



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Efecto de las vesículas de membrana externa de *Porphyromonas gingivalis*
sobre la función y metabolismo de células trofoblásticas**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Química Biológica

Brenda Ayelen Lara

Directora: Dra. Claudia Pérez Leirós

Directora adjunta: Dra. Vanesa Hauk

Consejera de estudios: Dra. Mirta Schattner

IQUIBICEN – UBA, CONICET – Laboratorio de Inmunofarmacología

Buenos Aires, Julio 2025

A Cali y Vane por abrirme las puertas al laboratorio hace 6 años y ser no solo las mejores directoras, sino también buenas personas. Gracias Cali por estar siempre pendiente de todo y tu manera de impulsar a los demás a animarse a más, por ayudarme siempre a encontrar la manera de que todo encaje perfectamente. A Vane, es difícil decir en pocas palabras lo agradecida que estoy, pero muchas gracias por enseñarme todo lo que aprendí durante estos años, que es un montón y de valor inmenso, por inspirarme a tener confianza en mí misma que es algo que a veces me cuesta, por aconsejarme y hacer que todo salga mejor de lo planeado.

A todos los que conforman el laboratorio de Inmunofarmacología, por hacerme sentir bienvenida desde el primer día, y por compartir conmigo todo lo que saben y aprender juntos. A Ani y Lari, QB51 queda tatuado en mi cora para siempre: las mañanas en el labo aprendiendo a diseñar primers, trabajando en el flujo nuevo que fue una emoción cuando llegó, las tardes de mil horas sacando fotos a los esféroides (y ahí, ahí ♪), los días largos que coincidíamos con muestras hasta tarde, los fines de semana en el lab jaja, en fin, las quiero un montón y gracias por estar siempre tanto para lo laboral como en lo personal. A Dani por siempre contagiar su alegría a los demás y así esparcir los dementores cuando estoy black, por todo lo que me enseñaste también. A Gui por todo lo que aprendí en los días largos de neutrófilos, por estar dispuesta a darme una mano siempre en todo y transmitir lo que sabe. A Fa, por siempre estar para ayudarme no importa la hora. A Dai, que siempre tan amablemente estuvo para ayudar y aconsejar con todo, sos un amor. A Sole por todo lo que me enseñó sobre dendris y las veces que nos quedamos hasta tarde ayudándome a repasar para congresos. A Esteban, por enseñarme a usar todos los programas de la compu y sus trucos, por ayudarme a salvar un western importante (nunca lo olvidaré), por los discords largos para resolver dudas. A Rochy por siempre ser una persona muy alegre que trae claridad y paz al laboratorio, junto con Cali logran que este laboratorio sea el mejor del mundo. A Maki por ser tan amable y siempre estar dispuesta a ayudar con todo. A Lour por ser mi leonina favorita y siempre traer su buen humor y alegría al laboratorio inspirando a todos. A Mati por todo lo que aprendimos juntos, haberme ayudado mil veces, y por bancarme. A Igna también por ser una persona alegre que contagia a los demás con su manera de ser. A Ailu, mi microbióloga fav, por ser una persona que va para adelante sin miedo inspirando a los que la rodean, y por todos esos días largos poniendo a punto ensayos que cuando salen bien, nos dan una alegría tremenda: aguante Pg. A las chicas que se fueron a seguir sus caminos por otros lados: Lauri, Liz y Lu, las tengo siempre presente y agradezco todo lo que aprendí de ustedes (falta Patroclo).

A las personas que trabajan en la cátedra de Odontología Preventiva y Comunitaria y la cátedra de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UBA. En especial a Lu Doga por su inmensa labor no solo atendiendo a las pacientes y obteniendo las muestras que son de gran valor,

sino también por todas las veces que nos juntamos a analizar los datos y nos apoyamos en los momentos de nervios, los buenos y los malos.

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

A la gente del Laboratorio de Patologías del Metabolismo y Envejecimiento del Institut Pasteur Montevideo.

A Agencia y CONICET por las becas que me otorgaron para poder realizar mi doctorado. A la UBA, en especial a la FCEyN por ser como mi segundo hogar además de mi casa de estudios. Al IQUIBICEN y el Departamento de Química Biológica y todos los que trabajan ahí, docentes y no docentes, hacen que el trabajo diario sea más lindo. Gracias especialmente a las personas de Bedelía no solo por la cantidad de veces que nos ayudaron facilitándonos reactivos o equipos sino por siempre estar predispuestos a ayudar a cualquier persona que lo precise, hacen que QB sea un lugar mejor. A Tania por prestarme su oído siempre y además ayudarme con los trámites y crisis administrativas tanto cuando nos licenciamos como ahora que nos doctoramos. A las chicas de QB11, Romi, Maru y Dani por permitirme usar su microscopio incontables veces. A los chicos de QB23: Cande, Cami, Ana, Agus y mi sagi favorita Ro, por todas las veces que nos ayudamos mutuamente, y por el apoyo experimental y emocional jaja, que es fundamental. A Nico y Charly, por la predisposición, paciencia y energía con la que siempre nos ayudaron para poder realizar este trabajo. A mis amigos de la facu, lxs men: Gabi, Fla, Meli, Romi, Dai, Cami, Lulitax, Nini y Gonza, que, aunque hoy en día ya no estemos en la misma facu o país o camino académico, siempre estuvieron presentes en este proceso, bancando en los momentos emocionantes como en aquellos no tan alegres.

A mis amigas de la vida, que además de estar en los momentos felices también me alentaron a continuar en los momentos de crisis y a seguir por lo que a uno le hace feliz. A Facu, por todo su apoyo incondicional y su amor.

A toda mi familia. A mis papás por haberme apoyado siempre. A mi hermana Bere y mi mamá por soportarme en los momentos de locura siendo el viejo del altillo leyendo papers, analizando cosas y armando presentaciones para que luego se las explique, acompañándome en los logros y momentos más felices de esta carrera, y en los no tan felices más. A mi papá, Ceci y mis hermanitos Martu y Sol por darme su cariño siempre y estar.

Efecto de las vesículas de membrana externa de *Porphyromonas gingivalis* sobre la función y metabolismo de células trofoblásticas

Durante la placentación, la invasión del estroma decidual y las arterias espiraladas por células trofoblásticas (Tb) es un paso crucial para permitir el flujo de oxígeno y nutrientes a través de la placenta. En este proceso, las células Tb se diferencian y adquieren un perfil con capacidad de migrar e invadir la decidua e interactuar con células endoteliales y células inmunes maternas, participando del remodelado vascular y del mantenimiento de la homeostasis en la interfase materno-fetal. Las poblaciones leucocitarias maternas son reclutadas desde el inicio de la gestación, y su perfil funcional es regulado en gran medida por factores solubles y de contacto de las células Tb. Todas estas funciones representan una alta demanda energética para las células Tb, por lo que perturbaciones en su metabolismo pueden impactar negativamente en el desarrollo placentario.

Las complicaciones gestacionales asociadas con defectos de la placentación y remodelación vascular, como la preeclampsia (PE) y la restricción del crecimiento fetal (RCF), se cuentan entre las condiciones que contribuyen en mayor medida a la morbilidad materna y neonatal. La gingivoperiodontitis es una enfermedad inflamatoria oral frecuente en mujeres gestantes. Las mujeres que cursan su embarazo con infección oral crónica activa, tienen riesgo dos a cuatro veces mayor de desarrollar complicaciones asociadas a hipertensión del embarazo y bajo peso del recién nacido. *Porphyromonas gingivalis* (Pg), uno de los principales patógenos orales que causa periodontitis, se detectó en fluido amniótico, placenta y placa subgingival en gestaciones con dichas complicaciones.

Pg produce y libera vesículas de membrana externa (OMV del inglés *outer membrane vesicles*) en las que exporta factores de virulencia y moléculas bioactivas que le permiten modular la respuesta inmune del huésped favoreciendo la patogenicidad y sobrevivencia bacteriana. Las hipótesis sobre efectos deletéreos de factores derivados de la gingivoperiodontitis sobre la placenta ponen el foco sobre la inflamación gingival como fuente distante de inflamación sistémica en la madre que afecta la placentación desde etapas tempranas; y/o proponen que la placenta podría ser el órgano blanco de patógenos periodontales. Estos accederían en forma directa o indirecta a través de productos bacterianos tales como OMV liberadas al medio o citoquinas, detectables en muestras de fluido gingival crevicular (FGC) o en la circulación.

Sobre esta base, el objetivo de la presente tesis es investigar los mecanismos moleculares y celulares por los cuales las OMV liberadas por *Porphyromonas gingivalis* modulan y reprograman metabólicamente a las células trofoblásticas en etapas tempranas de la gestación condicionando su función y su interacción con células endoteliales, neutrófilos, monocitos y células dendríticas.

Proponemos que estos mecanismos tienen un correlato *in vivo* por el cual las OMV de Pg afectan la placentación, a través de sus efectos sobre células inmunes y placentarias en modelos murinos y en mujeres gestantes.

Para abordar este objetivo general planteamos tres diseños: por un lado, utilizamos diseños *in vitro* de co-cultivo y comunicación celular con líneas celulares trofoblásticas y endoteliales humanas; también de éstas con neutrófilos, monocitos y células dendríticas obtenidos a partir de dadores sanos. Por otro lado, usamos un modelo murino de gestación para profundizar en los efectos *in vivo* de las OMV de Pg en la placentación. Por último, exploramos el efecto de muestras de fluido crevicular de mujeres gestantes obtenidas en la etapa final de la placentación, según la presencia o no de Pg.

En primer lugar, demostramos que las OMV de Pg son internalizadas por las células Tb sin afectar su viabilidad celular. Asimismo, las OMV causan una reprogramación metabólica de las células Tb evidenciado por una disminución en la incorporación de glucosa, una disminución en el uso de las vías glucolíticas y liberación de lactato, incluida la vía de las pentosas fosfato y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) totales. Por otro lado, las OMV promueven en las células Tb una actividad mitocondrial sostenida, donde la respiración basal y la capacidad de respiración máxima mitocondrial se vieron aumentadas, así como la producción de ROS mitocondriales. Por otro lado, también demostramos que las OMV disminuyen el flujo de la autofagia en las células Tb, proceso íntimamente relacionado con el metabolismo celular y su regulación. Los cambios metabólicos repercutieron en las funciones celulares propias de las células Tb: las OMV disminuyeron su capacidad de migración e invasión. Los efectos de las OMV también se evidenciaron *in vivo* en un modelo murino de gestación, con impacto sobre el metabolismo y funciones de la placenta, como también con disminución en el peso fetal y placentario.

En la segunda parte de este trabajo, evaluamos la interacción de las células Tb con células endoteliales e inmunes y el mantenimiento de la homeostasis en la interfase materno-fetal durante el remodelado vascular. En primer lugar, observamos que las OMV de Pg alteran la expresión de mediadores implicados en la angiogénesis. Junto con este resultado encontramos que los medios condicionados de las células Tb tratadas con OMV (MC OMV) disminuyeron la capacidad migratoria de las células endoteliales, aumentaron la producción de ROS y la activación endotelial medida como adhesión de monocitos. Por otro lado, vimos que el MC OMV indujo atracción de neutrófilos, activándolos con mayor producción de ROS. De igual manera, el MC OMV aumentó la atracción de monocitos. Por último, observamos que el MC OMV pierde la capacidad de inducir la diferenciación de monocitos de sangre periférica hacia células dendríticas tolerogénicas, como sí lo hace el medio condicionado de células Tb sin tratar (MC).

Finalmente, en la tercera parte del trabajo evaluamos el efecto del fluido gingival crevicular de pacientes gestantes de 16-20 semanas sobre funciones de las células Tb, teniendo en cuenta la presencia o no de Pg en el mismo. Encontramos que los fluidos positivos para Pg reducen la migración de las células Tb en mayor medida que los negativos para Pg. Los FGC positivos para Pg tendieron a un mayor aumento de ROS que los negativos para Pg. Más aún, el pretratamiento de células Tb con OMV redujo la producción de ROS inducida por el fluido gingival crevicular.

Concluimos que las OMV de Pg alteran el metabolismo de las células Tb afectando tanto su función como su capacidad para interactuar con células endoteliales e inmunes en un modelo de interfase materno-fetal humana. Estos efectos son consistentes con las alteraciones placentarias inducidas *in vivo* por OMV de Pg en un modelo murino y con los efectos *ex vivo* del fluido gingival crevicular de pacientes gestantes sobre células trofoblásticas.

Estos resultados sostienen la relevancia de las OMV de Pg en la alteración de la función y metabolismo de células trofoblásticas durante la placentación, y aportan al conocimiento de mecanismos etiopatogénicos que subyacen a la asociación de enfermedad gingivoperiodontal y complicaciones de la gestación.

Palabras clave: OMV de *Porphyromonas gingivalis* – metabolismo de células trofoblásticas – autofagia – comunicación celular en la interfase materno-fetal - células endoteliales - neutrófilos – monocitos – células dendríticas - gingivoperiodontitis del embarazo.

Effect of outer membrane vesicles from *Porphyromonas gingivalis* on trophoblast function and metabolism

During placentation, the invasion of the decidual stroma and spiral arteries by trophoblast cells (Tb) is a crucial step to ensure the proper flow of oxygen and nutrients through the placenta. In this process, Tb cells differentiate and acquire a phenotype that enables them to migrate and invade the decidua, interact with endothelial and maternal immune cells, and contribute to the remodeling of maternal vasculature while maintaining tissue and immune homeostasis at the maternal-fetal interface. Leukocyte populations are recruited from the onset of gestation, and their functional profile is largely regulated by soluble and contact-dependent factors produced by Tb cells. These functions entail a high energetic demand for Tb cells; thus, disturbances in their metabolism may adversely affect placental development.

Pregnancy complications associated with defects in placentation and vascular remodeling, such as preeclampsia (PE) and fetal growth restriction (FGR), are among the leading contributors to maternal and neonatal morbidity and mortality. Gingivoperiodontitis is a common inflammatory oral disease during pregnancy. Women with active chronic oral infections during gestation have a two- to fourfold increased risk of developing hypertensive disorders of pregnancy and low birthweight. *Porphyromonas gingivalis* (Pg), a major oral pathogen causing periodontitis, has been detected in amniotic fluid, placental tissue, and subgingival plaque in complicated pregnancies.

Pg produces and releases outer membrane vesicles (OMV), which carry virulence factors and bioactive molecules that modulate the host immune response, enhancing bacterial pathogenicity and survival. Hypotheses regarding the detrimental effects of periodontitis-derived factors on the placenta propose that gingival inflammation may act as a distant source of systemic maternal inflammation affecting early placentation; and/or that the placenta may be a target organ for periodontal pathogens reaching it directly or indirectly through bacterial products such as OMV or cytokines released into the local microenvironment, detectable in gingival crevicular fluid (GCF) or systemic circulation.

Based on this, the aim of the present thesis is to investigate the molecular and cellular mechanisms through which OMV released by *Porphyromonas gingivalis* metabolically reprogram trophoblast cells at early stages of gestation, affecting their function and their interactions with endothelial cells, neutrophils, monocytes, and dendritic cells. We propose that these mechanisms have an *in vivo* correlate, whereby Pg OMV contribute to the proinflammatory effects of components present in the gingival crevicular fluid.

To address this objective, we employed three complementary approaches: first, *in vitro* co-culture and cell communication models using human trophoblast and endothelial cell lines, as well as primary neutrophils, monocytes, and dendritic cells from healthy donors. Second, we used a murine pregnancy model to assess the *in vivo* effects of Pg OMV on placentation. Lastly, we explored the impact of Pg among components present in gingival crevicular fluid samples from pregnant women during the final phase of placental development.

We first demonstrated that Pg OMV were internalized by Tb cells without affecting cell viability. Upon internalization, OMV induced metabolic reprogramming in Tb cells, characterized by decreased glucose uptake, reduced glycolytic flux and lactate release, including suppression of the pentose phosphate pathway and total reactive oxygen species (ROS) production. Conversely, OMV promoted sustained mitochondrial activity in Tb cells, with increased basal and maximal mitochondrial respiration, and elevated mitochondrial ROS production. Additionally, OMV reduced autophagic flux in Tb cells, a process tightly linked to cellular metabolism and its regulation. These metabolic alterations impaired cellular functions, as OMV reduced the migratory and invasive capacity of Tb cells. These effects were confirmed in a murine early gestation model, where reduced glucose uptake and lactate release were observed in placental explants. Moreover, we found decreased fetal and placental weight at gestational day 14.5 following OMV treatment at day 6.5, before the completion of placental development.

In the second part of this work, we investigated the interactions between Tb cells and endothelial and immune cells to evaluate tissue homeostasis at the maternal-fetal interface during vascular remodeling. Pg OMV altered the expression of molecular mediators involved in angiogenesis. In line with this, conditioned media from OMV-treated Tb cells (OMV-CM) reduced endothelial cell migration, increased ROS production, and enhanced endothelial activation. OMV-CM also induced neutrophil recruitment and activation with increased ROS production. Similarly, OMV-CM attracted monocytes. In the final part of this section, we showed that OMV-CM lost the capacity to induce the differentiation of peripheral blood mononuclear cells into tolerogenic dendritic cells, as seen with conditioned media from untreated Tb cells.

Finally, in the last part of the thesis, we assessed the effect of the gingival crevicular fluid (GCF) from pregnant women at 16–20 weeks of gestation on Tb cell function. Pg-positive GCF samples reduced Tb cell migratory capacity compared to Pg-negative samples. On the other hand, GCF samples positive for Pg showed a tendency to increase ROS production compared to Pg-negative samples. Moreover, pretreatment of Tb cells with OMV prevented the effect of GCF-derived factors, as evidenced by a reduction in ROS production.

In conclusion, Pg OMV alter Tb cell metabolism, impairing their function and interactions with endothelial and immune cells at the maternal-fetal interface. These effects are consistent with placental alterations induced *in vivo* by Pg OMV as demonstrated using a murine model and with the effects observed *ex vivo* of the GCF from pregnant patients.

By providing supportive evidence that Porphyromonas gingivalis OMV alter placental cell metabolism and function, we aim to contribute original insights into the pathophysiological mechanisms of pregnancy complications associated with periodontal disease.

Key words: OMV from *Porphyromonas gingivalis* – trophoblast cell metabolism – autophagy - cell communication at the maternal-fetal interface – endothelial cells - neutrophils – monocytes – dendritic cells - gingivoperiodontitis of pregnancy.

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

1. **Lara, B.**, Loureiro, I., Gliosca, L., Castagnola, L., Merech, F., Gallino, L., Calo, G., Sassot, M., Ramhorst, R., Vota, D., Pérez Leirós, C., & Hauk, V. (2023). Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles shape trophoblast cell metabolism impairing functions associated to adverse pregnancy outcome. Journal of Cellular Physiology, 238(11), 2679–2691. <https://doi.org/10.1002/jcp.31138>
2. **Lara, B.**, Sassot, M., Calo, G., Paparini, D., Gliosca, L., Chaufan, G., Loureiro, I., Vota, D., Ramhorst, R., Pérez Leirós, C., & Hauk, V. (2023). Extracellular Vesicles of Porphyromonas gingivalis Disrupt Trophoblast Cell Interaction with Vascular and Immune Cells in an In Vitro Model of Early Placentation. Life, 13(10), 1971. <https://doi.org/10.3390/life13101971>

ABREVIATURAS

Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Acetil-CoA: Acetil coenzima A

AE: arterias espiraladas

AG: ácidos grasos

CD: célula dendrítica

CDi: células dendríticas inmaduras

CDm: células dendríticas maduras

CDTol: células dendríticas tolerogénicas

CEP: cono ectoplacentario

CTB: citotrofoblasto

CTBen: citotrofoblasto endotelial

CTBin: citotrofoblasto intersticial

CTG: célula trofoblástica gigante

DCFH-DA: dicloro fluoresceína di acetato

dM: macrófago decidual

dNK: célula *natural killer* decidual

EC: células endoteliales

EIV: espacio intervelloso

E.S.: error standard

ETC: cadena de transporte de electrones

FGC: fluído gingival crevicular

Fn: *Fusobacterium nucleatum*

G6PD: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GM-CSF: *granulocyte macrophage colony stimulating factor*

hCG: gonadotrofina coriónica humana

HK: hexoquinasa

IDH: isocitrato deshidrogenasa

IG: índice gingival

IP: índice de placa

LC-FAs: ácidos grasos de cadena larga

LPS: lipopolisacárido

LT: linfocito T

Ma: macrófago

MC OMV: medio condicionado de células trofoblásticas tratadas con OMV de Pg

MC: medio condicionado de células trofoblásticas

MCI: macizo celular interno

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos

MMP9: metaloproteinasa 9

Mo: monocito

mt Ψ : potencial de membrana mitocondrial

mtM: masa mitocondrial

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NETs: trampas extracelulares de los neutrófilos

NK: célula *natural killer*

OGDH: oxoglutarato deshidrogenasa

OMV: vesículas de membrana externa

OXPHOS: fosforilación oxidativa

PE: preeclampsia

pf: post-fertilización

Pg: *Porphyromonas gingivalis*

Pi: *Prevotella intermedia*

PLGF: *placental growth factor*

PMAD: patrones moleculares asociados a daño

PMAP: patrones moleculares asociados a patógenos

PKM2: piruvato quinasa 2

PP: parto pretérmino

PPP: vía de las pentosas fosfato

RCF: restricción del crecimiento fetal

ROS: especies reactivas de oxígeno

RRP: receptor de reconocimiento de patrones

SDH: succinato deshidrogenasa

SFB: suero fetal bovino

sFLT1: *soluble fms-like tyrosine kinase-1*

STB: sinciotrofoblasto

Tb: célula trofoblástica

TCA: ciclo del ácido tricarboxílico

Td: *Treponema denticola*

Tf: *Tannerella forsythia*

TIMP1: inhibidor de metaloproteinasa 1

TIMP2: inhibidor de metaloproteinasa 2

TLR: receptores tipo Toll

Treg: linfocito T regulatorio

uCD: célula dendrítica uterina

VE: vesículas extracelulares

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

VP: vellosidad primaria

VS y VT: vellosidad secundaria y vellosidad terciaria

ZP: zona pelúcida

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	17
Gingivoperiodontitis y embarazo.....	18
Enfermedad periodontal	18
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	20
Periodontitis y complicaciones gestacionales	21
Generación de la interfase materno fetal.....	25
Implantación	25
Placentación	28
Gestación en ratones.....	32
Control de la respuesta inflamatoria durante el embarazo	33
Interacción de las células trofoblásticas con los leucocitos maternos	34
Poblaciones inmunes en la interfase materno fetal	35
Metabolismo en la placenta	40
Función trofoblástica en etapas tempranas de la gestación: importancia del metabolismo	41
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
HIPÓTESIS.....	46
OBJETIVO GENERAL	46
OBJETIVOS ESPECIFICOS	46
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
1. CULTIVOS BACTERIANOS Y AISLAMIENTO DE OMV	48
1.1 Cultivo de Pg y obtención de OMV	48
1.2 Cuantificación de las OMV	48
1.3. Caracterización de las OMV	48
2. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES Y ENSAYOS FUNCIONALES.....	49
2.1 Mantenimiento de las líneas celulares trofoblásticas, endoteliales y monocíticas.....	49
2.2 Preservación de las líneas celulares	50
2.3 Incorporación de OMV por células trofoblásticas.....	50
2.4 Ensayo de viabilidad celular	51
2.5 Obtención de medios condicionados	51
2.6 Ensayo de migración celular (ensayo de cicatrización de heridas)	51
2.7 Ensayo de invasión celular	52
2.8 Detección de células apoptóticas y evaluación del ciclo celular	52
2.9 Ensayos con sondas fluorescentes y de metabolismo celular	52
2.10 Liberación de lactato	54
2.11 Ensayo de respiración mitocondrial (Mitostress)	54
2.12 Ensayos de autofagia.....	54

2.13 Ensayos con células endoteliales	55
2.14 Extracción de proteínas y western blotting	56
2.15 Actividad de enzimas antioxidantes.....	56
2.16 Obtención de ARNm, pasaje a ADNc y RTqPCR.....	56
2.17 Citometría de flujo	58
2.18 ELISA	59
3. ENSAYOS FUNCIONALES CON CÉLULAS INMUNES	59
3.1 Aislamiento de neutrófilos	59
3.2. Ensayos funcionales con neutrófilos	60
3.3 Obtención de PBMCs.....	60
3.4 Aislamiento de monocitos a partir de PBMCs.....	61
3.5 Diferenciación de monocitos a células dendríticas.....	61
4. ENSAYOS CON RATONES.....	61
4.1. Observación de OMV en sitios de implantación	62
4.2. Determinación del peso fetal y placentario, aislamiento placentario para histología y medición de expresión génica.....	62
4.3. Ensayo de incorporación de 2-NBDG y producción de lactato en placentas <i>ex vivo</i>	63
5. PACIENTES Y MUESTRAS ODONTOLÓGICAS.....	63
5.1. Características clínico-odontológicas de la población en estudio	63
5.2. Ensayos con células trofoblásticas y fluidos gingivales creviculares.....	66
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	66
RESULTADOS	67
CAPITULO 1:	68
Las OMV de <i>Porphyromonas gingivalis</i> modifican el metabolismo de las células trofoblásticas alterando la función placentaria	68
Aislamiento y caracterización de las OMV de Pg.....	68
Las células trofoblásticas incorporan OMV de forma tiempo y concentración-dependiente	69
Las OMV de Pg disminuyen la incorporación y el metabolismo de la glucosa en células Tb.....	71
Las OMV de Pg favorecen el metabolismo mitocondrial	75
Las OMV de Pg disminuyen el flujo autofágico en células trofoblásticas	83
El tratamiento <i>in vivo</i> con OMV de Pg induce complicaciones gestacionales.....	88
CAPITULO 2:	91
Las OMV de <i>Porphyromonas gingivalis</i> alteran la interacción de las células trofoblásticas con las células endoteliales e inmunes	91
Las OMV de Pg alteran la expresión de mediadores angiogénicos e inflamatorios en células trofoblásticas	91
Las células Tb pre-condicionadas por OMV de Pg alteran la migración y activación de las células endoteliales	92
Las células Tb al ser estimuladas con OMV de Pg atraen neutrófilos y los activan	94

Factores liberados por células Tb estimuladas con OMV de Pg atraen monocitos y alteran su perfil de activación.....	97
El medio condicionado de células Tb tratadas con OMV de Pg modifica el perfil de las células dendríticas necesario para el mantenimiento de la homeostasis inmune	99
CAPITULO 3:	103
Efecto del fluido gingival crevicular sobre células trofoblásticas	103
El fluido gingival de mujeres gestantes altera la función de las células trofoblásticas	103
Las OMV de Pg modifican los efectos de componentes del FGC sobre células trofoblásticas	104
DISCUSIÓN.....	106
REFERENCIAS	126

INTRODUCCIÓN

Gingivoperiodontitis y embarazo

Enfermedad periodontal

La gingivoperiodontitis se describe como un estado de disbiosis que compromete la integridad de los tejidos periodontales. En un estado de salud periodontal (**Fig. A**), la microbiota oral se encuentra adherida a la superficie radicular de los dientes constituyendo un *biofilm* compuesto inicialmente por bacterias grampositivas aerobias que interactúan física y metabólicamente entre sí. Desde el punto de vista nutricional, estas comunidades dependen del fluido gingival crevicular (FGC), un exudado similar al suero que se origina en los capilares gingivales y fluye hacia el bolsillo gingival desde los tejidos gingivales adyacentes, y en menor medida de los nutrientes salivales que provienen de la dieta ¹. En este estado, la microbiota se encuentra en simbiosis entre sí y en homeostasis con el sistema inmune del huésped, lo que favorece la supervivencia de bacterias comensales beneficiosas tanto para la microbiota como para la salud oral ².

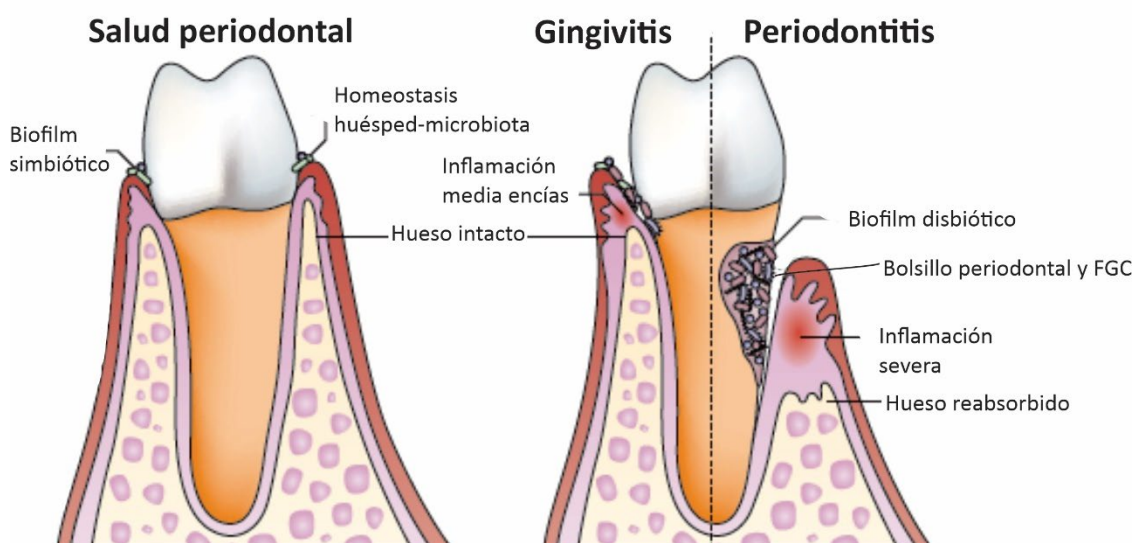


Figura A. Salud y enfermedad periodontal: gingivitis y periodontitis. Adaptado de Hajishengallis G. "Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation", *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(1):30–44.

La transición de la salud periodontal hacia la gingivoperiodontitis está asociada a un cambio de la comunidad microbiana simbiótica hacia una microbiota disbiótica. Esta microbiota está compuesta principalmente por bacterias gramnegativas anaerobias como *Actinomyces actinomycetemcomitans* (Aa), ***Porphyromonas gingivalis*** (Pg), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Prevotella intermedia* (Pi) y *Treponema denticola* (Td) que principalmente habitan en el bolsillo

gingival. Allí, están expuestas a distintos microambientes como el *biofilm* asociado a los dientes, el epitelio que recubre el bolsillo y el FGC, rico en mediadores inmunes producidos localmente. Estas bacterias expresan factores de virulencia que les permiten adaptarse y prosperar en ambientes inflamatorios, promoviendo así la colonización, co-agregación y la formación de una placa bacteriana. La hipótesis de ‘patógenos clave’ permite explicar cómo se produce la transición de una microbiota simbiótica a una disbiótica³. Un patógeno clave es aquel que, incluso en baja abundancia, es capaz de modificar la composición de la microbiota por el condicionamiento del sistema inmune haciendo que éste sea incapaz de frenar el crecimiento bacteriano y la patogenicidad que representa. Como resultado, se genera finalmente una microbiota disbiótica acompañada de un aumento en la carga bacteriana total. Los patógenos clave no son capaces de inducir la enfermedad por sí mismos, sino que requieren de la presencia de bacterias comensales que actúan como patógenos accesorios, facilitando su colonización y contribuyendo al desarrollo del desequilibrio bacteriano.

Pg, uno de los principales patógenos clave involucrados en la progresión de la enfermedad periodontal, secreta diversos factores de virulencia como el lipopolisacárido (LPS) y proteasas extracelulares llamadas gingipaínas que destruyen los tejidos que rodean a los dientes dejando nutrientes disponibles que luego son usados por otras bacterias, promoviendo el crecimiento del biofilm oral y la inflamación⁴. Por otro lado, Pg libera **vesículas de membrana externa (OMV** por las siglas en inglés *outer membrane vesicles*) que, junto con otros factores de virulencia, modulan la función del sistema inmune e interfieren en la eliminación de bacterias patógenas, promoviendo así la disbiosis e inflamación de los tejidos orales⁵⁻⁷. De esta manera, la disbiosis y la inflamación crean un ciclo de retroalimentación crónico y positivo que promueve el progreso de la enfermedad gingivoperiodontal. El proceso comienza como una inflamación moderada y reversible de las encías llamada **gingivitis**. Sin embargo, si esta condición persiste en el tiempo y se exacerba conduce a la **periodontitis**, una forma más severa e irreversible de la enfermedad que afecta a cerca del 45% de los adultos mayores de 30 años⁸.

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica que compromete no solo la integridad de las encías, sino también los tejidos que soportan la dentición como el ligamento periodontal y el hueso alveolar, conocidos colectivamente como periodonto, siendo la principal causa de pérdida de dentición en adultos. La inflamación del periodonto a su vez puede desencadenar una inflamación crónica sistémica, que está íntimamente asociada con diversas enfermedades sistémicas

^{3,9}.

Porphyromonas gingivalis

Como se mencionó previamente, Pg es considerada uno de los principales patógenos involucrados en la progresión de la enfermedad periodontal debido a su capacidad para producir numerosos factores de virulencia como el LPS, las gingipaínas y las fimbrias ¹⁰. Estos factores de virulencia pueden ser liberados luego de la lisis de la bacteria o en vesículas de membrana externa (OMV), que actúan como vehículos eficaces para el transporte de dichos factores y efectores moleculares, desempeñando un papel central tanto en la interacción con otras bacterias como con las células del huésped modulando la respuesta inmunológica ^{11,12}.

Específicamente, las OMV son nanoestructuras esféricas con doble bicapa de entre 50 y 250 nm de diámetro que brotan naturalmente de la membrana externa de las bacterias gramnegativas en fase de crecimiento y división celular ^{13,14}. La biogénesis de las OMV (**Fig. B**) es un proceso dinámico donde la cantidad liberada y su composición depende de varios factores: el efecto de los antibióticos, los niveles de pH ambiental, la temperatura, la concentración de nutrientes disponibles, el estrés oxidativo, la interacción con otras bacterias y células del huésped ^{15,16}. Además, la fase de crecimiento de la bacteria también influye en la producción de OMV: un estudio realizado por Mao y colaboradores ¹⁷ encontró que la cantidad de OMV producidas por Pg aumenta a medida que aumenta el tiempo de incubación, alcanzando su máximo durante la fase de crecimiento estacionario, tanto en cantidad como en concentración de proteínas. En otro reporte, se informó que la proporción de OMV de Pg respecto a las bacterias en los cultivos en la fase estacionaria fue de aproximadamente 2000:1 ¹⁸.

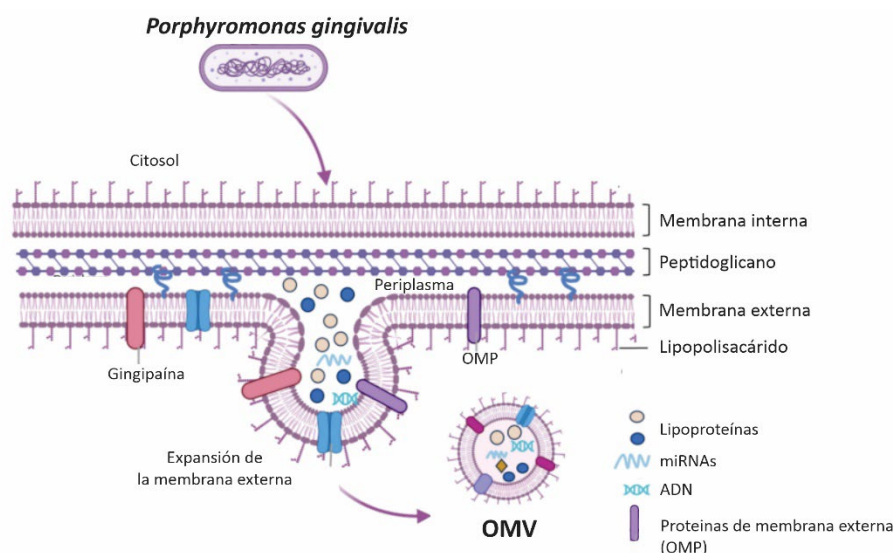


Figura B. Biogénesis de las OMV de Pg. Imagen tomada y adaptada de Wu Z, "Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis*: recent advances in pathogenicity and associated mechanisms ". *Front. Microbiol.* 16:1555868 (2025) ¹².

Los efectos patogénicos de las OMV de Pg dependen en gran medida del contenido proteico y de ácidos nucleicos ^{19,20}. Estas vesículas contienen proteínas procedentes del periplasma y de la membrana externa, que son fundamentales para su formación, estabilidad e integridad, así como para su funcionalidad. Al igual que la bacteria que le da origen, el contenido que transportan las OMV varía según las condiciones ambientales, lo que permite a la bacteria adaptarse a entornos cambiantes durante su crecimiento. La acumulación de factores de virulencia en la superficie de las OMV de Pg como fimbrias y LPS, constituye una ventaja estratégica para evadir la degradación mediante proteínas hidrolíticas, facilitando la adhesión e invasión de las células que infectan y permitiendo la diseminación hacia el torrente sanguíneo ^{7,21–24}. Por otro lado, también se ha reportado la presencia de ARN pequeños (sRNA) que actúan como miRNAs y ADN en el interior de las OMV de Pg, los cuales contribuyen a la modulación de la función inmune de las células que las internalizan ²⁵. Debido a su pequeño tamaño y estructura protectora, las OMV pueden diseminarse más allá de la célula que las produce, facilitando la colonización y propagación de Pg. Además, son capaces de ingresar al torrente sanguíneo, atravesar barreras biológicas y transportar componentes virulentos hacia tejidos distantes ^{26–28}. Existen numerosas evidencias que indican que las OMV de Pg son internalizadas por células eucariotas causando variadas respuestas funcionales, metabólicas e inmunes en las mismas ^{29–31}.

Diversos estudios han vinculado las OMV de Pg con el desarrollo de enfermedades sistémicas como la diabetes, enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer ^{28,32–35}. En distintos modelos experimentales se ha observado que estas vesículas pueden alterar la integridad de las monocapas epiteliales al desorganizar las uniones estrechas, provocar disfunción del endotelio, inducir la migración de neutrófilos y macrófagos, y desencadenar una respuesta inflamatoria intensa caracterizada por la liberación de citoquinas proinflamatorias ^{33,36}.

Periodontitis y complicaciones gestacionales

Complicaciones gestacionales como el parto pretérmino (PP), la restricción del crecimiento fetal (RCF) y la preeclampsia (PE) tienen un impacto significativo en la salud pública, ya que contribuyen de manera sustancial a la mortalidad y morbilidad materna y neonatal, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo ³⁷. La PE, en particular, es un trastorno hipertensivo del embarazo caracterizado por la aparición de hipertensión arterial y proteinuria, generalmente después de la semana 20 de gestación. Esta condición puede progresar a eclampsia y desencadenar complicaciones graves para la madre y el feto. Su prevalencia global se estima entre el 2% y el 8% de todos los embarazos ³⁸, siendo la principal causa directa de mortalidad materna en Argentina y la segunda a nivel mundial ³⁹. Inicialmente se atribuyó su etiología a una invasión

trofoblástica inadecuada que genera una perfusión placentaria deficiente, especialmente en las formas tempranas asociadas a RCF ⁴⁰. Sin embargo, hoy se reconoce que la PE es una enfermedad heterogénea cuya expresión clínica resulta de una combinación de factores placentarios e inmunológicos. En este contexto, la enfermedad periodontal ha emergido como un factor de riesgo relevante. Su prevalencia en mujeres embarazadas es variable, oscilando entre el 11% y el 100%, dependiendo de las definiciones diagnósticas utilizadas a la hora de la evaluación odontológica realizada ^{41,42}, y se estima que alrededor del 11% de las embarazadas desarrollan periodontitis ⁴³. Cada vez más investigaciones han identificado una asociación entre la periodontitis, en particular aquella en que está implicada Pg, y diversas complicaciones gestacionales, incluyendo PE, PP, RCF y diabetes gestacional, lo que refuerza la importancia de considerar la salud periodontal dentro de la evaluación integral del riesgo obstétrico ^{37,43,44}.

En cuanto a las hipótesis que vinculan los efectos deletéreos de factores derivados de la gingivoperiodontitis sobre la placenta, se han propuesto principalmente dos mecanismos que no se excluyen mutuamente (**Fig. C**). Por un lado, se postula un mecanismo indirecto, en el que la inflamación gingival podría representar una fuente distante de inflamación sistémica en la madre que afecta la placentación desde etapas tempranas. Este proceso estaría mediado por la liberación sistémica de mediadores proinflamatorios, como la IL-6 y la proteína C reactiva entre otros, desde los tejidos periodontales inflamados. Estos mediadores pueden alterar la respuesta inmune materna o interferir con procesos críticos en la formación y función placentaria, impactando negativamente el desarrollo fetal ⁴⁵. Por otro lado, se postula que la placenta podría constituir un órgano blanco para los patógenos periodontales que podrían acceder de manera directa, o indirectamente a través del transporte de productos bacterianos como las OMV liberadas al medio desde donde proliferan. De hecho, diversos estudios han detectado componentes bacterianos tanto en la circulación materna como en muestras de fluido crevicular durante el embarazo ^{35,46,47}. Además, los cambios hormonales propios del embarazo, caracterizados por un aumento en los niveles de estrógenos y progesterona, inducen una mayor permeabilidad vascular en los tejidos gingivales. Esta condición podría facilitar la entrada de bacterias o sus productos a la circulación sistémica con mayor facilidad que en condiciones normales, especialmente durante las etapas tempranas de la gestación, cuando la formación de la placenta es particularmente vulnerable.

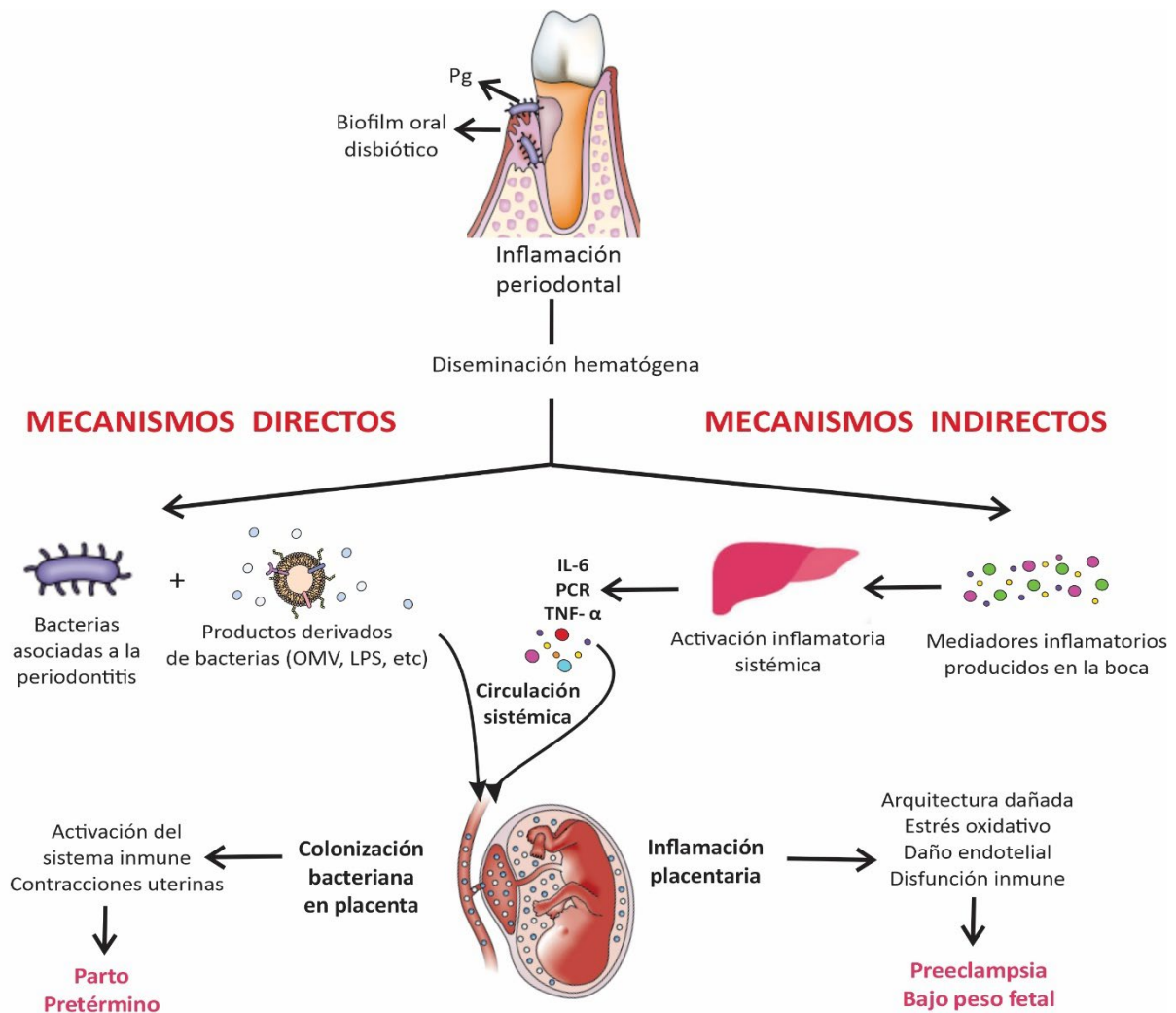


Figura C. Mecanismos propuestos que vinculan la gingivoperiodontitis con complicaciones gestacionales. La diseminación sanguínea de bacterias periodontopáticas y/o sus productos derivados, y de moléculas proinflamatorias producidas en la boca, están involucrados en los mecanismos directos e indirectos, respectivamente, que intentan explicar los efectos deletéreos de los factores de la gingivoperiodontitis sobre la placenta. PCR: proteína C reactiva.

Como se adelantó previamente, la composición diferencial del microbioma subgingival materno y los componentes gingivales liberados a la sangre se proponen como factores condicionantes del PP, el bajo peso al nacer y la PE^{46,48-51}. En este sentido, se ha reportado que el tratamiento de la periodontitis (que consiste en alisado y raspado radicular) durante el segundo trimestre de embarazo no logró reducir el riesgo de PP o RCF. Este resultado apoya la idea que, dado que la periodontitis es una enfermedad crónica, los patógenos orales pueden diseminarse al útero mucho antes del tratamiento periodontal y del embarazo. En relación con esto, un análisis comparativo por metagenómica del microbioma de la placenta humana y el de distintos órganos y

tejidos determinó que la placenta humana en condiciones fisiológicas presentaba un microbioma compuesto por microbiota comensal no patógena similar al microbioma oral, lo que sugiere una posible colonización vía hematógena de la microbiota oral al útero gestante ⁵⁰. En línea con esto, otros trabajos han sugerido que bacterias periodontopatógenas podrían llegar a la placenta tras ser fagocitadas por monocitos que las transportan en el torrente sanguíneo ⁵². Por otro lado, en cuanto a la presencia de factores derivados de las bacterias asociadas a la inflamación gingivoperiodontal, en un trabajo reciente reportaron la presencia de OMV provenientes de bacterias en placenta, sugiriendo que éstas efectivamente alcanzan la placenta por vía hematógena o paracrina intracelular ⁵³.

Dado que Pg es una de las principales bacterias implicadas en periodontitis y complicaciones gestacionales, y apoyando estas evidencias, estudios de caso-control en mujeres con PP detectaron Pg en fluido amniótico y en placa subgingival sugiriendo la transmisión sanguínea a la cavidad uterina ⁵⁴. Asimismo, otros estudios demostraron que la cantidad de bacterias totales fue mayor en placentas provenientes de pacientes que desarrollaron PE respecto a placentas de embarazos sanos, y que entre los patógenos presentes se encontraban patógenos causantes de periodontitis como Pg, *Tannerella forsythia* (Tf) y Td ⁵⁵. De igual modo, otros reportes demostraron que Pg puede alcanzar la placenta ⁵⁶, estimulando la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β causando inflamación en la interfase materno fetal ⁵⁷.

Por otro lado, en modelos de rata y ratón, se determinó que la infección periodontal con Fn indujo parto pretérmino, y con Pg previo a la gestación resultó en nacidos con bajo peso ^{58,59} alteraciones vasculares, metabólicas y de la placentación ^{60,61}.

En otro modelo murino, se vio que vesículas extracelulares (VE) provenientes de macrófagos previamente infectados con Pg, estaban implicadas en alteraciones del desarrollo placentario y fetos con menor peso comparado con los ratones que fueron inyectados con VEs control, apoyando la idea de que factores derivados de bacterias son capaces de alcanzar la placenta, alterar la función de células en la interfase y causar complicaciones gestacionales ⁶².

Estudios sobre la composición y efectos *in vitro* de muestras de fluido crevicular tomadas durante el embarazo dan cuenta de la utilidad de esta muestra de fácil acceso y limitada invasividad para la comprensión de mecanismos patogénicos y el diagnóstico de complicaciones gestacionales. Su análisis permite detectar biomarcadores como citoquinas, enzimas, VEs y otros factores que reflejan el estado inmunológico e inflamatorio durante la gestación ^{63–66}. En este sentido, estudios realizados en el laboratorio demostraron que factores presentes en el FGC de mujeres embarazadas alteraron la función *in vitro* de las células trofoblásticas, que son la unidad funcional de la placenta, y además

perturbaron la interacción de las mismas con neutrófilos. Por otro lado, estudios recientes reportaron la presencia de OMV bacterianas en muestras de FGC y se vio que en fluidos gingivales provenientes de pacientes con periodontitis y diabetes gestacional había un incremento de esas estructuras, en particular de OMV derivadas de bacterias como Pg y Fn ⁶⁶. Esto refuerza la idea de que los factores derivados de bacterias, en especial las OMV, pueden participar en la alteración de la función placentaria y en el desencadenamiento de complicaciones gestacionales, evidenciando la relevancia de la salud periodontal en el embarazo.

Generación de la interfase materno fetal

Para profundizar en los mecanismos por los cuales la gingivoperiodontitis, como condición inflamatoria crónica, se asocia con diversas complicaciones gestacionales, resulta importante comprender los procesos fisiológicos que dan lugar a una gestación exitosa para luego identificar los puntos vulnerables que podrían verse alterados ante un contexto inflamatorio local o sistémico.

El establecimiento exitoso del embarazo depende de múltiples factores como la fertilización del ovocito, el desarrollo del blastocisto y su implantación en la cavidad uterina. Inmediatamente luego de la implantación comienza a desarrollarse la placenta, un órgano transitorio que tiene como función nutrir y proteger al embrión mientras se desarrolla. Una adecuada placentación depende de la interacción sincronizada entre la decidua materna, el blastocisto que se implanta, las células que derivan del blastocisto llamadas trofoblásticas que van a formar la placenta, células vasculares y células inmunes maternas presentes en la interfase materno-fetal. Fallas en la placentación, así como también alteraciones en el microambiente inmunológico durante la gestación temprana pueden conducir a complicaciones severas tanto para la madre como para el feto.

Implantación

El endometrio es un tejido dinámico que presenta en forma cíclica cambios fenotípicos y funcionales que lo preparan para la implantación del blastocisto. En humanos, como resultado de una compleja interacción entre hipotálamo, hipófisis, ovario y útero, se da un ciclo menstrual de aproximadamente 28 días, donde el día 1 corresponde a la menstruación y el día 14 a la ovulación (**Fig. D**). Este ciclo puede ser dividido en dos fases: los primeros 14 días a partir de la menstruación constituyen la fase proliferativa (fase folicular), que está bajo la influencia del aumento de los niveles de estrógeno, lo que conduce a la proliferación de las células epiteliales, estromales y el endotelio vascular para regenerar el endometrio, y que culmina en el día 14 con la ovulación, dada por un pico

de las hormonas folículo estimulante y luteinizante. En este punto del ciclo, comienza la fase secretoria (fase luteal), que está caracterizada por la formación del cuerpo lúteo a partir del folículo roto, y la consecuente liberación de progesterona, lo que como veremos a continuación conduce a importantes cambios en la morfología y función endometrial indispensables para preparar el endometrio para una posible implantación del blastocisto ^{67,68}.

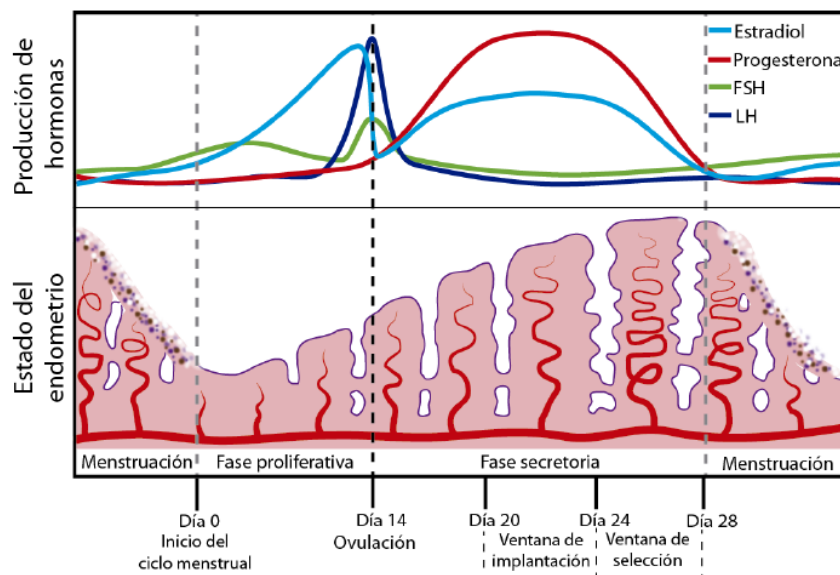


Figura D. Ciclo menstrual en humanos. Imagen adaptada de Gordon Betts et al. 2013 ⁶⁹.

La fertilización del ovocito por un espermatozoide ocurre en las trompas de Falopio entre 24 y 48 horas luego de la ovulación. Durante el periodo pre-implantatorio, el óvulo fertilizado (cigoto) comienza a sufrir sucesivas divisiones mitóticas, generando células cada vez más pequeñas llamadas blastómeros que se compactan formando la mórula. Alrededor del segundo o tercer día post fertilización (pf) comienza la transición de la mórula al estadio de blastocisto mediante cavitación, en donde la entrada de agua y sales entre los blastómeros forma una cavidad interna llena de líquido denominado blastocelo y dos poblaciones celulares: el macizo celular interno (MCI), que dará origen al embrión propiamente dicho, y al trofoectodermo, formado por una capa superficial de células epiteliales continua e impermeable que rodea y recubre al MCI, la cual dará origen a las estructuras extraembrionarias como la placenta y membranas amnióticas. En este punto, el blastocisto ingresa en la cavidad uterina aún rodeado por la zona pelúcida (ZP), una matriz extracelular rica en glicoproteínas que funciona como barrera protectora que se forma durante la oogénesis ⁷⁰⁻⁷².

La maduración del blastocisto se sincroniza con la diferenciación del endometrio uterino bajo el control de las hormonas esteroideas ováricas para alcanzar un nivel adecuado de madurez. El período temporal en el que el endometrio muestra la mayor receptividad para la implantación

embrionaria se define como la ventana de implantación, que ocurre en la fase secretora media del ciclo menstrual, alrededor del sexto y décimo día post ovulación. La receptividad endometrial involucra el desenmascaramiento de ligandos de adhesión que se encuentran inhibidos durante el resto del ciclo menstrual por la presencia de mucinas que protegen contra la adhesión celular e infecciones, así como también por la formación de microprotusiones en la superficie del epitelio llamadas pinopodos, que va a ser la zona del epitelio luminal del útero donde haga contacto el blastocisto inicialmente ⁷³⁻⁷⁵. Por fuera de la ventana implantatoria, el endometrio permanecerá refractario a la presencia de un blastocisto ⁷⁶. A partir del décimo día post ovulación, el endometrio sufre un proceso llamado decidualización. En humanos, este evento es independiente de la presencia de un blastocisto en la cavidad uterina, pero sí dependiente de señales maternas, que comienza en la fase secretora tardía del ciclo menstrual con la secreción de progesterona, y que continúa durante todo el embarazo, con una drástica remodelación tisular caracterizada por la diferenciación de las células estromales del endometrio, la generación de nuevos vasos sanguíneos y glándulas con mayor actividad secretora y un enriquecimiento de células inmunes maternas tanto uterinas como reclutadas ⁷⁷⁻⁸⁰.

Para que la implantación ocurra se necesita un 'diálogo' bidireccional y coordinado entre el endometrio receptivo y un blastocisto competente para implantarse. El blastocisto se encuentra capacitado para implantarse cuando eclosiona de la ZP en un proceso denominado *hatching*, aproximadamente en el sexto día post fertilización. Este evento, que depende tanto de factores físicos como la expansión de la cavidad del blastocisto, así como también de la producción de proteasas por las células del trofoectodermo que rompen la ZP, es crucial para que se dé la implantación, ya que los blastocistos que no logran romper la ZP tienen baja capacidad implantatoria y son absorbidos por el endometrio ⁸¹.

La implantación ocurre entre el séptimo y noveno día post fertilización ⁶⁷ y consta de tres etapas bien distinguidas entre sí (**Fig. E**). En este proceso, el blastocisto penetra el epitelio e invade el endometrio, dando lugar a un contacto estrecho entre los tejidos maternos y embrionarios que va a resultar en la formación de la placenta. Al entrar en contacto con el epitelio uterino, las **células trofoblásticas** (Tb) que conforman al trofoectodermo comienzan a diferenciarse, y con ello a adquirir características particulares. Por un lado, las células cercanas al embrioblasto o MCI retienen su carácter epitelial y generan una capa de células mononucleadas llamado citotrofoblasto (CTB). Estas células proliferan continuamente, se diferencian y se fusionan generando una capa más externa formada por células multinucleadas no proliferativas llamada sinciotrofoblasto (STB). Esta capa de células posee capacidad invasiva y ayuda a penetrar el tejido materno al comienzo de la implantación,

en parte por la producción de proteasas unidas a la membrana del trofoblasto o secretadas al espacio extracelular que van degradando la matriz extracelular del epitelio uterino ^{77,82,83}.

Las etapas de la implantación son:

- **Aposición:** las células endometriales producen citoquinas y quimioquinas que guían la unión inicial del blastocisto y el epitelio uterino a través de la expresión de moléculas de adhesión débiles en el trofoectodermo, en un proceso similar al *rolling* de los leucocitos sobre el endotelio vascular ^{84,85}
- **Adhesión estable:** luego del contacto inicial, el trofoectodermo libera factores solubles que modulan la capacidad adhesiva de las células epiteliales estromales ^{86,87}. La unión es estable debido a la expresión de moléculas de adhesión más fuertes como integrinas.
- **Invasión:** la capa de STB penetra el epitelio uterino, permitiendo la inserción del embrión en el estroma uterino. Es un proceso autolimitado y controlado tanto por la decidua como por las células Tb.

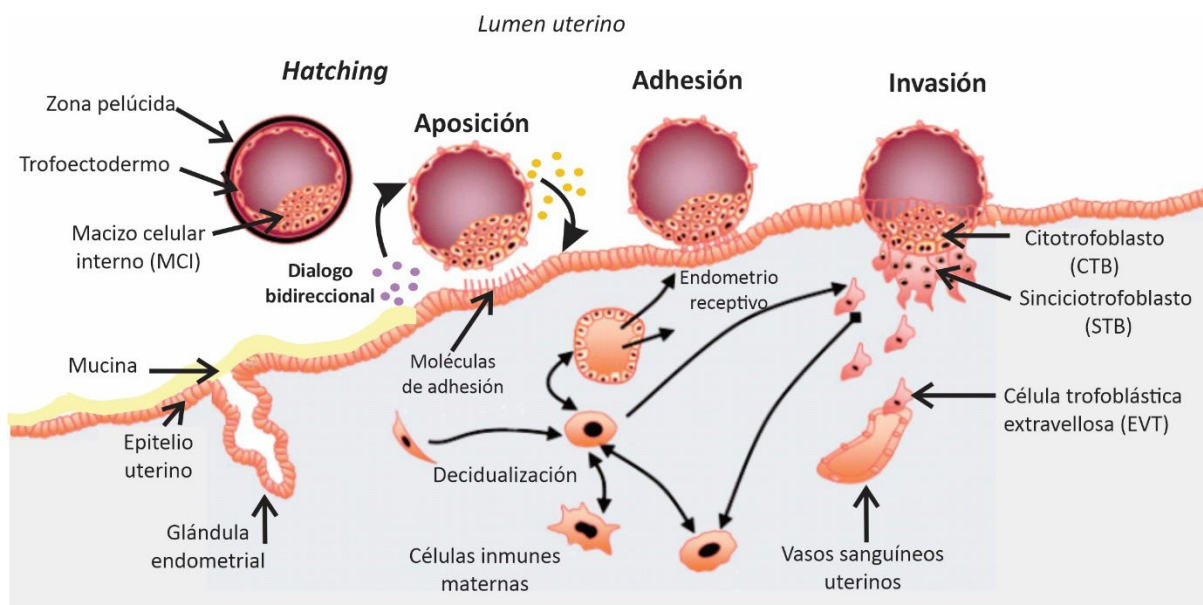


Figura E. Las etapas de la implantación embrionaria. Imagen tomada y adaptada de Salamonsen, "The importance of endometrial receptivity". *Reproduction, Fertility and Development*. 2009;21(7):923–934 ⁷⁸.

Placentación

La placenta es la principal interfase materno-fetal, compuesta por dos partes: el trofoblasto de origen embrionario y la decidua de origen materno. Tiene funciones fundamentales, ya que de ella depende el desarrollo fetal intrauterino. Por un lado, se encarga de proporcionar nutrientes, oxígeno

y de eliminar los desechos metabólicos generados a medida que avanza la gestación, así como de producir hormonas como la progesterona y la gonadotrofina coriónica humana (hCG) que tienen efectos sobre el desarrollo fetal y de la placenta misma^{88,89}. Por otro lado, la placenta ejerce funciones inmunológicas; expresa receptores de reconocimiento de patrones (RRP) que le permiten reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP) y actuar como una barrera de protección contra agentes patógenos, además de la capacidad para modular los perfiles funcionales de leucocitos presentes en la decidua contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis inmune^{90,91}.

Durante el desarrollo placentario, las vellosidades trofoblásticas conforman la unidad funcional de la placenta^{92,93}. Las vellosidades comienzan a formarse desde la segunda semana de gestación y dicho proceso continúa hasta el final del embarazo⁹⁴ (**Fig. F**).

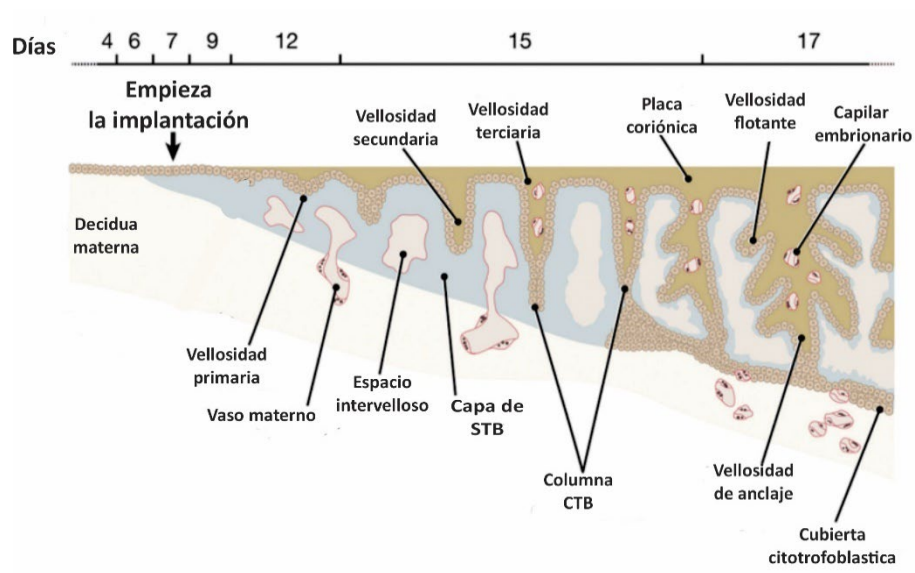


Figura F. Desarrollo de las vellosidades trofoblásticas luego de la implantación. Modificado de Carlson BM. *Human embryology and developmental biology, 5th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2014*⁹⁵.

Los días posteriores a la implantación están caracterizados por una intensa reorganización del STB que rodea al embrión e invade la decidua materna. Aproximadamente entre el día 9 y 10 pf la capa de STB invasiva comienza a formar espacios lacunares alrededor de los vasos y glándulas uterinas que posteriormente se fusionan y erosionan formando los espacios intervillosos (EIV). Los EIV son lagunas bañadas por sangre materna donde más adelante se embeberán las vellosidades maduras para realizar el intercambio de nutrientes, gases y desechos entre la sangre materna y la circulación fetal a través de la capa de STB⁹⁶. En simultáneo, comienza el desarrollo y morfogénesis de las vellosidades placentarias. Columnas de CTB se abren paso en la masa sincicial del STB y se expanden lateralmente sobre la decidua basal formando la cubierta citotrofoblástica, que será el punto de unión

y anclaje de la placenta a la decidua basal, cuya función es proteger al embrión del estrés oxidativo^{97,98} e impedir la invasión Tb más allá de los límites del miometrio. Sobre esta cubierta se unen las vellosidades de anclaje que constituyen vellosidades primarias (VP) y están formadas por un núcleo de CTB rodeado de STB. A partir de la zona de anclaje las VP se van a ramificar y madurar adquiriendo un núcleo mesodérmico de origen embrionario formando las vellosidades secundarias (VS). Alrededor del día 17 pf las VS se convierten en vellosidades terciarias (VT) que contienen además capilares placentarios inmaduros. A lo largo de todo el embarazo, los capilares aumentan de tamaño y se enrollan, empujando la capa de STB que conforma la parte terminal de la VT, disminuyendo así la distancia de intercambio de sustancias en los EIV entre la circulación fetal y la sangre materna y constituyendo así lo que conocemos como vellosidades flotantes maduras^{99,100}.

Las vellosidades de anclaje están conectadas a la decidua basal por una columna de CTB que prolifera formando células trofoblásticas extravellosas (EVT)^{101,102}. Aproximadamente 2 semanas pf, se pueden identificar dos poblaciones de EVT: las EVT intersticiales (EVTin) que invaden el estroma decidual, y las EVT endovasculares (EVTen) que colonizan las arterias espiraladas maternas (AE)^{103,104}. Las EVTin son las que primero migran a la decidua materna e interaccionan con células estromales, leucocitos maternos, células musculares y epiteliales de los vasos sanguíneos (**Fig. G**).

Estas interacciones son importantes tanto para la generación de la tolerancia inmunológica hacia el feto, así como para la regulación de la función de las EVT durante el remodelamiento de las AE^{105,106}, ya que se reclutan junto con macrófagos y células *natural killer* uterinas a las AE induciendo la apoptosis de su capa muscular para iniciar el remodelado¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Las EVTen con fenotipo más invasivo migran a la luz de los vasos disociando la capa endotelial de los mismos e induciendo su apoptosis, para luego reemplazar por completo las células endoteliales maternas dentro de los vasos¹⁰⁸. Estas modificaciones producen un cambio en las AE que inicialmente eran vasos estrechos con alta resistencia en conductos dilatados y de baja resistencia. La remodelación vascular de las AE culmina alrededor de la semana 18 de gestación, y si este proceso no se lleva a cabo correctamente puede conducir a patologías del embarazo, especialmente en el contexto de hipertensión materna¹¹⁰.

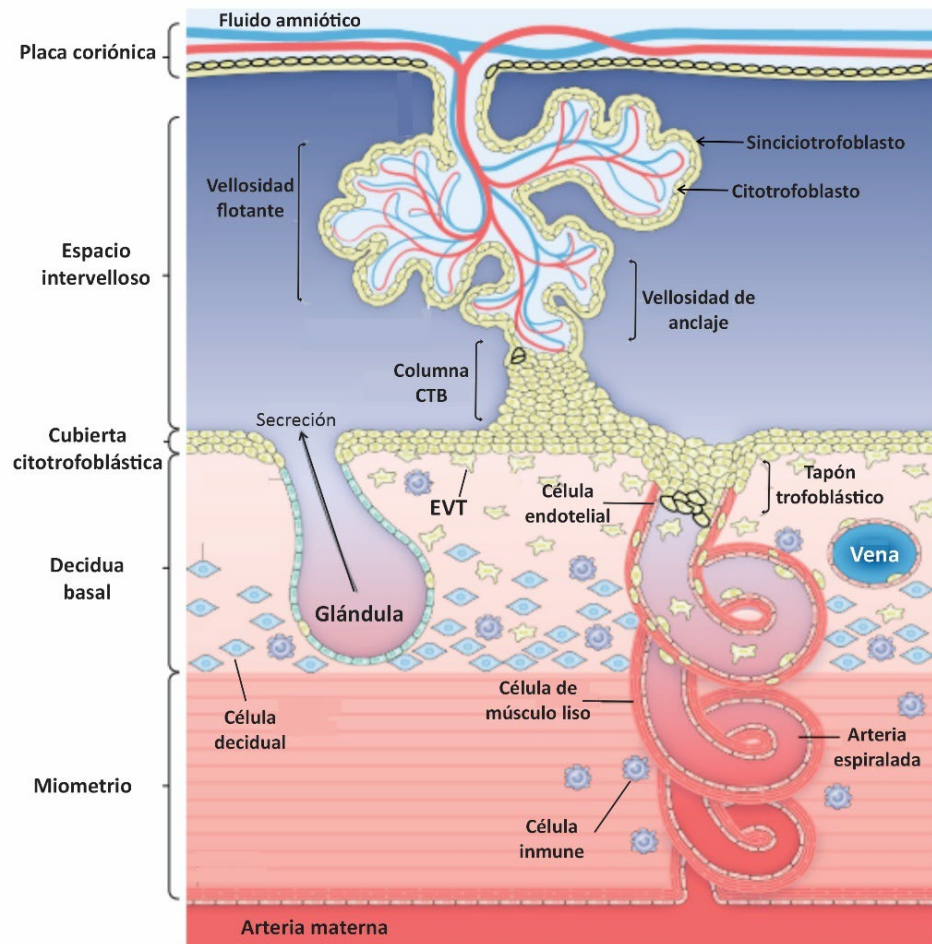


Figura G. Las vellosidades placentarias en el primer trimestre de gestación. Modificado de Aplin JD, "Tracking placental development in health and disease". *Nature Reviews Endocrinology*. 2020;16(9) ¹¹⁰.

Además de remodelar las AE, las EVTen también forman tapones de células Tb durante las primeras semanas del embarazo que ocluyen las AE en la decidua basal donde se implantó el embrión. La función de los tapones Tb es impedir el flujo sanguíneo hasta la semana 6-7 de gestación ¹¹¹ y al generarse un ambiente hipóxico, promover el desarrollo placentario, la vasculogénesis y angiogénesis. De hecho, un aumento prematuro de los niveles de oxígeno podría inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), causando daño oxidativo en la interfase materno-placentaria ¹¹². Durante las primeras semanas de gestación y antes de que se disuelvan los tapones Tb, la nutrición del embrión es histotrófica y depende de las secreciones glandulares del endometrio inducidas por la secreción de factores trofoblásticos que las estimulan ^{113,114}. Hacia el final del primer trimestre los tapones Tb se disuelven marcando el final de la nutrición histotrófica, estableciéndose la placentación hemocorial, donde las vellosidades maduras están en contacto directo con la sangre materna que ingresa al EIV

^{110,115}.

Gestación en ratones

Los ratones al igual que los humanos presentan una placentación hemocorial ¹¹⁶, si bien existen diferencias en los tiempos de gestación y la estructura placentaria (**Fig. H**). Anatómicamente el útero de los ratones tiene dos cuernos que están conectados a la vagina mediante el cérvix. En los extremos, se encuentran los ovarios con los respectivos oviductos. 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.

En los ratones, el día de apareo puede determinarse a partir de la observación del tapón vaginal que es una sustancia viscosa liberada por el macho y la hembra ¹¹⁷ considerando su aparición como el día 0,5 de fertilización. A diferencia de los humanos, la decidualización en ratones depende de la fertilización y la unión del blastocisto al útero ¹⁰³. Los blastocistos entran en el cuerno uterino y alrededor del día 4,5-5 post fertilización (pf) pierden la ZP y avanzan hasta alcanzar el segmento medio, donde se esparcen hacia ambas direcciones desde el centro de cada cuerno para implantarse. En el día 5,5 pf, las células más externas del trofoectodermo se diferencian en células trofoblásticas gigantes (CTG) que forman una monocapa de células que encapsulan al embrión en desarrollo y anclan la placenta del ratón a la decidua ¹¹⁸.

Alrededor del día 6,5 pf comienza la placentación murina y el trofoectodermo prolifera dando lugar a dos poblaciones celulares: el ectodermo coriónico que dará lugar a la zona laberíntica y el cono ectoplacentario (CEP) que da lugar a la zona de unión ¹¹⁹. La zona laberíntica surge por una sincicialización de las células Tb comparable a las vellosidades con capilares fetales en humanos ¹²⁰, está en contacto con la sangre materna y es por donde se produce el intercambio de sustancias con el feto. La capa celular derivada del CEP da lugar a la zona de unión, también conocida como espongiotrofoblasto, que limita con la decidua materna ¹²¹. Esta estructura, que sostiene al laberinto, se asemeja a las columnas CTB en humanos.

Entre los días 8,5 y 10,5 pf las CTG se observan entre los capilares de la decidua y la placenta, y secretan moléculas que intervienen en la remodelación vascular. Sin embargo, a diferencia de los humanos, en ratones la invasión es menos profunda: los vasos solamente pierden la capa de músculo liso, no se transforman completamente ^{122,123}. Finalmente, en el día 14,5 pf las distintas regiones de la placenta ya están formadas (**Fig. H, b**).

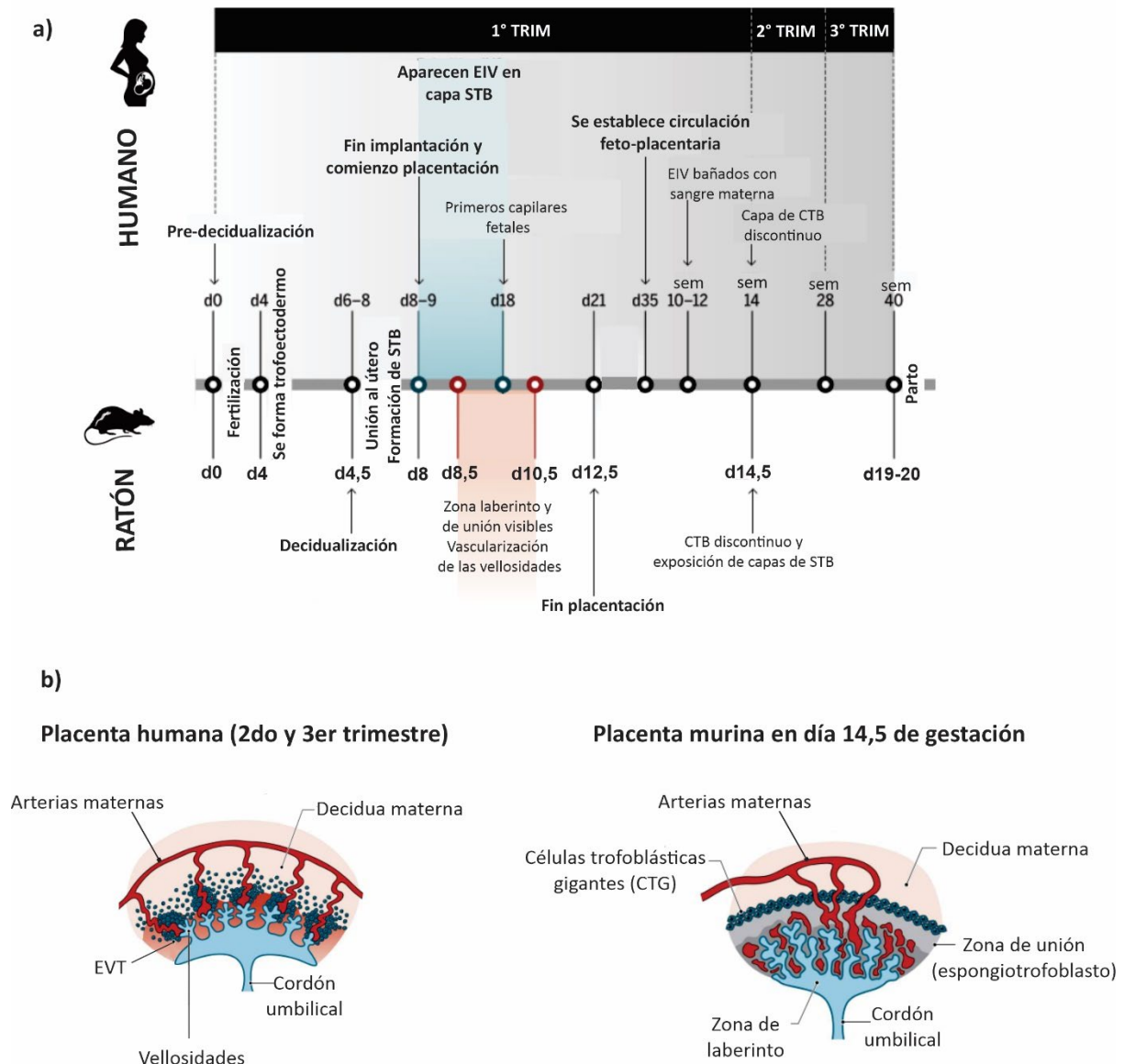


Figura H. Diferencias entre la gestación murina y humana. Imagen tomada y modificada de Ander SE, Diamond MS, Coyne CB, "Immune responses at the maternal-fetal interface". *Science Immunology*. 4, 6114, 2019 ¹¹⁸. **a)** Diferencias temporales en la gestación humana y murina. **b)** Estructura de la placenta humana y murina. Abreviaturas: CTB: citotrofoblasto, STB: sinciotrofoblasto, EVT: célula trofoblástica extravellosa.

Control de la respuesta inflamatoria durante el embarazo

Durante mucho tiempo se consideró que el éxito del embarazo estaba asociado a una supresión del sistema inmune materno, debido al concepto de que el feto se comporta como un semi-injerto que expresa antígenos tanto de origen materno como paterno. Sin embargo, hoy en día se sabe que el microambiente inmunológico durante la gestación no se encuentra suprimido, más bien se encuentra en una condición inmune única y dinámica que se modula ¹²⁴. En el embarazo, el sistema

inmune materno debe equilibrar necesidades opuestas como mantener una inmunidad reactiva para proteger a la madre y al feto de agentes patógenos, y al mismo tiempo debe mantener tolerancia inmunológica hacia el feto. Por lo tanto, la presencia de un infiltrado inmune en el sitio de implantación está asociado con los procesos de generación y mantenimiento de la interfase y con la promoción de la inmunotolerancia para el desarrollo normal del embarazo.

Interacción de las células trofoblásticas con los leucocitos maternos

La decidua al comienzo de la implantación y placentación contiene células de la inmunidad innata -células *natural killer* deciduales (dNK), macrófagos (Ma), células dendríticas (CD), neutrófilos, otras en menor proporción- y células de la inmunidad adaptativa como linfocitos T (LT). Estas células interactúan con las células Tb, principal tipo celular de la placenta. De hecho, diversos factores trofoblásticos determinan el microambiente inmune de la interfase materno-fetal, regulan el perfil funcional de las células inmunes y aseguran la homeostasis inmunológica y el crecimiento fetal ^{125,126}.

En la interacción inmune-trofoblástica, las células Tb secretan constitutivamente hormonas y citoquinas como CXCL-8 (o IL-8), CXCL-12, TGF- β y CCL2 (o MCP-1, proteína quimioatrayente de monocitos) que reclutan leucocitos maternos y modulan su función en cada etapa del embarazo ^{127,128}. Como se mencionó antes, la placenta expresa receptores de reconocimiento de patrones (RRP) que son capaces de sensor y responder ante estímulos del microambiente ¹²⁹, por lo que cualquier estímulo de estas vías de señalización como infecciones o déficit en la remoción de células apoptóticas, entre otros, puede conducir a la pérdida de la homeostasis inmunológica y afectar la evolución del embarazo.

Se han propuesto tres fases inmunológicas durante el embarazo ^{130,131}: una primera fase proinflamatoria controlada, desde la implantación e invasión trofoblástica hasta el comienzo del segundo trimestre; una segunda etapa antiinflamatoria y de tolerancia fetal que comprende el segundo y principio del tercer trimestre y está asociada con el crecimiento fetal; y por último una fase proinflamatoria que conduce al desencadenamiento del parto. Entre cada etapa hay un periodo de transición crítico que requiere la adaptación del sistema inmune materno. Por otro lado, el acortamiento o la extensión de un periodo determinado puede tener efectos perjudiciales para el desarrollo del feto y del embarazo (**Fig. I, a**).

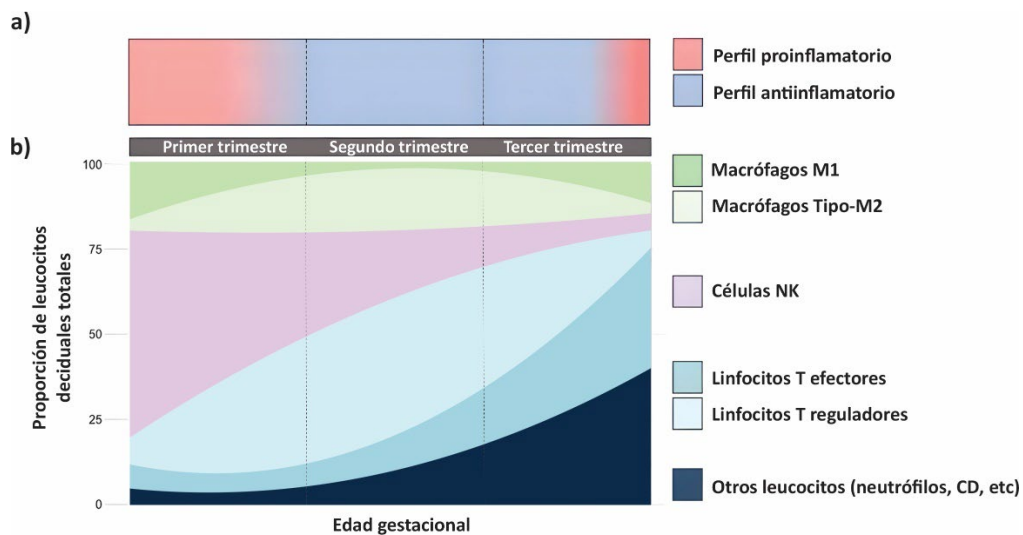


Figura I. Fases inmunológicas del embarazo y principales poblaciones leucocitarias en la decidua. a) Perfiles inmunológicos predominantes durante el embarazo. **b)** Proporciones relativas de leucocitos maternos presentes en la decidua a lo largo del embarazo. Otros leucocitos incluyen neutrófilos, células dendríticas (CD), células linfoides innatas (ILC) 1 y 3, linfocitos B y mastocitos. Imagen modificada de Adamo K., "Physically active pregnancies: Insights from the placenta". *Physiological Reports*, 2024;12:e16104 ¹³².

En la primera fase, durante la implantación y el comienzo de la formación de la placenta tiene lugar un proceso activo que involucra la ruptura y reestructuración de la decidua por parte de las EVT invasivas semejante al proceso de reparación tisular. En este proceso distintas células invaden los tejidos maternos con una alta tasa de muerte celular generando un ambiente proinflamatorio que, a su vez, activa la reparación celular y la remoción de estos cuerpos apoptóticos y restos celulares. En el sitio de implantación, la inflamación se caracteriza por la presencia de IL-6, IL-8, IL-15, TNF- α , factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), entre otras moléculas derivadas tanto de células estromales endometriales como de las células inmunes reclutadas ^{133,134}.

Luego sigue un estadio de rápido crecimiento y desarrollo fetal. Esta fase inmunológica se caracteriza por un perfil antiinflamatorio y tolerogénico mantenido por las células T_H que continúan actuando sobre células T regulatorias (Treg), macrófagos y CD ^{135,136}. Finalmente, una vez que el feto ha completado su desarrollo, se produce un cambio hacia un ambiente proinflamatorio que prepara el útero para el parto, caracterizado por la presencia de altos niveles citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α y donde el aumento en la proporción de "otros" leucocitos es principalmente por el aumento de neutrófilos.

Poblaciones inmunes en la interfase materno fetal

Entre el 30 y 40% de las células presentes en la decidua materna son leucocitos al inicio de la gestación ^{137,138} (Fig. I, b). Estas células inmunes conforman el sistema inmune decidual e incluyen

principalmente las células NK deciduales, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T. En menor medida también se encuentran células linfoides innatas (ILC) 1 y 3, linfocitos B y neutrófilos, estos últimos son reclutados en mayor proporción cerca del parto ¹³⁹. Las células NK deciduales (dNK) alcanzan un 70% de la población inmune decidual durante el primer trimestre. Las células EVT expresan ligandos como las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad no clásicas (como HLA-C, HLA-G y HLA-E) que interactúan con los receptores de las dNK y otras células inmunes, reduciendo la citotoxicidad de dNK y promoviendo la invasión trofoblástica ¹⁴⁰. De hecho, las dNK participan activamente en la invasión trofoblástica y la diferenciación hacia el fenotipo invasivo EVT en ^{109,141}. Las dNK también producen factores angiogénicos ¹⁴² interviniendo en la remodelación de las arterias espiraladas durante la formación de la placenta en el primer trimestre ¹⁴³. Luego de finalizar el remodelado vascular, la población de dNK decae progresivamente ^{116,144}. Estas células exhiben un fenotipo particular que difiere de las NK periféricas (pNK), con baja citotoxicidad, capaces de interactuar con macrófagos deciduales y células Treg ¹⁴⁵.

Los monocitos (Mo) circulan en la sangre durante días antes de migrar a los tejidos para convertirse en macrófagos o células dendríticas ¹⁴⁶. En el embarazo, los factores solubles derivados de Tb activan y reclutan monocitos a la decidua como también modulan la diferenciación de macrófagos deciduales (dM), los cuales constituyen un 20-30% de la población leucocitaria y se mantienen en estos niveles toda la gestación ¹⁴⁷ adoptando distintos fenotipos según el estímulo recibido y el entorno en el que se activan ¹⁴⁸.

Los dM expresan citoquinas y marcadores de perfiles pro y antiinflamatorios con características propias, por lo que se nombran como M1 a aquellos con perfil proinflamatorio y tipo M2 (M2-like) a los asociados a procesos antiinflamatorios, regulatorios y de reparación tisular ¹⁴⁹. Los dM con fenotipo M1 participan en la invasión y ruptura de tejidos, la degradación de la matriz extracelular y secretan IL-1 β que facilita la invasión Tb ¹⁵⁰. A medida que la invasión progresa, los dM adquieren un perfil tipo-M2 asociado a la fagocitosis de células apoptóticas producto de la remodelación tisular ¹⁵¹, lo que promueve la liberación de factores inmunosupresores y antiinflamatorios como TGF- β ¹⁵² que inducen tolerancia. Los dM también asisten la remodelación de las AE y angiogénesis, secretan VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y PLGF (factor de crecimiento placentario). Este perfil tipo-M2 es predominante en el segundo trimestre. En la tercera fase, los dM adquieren un fenotipo M1 nuevamente, inducen la activación de vías inflamatorias en la decidua que contribuyen al desencadenamiento del parto ¹⁵³.

Los linfocitos T (LT) conforman un 3-10 % de la población inmune decidual en el primer trimestre de gestación y a medida que progresa el embarazo su número va en aumento ¹³⁹. El microambiente de citoquinas presentes al momento de su activación determina la función efectora

en la que se diferencian las T CD4⁺ vírgenes (Th1, Th2, otras) o reguladora en el caso de las Treg. La interfase materno-fetal al momento de la implantación e invasión trofoblástica se caracteriza por un medio rico en citoquinas Th1 proinflamatorias. Durante la etapa de crecimiento fetal el perfil cambia hacia uno antiinflamatorio y tolerogénico, donde las Treg tienen un rol central en la inducción de inmunotolerancia materna hacia el feto ¹⁵⁴. De hecho, en pacientes con preeclampsia y parto pretérmino se vio que el porcentaje de Treg se encontraba disminuido ¹⁵⁵. Sintetizan grandes cantidades de TGF- β e IL-10, esenciales para limitar la activación de los Ma y NK durante la implantación ¹⁵⁶ y para la inducción de CD tolerogénicas. Por último, en el desencadenamiento del parto vuelve a predominar un perfil de citoquinas Th1.

Las células dendríticas uterinas (uCD) constituyen entre el 1 y 2% de la población leucocitaria decidual en etapas tempranas y se mantienen a lo largo de la gestación. Las CD son células presentadoras de antígenos profesionales, es decir, tienen la capacidad única de inducir la activación de linfocitos T vírgenes y su condicionamiento a distintos perfiles, incluidos aquellos de tipo supresor, frente a antígenos (Ag) durante la respuesta inmune. Dependiendo del estado de activación y maduración de las CD, pueden inducir efectos inmunogénicos o tolerogénicos. Por ejemplo, las CD inmaduras (CDi) pueden capturar Ag provenientes de células en proceso de muerte o alogénicas induciendo tolerancia en LT. Por otro lado, las CD maduras (CDm) funcionan como células presentadoras de antígeno profesionales muy potentes capaces de activar LT vírgenes y de memoria. Las CD uterinas son de origen mieloide y se generan a partir de precursores de médula ósea, monocitos circulantes, células madre CD34⁺ sanguíneas y posiblemente a partir de macrófagos tisulares. En el útero humano se han identificado CDm (CD83⁺) y CDi (CD83⁻) ¹³⁷ así como CD semi-maduras o tolerogénicas, las cuales aumentan en la fase secretoria del ciclo menstrual.

Estas últimas tienen un rol importante en la receptividad e inducción de la tolerancia hacia los Ag fetales durante etapas tempranas del embarazo. De hecho, se vio que la depleción de uCD en ratones condujo a fallas en el proceso de implantación con reabsorción embrionaria ¹⁵⁷. Se han descrito distintas subpoblaciones de uCD que ayudan a inducir la tolerancia durante el embarazo. En ausencia de un estímulo proinflamatorio o en microambientes antiinflamatorios como aquellos con IL-10, progesterona, hCG, las uCD se transforman en CD tolerogénicas (CDTol) ¹⁵⁸. Esta subpoblación usualmente expresa bajos niveles de HLA-DR, CD80 y CD86, y son resistentes a la maduración por activación de sus receptores de tipo Toll (TRL) ¹⁵⁹.

En este sentido, Gregori y colaboradores caracterizaron una subpoblación específica de células dendríticas tolerogénicas, denominadas DC-10, que puede diferenciarse in vitro a partir de monocitos humanos en presencia de GM-CSF, IL-4 e IL-10 ¹⁶⁰. Estas células se definen por un fenotipo

CD1a⁻ CD14⁺, y exhiben un perfil mieloide maduro (CD83⁺ CD86⁺ HLA-DR^{high}) incluso en ausencia de estímulos activadores. Además, secretan espontáneamente altos niveles de IL-10 y expresan HLA-G. Están implicadas en la inducción de linfocitos T reguladores Foxp3⁺, como los Tr1 y los HLA-G⁺ *T cells*, a través de mecanismos mediados por IL-10 y HLA-G ¹⁶¹. Estas células han sido detectadas en la decidua materna durante el primer trimestre ¹⁶⁰, y se postula que podrían contribuir al mantenimiento de la tolerancia inmunológica hacia el feto. En apoyo a esta hipótesis, se observó una disminución en la frecuencia de DC-10 en mujeres con aborto espontáneo ¹⁶².

Varias citoquinas como IL-4, IL-10 y GM-CSF con propiedades antiinflamatorias están presentes en la decidua generando un microambiente que promueve la activación de macrófagos en un perfil alternativo y a las CD en CDTol ¹⁶⁰. Estas células además de estar presentes *in vivo* se pueden diferenciar *in vitro* mediante el cultivo de monocitos aislados de sangre periférica humana en presencia de IL-10, IL-4 y GM-CSF ¹⁶³. Los ensayos para la obtención de CDi *in vitro* a partir de monocitos permiten investigar efectos de su condicionamiento por factores deciduales y trofoblásticos ^{136,164}.

Los neutrófilos son la población mayoritaria de la sangre en humanos (50 – 70%). Estas células de la inmunidad innata usualmente no residen en los tejidos, sino que son reclutados desde la circulación por Ma residentes que se encuentran con la injuria y secretan quimioquinas como IL-8, que los atraen. Una vez en el tejido inician rápidamente funciones microbidas, incluida la liberación de productos antimicrobianos y citoquinas proinflamatorias que sirven para contener la infección y reclutar más células inmunes, dándole tiempo a la respuesta inmune adaptativa para generar inmunidad y memoria (**Fig. J**).

Dependiendo del gradiente de concentración de IL-8 presente en el microambiente, esta puede ejercer distintos efectos sobre los neutrófilos: a bajas concentraciones actúa como un quimioattractante, mientras que altas concentraciones los activa y genera el estallido respiratorio. Por último, concentraciones aún más elevadas inducen la degranulación y la formación de trampas extracelulares de los neutrófilos (NETs) ¹⁶⁵.

Los mecanismos de activación de los neutrófilos pueden ser dependientes de oxígeno, con activación de la enzima Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH) oxidasa, o independientes del oxígeno, donde están implicadas proteínas con acción antimicrobiana. Cuando los neutrófilos se activan, la enzima NADPH oxidasa produce especies reactivas de oxígeno (ROS) que se liberan al medio. Esta enzima está compuesta por subunidades de membrana: gp91^{phox} y p22^{phox} y citosólicas: p47^{phox}, p40^{phox} y p67^{phox}. Las ROS cumplen diversas funciones antimicrobianas, como

activar proteasas e inducir la formación de NETs, así como atravesar la membrana de bacterias patógenas causando daño y destrucción de las mismas ^{166,167}.

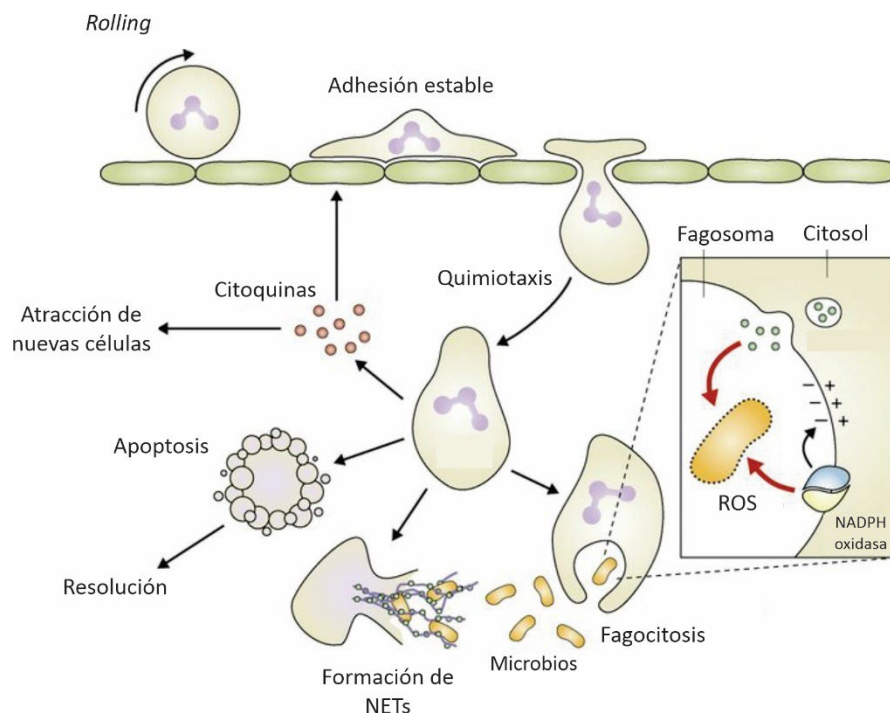


Figura J. Funciones de los neutrófilos. Imagen tomada y modificada de Mócsai A. “Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond”. *Journal of Experimental Medicine*. 2013;210(7):1289–1299.

Los neutrófilos tienen la vida media más corta de todos los leucocitos ¹⁶⁸, y su duración está influenciada principalmente por la presencia de citoquinas, patrones moleculares asociado a patógenos y daño. Usualmente mueren por apoptosis, que puede darse en dos escenarios distintos. En condiciones normales, los neutrófilos no activados permanecen en la sangre por unas 6-12 horas, luego migran al hígado, bazo o nuevamente a la médula ósea donde sufren apoptosis y son fagocitados por fagocitos profesionales. El otro escenario se presenta cuando los neutrófilos dejan la circulación para infiltrarse hacia un tejido por la influencia de mediadores inflamatorios. Allí pueden alargar su vida media según el ambiente inflamatorio presente. En este escenario, los neutrófilos se activan, fagocitan y eliminan patógenos, en gran medida mueren por apoptosis y son finalmente removidos por macrófagos tisulares u otros fagocitos profesionales. Este proceso contribuye a la resolución de la inflamación, dado que limita el reclutamiento de más células inmunes al foco de infección ^{169,170}.

Los neutrófilos son una fuente rica de mediadores inflamatorios, y tienen su mayor influjo en el útero gestante al final del tercer trimestre principalmente por el aumento de los niveles deciduales

de IL-8 y GM-CSF ¹⁵¹. Respecto a su rol en etapas tempranas de la gestación, se los encuentra en baja proporción en la placenta en desarrollo ¹⁷¹, donde son reclutados principalmente través de la IL-8 ¹⁷². Se ha descrito una subpoblación de neutrófilos atraída a la decidua humana de segundo trimestre de manera dependiente de IL-8 que libera factores proangiogénicos como VEGF, arginasa 1 y MCP-1 que actúan favoreciendo la remodelación vascular ¹⁷³. Por otro lado, se ha caracterizado una población de neutrófilos que se genera durante la gestación temprana bajo la influencia de señales hormonales, con funciones asociadas a la remodelación vascular y la inducción de la tolerancia inmunológica mediante la inducción de células Treg. Se ha demostrado que, al entrar en apoptosis, estos neutrófilos pueden inducir una población de LT (niT) con fenotipo regulatorio y capacidad proangiogénicas mediante la transferencia de determinadas proteínas derivadas de neutrófilos apoptóticos. Estas células producen VEGF, IL-10 e IL-17, y promueven el desarrollo de vasos *in vitro* ¹⁷⁴.

La presencia de neutrófilos anormalmente activados durante etapas tempranas de la gestación está implicada en complicaciones de la gestación como PE y parto prematuro ^{175,176}. De hecho, esta población celular ha demostrado ser una de las principales responsables de la disfunción vascular de mujeres con PE ¹⁷⁷. Su activación, puede ocurrir a partir de la exposición a lípidos oxidados secretados por la placenta como consecuencia del daño placentario o a la presencia de patógenos o productos liberados por éstos, así como también por el contacto con células trofoblásticas. Una vez activados, son capaces de infiltrar la vasculatura sistémica materna y liberar ROS, NETs, TNF- α y mieloperoxidasa (MPO), provocando daño en las células vecinas y lesión tisular ¹⁷⁸. Por ejemplo, en placentas de mujeres con PE, se ha observado una acumulación y activación excesiva de neutrófilos que generan NETs, las cuales contribuyen al daño endotelial, inflamación y disfunción placentaria característica de esta patología ¹⁷⁹. Esto resalta la importancia de conocer los mecanismos moduladores de los neutrófilos en etapas tempranas de la gestación y más aún en contextos de infecciones u otros procesos inflamatorios.

Metabolismo en la placenta

La placenta es un órgano con una alta actividad metabólica que puede satisfacer las necesidades bioenergéticas y biosintéticas propias y las del feto en crecimiento. Perturbaciones del metabolismo placentario y el estrés oxidativo se observan en complicaciones gestacionales como PE, PP y RCF ^{180,181}. La causa más común de estas patologías está asociada a insuficiencia placentaria: como resultado de una ineficiente remodelación vascular y/o una alteración de la homeostasis inmunológica, el flujo sanguíneo útero-placentario está reducido y por lo tanto es deficiente para transportar oxígeno y nutrientes al feto. El transporte transplacentario de nutrientes como glucosa y

aminoácidos se ve menos afectado por los cambios en el flujo sanguíneo ya que estos y otros nutrientes son incorporados a nivel celular mediante moléculas transportadoras, con un papel central del metabolismo y función de las células Tb de la placenta en este intercambio ¹⁸²⁻¹⁸⁴.

Función trofoblástica en etapas tempranas de la gestación: importancia del metabolismo

En la placenta a término, el STB es la principal capa celular que está en contacto intercambiando sustancias entre la sangre materna en el EIV y la sangre fetal en los capilares de las vellosidades flotantes. Tradicionalmente se consideró al STB el componente placentario con mayor actividad metabólica por el hecho de que la capa de CTB, que continuamente prolifera regenerando STB, desaparece gradualmente hacia el final de la gestación, asignándole entonces un papel menor en el metabolismo placentario a término ¹⁸⁵. Sin embargo, Kohali y colaboradores demostraron que las células CTB contribuyen de forma significativa a la actividad metabólica placentaria, que su aporte es mayor que el de la capa de STB en la placenta a término, y que cambios en el metabolismo del CTB (glucólisis y fosforilación oxidativa) podrían afectar el transporte de nutrientes como la glucosa ¹⁸⁶. Durante la gestación temprana, las CTB son muy abundantes y conforman una capa continua sobre el STB y los capilares fetales. La evidencia sugiere que hay importantes diferencias en cuanto a las vías metabólicas usadas por la placenta en el comienzo y al final de la gestación. En ese sentido, Burton y colaboradores proponen que, en el ambiente de bajo oxígeno del primer trimestre, las EVT se comportan metabólicamente en forma similar a las células tumorales, y que el mayor uso de la glucólisis sobre la fosforilación oxidativa podría proteger al embrión en desarrollo de la teratogénesis provocada por las ROS generadas durante la invasión Tb ¹⁸⁷.

El metabolismo Tb en etapas tempranas de la gestación, cuando el CTB se diferencia en EVT que invaden y remodelan los vasos maternos además de modular la respuesta inmune local, no ha sido explorado en profundidad en condiciones fisiológicas, y menos aún en el contexto de inflamación sistémica como la que se observa en la gingivoperiodontitis. La invasión y la producción de mediadores inflamatorios por células Tb requieren niveles altos de energía y se ven alterados en el contexto de infecciones. Por ejemplo, en un modelo de interfase materno fetal humana *in vitro* se vio que la infección de células Tb de primer trimestre con ZIKV modifica su metabolismo glucolítico, altera funciones como la migración e induce un microambiente tolerogénico que favorece la replicación viral, pero permite la supervivencia de las células Tb, sugiriendo que a pesar de la infección y una placentación ineficiente el embarazo podría progresar ¹⁸⁸.

La glucosa es la principal fuente de combustible para la generación de energía en la placenta. Aproximadamente el 50 % de la glucosa absorbida de la circulación materna se oxida en la placenta,

y solo un 20 % se transfiere al feto, metabolizándose el resto en lactato¹⁸⁹. La incorporación de glucosa por la placenta es mediada por transportadores específicos llamados GLUTs, cuya expresión varía a lo largo de la gestación¹⁹⁰. Entre las isoformas más importantes presentes en la placenta humana de primer trimestre están GLUT1 y GLUT3. La isoforma GLUT1 se expresa ubicuamente en la placenta y su expresión aumenta hacia el final de la gestación¹⁹¹. En cambio, GLUT3 se expresa desde el inicio de la gestación y su expresión decae a partir del primer trimestre¹⁹². Estudios *in vitro* utilizando la línea celular trofoblástica humana de primer trimestre HTR-8, con características semejantes a las EVT, demostraron que expresa ambos transportadores y que el uso de inhibidores específicos para GLUT1 y 3 alteró la migración Tb¹⁹³. En línea con esto, otro trabajo utilizando el inhibidor de la glucólisis 2-DG demostró que, aunque las células puedan incorporar glucosa, las HTR-8 necesitan metabolizarla mediante la glucólisis para satisfacer no solo la migración Tb, sino también la invasión Tb¹⁹⁴.

Además de la glucosa como principal fuente de combustible para el metabolismo placentario y fetal, diversos estudios han demostrado que la placenta utiliza también ácidos grasos y aminoácidos para obtener energía a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial. En la placenta se expresan proteínas implicadas en la transferencia de ácidos grasos. Para que los ácidos grasos de las lipoproteínas maternas sean accesibles para el transporte placentario deben hidrolizarse. Una vez que los ácidos grasos entran en la célula, se esterifican y principalmente pueden dirigirse a la mitocondria para β -oxidación o formar gotas lipídicas. Las células Tb expresan FATPs, transportadores de ácidos grasos de cadena larga. A su vez, las mitocondrias no son solo esenciales para generar energía sino también para modular la producción de especies reactivas del oxígeno asociado a funciones celulares, incluida la invasión celular (**Fig. K**).

Tras ser incorporada, la glucosa es transformada irreversiblemente en glucosa 6-fosfato por la enzima hexoquinasa 1 (HK1), y puede seguir dos vías principales. Por un lado, puede ingresar mediante la acción de la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (G6PD) a la vía de las pentosas fosfato (PPP) que genera precursores de nucleótidos y poder reductor en forma de NADPH. Este es utilizado por la NADPH oxidasa en la producción de ROS, que en niveles moderados contribuyen en la señalización celular de procesos como la proliferación y migración celular, mientras que en cantidades mayores actúan como defensa contra patógenos¹⁹⁵. Por otro lado, la glucosa-6-fosfato puede continuar la vía glucolítica donde intervienen otras enzimas limitantes como la piruvato quinasa M2 (PKM2) y convertirse en piruvato generando dos moléculas de ATP. Cuando el oxígeno no es limitante, el piruvato se oxida a acetil coenzima A (acetil-CoA) e ingresa a la mitocondria como sustrato en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), mientras que en condiciones de hipoxia el piruvato es metabolizado a lactato. Aunque el microambiente de la interfase materno fetal al comienzo de la placentación se caracteriza por ser hipóxico, las células Tb aun en presencia de oxígeno producen grandes cantidades

de lactato con un papel crucial induciendo perfiles tolerogénicos en leucocitos de la interfase materno fetal y favoreciendo el remodelado vascular ^{196,197}.

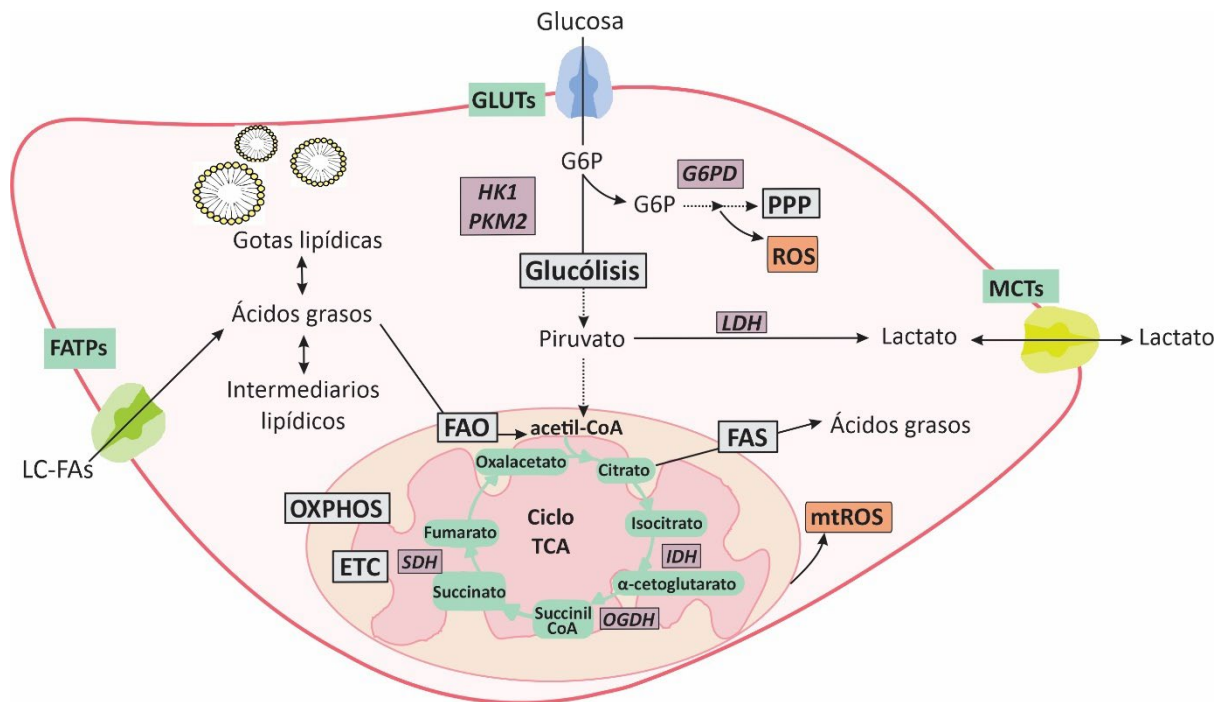


Figura K. Principales vías metabólicas utilizadas por las células Tb en la gestación temprana. Se esquematiza la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato (PPP), la síntesis de ácidos grasos (FAS) en el citoplasma, y la β-oxidación de ácidos grasos (FAO), la cadena de transporte de electrones (ETC), la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) en mitocondria. Abreviaturas: ácidos grasos de cadena larga (LC-FAs), transportadores de ácidos grasos de cadena larga (FATPs), transportadores de glucosa (GLUTs), transportadores de lactato (MCTs), hexoquinasa 1 (HK1), glucosa 6-fosfato (G6P), piruvato quinasa M2 (PKM2), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), lactato deshidrogenasa (LDH), succinato deshidrogenasa (SDH), isocitrato deshidrogenasa (IDH), 2-oxoglutarato deshidrogenasa (OGDH), especies reactivas de oxígeno totales (ROS), especies reactivas de oxígeno mitocondriales (mtROS).

En el ciclo del TCA, se genera una molécula de ATP por cada acetil-CoA que ingresa, y las reacciones de oxidación que tienen lugar durante la fosforilación oxidativa (OXPHOS) mitocondrial producen NADH y FADH₂ reducidos, que funcionan como donores de electrones que luego serán transportados a través de los diferentes complejos de la cadena de transporte (ETC) para establecer el gradiente de protones que impulsa la producción de ATP a través del complejo IV de la ETC. Finalmente, se forman cuatro moléculas de ATP más, sin embargo, el resultado neto es menor debido al consumo de energía que implica el transporte activo de sustratos por la mitocondria y por la fuga de protones mitocondriales ¹⁹⁸. Los intermediarios del TCA también pueden actuar como precursores

biosintéticos y como moléculas señalizadoras que alteran la respuesta inmune en contextos de inflamación aguda y crónica ^{199,200}.

Las perturbaciones en el metabolismo energético celular tienen consecuencias adicionales más allá de la bioenergética y la biosíntesis. Esto se debe a que los intermediarios, cofactores y cosustratos del metabolismo energético también funcionan como moléculas de señalización, que proporcionan un medio para comunicar el estado celular entre distintas organelas e integrar las vías metabólicas con la función celular. En particular, alteraciones en el metabolismo celular pueden traer consecuencias para la placentación. En presencia de infecciones se observan cambios en la disponibilidad de nutrientes y en la activación de vías de señalización que afectan el equilibrio energético de las células Tb, lo que puede llevar a disfunción placentaria. Concretamente, la inflamación inducida por citoquinas proinflamatorias puede alterar la actividad mitocondrial y generar un aumento del estrés oxidativo, comprometiendo la capacidad de la placenta para mantener un ambiente adecuado para el desarrollo fetal. En este contexto, la autofagia es un mecanismo clave para la regulación del metabolismo celular en las células Tb.

La autofagia es un proceso catabólico esencial para la degradación y reciclaje de componentes celulares, lo que permite la eliminación de organelas dañadas y la adaptación celular a condiciones de estrés. Durante la gestación temprana, la autofagia en las células Tb tiene un rol importante en la implantación, la invasión y remodelado vascular, y su inhibición está asociada a insuficiencia placentaria ²⁰¹. En estados de inflamación e infección, la activación de la autofagia representa una estrategia celular para mantener la homeostasis metabólica y evitar la apoptosis inducida por daño oxidativo. Sin embargo, un desbalance en este mecanismo puede contribuir a la disfunción placentaria y al desarrollo de patologías gestacionales como la PE y el RCF.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Las OMV liberadas por *Porphyromonas gingivalis* reprograman metabólicamente a las células trofoblásticas en etapas tempranas de la gestación condicionando su función y su interacción con células endoteliales, neutrófilos, monocitos y células dendríticas.

Proponemos que estos mecanismos tienen un correlato *in vivo* por el cual las OMV de Pg afectan la placentación a través de sus efectos sobre células inmunes y placentarias.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los mecanismos celulares y moleculares por los cuales OMV de Pg afectan la placentación, con especial foco en la función y metabolismo de las células trofoblásticas y el impacto de estos procesos en la interacción de las células trofoblásticas con células de la interfase materno-fetal alterando la homeostasis inmunológica y la transformación vascular.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Para abordar el objetivo general planteamos tres diseños: Por un lado, utilizamos diseños *in vitro* de co-cultivo y comunicación celular con líneas celulares trofoblásticas y endoteliales humanas; también de éstas con neutrófilos, monocitos y células dendríticas obtenidos a partir de dadores sanos. Por otro lado, usamos un modelo murino de gestación para profundizar en los efectos *in vivo* de las OMV de Pg en la placentación. Por último, exploramos el efecto de OMV sobre los componentes de fluido gingival crevicular en muestras obtenidas de mujeres gestantes hacia el final de la placentación.

Objetivo específico 1: Investigar la reprogramación metabólica inducida por OMV de Pg en células trofoblásticas humanas de primer trimestre y cómo impacta ese perfil metabólico en su función. De igual manera, evaluar en un modelo murino de gestación el efecto *in vivo* y *ex vivo* de OMV Pg sobre el metabolismo de las células placentarias murinas, la placentación y el crecimiento fetal.

Objetivo específico 2: Estudiar si los cambios ocurridos en el metabolismo y función de las células trofoblásticas tras ser estimuladas con OMV de Pg modifican su interacción con células endoteliales y leucocitos maternos, y su eventual impacto en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica en la interfase materno fetal.

Objetivo específico 3: En una población de pacientes con 16-20 semanas de gestación, estudiar el efecto del fluido gingival crevicular con o sin Pg sobre funciones de las células trofoblásticas y evaluar si el pretratamiento con OMV interfiere o modula el efecto de los fluidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS BACTERIANOS Y AISLAMIENTO DE OMV

1.1 Cultivo de Pg y obtención de OMV

La cepa de Pg ATCC 33277 fue cultivada en condiciones anaeróbicas a 37°C usando el medio *brain-heart infusion* (BHI, Oxoid) suplementado con 5% L-cisteína, 5 mg/L de hemina y 1 mg/L de menadiona hasta que las células alcanzaron la fase estacionaria (OD_{600nm}).

Los sobrenadantes de los cultivos de Pg fueron centrifugados dos veces a 8000 x g por 10 minutos a 4°C para eliminar restos bacterianos y debris celular. Los sobrenadantes que contienen las OMV fueron filtrados usando filtros de poro de 0,22 μm (GE Healthcare Life Sciences, Boston, MA, USA) y luego sometidos a ultracentrifugación por 70 minutos a 100.000 x g a 4°C. El pellet fue resuspendido en PBS y se repitió la ultracentrifugación en iguales condiciones. El pellet que contiene las OMV fue nuevamente resuspendido en PBS y filtrado con filtro de poro de 0,22 μm (**Fig. L**). Las OMV fueron preservadas a – 80°C hasta su utilización.

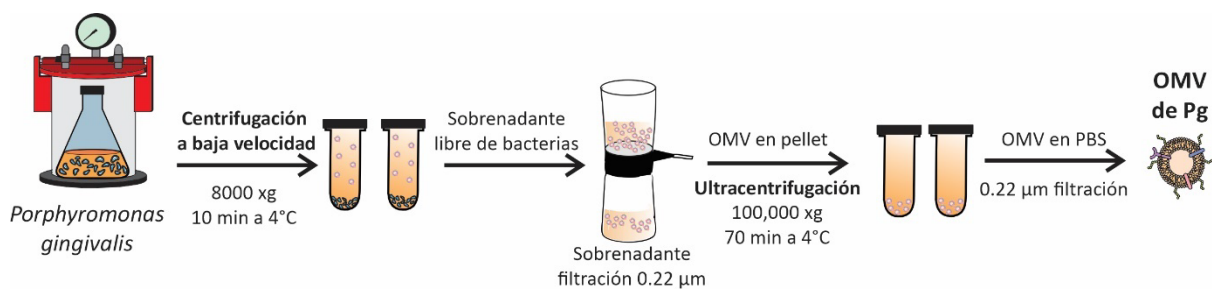


Figura L: Aislamiento de OMV de Pg. Esquema del protocolo de aislamiento de OMV.

1.2 Cuantificación de las OMV

Las OMV fueron cuantificadas usando el kit de cuantificación de microBCA (ThermoFischer). El ADN y ARN presente en las OMV fue cuantificado mediante absorbancia UV usando el equipo NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Las cuantificaciones fueron realizadas en más de 3 muestras provenientes de cultivos independientes de Pg.

1.3. Caracterización de las OMV

Se observaron las OMV aisladas mediante microscopía electrónica de transmisión. Brevemente, las muestras fueron absorbidas en grillas de cobre cubiertas de carbono lavadas con PBS y teñidas negativamente con acetato de uranilo (p/v 1%). También se analizó la distribución del tamaño de partículas mediante análisis de dispersión dinámica de la luz usando Malvern Zetasizer ZS90 (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK).

2. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES Y ENSAYOS FUNCIONALES

En esta tesis doctoral se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- La línea celular trofoblástica humana HTR8-SVneo (HTR-8) se estableció a partir 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). Esta línea celular retiene características fenotípicas (morfología, expresión de citoqueratina) de las células parentales no transfectadas por lo que resulta un modelo útil para el estudio de la función placentaria (Graham et al., 1993). Estas células fueron provistas por el Dr. Gil Mor de Wayne State University, Detroit, EEUU. En algunos estudios se empleó también la línea de trofoblasto humano de primer trimestre Swan71 provista por el Dr. Mor.
- La línea celular endotelial humana EA.hy926 fue provista por la Dra. Fernanda Parborell del IBYME-CONICET, Buenos Aires, Argentina.
- La línea celular monocítica humana THP1 (ATCC TIB-202).

2.1 Mantenimiento de las líneas celulares trofoblásticas, endoteliales y monocíticas

Las células trofoblásticas y endoteliales fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ en 4 mL de medio DMEM-F12 (Invitrogen) en el caso de las células trofoblásticas, mientras que las células endoteliales en medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) completo suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), estreptomicina 100 U/mL y penicilina 100 µg/mL. Las células fueron crecidas en monocapa en botellas de 25 cm² y se reemplazó el medio cada 48-72 h en condiciones de esterilidad dentro de una cabina de seguridad biológica de clase II. Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 90% de confluencia, fueron despegadas por tratamiento con 1 mL de TrypLE™ (Invitrogen) a 37°C. Una vez suspendidas, una alícuota de las células se resuspendió en 4 mL de medio fresco y se cultivó en una botella nueva.

Las células monocíticas fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ en 8 mL de medio RPMI 1640 completo suplementado con 10% de SFB, estreptomicina 100 U/mL, penicilina 100 µg/mL, 1% de glutamina, glucosa 250 mg/mL, sodio piruvato 11 mg/L y β-mercaptoetanol 50 µM. Las células fueron crecidas en suspensión en botellas de 25 cm² y se reemplazó el medio cada 96 h en condiciones de esterilidad dentro de una cabina de seguridad biológica de clase II.

2.2 Preservación de las líneas celulares

Para la criopreservación de las líneas celulares mencionadas, las suspensiones celulares obtenidas luego del tratamiento con TrypLE™ se centrifugaron y se resuspendieron en 1 mL de medio de congelación (10% de DMSO en SFB) en frío y luego se enfrió gradualmente desde una temperatura de -20°C hasta N₂ líquido.

2.3 Incorporación de OMV por células trofoblásticas

Para explorar la internalización de OMV por células trofoblásticas, se marcaron OMV con las sondas lipofílicas fluorescentes PKH-26 (rojo) o PKH-67 (verde) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células trofoblásticas fueron incubadas con concentraciones crecientes (0,1-1-10 µg/mL) de OMV a 37°C y la fluorescencia fue evaluada a distintos tiempos usando el lector de placa FLUOstar Optima (BMG Labtech).

Se realizaron dos controles (**Fig. M**):

- Control de especificidad:** Se realizó el protocolo de marcación con las sondas PKH en ausencia de OMV, ya que la sonda puede formar micelas que pueden ser incorporadas por las células dando señales positivas falsas.
- Control de endocitosis:** Se incubaron las células con OMV marcadas con sonda a 37°C (donde las células incorporan vesículas por endocitosis activa) o a 4°C en donde la endocitosis está inhibida por baja temperatura y reducción de actividad metabólica. De esta manera distinguimos la internalización activa de la adsorción pasiva o señales no específicas

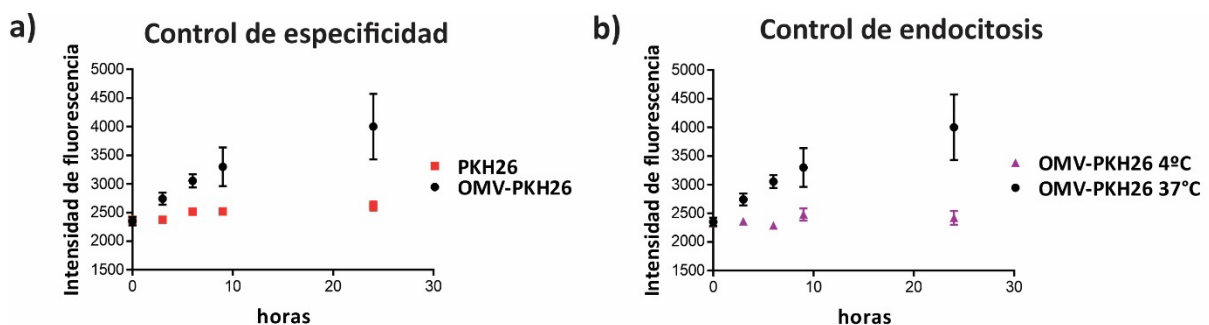


Figura M. Incorporación de OMV de Pg por células Tb. Para realizar el control de especificidad y de endocitosis, células HTR-8 fueron incubadas en presencia de OMV marcadas con la sonda PKH-26 en diferentes concentraciones durante 6-24h y se midió la intensidad de fluorescencia, la cual fue expresada en unidades arbitrarias para cada grupo. El gráfico muestra la media $\pm$ E.S., (n=3).

Para evaluar las vías de internalización, las células trofoblásticas fueron pre estimuladas durante 30 min con inhibidores de la endocitosis: 2 µM monensina (inhibe la acidificación de las vesículas endocíticas formadas en la endocitosis clatrina dependiente), 1 µM wortmanina (inhibe la

actividad fosfatidil inositol quinasas afectando el cerramiento de los macropinosomas), 1 μ M citocalasina-D (inhibe la polimerización de los filamentos de actina, previniendo la fusión de membranas), o 50 μ M nistatina (es un intercalante que disrumpe los dominios ricos en colesterol de la membrana plasmática, afectando la endocitosis dependiente de caveolina y la formación de balsas lipídicas). Luego, se agregaron OMV marcadas durante 24h y se estudió la incorporación de fluorescencia por citometría de flujo.

2.4 Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó usando la conversión de la sonda 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Luego de estimular a las células trofoblásticas con OMV durante 24 y 48h, se agregó 1 mg/mL de MTT y las células fueron incubadas por 2h a 37°C. Los productos de la reacción se solubilizaron usando DMSO, y la placa fue leída en un lector de placa a 570 nm.

2.5 Obtención de medios condicionados

Para obtener los medios condicionados (MC) de células trofoblásticas se cultivaron 3×10^4 células HTR-8 en 500 μ l de DMEM-F12 10% SFB en placas de 24 *wells* por 24h para permitir su adhesión. A continuación, el medio fue reemplazado por DMEM 2% SFB y las células fueron cultivadas en ausencia (MC) o presencia de 1 μ g/mL OMV de Pg (MC OMV) por 9h dado que es el tiempo en que las OMV ingresan a las células. Las células luego fueron lavadas 2 veces con PBS a 37°C para remover OMV que no hayan ingresado, y se cubrieron con medio fresco durante 18h; en el caso de los MC para ensayos con células endoteliales se colocó IMDM 0% SFB, mientras que para hacer los MC para ensayos con células inmunes o ELISA se colocó RPMI 2% SFB. Al finalizar la incubación, los MC fueron recolectados, centrifugados para remover células muertas y almacenados a -20°C hasta su utilización. Cabe mencionar que se verificó la ausencia de OMV de Pg en los medios condicionados de células Tb mediante fluorimetría, realizando el protocolo de obtención de medios condicionados con OMV marcadas con la sonda PKH-26 y evaluando su presencia en los MC.

2.6 Ensayo de migración celular (ensayo de cicatrización de heridas)

Las células trofoblásticas y endoteliales fueron cultivadas en placas de 24/48 *wells* respectivamente y cuando alcanzaron la confluencia formando una monocapa, se realizó una herida usando un tip de p10 estéril. Luego se lavaron los *wells* con PBS para remover las células levantadas, y se añadió medio fresco y los estímulos correspondientes, según el experimento. En el caso de las células Tb, luego de realizar la herida se utilizó medio DMEM-F12 2% SFB para realizar las estimulaciones correspondientes, mientras que, en el caso de las células endoteliales, el estímulo

consistió en una dilución 1:2 de los medios condicionados provenientes de las células Tb en DMEM 0% SFB. En ese caso, como control se realizó el ensayo en presencia de DMEM 0% y DMEM 2% como control positivo de migración. Se tomaron microfotografías a las 0h y 18h post herida. Las imágenes fueron analizadas usando ImageJ® y el área migrada se calculó como se describe en ⁶⁵.

2.7 Ensayo de invasión celular

Células trofoblásticas (3×10^4) pre-estimuladas con 1 $\mu\text{g/mL}$ de OMV de Pg o no, fueron resuspendidas en 200 μl de DMEM-F12 y posteriormente sembradas en el inserto superior de 6,5 mm de transwells de membrana de policarbonato de poro 8 μm (BD) previamente cubiertos con 30 μl de Geltrex (Thermofischer) diluidos 1:5 en medio Optimem (BD), el cual representa la matriz extracelular. Tras 24h de incubación a 37°C, los insertos de transwells fueron lavados y se separaron las células que no migraron eliminando la capa de Matrigel que recubría el interior del transwell suavemente con un hisopo. Luego se fijaron las células que habían migrado con metanol frío, y se tiñeron los núcleos con DAPI por 10 min, se cortó la malla con un bisturí y se montó el inserto sobre PBS: Glicerol (1:1). Se utilizó un microscopio de fluorescencia Olympus y se tomaron fotografías utilizando el aumento 10x. Se cuantificaron los núcleos de al menos 10 campos al azar no superpuestos por condición como en ²⁰².

2.8 Detección de células apoptóticas y evaluación del ciclo celular

Para evaluar el efecto de las OMV sobre la apoptosis y el ciclo celular, las células fueron estimuladas en presencia o ausencia de 1 $\mu\text{g/mL}$ de OMV de Pg. La frecuencia de células trofoblásticas apoptóticas fue evaluada por citometría de flujo realizando una doble marcación para ioduro de propidio y anexina V siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Bioscience). Para evaluar el ciclo celular, luego del estímulo las células se fijaron con metanol y fueron resuspendidas en una mezcla de tinción conteniendo 40 $\mu\text{g/mL}$ de ioduro de propidio y 20 $\mu\text{g/mL}$ de RNasa. Se evaluó la marcación por citometría de flujo.

2.9 Ensayos con sondas fluorescentes y de metabolismo celular

Las células Tb HTR-8 (3×10^4 /pocillo) fueron cultivadas en placas de 24 wells y cuando alcanzaron el 70% de confluencia se renovó el medio colocando 300 μl DMEM-F12 2% SFB y se estimularon con 1 $\mu\text{g/mL}$ de OMV de Pg durante 4 y 24h según el ensayo. La incorporación de glucosa y ácidos grasos fue cuantificada usando las sondas fluorescentes 2-NBDG y BODIPY FL C12, respectivamente, y la acumulación de gotas lipídicas usando la sonda BODIPY 493/503 (descrito a continuación).

Para estudiar el transporte de glucosa por células Tb, 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. Luego de estimular con OMV por 4 o 24 h, las células 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 dos veces, se despegaron con TrypLE/Tripsina y se resuspendieron en PBS SFB 2% para análisis por citometría de flujo.

Para estudiar el transporte de ácidos grasos de cadena larga por células Tb se utilizó la sonda fluorescente BODIPY-FL C12 (Molecular Probes-Life Technologies, California, EEUU) previamente conjugada con BSA libre de ácidos grasos 0,1% en RPMI-1640 sin suero. Luego de estimular a las células con las OMV, se añadió la sonda fluorescente 5 μ M por 10 min, se lavaron con BSA 0,2% en PBS y fueron resuspendidas en PBS SFB 2% para análisis por citometría de flujo.

Para estudiar la acumulación de gotas lipídicas, las células fueron incubadas con las OMV por los tiempos señalados en cada caso, y luego se añadió 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 dos veces, fueron despegadas con TrypLE/Tripsina y resuspendidas en SFB al 2% en PBS para análisis por citometría de flujo.

La masa y potencial de membrana mitocondrial fueron evaluados usando MitoSpy Green (Biolegend Inc, California, EEUU) y Mitotracker Red CMXRos (Termo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU) mientras que la producción de ROS mitocondrial se evaluó usando MitoSox (Termo Fisher Scientific). Células Tb fueron cultivadas en placas de 24 pocillos con las OMV por distintos tiempos, luego las células fueron lavadas e incubadas por 30 min a 37°C y 5% CO₂ con 250 nM MitoSpy Green y 250 nM Mitotracker CMXRos 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 PBS SFB 2% para análisis por citometría de flujo. Se calculó el ratio Mitotracker CMXRos/MitoSpy Green para comparar la funcionalidad mitocondrial entre tratamientos

La producción de ROS totales se evaluó usando la sonda DCFH-DA como en ^{65,203}. Luego de estimular a las células con las OMV por 4 o 24h, se añadió 10 μ M de la sonda diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU) por 30 min. Las células fueron lavadas con PBS, despegadas y resuspendidas en PBS SFB 2% 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/>). En algunos casos también se visualizó la fluorescencia de las sondas en las células vivas o fijadas utilizando un microscopio confocal Olympus FV1000, utilizando el aumento 60X.

2.10 Liberación de lactato

La concentración de L-lactato en el sobrenadante de las células trofoblásticas o explantes de placenta de ratón fue evaluada usando el Accutrend Plus System según manual (Roche Diagnostics). El equipo consta de un lector que mide sobre tiras reactivas específicas, el cambio colorimétrico a 657 nm de un reactivo cromogénico 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.

2.11 Ensayo de respiración mitocondrial (Mitostress)

Las células Tb HTR-8 ($1,5 \times 10^4$ /pocillo) sembradas en las placas específicas V3 PS (Agilent, California, EEUU) fueron estimuladas o no con $1 \mu\text{g/mL}$ de OMV de Pg durante 24h y se realizó un ensayo de *Mitostress* empleando la metodología y plataforma Seahorse® en el Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay, en colaboración con el Dr. Carlos Escande. Brevemente, el medio se descartó y las células Tb se colocaron en el analizador de flujo extracelular Seahorse XFe96 (Agilent, California, EEUU). El consumo de oxígeno se determinó al comienzo del ensayo y después de la adición secuencial de $2,5 \mu\text{M}$ oligomicina, $2 \mu\text{M}$ FCCP, $0,5 \mu\text{M}$ Rotenona + Antimicina D empleando placas y reactivos provistos por el fabricante y siguiendo las instrucciones del equipo. Este ensayo representa la tasa de consumo de oxígeno (OCR por las siglas en ingles *Oxygen Consumption Rate*), y para el cálculo de los parámetros se utilizan los mencionados inhibidores de distintos pasos de la cadena respiratoria. Los parámetros mitocondriales del perfil de respiración mitocondrial analizados fueron respiración basal y máxima, la producción de ATP asociada a la respiración mitocondrial, la capacidad respiratoria máxima y la capacidad de reserva. Los ensayos se realizaron con 6 réplicas de cada condición y se repitieron con estas réplicas en 3 ensayos independientes empleando distintos cultivos celulares y distintos lotes de OMV de Pg.

2.12 Ensayos de autofagia

Para evaluar el flujo autofágico, células trofoblásticas fueron tratadas con OMV durante 24h en DMEM-F12 2% SFB, y luego para evaluar la acumulación de vesículas autofágicas se agregó 100 nM Bafilomocina A1 que es un inhibidor de la acidificación lisosomal y la posterior fusión de autofagosomas con lisosomas, o DMSO como control durante 2h. Posteriormente, las células se fijaron con PFA 4% y

se marcaron con anticuerpos contra LC3 y p62. Para evaluar los lisosomas, las células fueron incubadas con la sonda LysoTracker red (Thermo Fisher Scientific) durante 30 min para permitir la marcación de los lisosomas, y luego se fijaron con PFA 4%. En células fijadas también se realizaron marcaciones con anticuerpos contra LAMP1 y 2, que son marcadores de membrana lisosomal. Se tomaron imágenes de microscopia confocal (Olympus DSU) de al menos 5 campos diferentes por condición, y utilizando el programa ImageJ se cuantificó la densidad óptica integrada de la señal de al menos 30 células por campo, para evaluar las vesículas autofágicas positivas para LC3 y p62. Para evaluar los lisosomas, se cuantificó el área positiva para la señal de LysoTracker o positiva para la señal de LAMP 1 y 2 (siendo ésta el área ocupada por lisosomas) y el área celular de cada célula medida, y los resultados se expresaron como porcentaje de área lisosomal, que es el cociente entre el área ocupada por lisosomas sobre el área celular. Esto se realizó para 30 células por campo, de 5 campos por condición.

Para evaluar si la autofagia tenía un rol en la migración Tb, se realizó un ensayo de migración por herida. Para eso, células Tb crecidas en monocapa fueron tratadas con el inductor de autofagia rapamicina (0,5 μ M) o el inhibidor 3-metiladenina (5 mM) durante 1h, luego se realizó una herida y se incubaron en presencia o ausencia de OMV. Se tomaron fotos a las 0 y 18h y el área migrada fue cuantificada como se explicó anteriormente.

2.13 Ensayos con células endoteliales

Se evaluó la capacidad migratoria de las células endoteliales Ea.hy926 cuando estaban en presencia de medios condicionados de células Tb que habían sido previamente estimuladas con OMV de Pg (MC OMV) o no (MC) mediante un ensayo de migración por herida como se describió previamente.

Para evaluar la producción de ROS, se estimularon células Ea.hy.926 con MC o MC OMV en dilución 1:2 con DMEM 0% SFB, y con DMEM 2% SFB como control durante 24h. Al finalizar la incubación, las células fueron lavadas y marcadas con la sonda fluorescente DCFH-DA como se explicó previamente. La fluorescencia se analizó mediante fluorimetría.

Para evaluar la activación endotelial, células Ea.hy926 fueron pretratadas con MC o MC OMV o no (DMEM 0% SFB) durante 24h. Luego, células THP-1 marcadas con calceína verde AM (5 μ M) se co-cultivaron con las células endoteliales durante 1h para permitir su adhesión. Transcurrido el tiempo, se lavaron las células con PBS a 37°C y se tomaron imágenes con un microscopio de fluorescencia para evaluar las células monocíticas adheridas al endotelio.

2.14 Extracción de proteínas y western blotting

Las células trofoblásticas fueron estimuladas durante 24h en presencia o ausencia de 1 µg/mL de OMV de Pg y luego las proteínas se extrajeron en buffer RIPA con inhibidores de proteasas. Las proteínas se cuantificaron utilizando el kit de cuantificación de microBCA (ThermoFischer) y 50 µg de proteínas por cada condición fueron sujetas a una electroforesis de SDS-PAGE y electro transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas y luego incubadas con anticuerpo anti GLUT1, GLUT3 o GAPDH (control de carga) *overnight* a 4 °C. Las bandas fueron reveladas con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa y detectadas por quimioluminiscencia. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias respecto al control de carga.

2.15 Actividad de enzimas antioxidantes

Para la determinación de la actividad enzimática de la catalasa, células trofoblásticas en confluencia fueron estimuladas o no con OMV durante 24h. Posteriormente, las células se lisaron, seguido de una centrifugación a 11.000 x g, y los ensayos se llevaron a cabo en los sobrenadantes resultantes. La actividad de la catalasa (CAT, EC1.11.1.6) se evaluó monitorizando la descomposición del peróxido de hidrógeno a 240 nm. La mezcla de reacción comprendía 50 mM de buffer fosfato potásico (pH 7,0) y 30 mM de peróxido de hidrógeno. Los resultados se cuantificaron como UCAT (unidades de catalasa) por mg de proteína^{204,205}. Las UCAT se definieron como la cantidad de enzima que degrada 1 mmol de peróxido por minuto.

2.16 Obtención de ARNm, pasaje a ADNc y RTqPCR

La expresión génica de ARNm fue determinada por qPCR. Luego de realizar los tratamientos, se descartó el medio y las células fueron cosechadas y conservadas en 500 µl Trizol® (Life Technologies, Grand Islands, NY, USA) a -20°C hasta realizar la extracción de ARN. La extracción se realizó según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se añadió 1/5 de volumen de cloroformo y se centrifugó a 12.000 g por 15 min a 4°C. El ARN se encuentra disuelto en la fase acuosa, la cual se transfirió a un tubo nuevo y para precipitarlo se incubó 10 min a 4°C con isopropanol en relación 1:1. Luego se centrifugó 10 min a 12.000 g a 4°C, quedando el ARN en el pellet. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue lavado con 500 µl de etanol 75% por centrifugación a 7.500 rpm por 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y luego de evaporado el etanol, el ARN fue resuspendido en agua estéril. El ARN fue incubado 10 min a 60°C para desestabilizar su estructura secundaria y luego fue cuantificado a 260 nm en NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Cuando no se realizó la retrotranscripción inmediatamente el ARN fue conservado a -80°C hasta su utilización.

Los ADNc se generaron a partir de 1 µg de ARN total. La mezcla de reacción fue: dNTPs 25 mM (Embiotec), oligo dT 5 ng/µl (Biodynamics), RT M-MLV 100 U, RNAsin 15 U y Buffer RT M-MLV 1X (Promega), hasta un volumen final de 20 µl. La reacción se llevó a cabo a 42°C durante 1 h y se detuvo incubando durante 10 min a 90°C en una termocicladora Bio-Rad MyCycler. El ADNc obtenido se conservó a -20°C hasta su uso. Para la determinación de la expresión de ARN mensajeros por PCR a tiempo real, 100 ng de ADNc (50 ng para el gen constitutivo YWHAZ (h) para las células trofoblásticas y GAPDH (h) para los neutrófilos, S29 (mm)) fueron incubados con FastStart SYBR Green Master (Roche) y los *primers* correspondientes sentido y antisentido (**Tabla 1**) en una termocicladora Bio-Rad iQ2 para PCR en tiempo real. Los datos se analizaron con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para células humanas o $2^{-\Delta CT}$ en el caso de los ratones, normalizando la expresión al gen constitutivo YWHAZ (en línea celular trofoblástica) y GAPDH (para neutrófilos), o S29 (en el modelo murino) respectivamente ²⁰⁶.

Gen	Especie	Secuencia	
GLUT 1	h	Sentido	CTGAGCATCATCTTCATCCCG
		Antisentido	CGCAGCTTCTTTAGCACACTCT
GLUT 3	h	Sentido	CGAGACCCAGAGATGCTGTAATG
		Antisentido	TGGAAGAGCCGATTGTAGC
HK-1	h	Sentido	TGACACCCAGAGAACATCG
		Antisentido	AGGTGATCAGGATGGCCTCA
PKM-2	h	Sentido	CTGTGCTACTCAGATGCTGGA
		Antisentido	GTGGAGTGACTTGAGGCTCG
FATP-1	h	Sentido	CCGGAATTGACTGTGACCACTT
		Antisentido	CACGCAGTGCAGGGTTCA
FATP-2	h	Sentido	CACAGGTCTTCCAAAAGCAGC
		Antisentido	AGTCCGAAGGCAAGAGTAG
FATP-3	h	Sentido	GAGAACTTGCCACCTTATGCC
		Antisentido	CGAAGCCCTCATTTGCCATC
SDHb	h	Sentido	TGTGATAAAGGATCTTGTTCCCGA
		Antisentido	CGTAGAGCCCGTCCAGTTTC
IDH-1	h	Sentido	GGCTCTGTCTAAGGGTTGGC
		Antisentido	CTGGGACTTGTAAGGCTGTCA
OGDH-1	h	Sentido	CGGCAACAGATACAAGAACGTG
		Antisentido	GCAGAATAGCACC GAATCTGTTG
G6PD	h	Sentido	CGGCAACAGATACAAGAACGTG
		Antisentido	GCAGTGGGGTGAAAATACGC
TGF-β1	h	Sentido	GGACACCAACTATTGCTTCAG
		Antisentido	CCAGGCTCCAAATGTAGGG
TIMP-1	h	Sentido	CTGCGGATACTTCCACAGGT
		Antisentido	GCAGGATTCAGGCTATCTGG
TIMP-2	h	Sentido	GATGCACATCACCTCTGTG
		Antisentido	TCCAGGAAGGGATGTGAGAG
MMP9	h	Sentido	GTCGTGGTTCCAACCTCGGT
		Antisentido	TCCTGGGTGTAGAGTCTCTCG
VEGF-α	h	Sentido	CGCAGCTACTGCCATCCAAT
		Antisentido	GTGAGGTTTGATCCGCATAATCT

PLGF	h	Sentido	TGTTCAAGCCATCCTGTGTCTC
		Antisentido	CCCAGAACGAACGGATCTTTAGG
IL-6	h	Sentido	TTCGGTACATCCTCGACGGC
		Antisentido	TCACCAGGCAAGTCTCCTCA
IL-8	h	Sentido	CCAACACAGAAATTATTGTAAAGC
		Antisentido	CACTGGCATCTTCACTGATTC
sFLT1	h	Sentido	AGAGGTGAGCACTGCAACAA
		Antisentido	TCTCCTCCGAGCCTGAAAAGT
MCP-1	h	Sentido	CAGCAGCAAGTGTCCTCAAAG
		Antisentido	GAGTGAGTGTTCAAGTCTTCGG
gp91 ^{phox}	h	Sentido	ACATTCAACCTCTGCCACCAT
		Antisentido	ACCCAGCCAAACCAGAAATG
p47 ^{phox}	h	Sentido	CCCACGGACAACCAGACAAA
		Antisentido	TCTGACAGAACCACCAACCG
p67 ^{phox}	h	Sentido	CTGTTTGCCTGTGAGGTGTT
		Antisentido	AGACACACTCCATCGCCTTG
TNF- α	h	Sentido	GCCTCTTCTCCTTCCTGATCG
		Antisentido	CAGCTTGAGGGTTTGCTACA
YWHAZ	h	Sentido	CAGAGAGAAAATTGAGACGGAGC
		Antisentido	CCCAGAACGAACGGATCTTTAGG
GAPDH	h	Sentido	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG
		Antisentido	TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT
S29	m	Sentido	GGAGTACCCACGGAAGTTCGG
		Antisentido	GGAAGCACTGGCGGCACATG
GLUT 1	m	Sentido	GATCCAGCAGCAAGAAGGTG
		Antisentido	GCGGTGGTTCCATGTTTGATTG
GLUT 3	m	Sentido	AGGACCCGAGGAACACTTG
		Antisentido	TAGCCAACTGGAAAGAGCCG
16S	b	Sentido	CGTAGTAATCGTGGATCAGAAATG
		Antisentido	TGTGACGGGCGGTGTGTA
Pg	b	Sentido	ACGAATCAAAGGTGGCTAAGTT
		Antisentido	ACGAATCAAAGGTGGCTAAGTT
Fn	b	Sentido	ACCTAAGGGAGAAACAGAACCA
		Antisentido	CCTGCCTTAATTCATCTCCAT
Aa	b	Sentido	GCGAACGTTACGCGTTTTAC
		Antisentido	GGCAAATAAACGTGGGTGAC

Tabla 1. Secuencias de los *primers* utilizados. h: humano, m: ratón, b: bacteriano.

2.17 Citometría de flujo

Las células HTR-8, endoteliales, neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas fueron recuperadas y lavadas con buffer FACS (2% SFB en PBS) a temperatura ambiente. Los precipitados celulares obtenidos se resuspendieron y se incubaron con los anticuerpos correspondientes, con previa permeabilización o no, según el protocolo de marcación recomendado por los fabricantes.

Las muestras de los correspondientes experimentos se analizaron en un citómetro de Flujo FacsAria II (BD) y se adquirieron 10.000 eventos. Los resultados se interpretaron utilizando el programa FlowJo®.

2.18 ELISA

Para la cuantificación de IL-10 presente en los sobrenadantes de cultivos de células HTR-8 y células dendríticas se realizaron ensayos de ELISA tipo sándwich siguiendo los protocolos recomendados por los fabricantes (BD). Brevemente, el anticuerpo específico para cada citoquina se incubó en la placa de ELISA por 18 h (anticuerpo de captura). Luego se bloqueó con PBS-SFB 10% por 1 h y se lavó 4 veces. Después, los estándares provistos por los kits y las muestras se incubaron en el soporte durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con solución de lavado (PBS Tween 0,05%) y se agregó el anticuerpo conjugado con biotina (anticuerpo de detección) para cada citoquina durante 1 h en conjunto con la streptoavidina conjugada a HRP y, finalmente, se reveló con el sustrato TMB diluido al medio con H₂O. La reacción se detuvo agregando solución STOP (H₂SO₄ 2N) y la densidad óptica se leyó a 450-570 nm en un lector de ELISA.

3. ENSAYOS FUNCIONALES CON CÉLULAS INMUNES

Los neutrófilos y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) fueron obtenidas a partir de muestras de sangre periférica por punción de la vena del antebrazo de dadores sanos que no estuvieron bajo tratamiento farmacológico por al menos 10 días. Todos los dadores dieron su consentimiento por escrito para la obtención de la muestra en el marco del protocolo aprobado por la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (10469).

3.1 Aislamiento de neutrófilos

En primer lugar, la sangre entera fue diluida al medio con solución fisiológica. Los neutrófilos fueron aislados mediante centrifugación en gradiente de Ficoll® Paque PLUS de 1,077 g/mL de densidad (GE Healthcare) a 480 g por 20 min y posterior sedimentación con Dextrán 6% (GE Healthcare). Luego, los eritrocitos contaminantes fueron removidos por lisis hipotónica con agua durante 30 segundos. Los neutrófilos aislados fueron resuspendidos en medio RPMI completo: RPMI 1640 completo suplementado con 10% de SFB, estreptomycin 100 U/mL y penicilina 100 µg/mL.

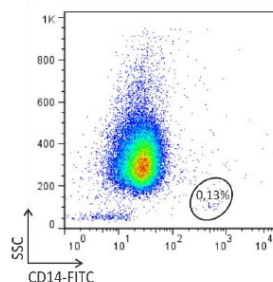


Figura N. Pureza de los aislamientos de neutrófilos realizados. Se muestra un *dotplot* representativo de la granularidad (SSC) en función de la expresión de CD14 evaluado por citometría de flujo. Debido a que el marcador CD14 en monocitos supera en más de un orden de magnitud a la expresión en neutrófilos, este tipo de análisis nos permite determinar el grado de contaminación de la muestra. En este gráfico representativo, hay una contaminación del 0,13% de monocitos, considerándolo aceptable para su uso.

3.2. Ensayos funcionales con neutrófilos

3.2.1 Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno

Los neutrófilos fueron cultivados en microtubos (1×10^6 /mL) por 45 min a 37°C en RPMI 2% SFB (control) o en presencia de MC o MC OMV, y luego se incubaron por 15 min adicionales con 5 μ M de la sonda diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich). En otros experimentos luego de la incubación con medios condicionados los neutrófilos fueron incubados con PMA 100 ng/mL durante 30 min y se evaluó la producción de ROS. En todos los casos, al finalizar la incubación se agregó PBS frío y las células fueron analizadas por citometría de flujo inmediatamente después.

3.2.2. Ensayo de migración de neutrófilos

Para realizar los ensayos de migración se utilizaron 2×10^5 neutrófilos recién purificados para cada condición. Los neutrófilos (resuspendidos en 200 μ L de RPMI 2% SFB) se colocaron sobre la cámara superior de un transwell con poros de 5 μ m para permitir su migración hacia la cámara inferior durante 1h, en un diseño experimental similar al utilizado por Blidberg y colaboradores ²⁰⁷. En la cámara inferior se colocó MC, MC OMV, o RPMI con 2% de SFB como control.

3.2.3. Evaluación de la expresión de genes en neutrófilos

Para obtener ARN de los neutrófilos, se incubaron $1 \cdot 10^7$ células recién purificadas en 500 μ L de MC, MC OMV, RPMI 2% SFB como control durante 6h. Transcurrido ese tiempo, las células fueron centrifugadas y lavadas con PBS, se colocaron en Trizol® y se conservaron a -20 °C hasta el aislamiento del ARN. Una vez realizado el pasaje a ADNc como se describe previamente, se evaluó la expresión de ARN mensajero de p47^{phox}, gp91^{phox}, p67^{phox}, IL-8 y TNF- α por RTqPCR.

3.3 Obtención de PBMCs

En este caso las muestras de sangre periférica fueron obtenidas a partir de *buffy coats* que son concentrados de leucocitos y plaquetas generados por centrifugación de bolsas de sangre entera de dadoras mujeres sanas en edad fértil. En primer lugar, la sangre fue diluida al medio con solución fisiológica, y los PBMCs se aislaron a partir del halo correspondiente utilizando un gradiente de Ficoll® Paque PLUS de 1,077 g/mL de densidad (GE Healthcare) como se describió en el apartado anterior. Las células se lavaron 2 veces con solución fisiológica estéril (483 x g durante 10 min a 4°C) y

posteriormente se resuspendieron en medio completo para realizar el recuento celular. En todos los casos, el grado de contaminación con células polimorfonucleares fue menor al 5%.

3.4 Aislamiento de monocitos a partir de PBMCs

Se realizó a partir de una centrifugación en gradiente de densidad discontinuo de Percoll PLUS (GE Healthcare Life Sciences), según protocolo previamente descrito con modificaciones ²⁰⁸. Para esto, los PBMCs se lavaron y resuspendieron en 2 mL de solución de Tyrode libre de calcio y magnesio (40×10^6 células/mL) 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 preformadas en tubos de polipropileno de 15 mL: 50% al fondo, seguida de 40%. Luego, la solución de PBMCs fue sembrada en la parte superior y se centrifugó a 620 x g por 50 min a 4°C. De esta manera, los monocitos se recuperaron de la interfase con pipeta Pasteur cuidadosamente y se lavaron con solución fisiológica estéril dos veces a 210 x g durante 10 min para eliminar el resto de Percoll. La pureza y viabilidad fueron analizadas por citometría de flujo y tinción con azul de tripán, respectivamente, con un grado de contaminación máximo de linfocitos del 25 %.

3.5 Diferenciación de monocitos a células dendríticas

Para obtener células dendríticas (CD) inmaduras, los monocitos fueron cultivados en medio completo para CD con 30 ng/mL de IL-4 y 30 ng/mL de GM-CSF recombinantes humanos (1×10^6 cél/mL; tratamiento control) en placa de 96 pocillos con fondo en U, por al menos cinco días como en ¹⁶⁴. El nivel de diferenciación fue confirmado por la presencia de CD1a y la ausencia de CD14, mediante marcación y citometría de flujo.

4. ENSAYOS CON RATONES

Se utilizaron ratones C57BL/6, alojados en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (FCEyN, UBA). Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con los protocolos estándares establecidos por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Se colocaron en apareo hembras de al menos 8 semanas de edad con machos de la misma cepa. La cópula se verificó por la observación de la presencia del tapón mucoso vaginal, día 0,5 de gestación. Una vez observado el tapón, las hembras fueron separadas en otra jaula y se las mantuvo

con agua y alimento *ad libitum* hasta el día 6,5 de gestación donde se realizaron inyecciones intraperitoneales con PBS o 5 µg/kg OMV de Pg (**Fig. Ñ**).

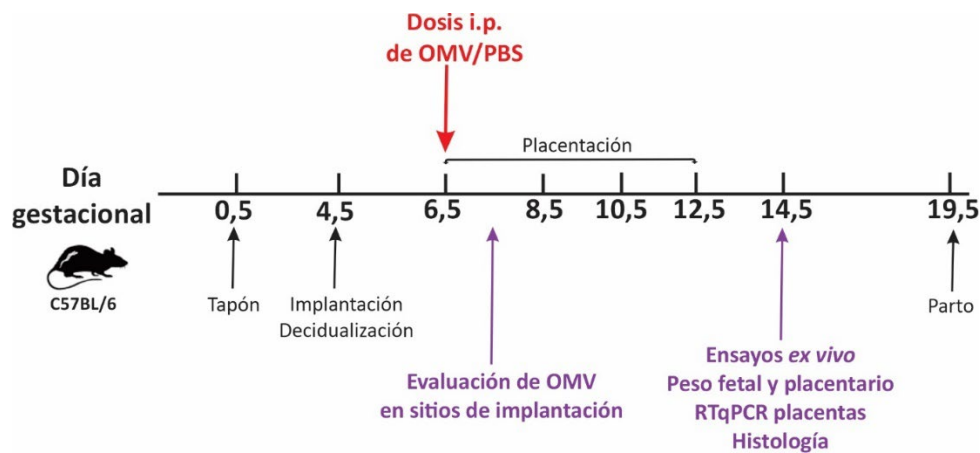


Figura Ñ. Esquema del protocolo utilizado con el modelo murino de gestación. Luego de la inyección i.p. con OMV o PBS en el día 6,5 de gestación se realizaron los experimentos indicados en el día correspondiente según se indica (línea de tiempo).

La dosis ip (5 µg/kg) se calculó en base a estudios *in vitro* realizados en esta tesis doctoral, a informes previos con péptidos administrados localmente en el día 6.5^{209,210} y a la estimación del volumen de líquido peritoneal en ratones hembra de esta cepa²¹¹. El ajuste de la dosis también implicó probar una dosis más baja (10%) y una más alta (10x) en un pequeño grupo de animales preñados en el día 6.5. En el día 14,5 de gestación, las hembras fueron sacrificadas, y los sitios de implantación, placentas y fetos fueron separados y utilizados según el ensayo realizado.

4.1. Observación de OMV en sitios de implantación

En el día 6,5 de gestación se inyectó OMV de Pg marcada con PKH-67 para monitorear su presencia en los sitios de implantación a las 6h post inyección. Los sitios fueron aislados y fijados en PFA al 4% durante toda la noche. Luego, se realizaron cortes a 60 µm en un microtomo vibrante y se marcaron con DAPI para visualizar los núcleos. Los cortes se observaron en un microscopio confocal.

4.2. Determinación del peso fetal y placentario, aislamiento placentario para histología y medición de expresión génica

En el día 14,5 de gestación se extrajo todo el útero y se analizó macroscópicamente en cada ratón: se evaluó individualmente el número de sitios de implantación viables, los procesos de reabsorción en curso, el tamaño y peso placentario y fetal²¹⁰. Se pesaron por separado las placentas y fetos. Algunas placentas se colocaron en Trizol[®] y se realizó el aislamiento de ARNm para posterior

medición de expresión de GLUT1 y GLUT3 como se describió previamente. Para realizar los cortes histológicos algunas placentas se fijaron en PFA al 4% y se incluyeron en parafina, y luego se realizó tinción con hematoxilina y eosina.

4.3. Ensayo de incorporación de 2-NBDG y producción de lactato en placentas *ex vivo*

La placenta se aisló y se lavó exhaustivamente, se secó suavemente y luego se dividió en cuatro explantes similares y se pesó. Cada explante se colocó en un pocillo sin recubrimiento (placa de cultivo celular de 24 pocillos) con medio DMEM-F12 2% SFB a 37 °C. Los explantes de cada placenta se trataron o no con 1 µg/mL de OMV de Pg durante 24 h en una cámara humidificada con 5% de CO₂ a 37 °C. Por un lado, se recolectó el sobrenadante y se evaluó la liberación de L-lactato en el mismo como se describió previamente. Por otro lado, a los explantes se les añadió 200 µM de la sonda fluorescente 2-NBDG durante 10 min en DMEM-F12 sin glucosa, se lavaron, se incubaron con buffer RIPA frío y se homogeneizaron. La fluorescencia de 2-NBDG en los sobrenadantes de tejido se midió en un lector de microplacas FLUOstar Optima (BMG Labtech). El contenido de 2-NBDG se relativizó a µg de proteína como en ²¹².

5. PACIENTES Y MUESTRAS ODONTOLÓGICAS

La población de estudio incluyó 52 pacientes de 18 a 42 años entre las semanas 16 y 20 de gestación que se encontraban bajo control obstétrico regular (Emba 16-20 sem). Las pacientes fueron atendidas por odontólogos en la Catedra de Odontología Preventiva y Comunitaria de la Facultad de Odontología de la UBA, y fueron comparadas con un grupo control (No emba) definido por los mismos parámetros socio-demográficos formado por mujeres sanas periodontalmente (n=18). Las mujeres embarazadas con diagnóstico de hipertensión, IMC menor a 18,5 o mayor a 30 (OMS) previo al embarazo, diabetes, con serología positiva para sífilis, hepatitis B, Chagas, toxoplasmosis, HIV, con anticuerpos antifosfolípidos o SARS-COV2 fueron excluidas. Las pacientes incluidas en el estudio firmaron un consentimiento informado según lo aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la UBA (#20211157).

5.1. Características clínico-odontológicas de la población en estudio

La examinación clínica de todas las pacientes se realizó en la cátedra de Odontología Preventiva y Comunitaria de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires por odontólogos especialistas. El examen periodontal incluyó la evaluación de distintos parámetros: profundidad de bolsillos periodontales (PD), nivel de inserción clínico (CAL) y sangrado al sondaje (BOP) en seis sitios por diente. El estado de inflamación gingival fue medido usando el índice gingival

(IG) de Løe y Silness y la presencia de biofilm bacteriano fue establecida evaluando la placa bacteriana visible registrada como índice de placa (IP). Los sitios comprometidos periodontalmente fueron aquellos con PD y/o CAL mayor a 3 mm y positivos para BOP.

Los mismos profesionales colectaron el fluido gingival crevicular (FGC) de cada paciente y las muestras fueron colocadas en medio RTF (Reduce Transfer Fluid) e inmediatamente refrigeradas a -80 °C. Los FCG fueron usados para la cuantificación e identificación de bacterias presentes como se describe en ⁶⁵. Brevemente, la extracción de ADN genómico bacteriano se hizo usando columnas de afinidad (Presto TM Mini dDNA Bacteria kit, Geneaid) y la cuantificación relativa de *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* se llevó a cabo mediante qPCR usando DNA strand SYBER Green Master Mix (Bio-Rad). Los *primers* utilizados están detallados en la **Tabla 1**. La determinación de bacterias totales fue realizada con oligonucleótidos para la región de la subunidad 16S.

Como se muestra en la **Tabla 2**, la población de pacientes gestantes presenta un estado de gingivoperiodontitis moderada, con diferencias significativas en los parámetros periodontales y en la carga bacteriana total con respecto a la población control.

Parámetros periodontales, clínicos y microbiológicos	Grupos de pacientes	
	Embarazadas 16-20 sem	Mujeres no embarazadas
Índice gingival	0,67 ± 0,08 *	0,22 ± 0,08
Índice de placa	0,81 ± 0,07 **	0,35 ± 0,11
Edad (rango)	18 - 42	18 - 42
Peso recién nacido (g)	3305 ± 82,27	-
Duración de la gestación (semanas)	37,81 ± 0,37	-
Bacterias totales en FGC (copias 16S/μl)	8,5x10 ⁶ ± 17,7x10 ⁶ ****	2,4x10 ⁵ ± 7,7x10 ⁴

Tabla 2. Estado gingivoperiodontal de pacientes gestantes y población control. Se evaluó el estado clínico periodontal de una población de pacientes embarazadas (n=52) de 16-20 semanas de gestación y pacientes control de la misma edad (n=18). Los valores representan la media ± E.S. **** p< 0,0001, ** p<0,01, *p<0,05. Se realizó una prueba estadística de Mann Whitney para comparar entre grupos.

Se detectó Pg en el 62% de las muestras provenientes de pacientes gestantes, mientras que Fn estaba ampliamente distribuido en todas las muestras de este grupo (85%). En ambos casos, los niveles fueron superiores a los observados en el grupo no gestante utilizado como control (**Fig. O**). Por

el contrario, Aa se detectó en el 48% de las pacientes gestantes, pero no en las pacientes control (no se muestra).

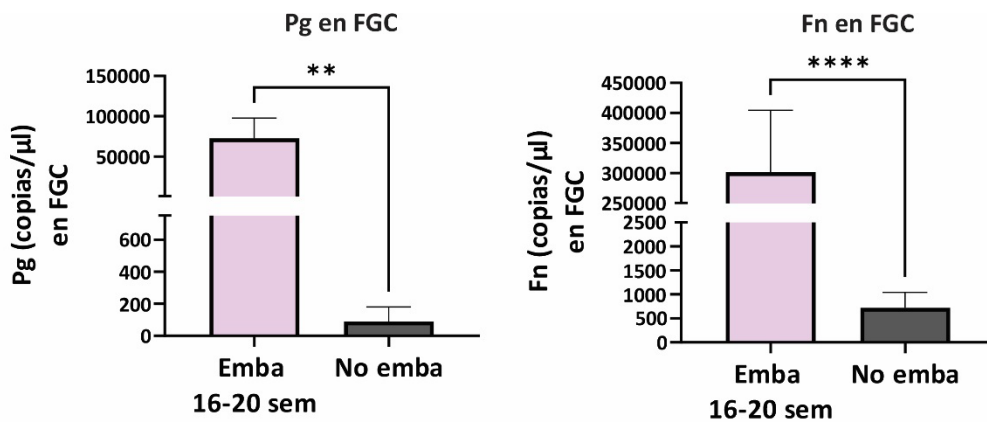


Figura O. Bacterias periodontopáticas en fluido gingival crevicular. Se evaluó la cantidad de *Pg* y *Fn* presente en los FGC de embarazadas y grupo control mediante RTqPCR. Prueba de Mann Whitney. **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$.

Todas las pacientes embarazadas estudiadas tuvieron una gestación sin complicaciones obstétricas, con duración y peso fetal normales. Más aun, vimos que la inflamación gingival no variaba en función de la presencia o no de *Pg* en los fluidos (**Fig. P**).

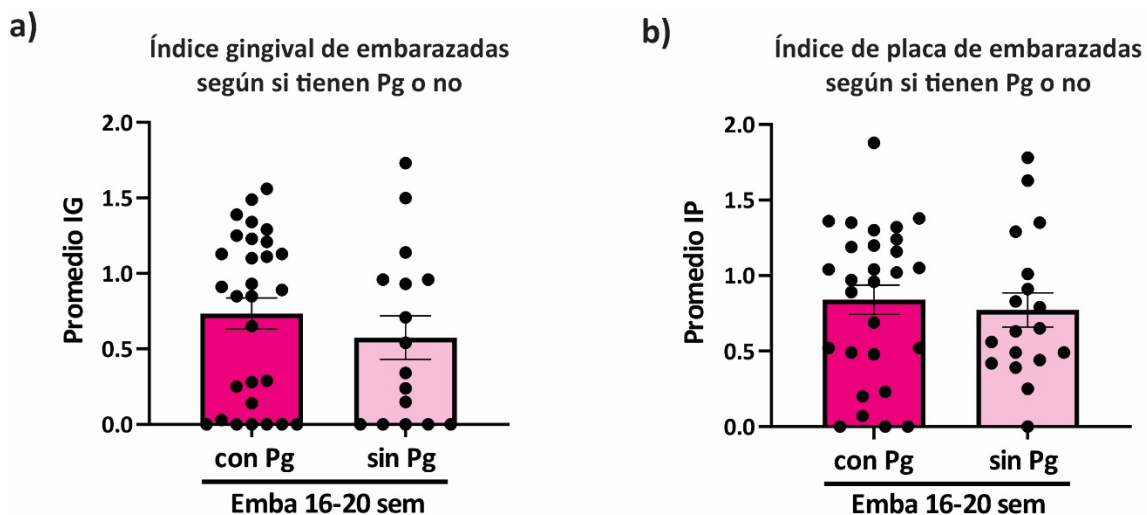


Figura P. Índices periodontales en mujeres gestantes. Índice gingival (IG) y de placa (IP) promedio de mujeres embarazadas de 16-20 semanas de gestación clasificadas según la presencia o ausencia de *Pg* detectada en la muestra de FGC tomada al momento de la examinación periodontal.

Considerando que las bacterias periodontopáticas pueden ganar acceso a la placenta y el rol patogénico de *Pg*^{10,213,214}, evaluamos parámetros clínicos obstétricos como el peso de los recién

nacidos y la duración de la gestación colocando el foco en si durante la gestación temprana tenían Pg o no en sus FGC, y no encontramos diferencias (**Fig. Q**).

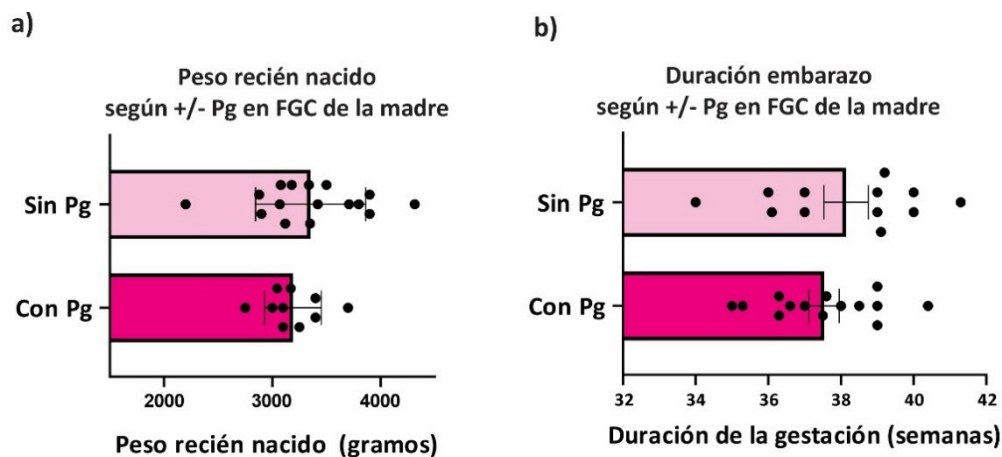


Figura Q. Parámetros clínicos obstétricos. El peso de los recién nacidos **(a)** y la duración del embarazo **(b)** registrados al finalizar la gestación fueron comparados en un grupo de pacientes (cada punto representa una paciente) distribuidas según que la muestra de su FGC tuviera o no presencia de Pg.

5.2. Ensayos con células trofoblásticas y fluidos gingivales creviculares

Células HTR-8 crecidas hasta confluencia se incubaron en 300 μ l finales con DMEM-F12 2% SFB y los FGC en una dilución 1:5 durante 18 h para evaluar la capacidad migratoria de las células trofoblásticas, o durante 24h para evaluar la producción de ROS usando la sonda DCFH-DA como se describió previamente.

Para estudiar el condicionamiento de las OMV sobre las células trofoblásticas cuando se estimulan con los FGC, pretratamos a las células con 1 μ g/mL de OMV de Pg durante 24h, y luego renovamos el medio y agregamos FGC en dilución 1:5. A las 24h de incubación se midió la producción de ROS como se describió antes. En algunos ensayos, las OMV se añadieron conjuntamente con los FGC por 24 h, y 24 h después se midió la producción de ROS.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para pruebas paramétricas se realizaron test t de Student o ANOVA de un factor, para muestras pareadas o no, con comparaciones múltiples de Dunnett o Tukey. Para pruebas no paramétricas se utilizaron pruebas de Wilcoxon, Mann Whitney, Kruskal Wallis o Friedman con comparaciones múltiples de Dunn's. Se utilizó el software GraphPad Prism 9.4 (GraphPad software Inc) para realizar las pruebas estadísticas. Se definió la significación estadística como $p < 0.05$.

RESULTADOS

CAPITULO 1:

Las OMV de *Porphyromonas gingivalis* modifican el metabolismo de las células trofoblásticas alterando la función placentaria

Aislamiento y caracterización de las OMV de Pg

Como primer objetivo nos propusimos aislar y caracterizar las OMV de *P. gingivalis*, con el fin de estudiar posteriormente su efecto en células trofoblásticas. Para ello, cultivamos Pg en condiciones anaerobias y aislamos las OMV a partir de sobrenadantes del cultivo por ultracentrifugación diferencial. La presencia y morfología de las OMV aisladas fue confirmada mediante microscopía electrónica de transmisión como se observa en la **Figura 1a** donde se visualizan estructuras esféricas con una membrana definida. Luego, evaluamos la distribución de tamaño de las vesículas mediante la técnica de distribución dinámica de la luz (**Fig. 1b**) y vimos que se encontraban en un rango de 35-220 nm de diámetro, con un tamaño promedio de 108 ± 39 nm, coherente con lo reportado para bacterias gramnegativas²¹⁵. Por otro lado, evaluamos la presencia de cargos biológicamente activos en las OMV como proteínas, ARN y ADN (**Fig. 1c**), confirmando que las vesículas contienen un repertorio molecular complejo potencialmente capaz de modular funciones celulares.

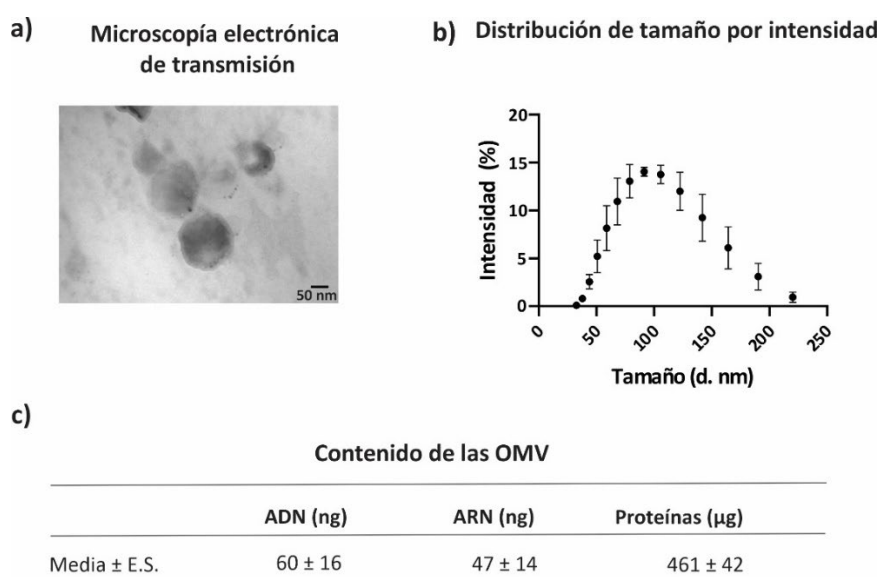


Figura 1. Caracterización de las OMV. a) Imagen representativa de una microscopía electrónica de transmisión donde se observan vesículas esféricas con doble membrana. Escala de la barra: 50 nm, aumento 250.000x. b) Análisis de la distribución de tamaños de las OMV aisladas (n=3 proveniente de aislados diferentes) mediante dispersión dinámica de la luz (DLS). c) ADN, ARN y proteínas totales de las OMV obtenidas de 500 μl de al menos 3 cultivos diferentes.

Las células trofoblásticas incorporan OMV de forma tiempo y concentración-dependiente

En primer lugar, evaluamos si las células Tb incorporan OMV de Pg. Para eso, incubamos a las células con concentraciones crecientes de OMV marcadas con la sonda lipofílica fluorescente PKH-67 (**Fig. 2a**) y analizamos la incorporación a las 3, 6, 9 y 24h del inicio del tratamiento. Encontramos que las células Tb incorporaban OMV de forma tiempo y concentración-dependiente. Basándonos en estos resultados, seleccionamos una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ de OMV para los ensayos posteriores dado que fue la menor concentración que mostró una rápida internalización observable (**Fig. 2b**) a las 9h, y confirmada en imágenes de microscopía confocal como se observa en la **Figura 2c**. La incorporación de OMV por las células Tb no afectó la viabilidad celular (**Fig. 2d**).

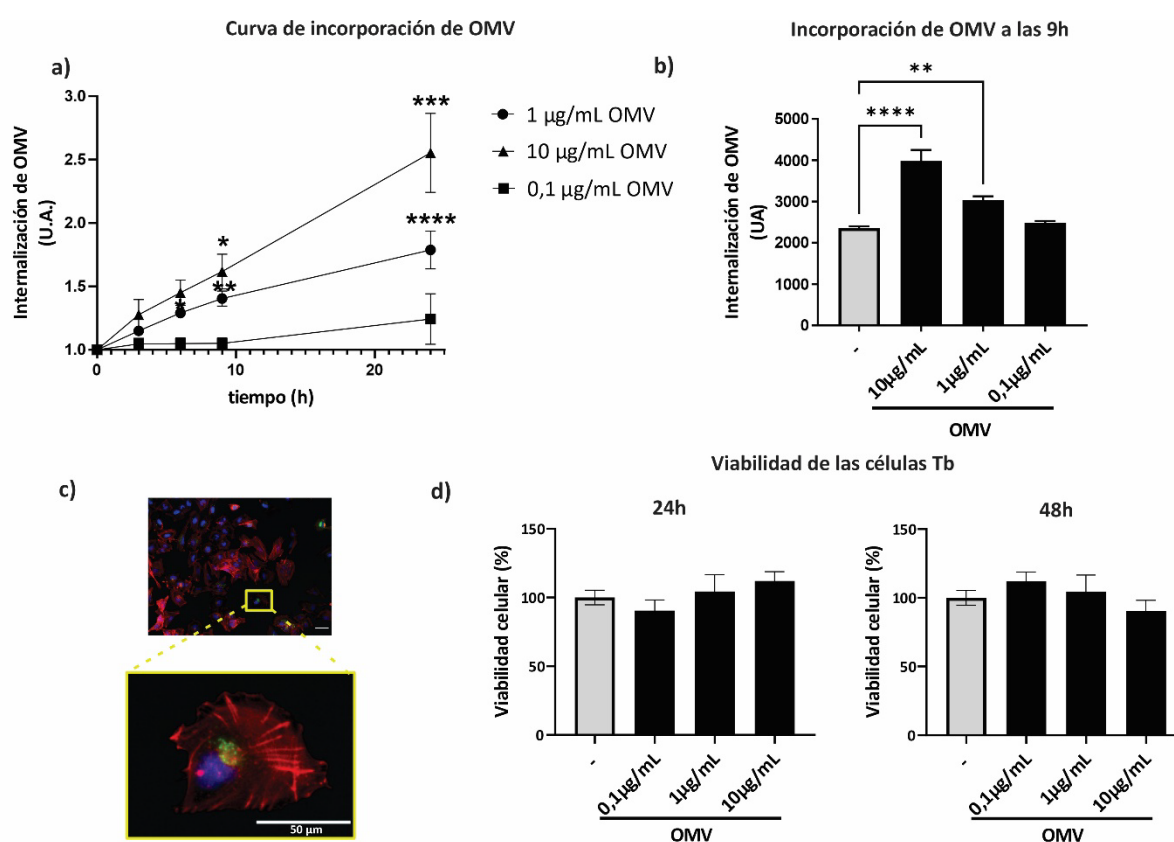


Figura 2. Las células Tb internalizan OMV de Pg. a y b) Células Tb HTR-8 fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de OMV marcadas con la sonda PKH-67 durante 6-24h (**a**) o a las 9h (**b**) y se midió la intensidad de fluorescencia expresada en unidades arbitrarias (UA) para cada grupo. El gráfico muestra la media $\pm$ E.S. ($n=3$), * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$, ANOVA seguido por una prueba de Dunnet. **c)** La incorporación de OMV de Pg marcadas con PKH-67 se analizó por microscopía confocal. Se utilizó faloidina-TRITC para visualizar el citoesqueleto de actina de las células Tb y DAPI para los núcleos. La imagen mostrada es representativa de al menos tres experimentos independientes. Barra de escala: 50 μm . **d)** La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT a las 24 y 48h de estímulo con OMV. Los resultados se expresan como media $\pm$ E.S. ($n=6$) del % de viabilidad tomando el valor de absorbancia promedio del control (-) como 100%.

Para comprender los mecanismos por los cuales las OMV son incorporadas por las células Tb, estudiamos el efecto de inhibidores farmacológicos ²¹⁶ (**Fig. 3a**). La internalización de OMV se redujo significativamente con nistatina, un disruptor de dominios de membrana ricos en colesterol, como también cuando utilizamos monensina, un ionóforo que disipa el gradiente de protones e inhibe la endocitosis mediada por clatrina (**Fig. 3b**). En cambio, el tratamiento con wortmanina, que inhibe la internalización mediada por caveolas y balsas lipídicas, y con citocalasina D, que inhibe la endocitosis mediada por actina, no tuvieron un efecto significativo. En conjunto, estos resultados indican que las células Tb internalizan OMV de Pg principalmente por endocitosis mediada por clatrina y caveolina.

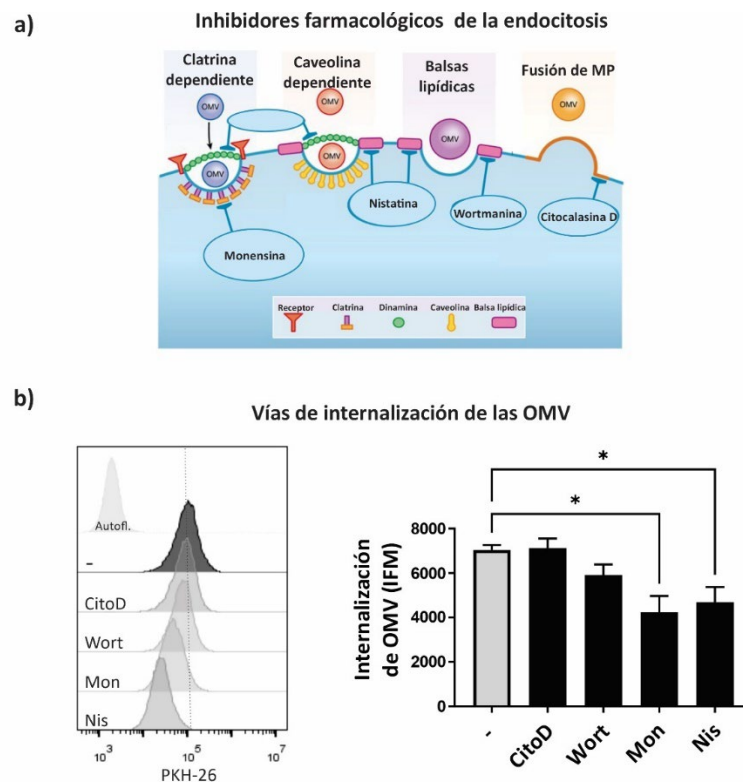


Figura 3. Las células Tb internalizan OMV de Pg por endocitosis mediada por clatrina y caveolina. a) Imagen tomada y modificada de ²¹⁶, donde se esquematizan las vías endocíticas e inhibidores farmacológicos utilizados. b) Las células Tb se pre-incubaron durante 30 min con monensina (Mon) (2 μ M), wortmanina (Wort) (1 μ M), citocalasina-D (CitoD) (1 μ M) o nistatina (Nis) (50 μ M). Luego se añadieron las OMV de Pg marcadas con PKH-26 y se midió la internalización después de 24h de cultivo mediante citometría de flujo. Se muestra un histograma representativo del análisis de incorporación de OMV de PKH-26 en las distintas condiciones. Los valores son la media $\pm$ E.S. (n= 5), * p< 0.05, ANOVA seguido por una prueba de Dunnet.

Las OMV de Pg disminuyen la incorporación y el metabolismo de la glucosa en células Tb

Las células trofoblásticas llevan a cabo procesos fundamentales para el establecimiento y mantenimiento de la gestación como proliferación, migración, diferenciación e interacción con células del sistema inmune materno, todos ellos altamente dependientes de la disponibilidad de energía. Teniendo en cuenta que la glucosa representa la principal fuente de combustible en esta etapa, en primer lugar, evaluamos si el tratamiento con OMV de Pg altera el transporte de glucosa en dichas células. Medimos la incorporación de glucosa en células trofoblásticas tratadas o no con OMV utilizando un análogo fluorescente de la D-glucosa, 2-NBDG, seguido de su detección por citometría de flujo.

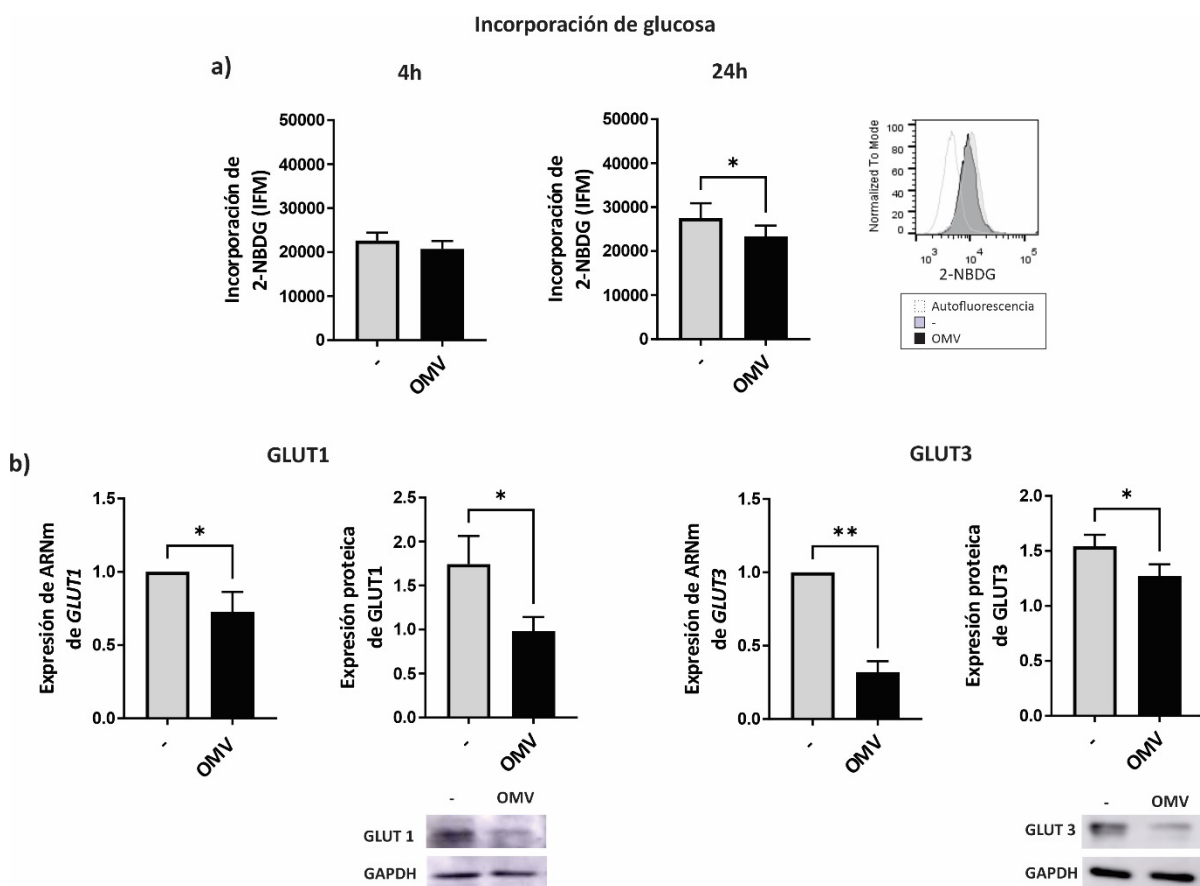


Figura 4. Las OMV de Pg disminuyen la incorporación de la glucosa en células Tb. Células Tb fueron incubadas con OMV de Pg durante 4-24h. **a)** La incorporación de glucosa fue evaluada por citometría de flujo utilizando el análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG (n=4). Se muestra un histograma representativo. **b)** La expresión de ARNm de *GLUT1* y *GLUT3* fue evaluada por RTqPCR 6h post estímulo, mientras que la expresión proteica fue evaluada luego de 24h por *western blot*. La expresión fue normalizada respecto a GAPDH y se expresó en unidades arbitrarias. Los valores son la media $\pm$ E.S. (n=4), *p<0.05, **p<0.01. Test t de Student pareado.

En la **figura 4a** se observa que el tratamiento con OMV reduce significativamente la incorporación de glucosa luego de 24h de estímulo, sin observar cambios a tiempos cortos. Dado que la incorporación de glucosa se vio comprometida, evaluamos la expresión de los principales transportadores de glucosa presentes en la placenta, GLUT1 y GLUT3. Como se puede ver en la **figura 4b** el tratamiento con OMV reduce la expresión de ambos transportadores GLUT1 y GLUT 3 tanto a nivel de ARNm como proteico.

Una vez ingresada a la célula, la glucosa es fosforilada en su carbono-6 convirtiéndose en glucosa 6-P (**Fig. 5a**). Ésta puede ser oxidada en la vía de las pentosas fosfato (PPP) o continuar la vía glucolítica generando ATP y dando piruvato, que a su vez podrá ser convertido a lactato por la enzima lactato deshidrogenasa en el citoplasma, o ingresar a la mitocondria y, como acetil-CoA, ser intermediario del TCA aumentando la fosforilación oxidativa. Consistentemente con la disminución en la incorporación de glucosa, las células tratadas con OMV mostraron una reducción en la liberación de lactato (**Fig. 5b**), como también en la expresión de enzimas limitantes de esta vía como la hexoquinasa 1 (HK1) y la piruvato quinasa M2 (PKM2) (**Fig. 5c**).

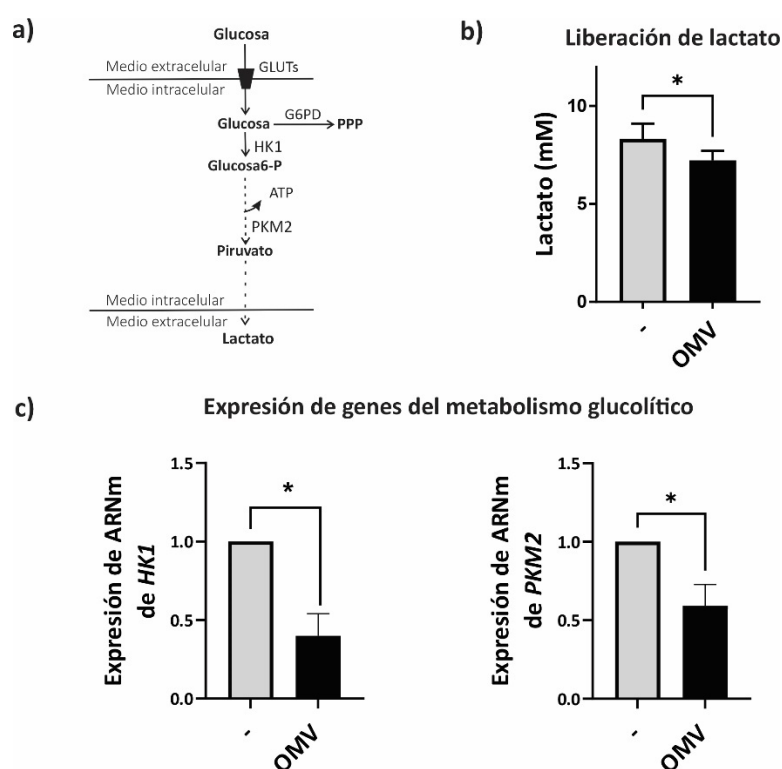


Figura 5. Las OMV de Pg disminuyen el metabolismo de glucosa en células Tb. a) Esquema de vías metabólicas de glucosa. b) La producción de lactato en los sobrenadantes de células Tb a las 24h de incubación con OMV fue determinada usando Accutrend Plus. Los valores son la media $\pm$ E.S. (n=4). c) La expresión de ARNm de enzimas glucolíticas en las células Tb fue evaluada tras 6h de estimulación con OMV mediante RTqPCR. Los valores son la media $\pm$ E.S. (n=5). *p<0,05. Test t de Student pareado.

Estos resultados los confirmamos y validamos con ensayos *ex vivo*, en los cuales incubamos explantes de placenta murina de día 14,5 de gestación con OMV de Pg durante 24h. Consistente con los resultados en células humanas *in vitro*, en placenta murina se observó menor incorporación de glucosa y menor liberación de lactato (**Fig. 6**).

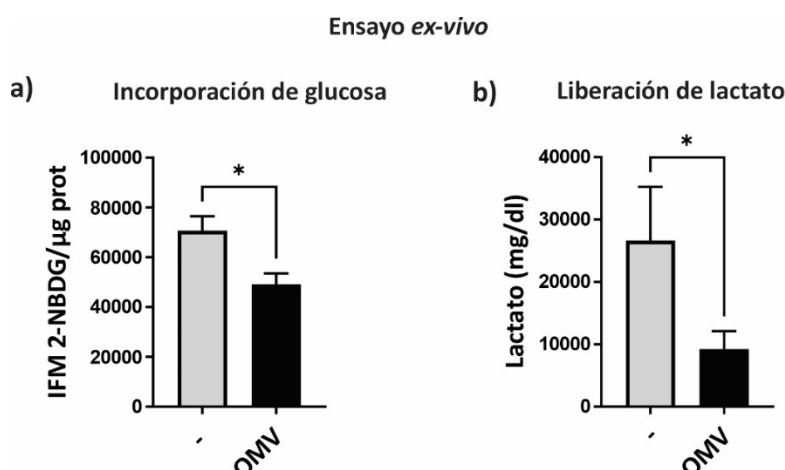


Figura 6. Las OMV de Pg disminuyen el metabolismo de la glucosa en placentas murinas *ex-vivo*. **a)** Para evaluar la incorporación de glucosa, se incubaron los explantes de placenta estimulados durante 24h con OMV de Pg y luego con 2-NBDG durante 10 minutos. Luego, se lavaron, se procesaron y se evaluó la fluorescencia incorporada mediante fluorimetría. **b)** Los sobrenadantes de los explantes fueron colectados y se cuantificó el lactato liberado mediante Accutrend Plus. Los valores representan la media $\pm$ E.S. de placentas de al menos cuatro ratones al día 14,5 de gestación. * $p < 0.05$. Test t de Student.

Dado que la alteración en el metabolismo de la glucosa podría comprometer la disponibilidad de energía en las células trofoblásticas, nos propusimos investigar si las OMV de *P. gingivalis* también impactaban sobre otras rutas metabólicas relevantes, como el metabolismo lipídico. Para eso en primer lugar evaluamos el transporte de ácidos grasos de cadena larga (LC-FAs). Para evaluar la incorporación, utilizamos el análogo de un ácido graso fluorescente de cadena larga BODIPY FL C12, que es transportado por transportadores de LC-FAs FATP1, FATP2 y FATP3 que se expresan en células trofoblásticas. Como se puede observar en la **Figura 7a** las células Tb incubadas con OMV de Pg presentan un aumento en la incorporación de LC-FAs 4h luego de la estimulación, mientras que a las 24h esa diferencia se pierde. Al evaluar la expresión de los transportadores, encontramos que las OMV disminuyeron la expresión génica de FATP2, uno de los principales transportadores de ácidos grasos en células Tb (**Fig. 7b**). Estos hallazgos sugieren una respuesta temprana con captación lipídica seguida por una posible regulación negativa compensatoria.

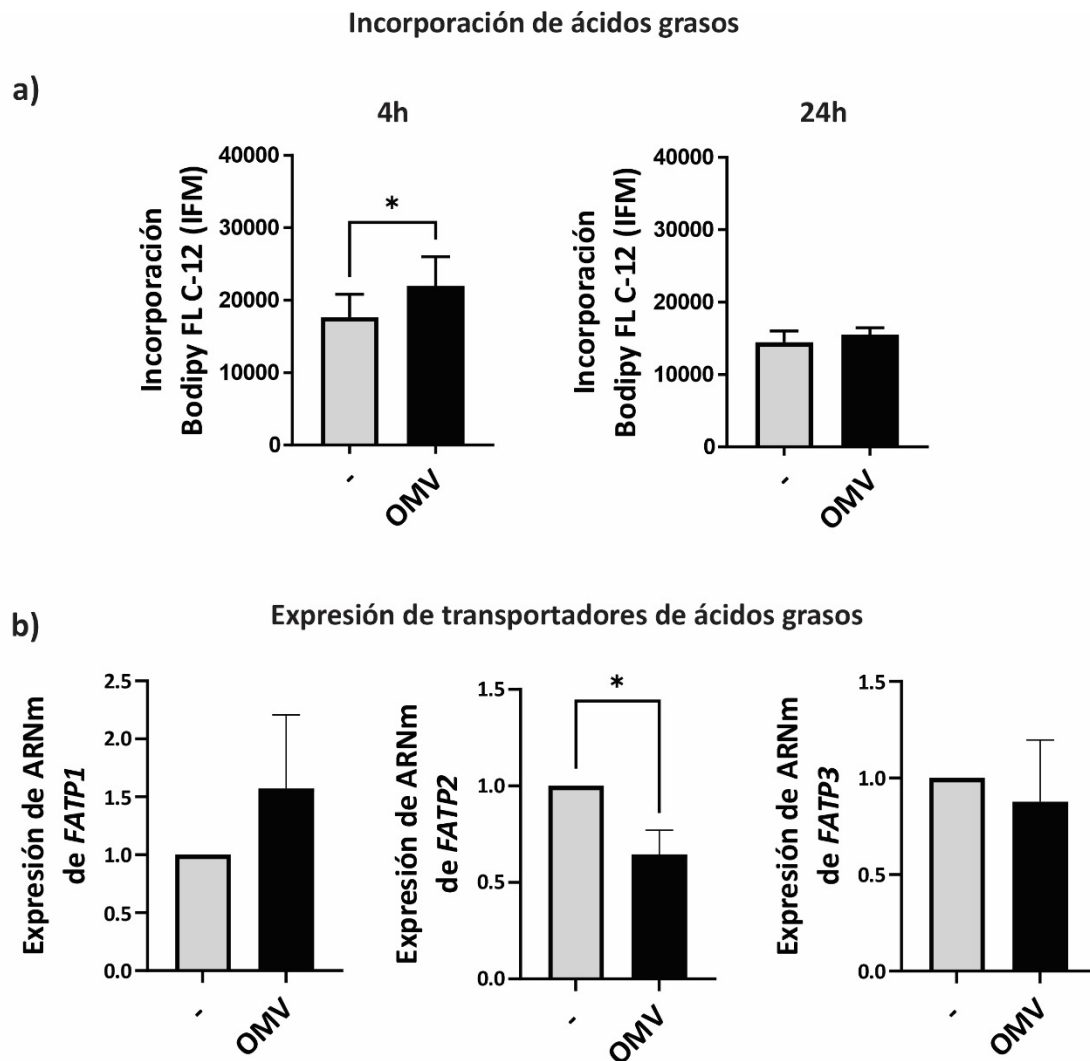


Figura 7. Las OMV de Pg modulan la incorporación de ácidos grasos de cadena larga en células Tb. Células Tb fueron estimuladas con OMV de Pg durante 4-24h. **a)** La incorporación de ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados fue evaluada usando la sonda fluorescente Bodipy FL-C12 por citometría de flujo. **b)** La expresión de ARNm de *FATP1*, 2 y 3 en células Tb fue evaluada por RTqPCR tras 6h de estímulo. Los valores representan la media $\pm$ E.S. (n=4) *p<0.05. Prueba t de Student pareada.

Las células trofoblásticas acumulan gotas lipídicas citoplasmáticas como reserva energética. Para profundizar en el impacto de las OMV de Pg sobre el metabolismo lipídico, evaluamos la acumulación de gotas lipídicas con la sonda Bodipy 493/503 mediante citometría de flujo y también por microscopía confocal. Por citometría de flujo no detectamos cambios significativos en la acumulación de gotas lipídicas (**Fig. 8a**). Sin embargo, el análisis por microscopía confocal reveló una leve tendencia a la disminución en el número y tamaño de estas estructuras (**Fig. 8b**). La ausencia de acumulación de gotas lipídicas, a pesar del aumento temprano en la captación de ácidos grasos de

cadena larga, sugiere que éstos podrían estar siendo utilizados en mayor medida como fuente energética que destinados a su almacenamiento o para la síntesis de mediadores bioactivos lipídicos.

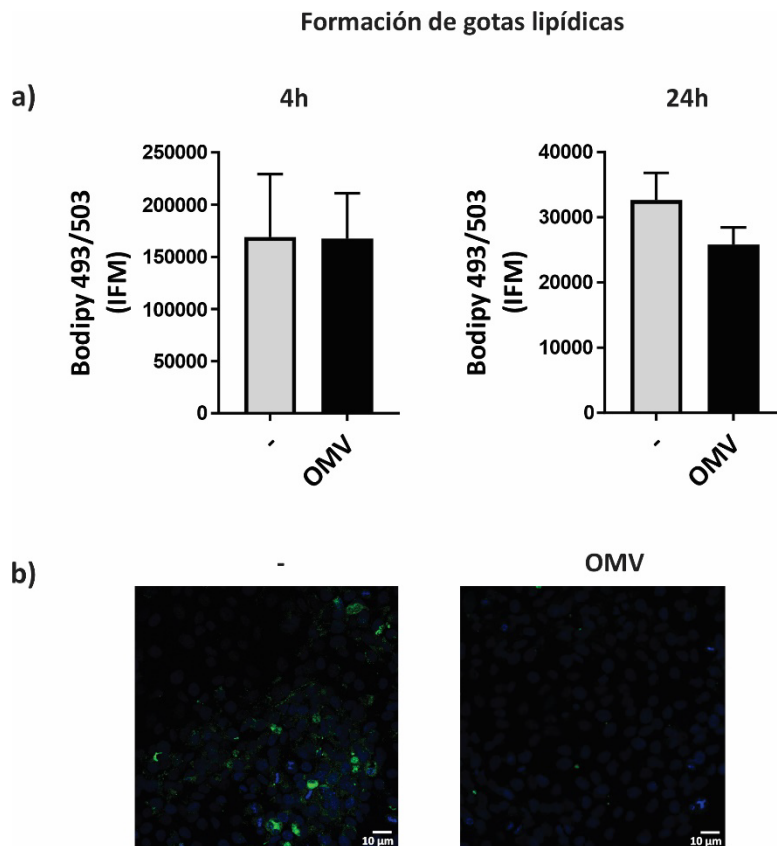


Figura 8. Efecto de las OMV sobre el metabolismo lipídico en células Tb. Células Tb fueron estimuladas con OMV de Pg durante 4-24h. **a)** La acumulación de gotas lipídicas se estudió utilizando la sonda Bodipy 493/503 y se evaluó mediante citometría de flujo. Media $\pm$ E.S. (n=4). **b)** Imagen representativa de microscopía confocal de células Tb estimuladas durante 4h con OMV de Pg donde se visualizan las gotas lipídicas marcadas con la sonda Bodipy 493/503 (verde). Las células fueron fijadas y los núcleos teñidos con DAPI. Aumento 60X.

Las OMV de Pg favorecen el metabolismo mitocondrial

Dado que tanto la glucosa como los ácidos grasos son nutrientes cuyo metabolismo converge en vías mitocondriales para la producción de ATP, y considerando que observamos que las OMV modulan la incorporación y el procesamiento de ambos nutrientes, nos propusimos estudiar si estas vesículas también impactan sobre el metabolismo mitocondrial de las células trofoblásticas. En particular, evaluamos si frente a la menor incorporación de glucosa y de su metabolismo tras la estimulación con OMV las células presentaban un aumento en la actividad mitocondrial, como una forma alternativa de sostener la demanda energética celular. Para profundizar en este aspecto,

evaluamos distintos parámetros relacionados con la actividad mitocondrial, incluyendo el potencial de membrana y la masa mitocondrial utilizando las sondas fluorescentes MitoTracker CMXRos y Mitospy green respectivamente; también la expresión de enzimas del ciclo TCA, y la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales (mtROS) y totales (ROS) por citometría de flujo empleando la sonda MitoSOX y DCFH-DA en cada caso. Asimismo, determinamos la tasa de consumo de oxígeno en un ensayo de estrés mitocondrial (MitoStress Test) utilizando la tecnología Seahorse XF (Agilent).

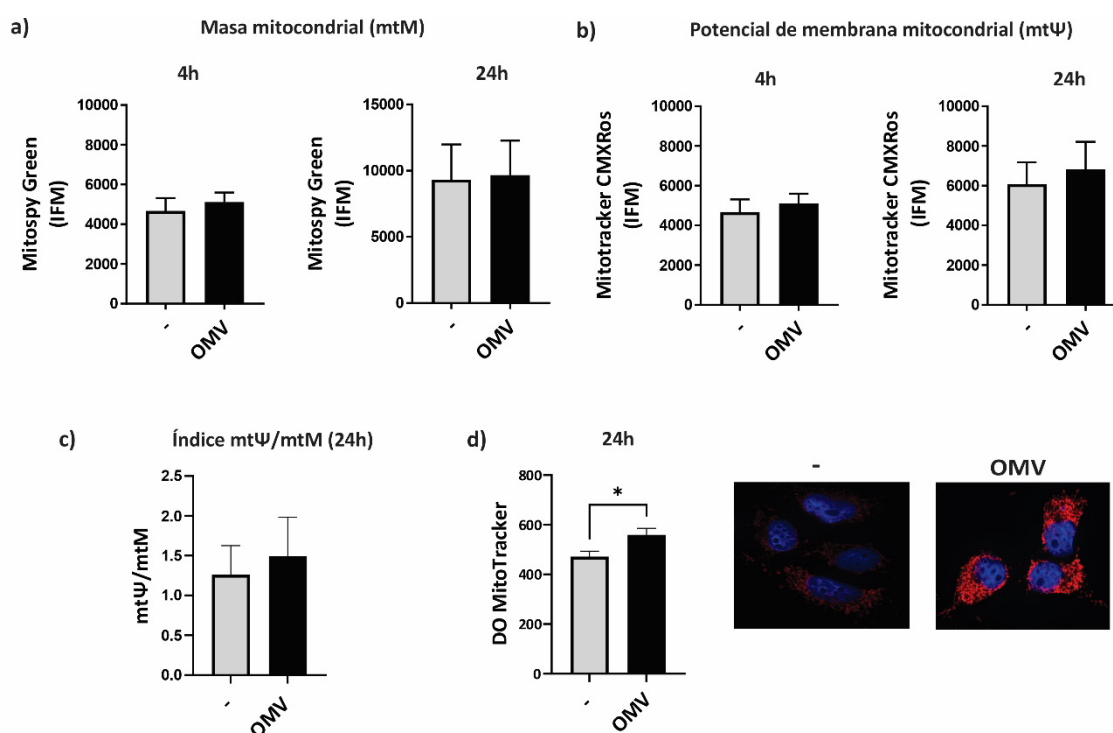


Figura 9. Las OMV de Pg aumentan el potencial de membrana mitocondrial en células Tb. Células Tb fueron incubadas con OMV de Pg durante 4-24h. **a)** La masa mitocondrial fue evaluada utilizando la sonda Mitospy Green mediante citometría de flujo. Los valores son la media $\pm$ E.S. (n=6). **b)** El potencial de membrana mitocondrial se estudió usando la sonda Mitotracker CMXRos y se evaluó por citometría de flujo (n=6). **c)** La viabilidad mitocondrial se expresó como un índice de la relación mtΨ/mtMasa. **d)** Adicionalmente se evaluó el potencial de membrana mitocondrial a las 24h de estímulo con OMV con la sonda Mitotracker CMXRos mediante microscopía confocal. Brevemente, se tomaron fotos de al menos 30 campos al azar y se cuantificó la densidad óptica de fluorescencia (roja) proveniente de las mitocondrias para cada condición. A la derecha se muestran imágenes representativas donde también se visualizan los núcleos teñidos con DAPI. *p<0.05. Prueba t de Student no pareada.

Como se puede observar en la **Figura 9** las OMV no modulan la masa mitocondrial mientras que se observa una tendencia al incremento del potencial de membrana mitocondrial en células trofoblásticas, medidas como intensidad de fluorescencia media por citometría (**Fig. 9a, b**). Tampoco se observaron diferencias en la relación entre la masa y el potencial de membrana (**Fig. 9c**). El potencial de membrana mitocondrial es un marcador de función mitocondrial crítico ²¹⁷que también puede evaluarse por microscopia, proporcionando información espacial de las mitocondrias. Empleando este método pudimos detectar un aumento significativo del potencial de membrana mitocondrial post tratamiento con OMV (**Fig. 9c**).

Por otro lado, observamos un aumento en la expresión de la subunidad B de succinato deshidrogenasa (*SDHb*), una enzima clave tanto del ciclo del ácido tricarboxílico como de la cadena de transporte de electrones. La expresión de otras enzimas del TCA, como isocitrato deshidrogenasa 1 (*IDH1*) y 2-oxoglutarato deshidrogenasa (*OGDH*), no mostraron diferencias significativas luego del estímulo con OMV de Pg (**Fig. 10**).

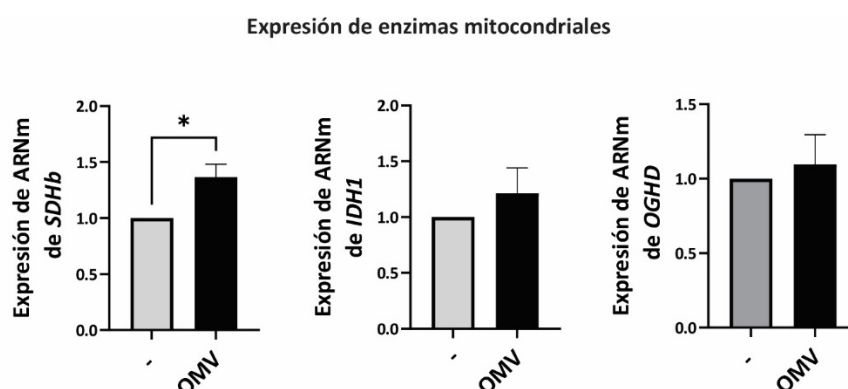


Figura 10. Las OMV de Pg alteran la expresión de enzimas mitocondriales. Células Tb fueron estimuladas durante 6h con OMV. Se evaluó la expresión de ARNm de succinato deshidrogenasa subunidad b (*SDHb*), isocitrato deshidrogenasa (*IDH1*) y de 2-oxoglutarato deshidrogenasa (*OGDH*). Los valores son la media $\pm$ E.S. (n=5), *p<0.05, Prueba t de Student pareada.

A su vez, evaluamos la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las células Tb tratadas con OMV mostraron un aumento en la generación de ROS mitocondriales detectadas con MitoSOX (**Fig. 11a**), mientras que la producción de ROS totales celulares, que incluyen fuentes no mitocondriales como las asociadas a la vía de las pentosas fosfato, no solo no se incrementó, sino que se redujo (**Fig. 11b**). En línea con esta observación, encontramos una disminución en la expresión de

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*G6PD*) (**Fig. 11c**), enzima clave responsable de ingresar glucosa a la vía de las pentosas fosfato (**Fig. 5a**).

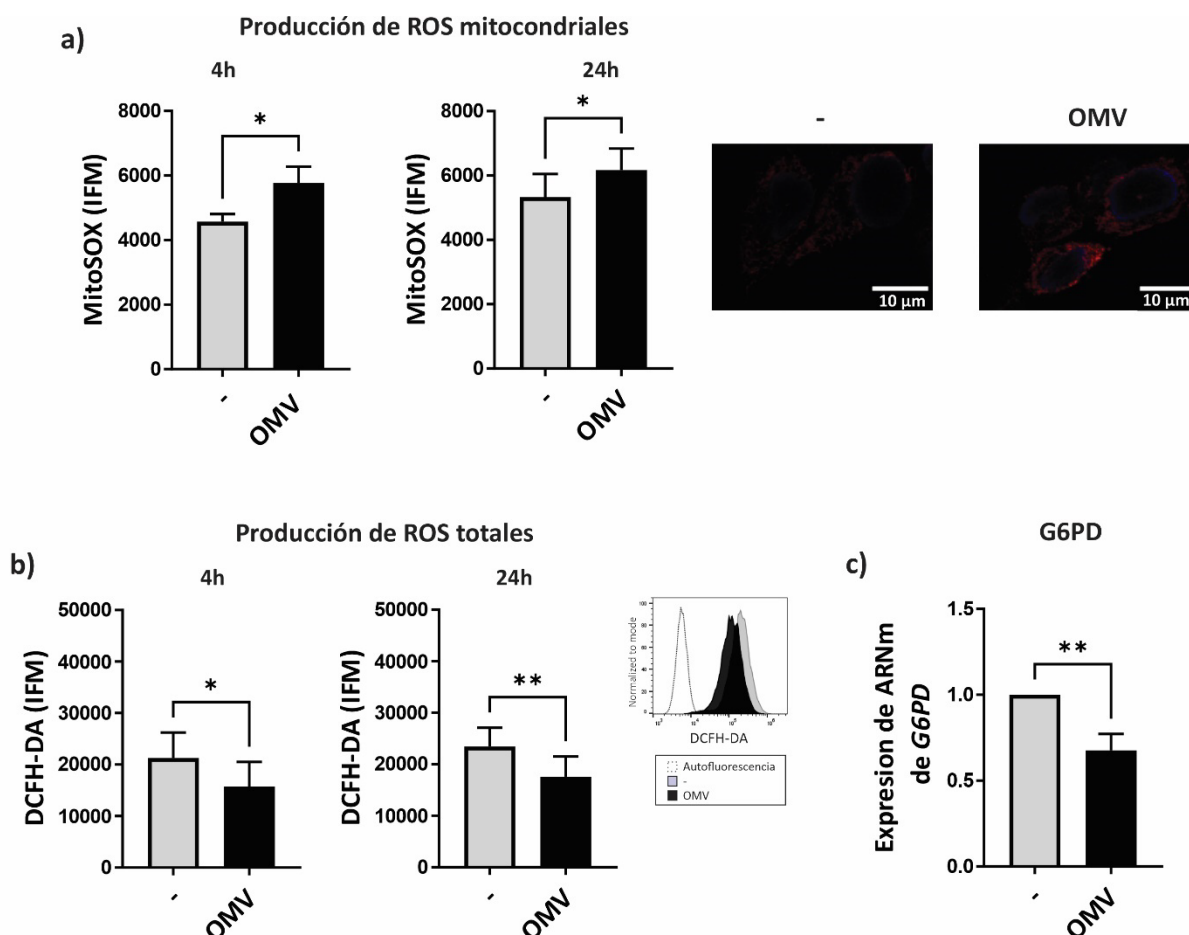


Figura 11. Las OMV de *Pg* modulan en forma diferencial la producción de ROS en células Tb. Células Tb fueron estimuladas con OMV de *Pg* durante 4-24h. **a)** La producción de ROS mitocondriales fue evaluada utilizando la sonda MitoSOX Red mediante citometría de flujo. A la derecha se muestran imágenes representativas de microscopía confocal utilizando dicha sonda y DAPI para visualizar los núcleos. Aumento 60x. Barra de escala: 10 μ m. **b)** La producción de ROS totales se determinó utilizando la sonda DCFH-DA. **c)** Expresión de ARNm de la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*G6PD*). En todos los casos los valores son la media $\pm$ E.S. (n=6), *p<0.05, **p<0.001. Prueba t de Student pareada.

Dado que observamos que las OMV reducían la producción de ROS totales, y considerando que bacterias anaerobias como *Pg* son capaces de modular las enzimas antioxidantes en las células del huésped como una estrategia de supervivencia^{218,219}, lo siguiente que evaluamos fue el potencial

de las OMV de Pg para prevenir la formación de ROS, enfocándonos particularmente en la actividad de la enzima catalasa. Como se observa en la **figura 12a**, el tratamiento con OMV aumentó la actividad catalasa en las células Tb tras 24h de estimulación. Para profundizar en la modulación del estrés oxidativo de las OMV sobre las células Tb, realizamos un ensayo de “rescate”, en el que las células fueron pretratadas durante 24h con OMV antes de ser expuestas a un inductor de estrés oxidativo como la rotenona. Tal como esperábamos, la rotenona aumentó los niveles de ROS totales, sin embargo, ese aumento se vio atenuado significativamente cuando las células Tb habían sido previamente tratadas con las OMV (**Fig. 12b**), lo que sugiere un efecto protector antioxidante de las OMV de Pg.

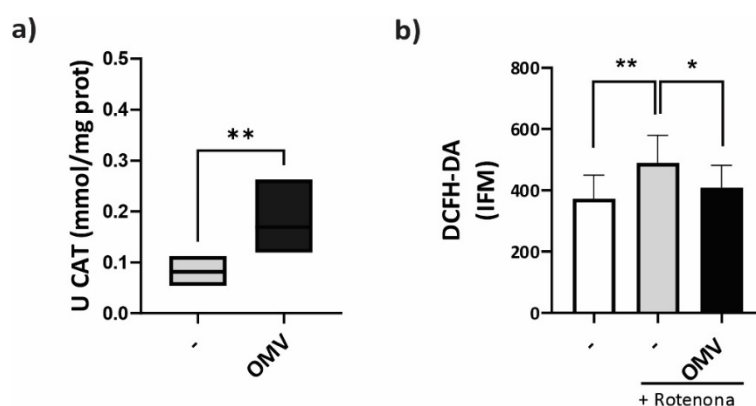


Figura 12. Las OMV de Pg modulan el estado oxidativo de las células Tb. Células Tb fueron incubadas con OMV de Pg durante 24h. **a)** Para evaluar la actividad antioxidante las células se lavaron, se lisaron y centrifugaron. La actividad enzimática de la catalasa se determinó en el sobrenadante obtenido, midiendo la descomposición de H_2O_2 a 240 nm. Los resultados se cuantificaron como UCAT (unidades de catalasa, definiéndola como la cantidad de enzima que degrada 1 mmol de H_2O_2 por minuto) por mg de proteína. (n=6), **p<0.01, Prueba t de Student pareada. **b)** Luego de la incubación con OMV, se agregó rotenona (200 μ M) por 1h más y la producción de ROS totales fue evaluada por citometría de flujo tal como se describió previamente. Los valores son la media $\pm$ E.S. (n=5), **p <0.01, *p <0.05.

Para profundizar en la dinámica respiratoria mitocondrial, realizamos un ensayo MitoStress utilizando tecnología Seahorse™ (**Fig. 13a**). Las células estimuladas con OMV presentaron un aumento en la tasa de respiración basal y máxima (**Fig. 13b, c**). Además, observamos un incremento en la producción de ATP mitocondrial y en la capacidad de reserva respiratoria, indicando que las mitocondrias responden al estímulo adaptativamente, aumentando su eficiencia bioenergética.

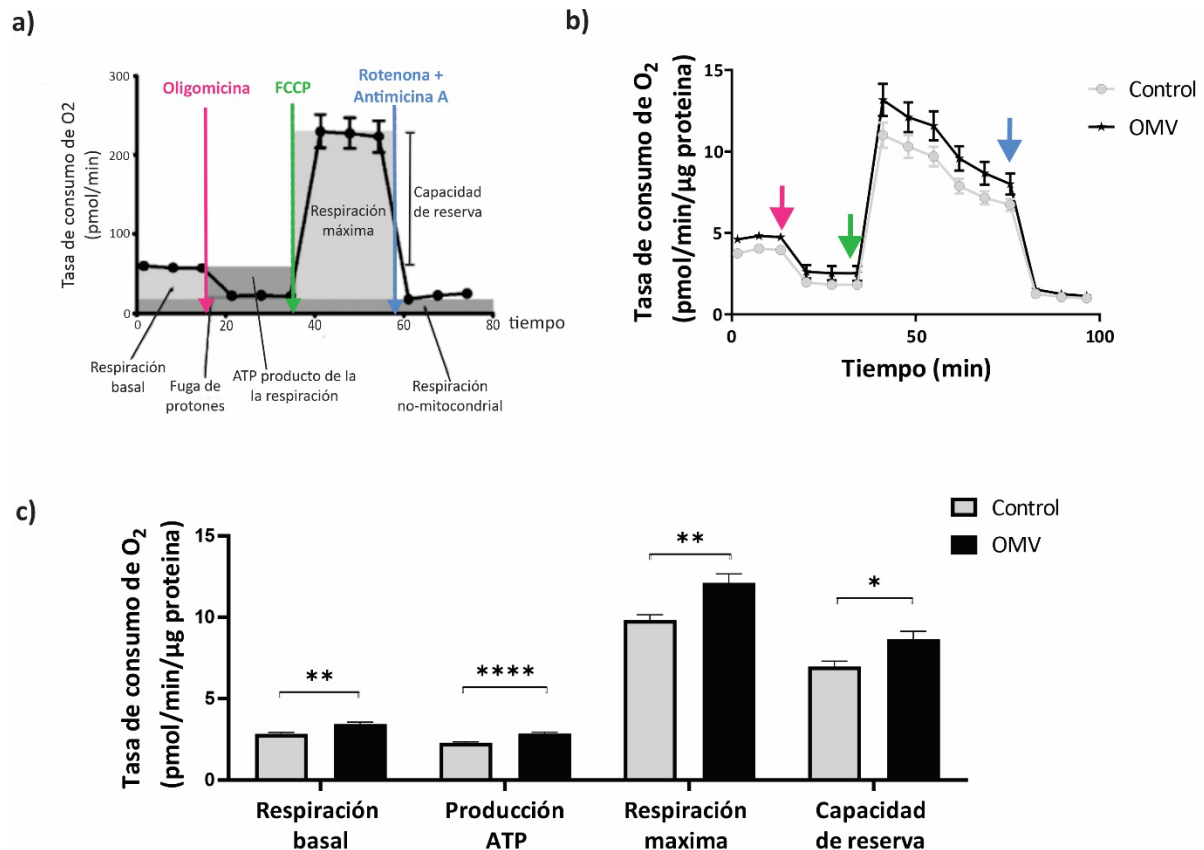


Figura 13. Las OMV de Pg aumentan la respiración basal y máxima mitocondrial, la producción de ATP relacionada a la respiración mitocondrial y la capacidad de reserva mitocondrial en las células Tb. **a)** Esquema de la prueba MitoStress, donde se usan inhibidores de la cadena de transporte de electrones (oligomicina 2,5 μM, FCCP 2 μM, 0,5 μM rotenona + antimicina A). **b)** Tasa de consumo de oxígeno en células Tb tratadas o no con OMV de Pg. Se muestra un ensayo representativo realizado con 6 réplicas en células HTR-8. Los valores representan la media ± E.S. de las réplicas. **c)** Parámetros calculados a partir de los ensayos de estrés mitocondrial como el que se muestra en b). Los valores corresponden a la media ± E.S., n=6 usando 3 cultivos de HTR-8 diferentes, ****p<0.0001, ** p<0.01, *p<0.05. Prueba t de Student no pareada.

Finalmente, al evaluar la apoptosis celular mediante citometría de flujo no detectamos diferencias significativas entre condiciones (**Fig. 14a**). De igual modo, determinamos que el ciclo celular no fue afectado por las OMV de Pg (**Fig. 14b**). Estos resultados en conjunto con lo observado en el ensayo de viabilidad celular (**Fig. 2d**) y en el índice de viabilidad mitocondrial (**Fig. 9d**) que no se modifican, sugieren que las alteraciones metabólicas inducidas por las OMV no afectan la viabilidad celular en este contexto.

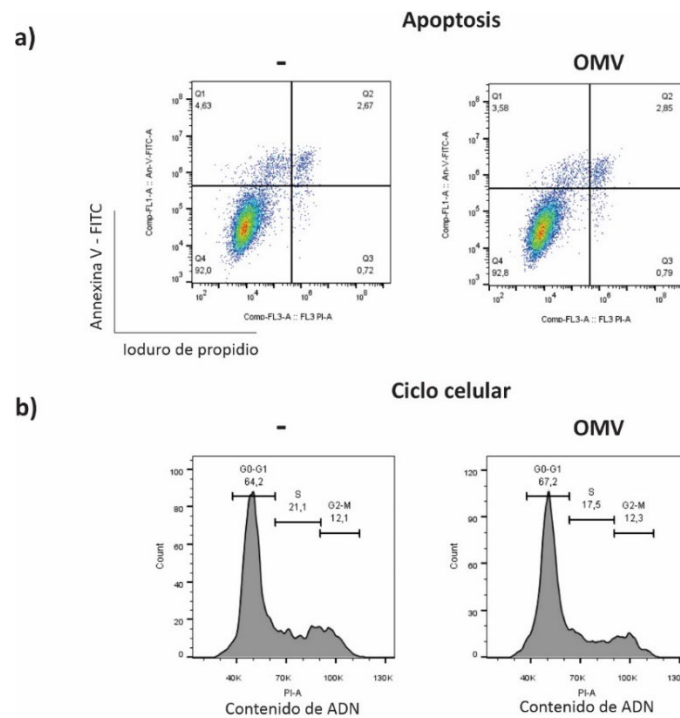


Figura 14. Las OMV de Pg no inducen muerte celular ni alteran el ciclo celular de células Tb. Para determinar la apoptosis **(a)** y el ciclo celular **(b)** a las 24h de estímulo con OMV, las células fueron marcadas con Anexina V e ioduro de propidio o con una mezcla de tinción que contiene ioduro de propidio y RNAsa, respectivamente. Se evaluó la marcación en ambos casos mediante citometría de flujo. Se muestran ensayos representativos en cada caso de tres similares con distintos cultivos de células Tb.

En conjunto, estos resultados indican que las OMV de Pg promueven una reprogramación metabólica en células trofoblásticas, favoreciendo el metabolismo oxidativo mitocondrial en paralelo con la reducción del metabolismo glucolítico, sin comprometer la viabilidad celular. Esta adaptación metabólica podría representar un mecanismo de compensación energética ante el estrés inducido por la exposición a las OMV de Pg.

Las OMV de Pg reducen la migración e invasión trofoblástica

En vista de los cambios metabólicos observados en las células Tb tras el estímulo de las OMV de Pg, y considerando que la migración y la invasión de células Tb son procesos de alto consumo energético que dependen principalmente de la captación de glucosa ¹⁹³, lo siguiente que hicimos fue estudiar el efecto de las OMV sobre la capacidad de migración e invasión trofoblástica. Como esperábamos, las OMV inhibieron la migración (**Fig. 15**) y la invasión (**Fig. 16**) de las células Tb.

Es importante destacar que los efectos de las OMV de Pg sobre la función trofoblástica también se observaron en las células Swan71, otra línea de células trofoblásticas humanas de primer trimestre que comparten características fenotípicas similares a las células extravelosas.

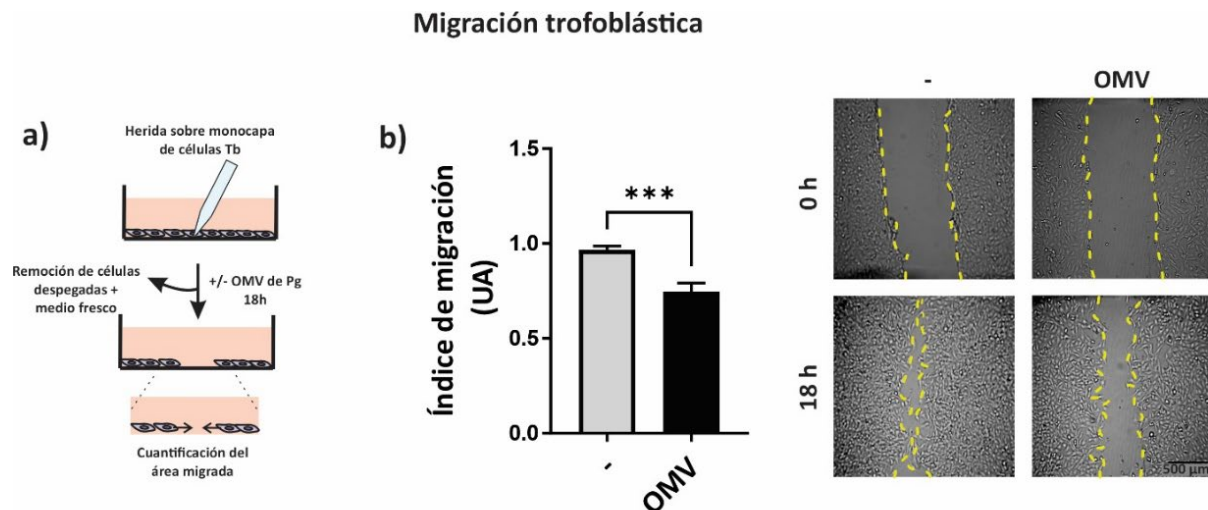


Figura 15. Las OMV de Pg disminuyen la capacidad migratoria de las células Tb. a) Se realizó una herida en la monocapa de células Tb crecidas hasta confluencia, luego se incubaron en presencia o ausencia de OMV de Pg. Se tomaron microfotografías a las 0 y 18h post herida, y se cuantificó la migración de las células usando el software Image J. Los valores representan la media $\pm$ E.S. de seis ensayos independientes, y se representó en unidades arbitrarias respecto a la migración control (-). Barra de escala= 500 μ m. ***p<0.001. Prueba t de Student pareada.

Durante el proceso de invasión, las células trofoblásticas secretan metaloproteinasas de matriz (MMPs), como MMP9, que degradan la matriz extracelular permitiendo su avance hacia los tejidos maternos. Consistente con estos resultados, se observó una menor expresión de ARNm de metaloproteinasa 9 (MMP9) e IL-6 (**Fig. 16 c**), una citoquina que potencia este comportamiento invasivo²²⁰. La disminución de IL-6 lo confirmamos por citometría de flujo (**Fig. 16 d**). En paralelo, se observó un aumento en la expresión de TIMP1 y TIMP2, inhibidores tisulares de MMPs (**Fig. 16c**).

Invasión trofoblástica

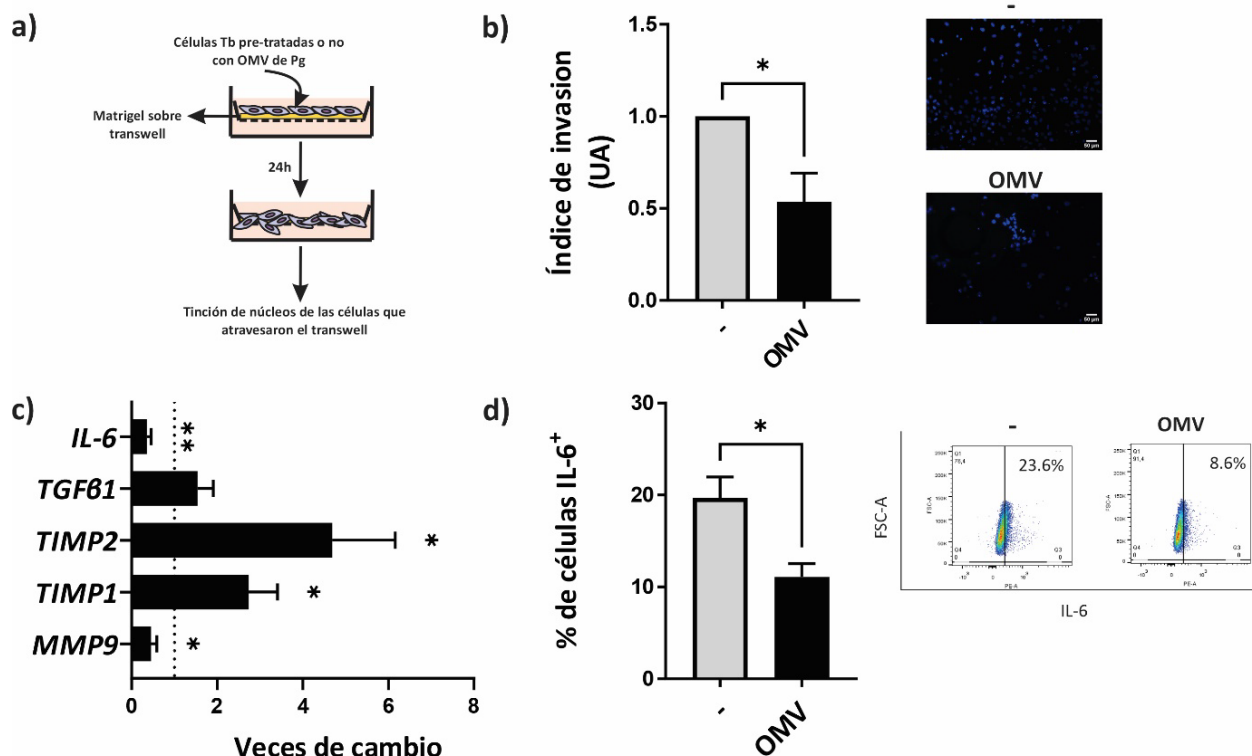


Figura 16. Las OMV de Pg suprimen la invasión de las células Tb. **a)** Para estudiar la invasión Tb, se cultivaron células pretratadas con OMV o no sobre transwells con poro 8 μm recubiertos con Geltrex (un sustituto de la matriz extracelular) por 24h. Luego se eliminaron las células que no invadieron y permanecían en la parte superior del inserto mientras que las células que lograron atravesar la matriz y migrar al lado inferior del *transwell* fueron fijadas y teñidas con DAPI para visualizar los núcleos. La membrana del transwell se montó sobre un portaobjetos y los núcleos se visualizaron y se cuantificaron mediante microscopía de fluorescencia. Se muestran microfotografías representativas de los experimentos. Aumento 10x, barra de escala= 50 μm . **b)** La invasión se expresó en unidades arbitrarias respecto a la invasión control (-). Los valores representan la media $\pm$ E.S. de tres ensayos independientes. **c)** Se evaluó la expresión de ARNm de enzimas, inhibidores y citoquinas asociadas al proceso de invasión Tb tras 6h de estímulo con OMV de Pg (n=6). **d)** La producción de IL-6 se evaluó luego de 24h de estímulo mediante citometría de flujo. A la derecha se muestra un *dotplot* representativo de tres ensayos independientes. **p<0.01, *p<0.05. Prueba t pareada de Student.

Las OMV de Pg disminuyen el flujo autofágico en células trofoblásticas

La autofagia es un proceso fisiológico crucial que está estrictamente regulado durante la gestación, en particular en etapas tempranas de la placentación ²⁰¹. Este mecanismo permite a las células adaptarse a condiciones de estrés, mediante el reciclaje de componentes intracelulares y la

preservación de la homeostasis energética. En células trofoblásticas, la autofagia no solo cumple un rol clave en el mantenimiento de la homeostasis y la viabilidad celular, sino que también ha sido implicada en la regulación de funciones esenciales como la migración e invasión²²¹.

Considerando que las OMV inducen cambios metabólicos y reducen la capacidad invasiva de las células Tb, lo siguiente que nos propusimos fue estudiar si este proceso podía estar vinculado con una modulación de la autofagia. Para esto evaluamos el flujo autofágico, es decir, la dinámica del proceso de formación y degradación de autofagosomas (**Fig. 17**). Utilizamos Bafilomicina A1 (Baf A1), un inhibidor de la fusión entre autofagosomas y lisosomas, que permite distinguir si los cambios en los niveles de proteínas autofágicas se deben a una activación del proceso o a un bloqueo en su resolución.

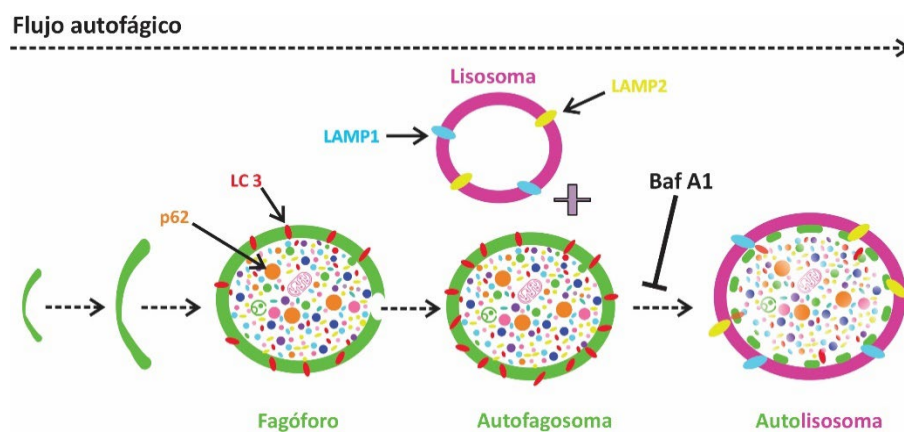


Figura 17. Esquema del flujo autofágico y sus componentes. Para estudiar el flujo autofágico se utilizan inhibidores de la acidificación lisosomal (en este caso utilizamos Baf A1) con el objetivo de prevenir la fusión de autofagosomas con lisosomas formando autolisosomas, evitando la degradación de las moléculas marcadoras de fagóforos (LC3, p62). La acumulación de vesículas positivas para estos marcadores sugiere que el flujo autofágico está bloqueado porque no se estarían degradando, mientras que su disminución en el tiempo es indicadora de que el flujo transcurre normalmente porque se van degradando los componentes en el autolisosoma.

El análisis del flujo autofágico se realizó mediante microscopía confocal, cuantificando el número de vesículas positivas para LC3 y p62, dos marcadores complementarios, cuya acumulación indica un bloqueo de este proceso. Como se observa en la **Figura 18**, en condiciones control, el tratamiento con Baf A1 produjo un aumento significativo en el número de vesículas positivas para LC3 y p62, sin embargo, en células tratadas con OMV este incremento inducido por Baf A1 se pierde, sugiriendo que el flujo autofágico se encuentra inhibido.

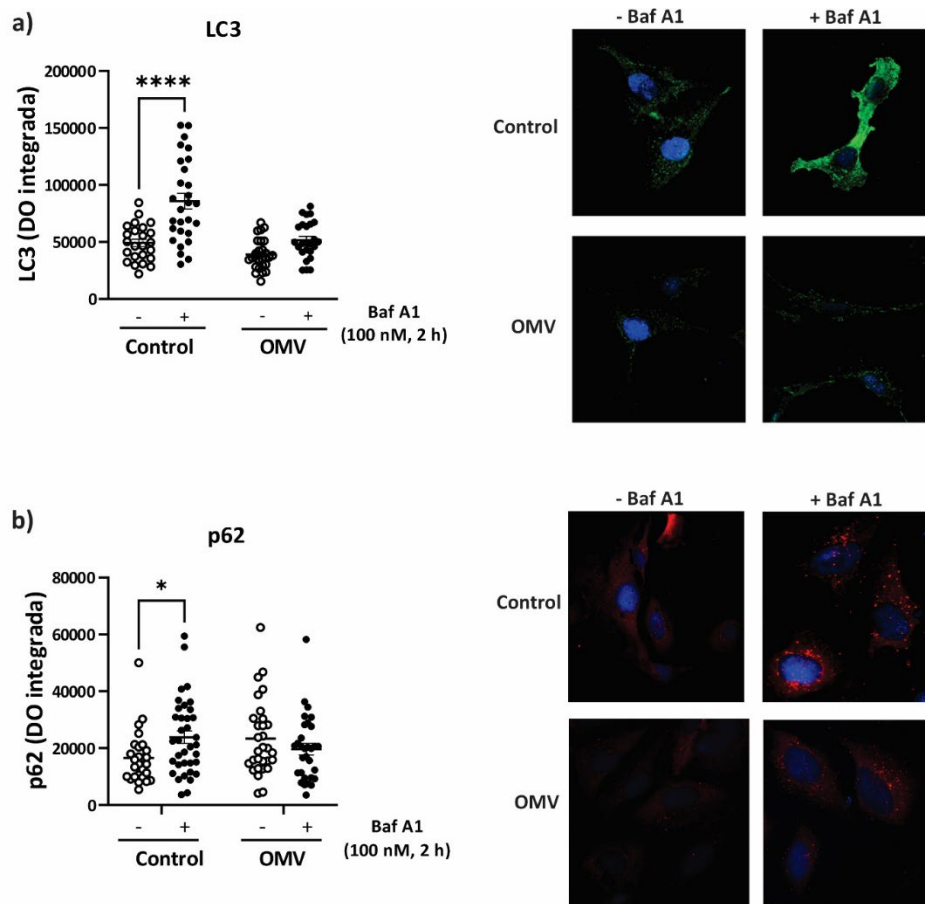


Figura 18. Las OMV de *Pg* disminuyen la autofagia en las células *Tb*. Células *Tb* fueron estimuladas con OMV de *Pg* durante 24h. Para frenar el flujo autofágico se añadió 100 nM de Baf A1 (o DMSO como control) durante 2h, y luego las células se fijaron y marcaron con anticuerpos para LC3 **(a)** y p62 **(b)** respectivamente, para evaluar formación de autofagosomas. Las células se visualizaron en un microscopio confocal y se tomaron fotos de al menos 5 campos por condición. Se cuantificó la densidad óptica integrada de la señal de las vesículas positivas para los marcadores de al menos 30 células por campo, utilizando el programa ImageJ. **** $p < 0.0001$, * $p < 0.05$, ANOVA de dos factores, seguido por una prueba de Tukey.

Dado que los lisosomas participan activamente en la etapa final de la autofagia mediante la fusión con autofagosomas y la degradación del contenido intracelular secuestrado, a continuación, evaluamos la expresión de LAMP1 y LAMP2, así como el área lisosomal total mediante tinción con LysoTracker y análisis por microscopía confocal.

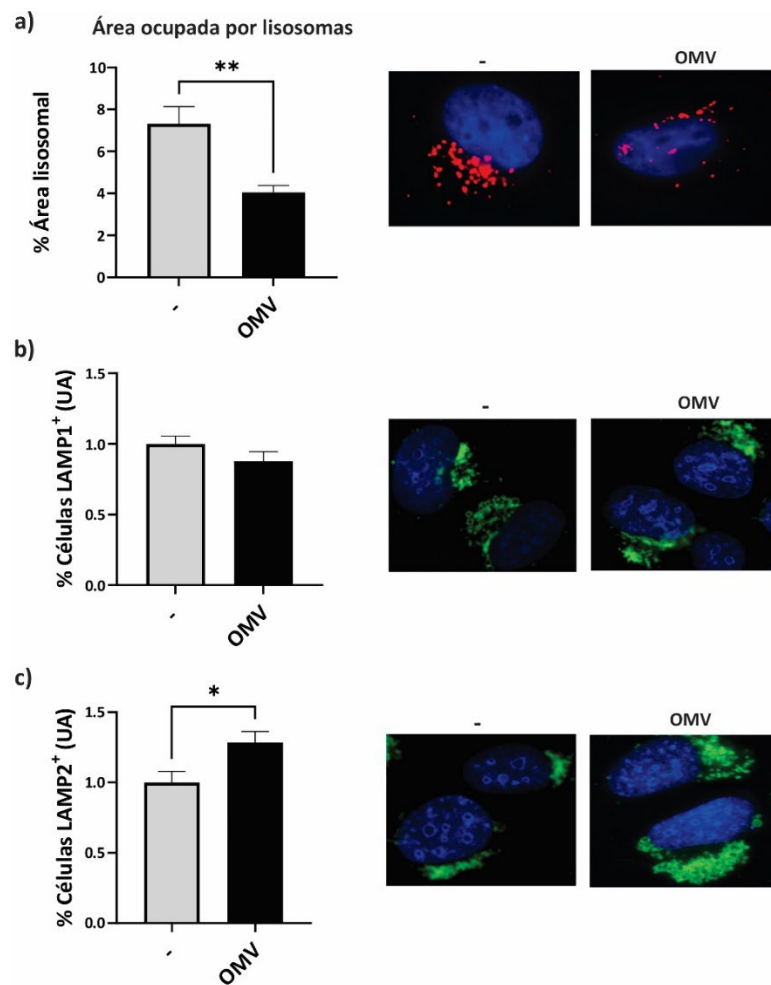


Figura 19. Las OMV de Pg reducen el área ocupada por lisosomas en las células Tb. Células Tb fueron estimuladas con OMV de Pg durante 24h. Luego de la incubación se evaluaron los lisosomas mediante dos aproximaciones: **(a)** tinción con LysoTracker Red durante 30 min para marcar los lisosomas y luego se lavó, fijación y montaje. **(b-c)** inmunofluorescencia con anticuerpos específicos LAMP1 y LAMP2 respectivamente. Las células se visualizaron en un microscopio confocal y se tomaron fotos de al menos 5 campos por condición (vidrio), y se cuantificó el porcentaje del área lisosomal de al menos 30 células, que es el cociente del área ocupada por lisosomas sobre el área celular. El porcentaje de células positivas para LAMPs fue expresada en unidades arbitrarias respecto al control sin tratar (-). Los valores son la media $\pm$ E.S. ****** $p < 0.001$, ***** $p < 0.05$. Prueba t de Student no pareada.

Como se puede ver en la **Figura 19a**, encontramos que en las células Tb tratadas con OMV disminuyó significativamente el área lisosomal. Al analizar los niveles de proteínas de membrana lisosomal, observamos una tendencia a la reducción de LAMP1, mientras que LAMP2 se encontró aumentada (**Fig. 19 b, c**). Dado que LAMP2 se expresa mayoritariamente en placenta y juega un rol más directo en la fusión lisosomal con autofagosomas y en la degradación eficiente del contenido intracelular ²²², estos resultados sugieren que las OMV no solo afectan la cantidad de lisosomas, sino

también su funcionalidad, contribuyendo a un flujo autofágico disminuido. La disminución de LAMP1 podría ser un intento compensatorio, aunque esto requiere confirmación en futuros estudios.

Por último, teniendo en cuenta que la migración Tb como se mencionó anteriormente está fuertemente asociada con la autofagia nos propusimos evaluar si la alteración en el flujo autofágico inducida por las OMV está relacionada con la disminución en la migración observada previamente (**Fig. 15**). Para ello, realizamos ensayos funcionales utilizando moduladores farmacológicos de la autofagia (**Fig. 20**). Al inhibir la autofagia con 3-metiladenina (3-MA), observamos que las células trofoblásticas control presentaban una marcada disminución en su capacidad migratoria, confirmando que una autofagia activa es necesaria para sostener una migración eficiente. Por otro lado, al inducir la autofagia con rapamicina (RAPA), encontramos que las células tratadas con OMV recuperaban su capacidad migratoria, alcanzando valores comparables a los del control (**Fig. 20b**). Estos resultados indican que la disminución en la migración inducida por las OMV podría estar asociada, al menos en parte, con la disrupción del flujo autofágico.

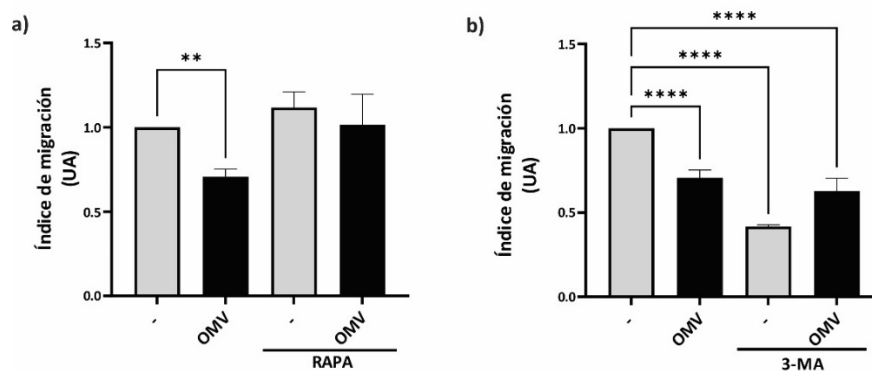


Figura 20. La disminución de la migración Tb está asociada con la inhibición del flujo autofágico. Células Tb crecidas en monocapa fueron tratadas con el inductor de la autofagia rapamicina **(a)** o el inhibidor 3-metiladenina **(b)** durante 1h, luego se realizó una herida y se incubaron en presencia de OMV de Pg durante 18h. Se tomaron fotos a las 0 y 18h y el área migrada fue cuantificada. Los valores representan la media $\pm$ E.S. de seis ensayos independientes, y se representó en unidades arbitrarias respecto a la migración control (-). **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$. ANOVA seguido por una prueba de Dunnet.

El tratamiento *in vivo* con OMV de Pg induce complicaciones gestacionales

Para evaluar la relevancia fisiopatológica de los resultados *in vitro*, quisimos investigar si el tratamiento *in vivo* con OMV de Pg altera el desarrollo placentario y fetal. Para esto realizamos una única inyección i.p. con OMV en hembras C57BL/6 al día 6,5 de gestación, luego de la implantación embrionaria que ocurre al día 4,5 y previo a la placentación completa.

En primer lugar, evaluamos si las OMV de Pg alcanzan los sitios de implantación en el útero gestante tras su administración al día 6,5 de gestación. Para ello, utilizamos OMV marcadas con la sonda fluorescente PKH-67 y 6h post-tratamiento se recolectaron los sitios de implantación y se realizaron cortes por criostato. Los tejidos fueron contrateñidos con DAPI para visualizar los núcleos celulares. Como se muestra en la figura (**Fig. 21**), se detectaron señales fluorescentes compatibles con la presencia de OMV en el sitio de implantación, lo que confirma que estas vesículas pueden alcanzar la interfase materno-fetal.

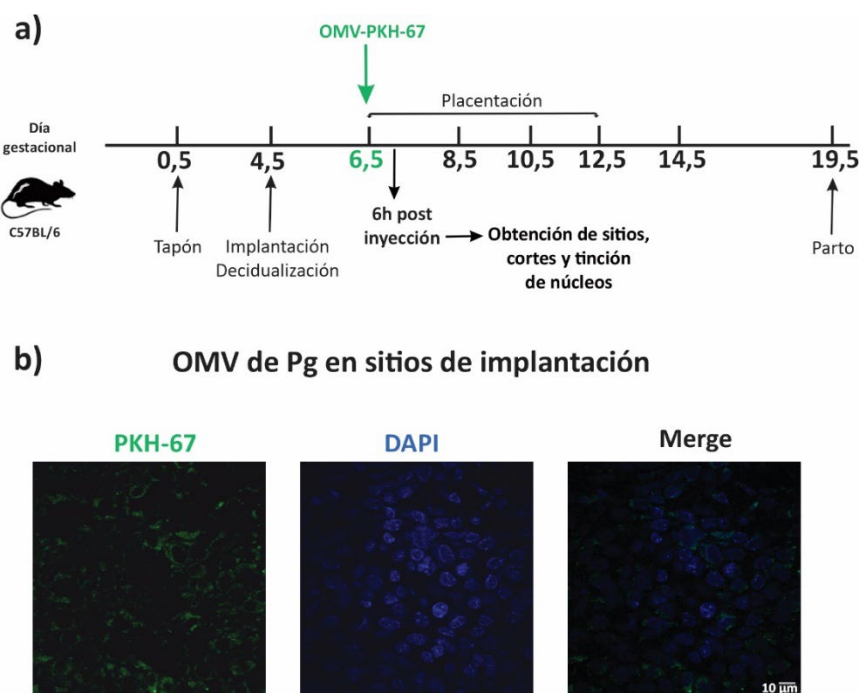


Figura 21. Las OMV de Pg alcanzan la interfase materno-fetal *in vivo*. **a)** Seis horas después de la inyección intraperitoneal con OMV de Pg marcadas con PKH-67, se obtuvieron los sitios de implantación y se fijaron durante toda la noche en una solución de PFA al 4%, y luego se cortaron a 60 µm en un microtomo vibratorio y se tiñeron con DAPI para visualizar los núcleos por microscopía confocal. **b)** Imágenes representativas de las OMV (verde) en los sitios de implantación. Aumento 60x. Barra de escala: 10µm.

A continuación, evaluamos si el tratamiento con OMV altera parámetros de la gestación, como su duración y la tasa de reabsorción embrionaria. No se observaron diferencias significativas entre grupos tratados y controles: ambos presentaron un promedio de 7 ± 1 crías por camada y una duración de gestación de $19,5 \pm 0,5$ días. Posteriormente, analizamos el impacto de las OMV sobre el peso fetal y placentario en el día 14,5 de gestación. Observamos una reducción significativa en el peso fetal con relación a la edad gestacional en las hembras tratadas con OMV (**Fig. 22a**), acompañada por una disminución en el peso de las placentas (**Fig. 22b**). Estos resultados sugieren un compromiso en la función placentaria. De hecho, cuando evaluamos la eficiencia placentaria, que es un índice que indica la capacidad de la placenta para intercambiar nutrientes y oxígeno como también desechos con el feto, encontramos que se hallaba disminuida tras el tratamiento. Este resultado es consistente con un efecto deletéreo *in vivo* de las OMV de Pg, generando una función placentaria ineficiente (**Fig. 22c**).

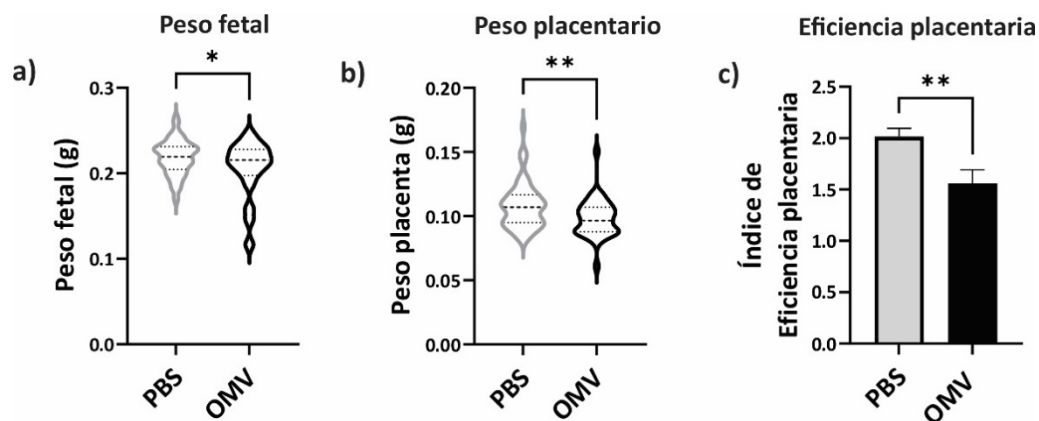


Figura 22. El tratamiento con OMV de Pg reduce el peso placentario y fetal y altera la eficiencia placentaria en un modelo murino. Hembras C57BL/6 preñadas fueron inyectadas intraperitonealmente el día 6,5 de gestación con 5 $\mu\text{g/kg}$ de OMV de Pg o PBS como control. Se evaluó el peso fetal (**a**) y placentario (**b**) en gramos en el día 14,5 de gestación. Los valores corresponden a grupos de al menos seis hembras preñadas de cada tratamiento. **c**) Para calcular la eficiencia placentaria, se realizó un cociente entre el peso fetal y el peso de su respectiva placenta para cada tratamiento. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Prueba de Mann Whitney.

Consistente con los resultados obtenidos en células trofoblásticas humanas (**Fig. 4b**), detectamos una menor expresión de GLUT1 en las placentas de ratones tratados con OMV, y una tendencia a la reducción de GLUT3 (**Fig. 23**), lo cual podría contribuir a un transporte deficiente de glucosa hacia el feto y explicar en parte la deficiencia placentaria y el menor crecimiento fetal observado.

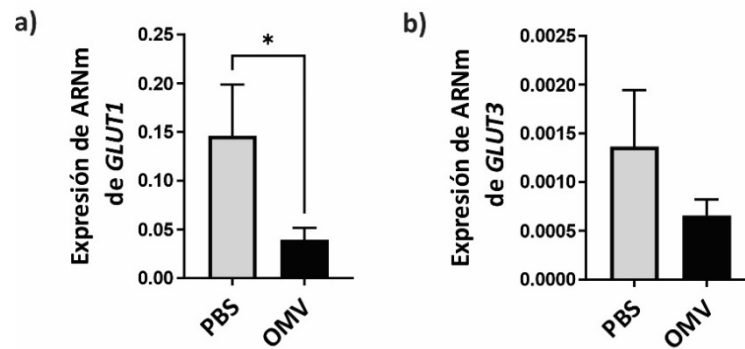


Figura 23. El tratamiento con OMV de Pg reduce la expresión de transportadores de glucosa en la placenta. Se inyectó intraperitonealmente a hembras C57BL/6 en el día 6,5 de gestación con 5 μ g/kg de OMV de Pg o PBS como control. Se aislaron las placentas de al menos seis hembras preñadas de cada tratamiento en el día 14,5 de gestación y se extrajo el ARN de éstas. Los niveles de ARNm de *GLUT1* y *GLUT3* se evaluaron mediante RTqPCR. Los valores son la media $\pm$ E.S. * $p < 0.05$. Prueba de Mann Whitney.

Al evaluar la histología de las placentas obtenidas el día 14,5 de gestación, observamos que el tratamiento con OMV afectó la organización tisular, particularmente en la zona de laberinto (**Fig. 24a**), donde se ven alteraciones estructurales compatibles con hipertrofia en las células trofoblásticas. Dentro de la zona de unión observamos extensión de las células trofoblásticas gigantes con una tendencia a aumentar el grosor (**Fig. 24b**).

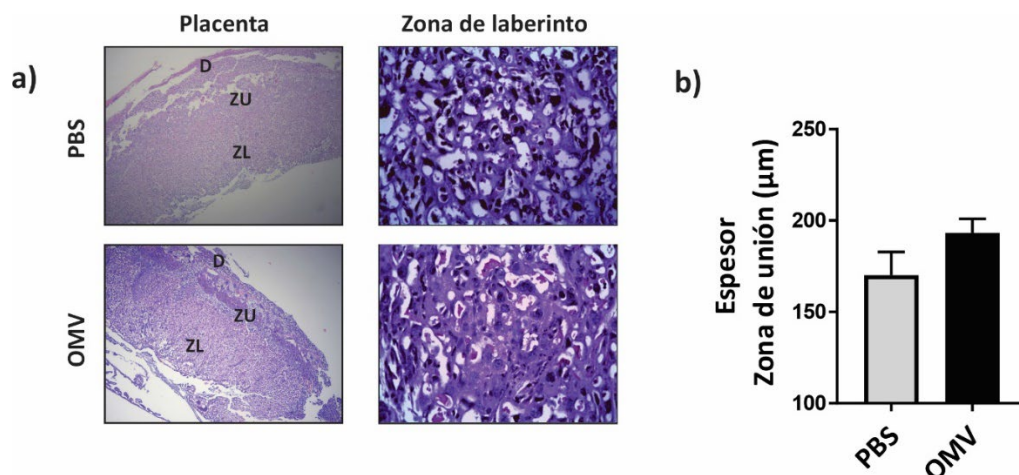


Figura 24. El tratamiento con OMV de Pg alteró la estructura placentaria en un modelo murino. **a)** Imágenes representativas de la histología de la placenta en el día gestacional 14,5. Panel izquierdo: aumento $\times 4$ de la sección transversal de la placenta que muestra la decidua materna (D), la zona de unión (ZU) y la zona del laberinto (ZL). Panel derecho: aumento $\times 40$ de la capa de la zona laberíntica placentaria. **b)** Cuantificación del espesor de la zona de unión.

CAPITULO 2:

Las OMV de *Porphyromonas gingivalis* alteran la interacción de las células trofoblásticas con las células endoteliales e inmunes

Las OMV de Pg alteran la expresión de mediadores angiogénicos e inflamatorios en células trofoblásticas

La interacción cooperativa entre los leucocitos maternos reclutados a la decidua, las células vasculares y las células Tb en la interfase materno-placentaria es fundamental para la remodelación vascular y el mantenimiento de la homeostasis inmunológica ^{110,124}. Las células Tb se diferencian a un fenotipo invasivo que interactúa con las células endoteliales vasculares como un paso crucial para la transformación de los vasos sanguíneos y la placentación adecuada ^{115,223}. A su vez, los factores liberados por las células Tb regulan la actividad y el reclutamiento de células inmunes, como monocitos y neutrófilos, ^{223,224} contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis placentaria ^{225,226}.

Dado el impacto de las OMV sobre el metabolismo y funciones de las células Tb descripto antes y teniendo en cuenta que las OMV de Pg han sido implicadas en la modulación de la respuesta inflamatoria y en la disrupción de la función endotelial en diversos modelos, nos preguntamos si las vesículas de membrana externa de *Porphyromonas gingivalis* modulan la expresión de los principales mediadores angiogénicos e inflamatorios en las células trofoblásticas.

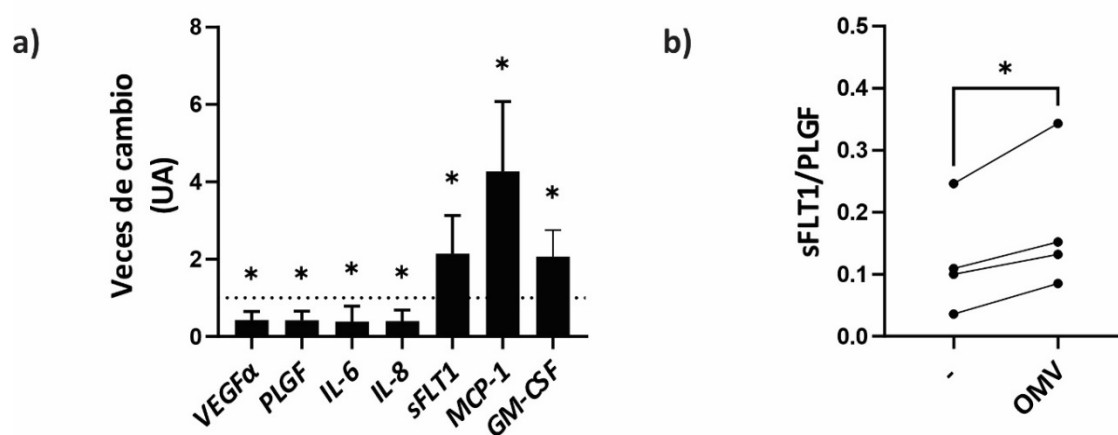


Figura 25. Las OMV de Pg alteran el perfil angiogénico e inflamatorio de las células Tb. **a)** Se evaluó la expresión de ARNm en células Tb tratadas con OMV de Pg durante 6h mediante RTqPCR. Los valores que se muestran en las barras negras corresponden a los niveles de expresión (media ± E.S.) en las células tratadas respecto a las células sin tratar (línea punteada) (n=4). **b)** Cociente sFLT1/PLGF calculado para células Tb sin tratar (-) o tratadas con OMV de Pg. *p < 0,05, prueba t de Student pareada.

Como se puede observar en la **Figura 25**, encontramos que el tratamiento con OMV indujo una modulación selectiva de marcadores inflamatorios y angiogénicos, con una expresión reducida de *IL-8*, *IL-6*, *PIGF* y *VEGF- α* acompañada de una mayor expresión de *s-Flt-1*, *MCP-1* y *GM-CSF* (**Fig. 25a**). Sobre la base de que la relación *sFlt-1*/PIGF ha sido aprobada como una ayuda diagnóstica junto con otros hallazgos clínicos para la PE y validada como una prueba predictiva²²⁷, se calculó la relación *sFlt-1*/PIGF y se encontró que aumentaba por el tratamiento con OMV (**Fig. 25b**).

Las células Tb pre-condicionadas por OMV de Pg alteran la migración y activación de las células endoteliales

La remodelación de las arterias espiraladas uterinas es fundamental para una adecuada placentación. Dicho proceso depende de la interacción entre las células Tb y las células endoteliales de los vasos maternos. Diversas condiciones pueden interferir con esta remodelación, entre ellas, las infecciones maternas. Dado el desequilibrio en la expresión de mediadores pro y anti- angiogénicos inducidos en las células Tb por el tratamiento con OMV de Pg (**Fig. 25**), nos preguntamos si las OMV afectan la interacción Tb-endotelio. Para estudiar la interacción celular se prepararon medios condicionados provenientes de las células Tb tratadas o no con OMV (**Fig. 26**) y estos medios fueron utilizados para estimular células endoteliales.

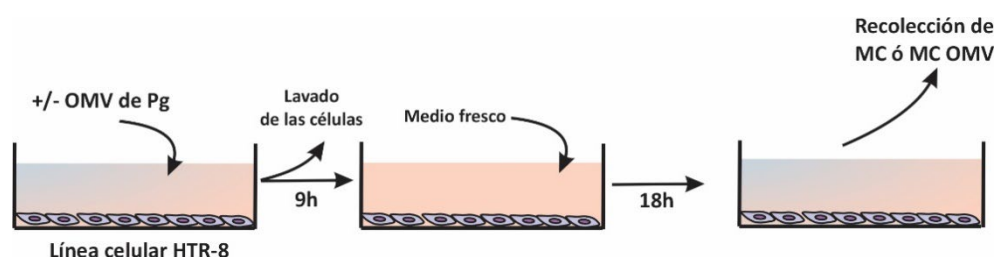


Figura 26. Generación de medios condicionados de células Tb. Para obtener los medios condicionados, se estimularon células Tb (línea HTR-8) con OMV de Pg durante 9h. Luego se realizaron dos lavados sucesivos para retirar las OMV no incorporadas por las células y se renovó el medio de cultivo. Las células se incubaron *overnight*, y los medios condicionados de células Tb sin tratar (MC) o tratadas con OMV (MC OMV) fueron recolectados. Se comprobó la ausencia de OMV en los MC como se describe en Materiales y Métodos.

En primer lugar, evaluamos el efecto de los medios condicionados sobre la capacidad migratoria de las células endoteliales. Encontramos que el MC OMV disminuye significativamente la migración de las células endoteliales luego de 18h de incubación en comparación con el MC (**Fig. 27**).

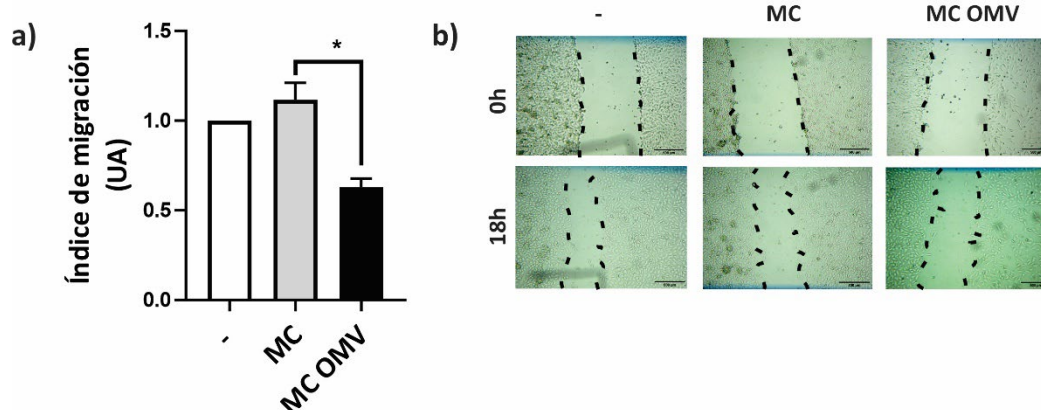


Figura 27. El MC OMV disminuye la capacidad migratoria de las células endoteliales. **a)** Se realizó una herida en una monocapa de células endoteliales Ea.hy926 crecidas hasta confluencia y luego se incubaron con DMEM 0 %SFB (-) como control, o en presencia de MC o MC OMV durante 18h. Se tomaron microfotografías a las 0 y 18h post herida y se cuantificó la migración de las células usando el software Image J. Los valores representan la media $\pm$ E.S. de cuatro ensayos independientes, representados en unidades arbitrarias respecto a la migración control (-). Barra de escala= 500 μ m. * $p < 0.05$. ANOVA seguido por prueba de Bonferroni. **b)** Microfotografías representativas del ensayo.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son derivados reactivos del oxígeno molecular que desempeñan funciones de señalización en diversos procesos celulares. No obstante, cuando su producción excede la capacidad de los sistemas antioxidantes celulares, se genera un estado de estrés oxidativo que afecta la función endotelial con el consecuente daño vascular. Entre los efectos nocivos de las ROS se incluyen la inducción de apoptosis en células endoteliales (ECs), el incremento de su adhesividad a monocitos y la alteración de su capacidad angiogénica. Teniendo en cuenta el efecto modulador de las OMV sobre el estado oxidativo en las células Tb (**Fig. 12**), nos propusimos evaluar si el medio condicionado proveniente de células trofoblásticas tratadas con OMV era capaz de inducir cambios en los niveles de ROS. Tal como se muestra en la **Figura 28a**, la exposición de células endoteliales al MC OMV resultó en un aumento significativo en la producción de especies reactivas de oxígeno en comparación con el control no tratado.

Un factor que contribuye a la disfunción endotelial es su activación y la consecuente adhesión de leucocitos que circulan por los capilares. Por lo tanto, a continuación, evaluamos este proceso mediante un diseño *in vitro*, analizando la adhesión de monocitos a las células endoteliales como un marcador de activación endotelial. Como se muestra en las **Figuras 28b, c** las células endoteliales pretratadas con MC OMV se activan generando mayor adhesión de monocitos.

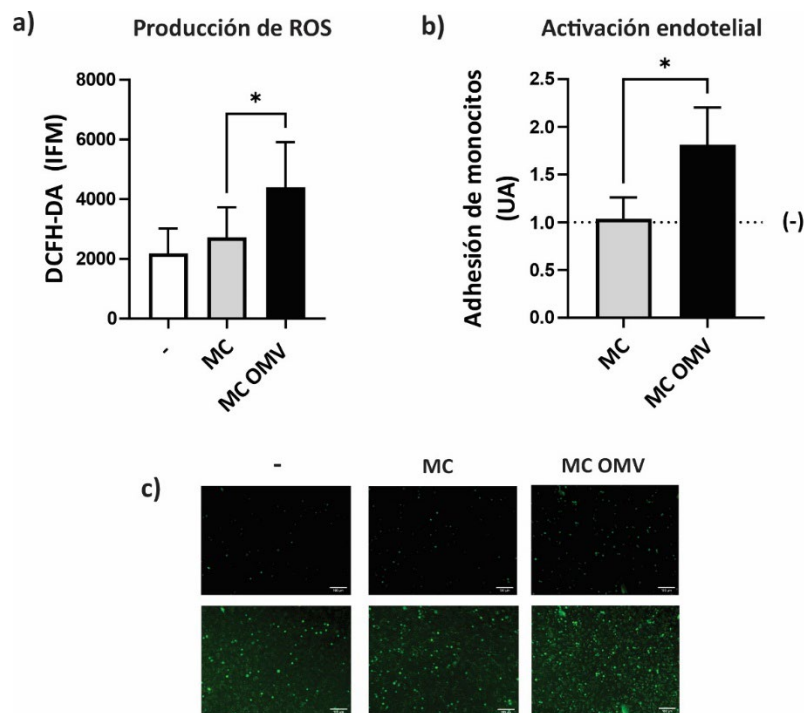


Figura 28. Las células Tb tratadas con OMV Pg activan a las células endoteliales. Células Ea.hy926 fueron pretratadas o no (-) con MC o MC OMV durante 24h. **a)** Se evaluó la producción de ROS como se describió previamente utilizando la sonda DCFH-DA. Los valores representan la IFM para cada condición de 5 ensayos independientes. **b)** Células THP-1 fueron marcadas con calceína verde AM (5 μ M) y se co-cultivaron con las células endoteliales durante 1h para permitir su adhesión. Transcurrido el tiempo, se lavaron las células y se tomaron imágenes con un microscopio de fluorescencia para evaluar las células monocíticas adheridas al endotelio. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias respecto a la adhesión monocítica control (-) de 4 ensayos independientes. **c)** Imágenes representativas del ensayo de activación endotelial, en el panel superior se muestran las imágenes bajo microscopio de fluorescencia y en el panel inferior imágenes en campo claro. * $p < 0.05$. Barra de escala= 100 μ m.

Las células Tb al ser estimuladas con OMV de Pg atraen neutrófilos y los activan

La activación y el reclutamiento de neutrófilos en la interfase materno-placentaria participan activamente en la regulación de la respuesta inmune local y en el establecimiento de un entorno tolerogénico durante la gestación temprana ^{225,226}. Sin embargo, cuando estos leucocitos se encuentran excesivamente activados, pueden ejercer efectos dañinos sobre la función de las células trofoblásticas, comprometiendo procesos fundamentales para la placentación ^{226,228,229}. En este contexto, nos propusimos investigar si los factores solubles secretados por células trofoblásticas expuestas a OMV de Pg podían modular la quimioatracción y activación de neutrófilos.

Como se observa en la **Figura 29a**, el MC OMV indujo una mayor quimioatracción de los neutrófilos que el MC control. Luego, para determinar si el MC OMV era capaz también de la activación de neutrófilos, evaluamos la producción de ROS en estas células tras ser incubadas durante 6 h con los medios condicionados. Consistente con el aumento en la migración de los neutrófilos, el MC OMV también indujo un incremento en la producción de ROS (**Fig. 29b**).

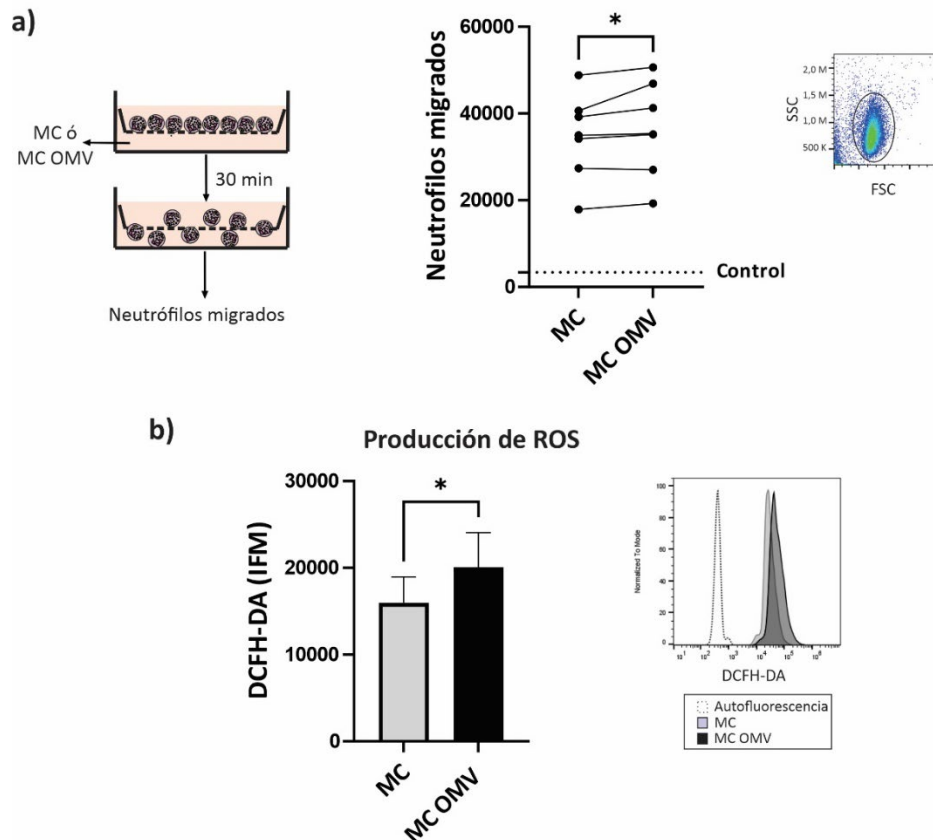


Figura 29. El medio condicionado de células Tb estimuladas con OMV de Pg atrae y activa a los neutrófilos. a) Izquierda: Se colocaron neutrófilos en la cámara superior de un transwell de 3 μ m y se evaluó, mediante citometría de flujo, la migración de estos hacia los medios condicionados o RPMI 2% SFB (-) colocados en la cámara inferior durante 30 min. A la derecha se muestra la estrategia de selección para la población de neutrófilos. $n=7$, $*p<0,05$. **b)** Se estimularon neutrófilos durante 45 min con MC o MC OMV, y la producción de ROS se cuantificó mediante citometría de flujo usando la sonda DCFH-DA. A la derecha se muestran los histogramas representativos de un ensayo. Los valores representan la media $\pm$ E.S., $n=9$, $*p<0,05$, Prueba de Wilcoxon.

Estos resultados se alinearon con una mayor expresión de ARNm de *gp91^{phox}*, *p47^{phox}* y *p67^{phox}*, subunidades del complejo NADPH oxidasa (**Fig. 30a**), responsable de la mayor parte de la

producción de ROS en los neutrófilos ¹⁶⁷. Más aún, el MC OMV también aumentó la expresión de IL-8 y TNF- α , marcadores de activación de neutrófilos (Fig. 30b).

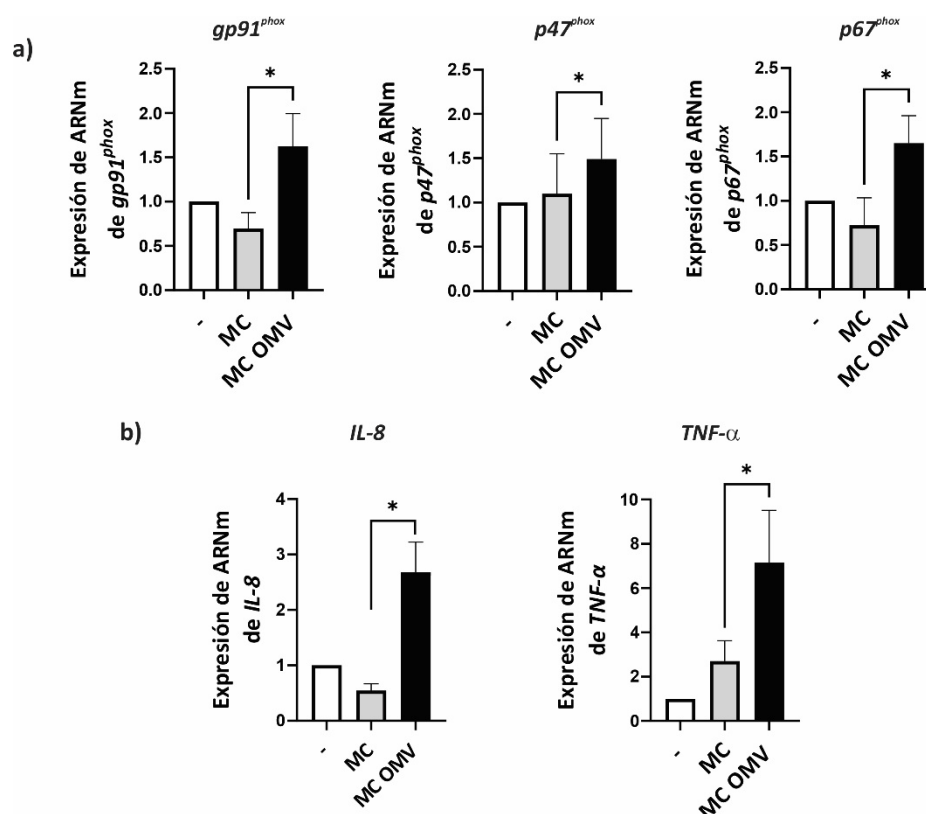


Figura 30. El medio condicionado de células Tb estimuladas con OMV de Pg activa a los neutrófilos hacia un perfil proinflamatorio. Los neutrófilos se incubaron durante 6h con RPMI 2% SFB (-), MC o MC OMV y la expresión de ARNm de *gp91^{phox}*, *p47^{phox}*, *p67^{phox}* (a), *IL-8* y *TNF- α* (b) se evaluó por RTqPCR. Los valores representan la media $\pm$ E.S., expresados como veces de cambio respecto al control (-), n=6, *p<0,05. Prueba de Wilcoxon.

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que el MC de células Tb desactiva a los neutrófilos activados con PMA, evidenciado como una disminución en la producción de ROS y liberación de NETS ²²⁵. En base a estos antecedentes, nos propusimos evaluar si esta capacidad de inhibir la activación de neutrófilos se ve alterada cuando las células trofoblásticas han sido previamente expuestas a OMV de Pg. Para ello, comparamos el efecto del MC y del MC OMV sobre neutrófilos. Observamos que los neutrófilos preconditionados con MC OMV no mostraron la reducción esperada en la producción de ROS cuando eran expuestos al PMA, en comparación con los

neutrófilos tratados con el MC control (**Fig. 31**). Estos resultados sugieren que cuando las células trofoblásticas estuvieron expuestas a OMV de Pg pierden su capacidad de desactivar a los neutrófilos.

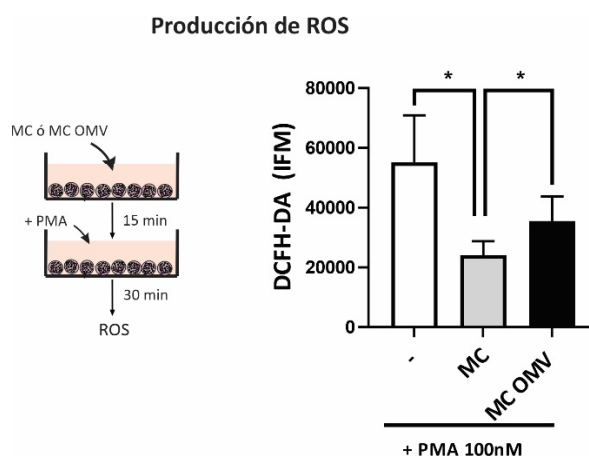


Figura 31. Las células Tb estimuladas con OMV de Pg pierden su capacidad de desactivación de neutrófilos.

Izquierda: Esquema del diseño experimental. Los neutrófilos se pretrataron con RPMI 2% SFB (-), MC o MC OMV durante 15 min. Luego, se estimularon durante 45 min con PMA para activar la producción de ROS. Derecha: La producción de ROS se evaluó usando la sonda DCFH-DA como se describió antes. Los valores representan la media $\pm$ E.S., $n=9$. * $p<0.05$, Prueba de Friedman.

Factores liberados por células Tb estimuladas con OMV de Pg atraen monocitos y alteran su perfil de activación

Teniendo en cuenta que las células Tb estimuladas con OMV presentaron un aumento significativo en la expresión de GM-CSF y MCP-1 (**Fig. 25**), dos factores clave en la regulación del comportamiento de las células mieloides, lo siguiente que hicimos fue evaluar si los factores solubles liberados por células Tb inducían la migración de monocitos. Entre estos componentes, GM-CSF es una citoquina capaz de modular la proliferación, activación y diferenciación de monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y eosinófilos, y en contextos inflamatorios puede potenciar su supervivencia y activación ^{230,231}. Por su parte, MCP-1 actúa como un potente quimioatrayente de monocitos, particularmente de los monocitos clásicos CD14⁺ CD16⁻ ²³². En este sentido, encontramos que el MC OMV indujo un aumento significativo en la cantidad de monocitos migrados en comparación con el MC (**Fig. 32a**).

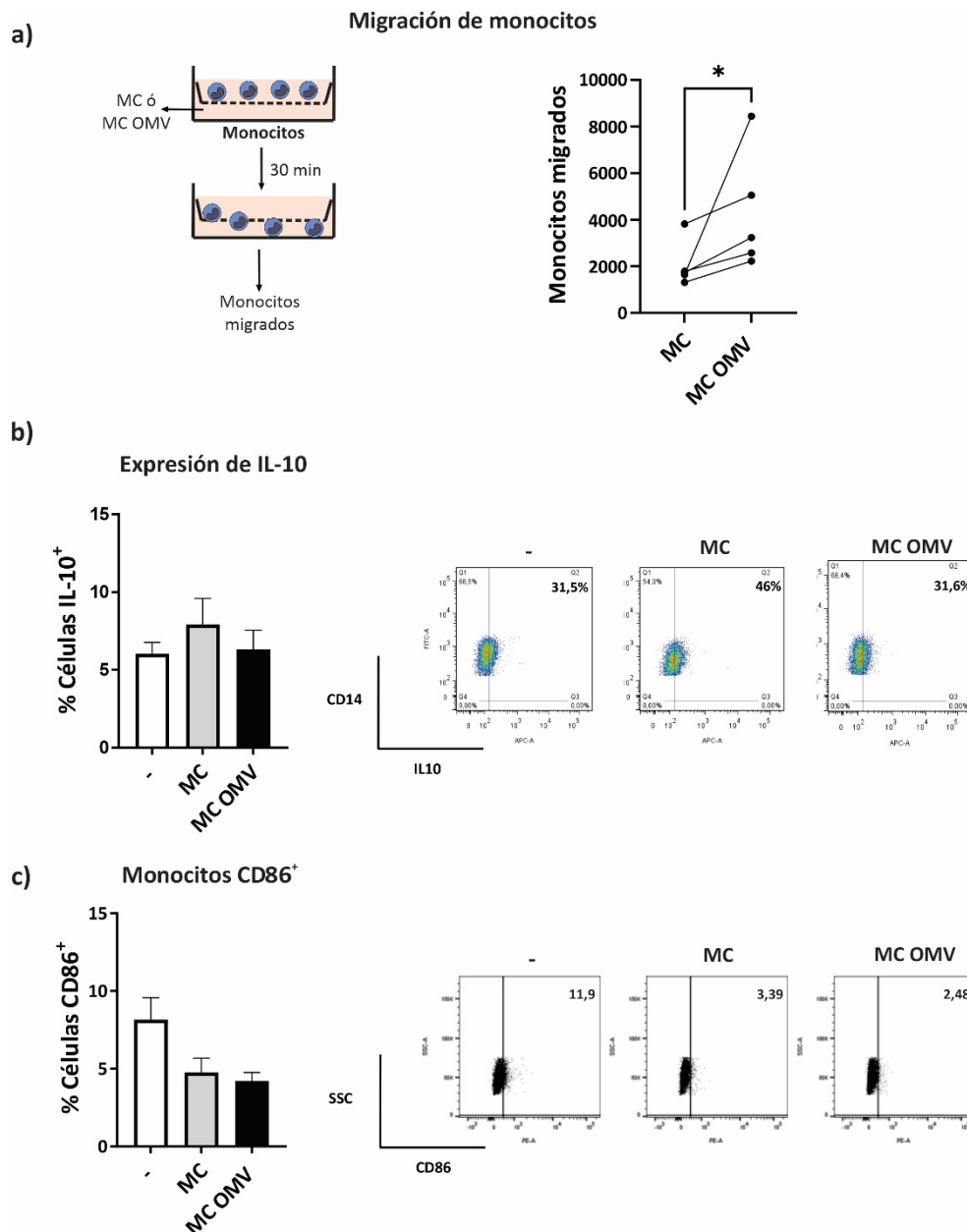


Figura 32. El MC OMV induce la migración de monocitos. **a)** Monocitos fueron incubados por 30 min sobre transwells de poro de 3 μ m y se evaluó la migración de estos hacia los medios condicionados colocados en la cámara inferior durante 30 min mediante citometría de flujo (n=5), *p<0.05, Prueba de Wilcoxon. Para analizar el estado de activación que adquieren los monocitos, las células se incubaron en presencia de RPMI 2% SFB (-), MC o MC OMV durante 24h y la expresión de marcadores se analizó por citometría de flujo en al menos 4 ensayos independientes. **b)** Frecuencia de monocitos IL-10⁺ (media $\pm$ E.S.) (n=4). **c)** Frecuencia de monocitos CD86⁺. A la derecha se observa un *dotplot* representativo de uno de los ensayos realizados (n=5).

Más aún, teniendo en cuenta que las células Tb coordinan no solo el reclutamiento de las poblaciones leucocitarias, sino también modulan su perfil ¹³⁵, analizamos el efecto de estos medios

condicionados sobre la expresión de los marcadores CD86 e IL-10. Como se observa en la **Fig. 32b**, hay una tendencia a aumentar el porcentaje de células IL-10⁺ en monocitos incubados con MC, tendencia que se pierde al tratar con MC OMV. En paralelo, se observa una tendencia a la disminución de células CD86⁺ con el MC respecto al control, sin que el MC OMV modifique este efecto (**Fig. 32c**).

El medio condicionado de células Tb tratadas con OMV de Pg modifica el perfil de las células dendríticas necesario para el mantenimiento de la homeostasis inmune

Las células trofoblásticas inducen la diferenciación de células dendríticas hacia un fenotipo tolerogénico caracterizado por ser CD1a⁻CD14⁺ ²³³. Así, luego evaluamos el efecto de los MC de células trofoblásticas condicionadas con OMV sobre la diferenciación de células dendríticas. Monocitos fueron diferenciados a células dendríticas inmaduras con GM-CSF + IL-4, en presencia de MC ó MC OMV por 5 días ¹⁶⁴ (**Fig. 33a**). Como se esperaba, el MC inhibió la diferenciación de células dendríticas hacia un perfil clásico inmaduro CD1a⁺ (**Fig. 33b**) y aumentó la diferenciación hacia un perfil CD14⁺ (**Fig. 33c**). En cambio, el efecto se previno cuando las células se diferenciaron en presencia de MC OMV.

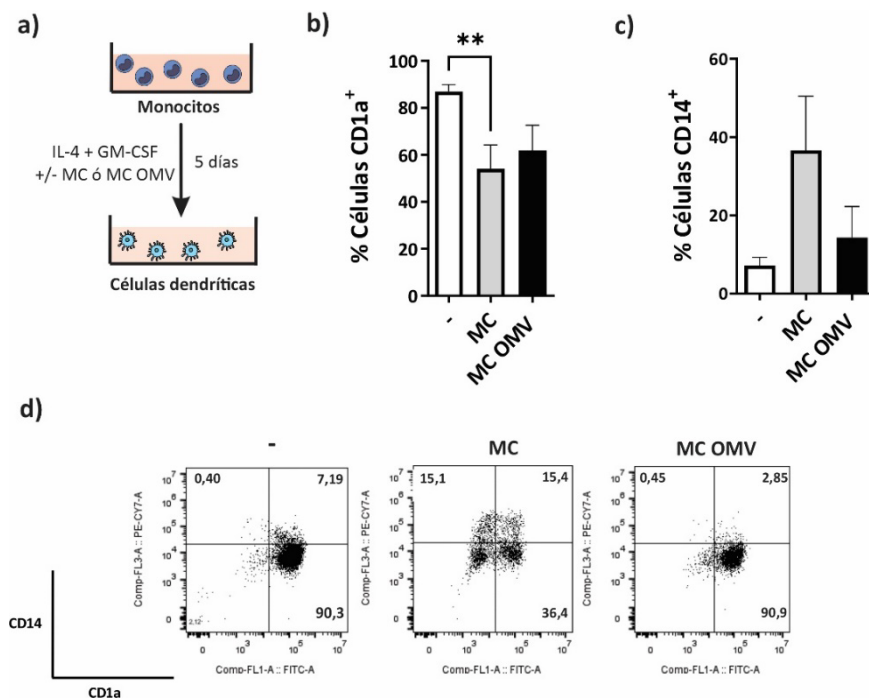


Figura 33. El *priming* de células trofoblásticas con OMV de Pg inhibe la diferenciación de células dendríticas hacia un fenotipo CD1a⁻CD14⁺. a) Para obtener células dendríticas, se cultivaron monocitos en medio completo con IL-4 y GM-CSF en ausencia (-) o presencia de MC o MC OMV durante cinco días. Al finalizar la incubación, las

CD se lavaron y se analizó la expresión de marcadores de superficie CD1a (**b**) y CD14 (**c**) mediante citometría de flujo. Los resultados representan la media $\pm$ E.S. de al menos 7 ensayos. **d**) *Dotplot* representativo de las marcaciones. $**p<0.01$, Prueba de Wilcoxon.

Dado que los MC de células trofoblásticas tratadas con OMV alteran la diferenciación hacia el perfil inmaduro clásico de las células dendríticas, analizamos su impacto sobre la adquisición de un perfil tolerogénico en las mismas. Para ello, se evaluó la expresión de marcadores clásicos de activación/maduración CD86/CD83, respectivamente, y la secreción de IL-10 por ELISA (**Fig. 34**).

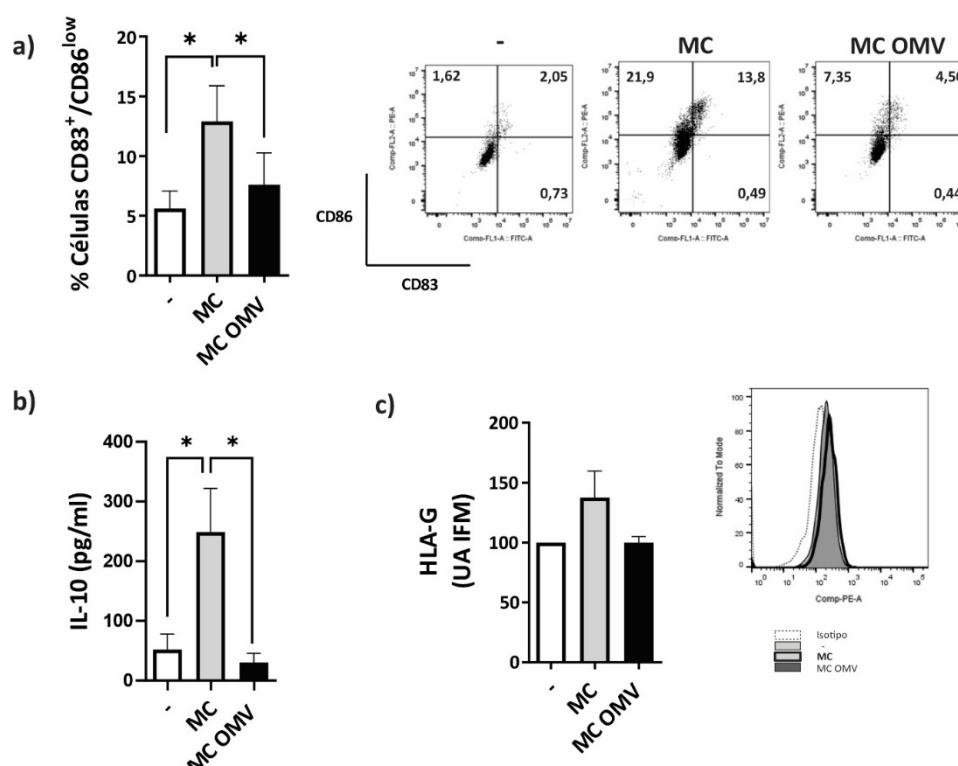


Figura 34. Las células Tb tratadas con OMV de Pg pierden la capacidad de inducir células dendríticas tolerogénicas. **a)** Se analizó la expresión de marcadores por citometría de flujo. A la izquierda se muestra el porcentaje de células CD83⁺/CD86^{low}. A la derecha un *dotplot* representativo de al menos 7 ensayos. **b)** La secreción de IL-10 se evaluó a partir del sobrenadante de las células dendríticas mediante ELISA. **c)** La expresión de HLA-G se evaluó por citometría de flujo, y la IFM se representó como unidades arbitrarias respecto al control (-). $*p<0.05$, Prueba de Wilcoxon.

Las células diferenciadas en presencia de MC inducen la diferenciación de células CD83⁺CD86^{low} asociadas a un perfil maduro, pero de bajo tenor de activación. En este sentido, también observamos un aumento en la secreción de IL-10 y una tendencia al aumento de la expresión de la

molécula tolerogénica HLA-G. En contraste, el MC OMV previno la diferenciación de este perfil tolerogénico al demostrar una disminución significativa en la frecuencia de células $CD83^+CD86^{low}$, en la secreción de IL-10 y en la expresión de HLA-G respecto a MC. Esto sugiere que el tratamiento con OMV altera la secreción de factores solubles por la célula trofoblástica interfiriendo en su capacidad de inducir un fenotipo tolerogénico sobre la célula dendrítica.

Finalmente, para determinar el efecto del MC OMV en la maduración de las células dendríticas y su capacidad de responder a estímulos proinflamatorios, se desafió a las células con LPS y se evaluó la expresión de CD83 y CD86 (**Fig. 35**).

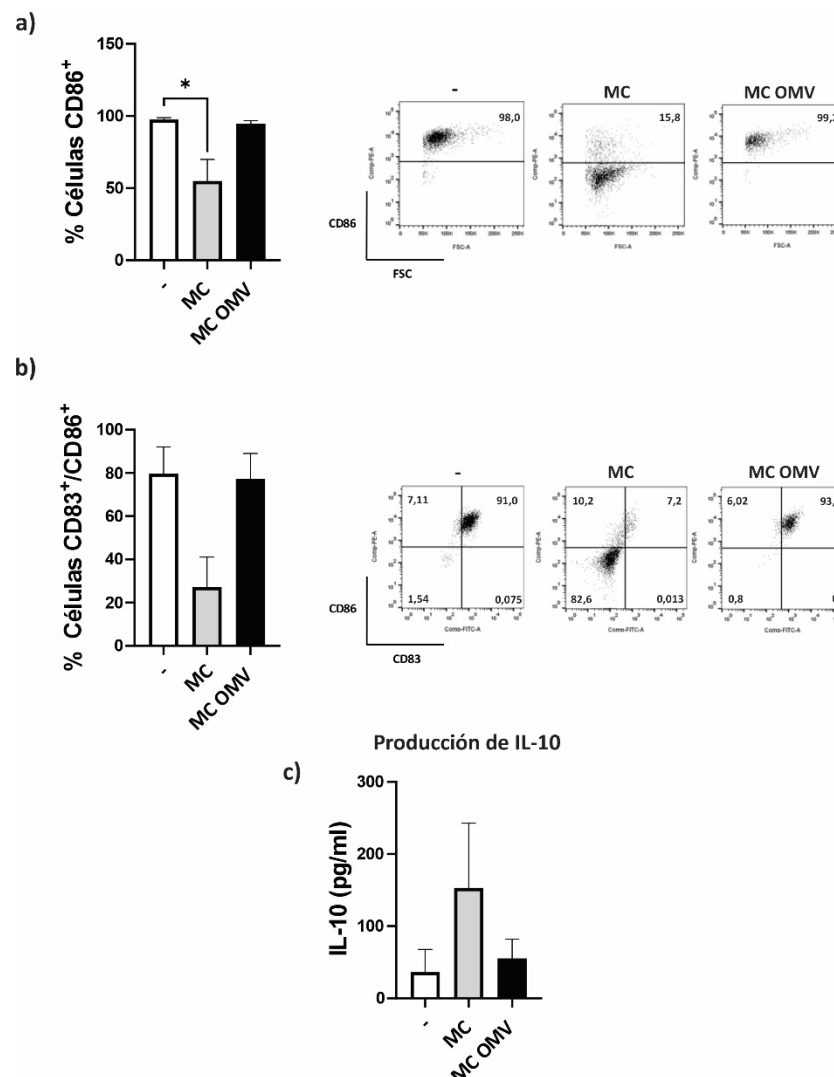


Figura 35. Las CD diferenciadas en presencia de MC OMV pueden activarse frente a un estímulo inflamatorio. Se obtuvieron células dendríticas como se describe en la Figura 34a. En el día cinco del protocolo de diferenciación, las CD fueron desafiadas con 200 ng/mL LPS durante toda la noche. Posteriormente, se evaluó la expresión de marcadores de activación por citometría de flujo. **a)** A la izquierda se muestra la cuantificación de células $CD86^+$, a la derecha se muestra un *dotplot* representativo del mismo experimento. **b)** Porcentaje de

células CD83⁺/CD86^{low}. Los resultados representan la media $\pm$ E.S. n=7. *p<0.05, Prueba de Wilcoxon. **c)** La producción de IL-10 en los sobrenadantes de células dendríticas previamente diferenciadas y desafiadas con LPS fue evaluada por ELISA (n=3).

Como era de esperarse, mientras que las células diferenciadas con MC mostraron una menor activación, aquellas cultivadas con MC OMV respondieron de manera similar a un perfil clásico de células dendríticas maduras (-), con un aumento significativo en la población CD86⁺ (**Fig. 35a**) y una alta frecuencia de células CD83⁺CD86⁺ (**Fig. 35b**). En línea con esto, las células diferenciadas en MC ante la presencia de LPS responden con una mayor tendencia en la secreción de IL-10, mientras que aquellas diferenciadas en MC OMV respondieron produciendo menor cantidad, de forma similar a las células dendríticas maduras (-) (**Fig. 35c**).

En conjunto, estos resultados muestran que los factores liberados por células trofoblásticas expuestas a OMV de Pg no solo impiden la inducción de un perfil tolerogénico, sino que permiten la activación/maduración de células dendríticas en respuesta a señales inflamatorias.

CAPITULO 3:

Efecto del fluido gingival crevicular sobre células trofoblásticas

Con el objetivo de explorar la relevancia de la presencia de Pg en el fluido gingival crevicular (FGC) en una población de pacientes de 16-20 semanas de gestación, estudiamos el efecto de los mismos sobre células trofoblásticas haciendo foco en la presencia o no de Pg en los mismos, mediante la evaluación de la capacidad migratoria y la producción de ROS.

La población de mujeres gestantes presentó parámetros clínico-odontológicos similares y compatibles con una gingivitis moderada, comparada con una población de mujeres de la misma edad no gestantes y periodontalmente sanas (**Tabla 2, en Materiales y Métodos**). Los embarazos tuvieron una duración y peso de recién nacidos normales independientemente de la presencia o no de Pg en el FGC (**Figura P, en Materiales y Métodos**).

El fluido gingival de mujeres gestantes altera la función de las células trofoblásticas

En primera instancia evaluamos el efecto de los FGC sobre la capacidad migratoria de las células Tb. Encontramos que aquellos fluidos con presencia de Pg inducían una disminución de la migración trofoblástica mayor comparado con aquellos negativos para Pg (**Fig. 36**). Es interesante notar que este efecto es similar al observado al incubar las células con las OMV (**Fig. 15**).

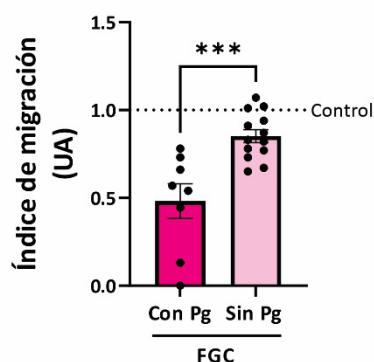


Figura 36. La presencia de Pg en FGC de embarazadas modula la migración de las células Tb. Se realizó una herida en una monocapa de células Tb crecidas hasta confluencia y luego se incubaron con los fluidos utilizando una dilución 1:5 en DMEM 2% SFB, o con DMEM 2% SFB solo como control (línea punteada) durante 18h. Se consideró la presencia o ausencia de Pg en cada muestra para probar los FGC. La migración se cuantificó como se describió previamente, y los resultados se expresaron como unidades arbitrarias respecto a la migración control. *** $p < 0.001$, Prueba de Mann Whitney.

Asimismo, evaluamos la producción de ROS totales en las células Tb y observamos una tendencia al aumento en la producción de ROS en aquellas células tratadas con FGC positivos para Pg respecto a los negativos para Pg (**Fig. 37**). Vale destacar que los FGC con Pg aumentaron significativamente la producción de ROS respecto de la línea punteada que señala la producción basal (control) ($p < 0.0001$), lo que sugiere que la presencia de Pg es un fuerte estímulo para la producción de ROS. Este resultado nos resultó interesante por contrastar con lo que previamente habíamos observado con las OMV de Pg aisladas, que reducían la producción de ROS totales en células Tb, asociado a una reducción de la incorporación de glucosa y de las vías glucolíticas (**Fig. 4 y Fig. 11b**).

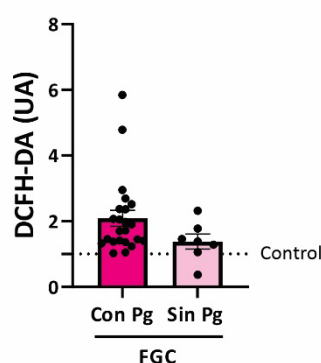


Figura 37. Los FGC de embarazadas positivos para Pg tienden a aumentar la producción de ROS. Las células se estimularon con los FGC en dilución 1:5 con DMEM 2% SFB, o con DMEM 2% SFB como control (línea punteada) durante 18h. La producción de ROS se cuantificó usando la sonda DCFH-DA como se describió previamente. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias respecto a la producción de ROS control. $p = 0.0591$, Prueba de Mann Whitney.

Las OMV de Pg modifican los efectos de componentes del FGC sobre células trofoblásticas

Sobre la base que las OMV de Pg tienen la capacidad de modular diferencialmente la producción de ROS en células Tb (**Fig. 11b**), y que los FGC con Pg aumentaron significativamente la producción de ROS en células Tb respecto del basal e incluso mostraron una tendencia a mayor aumento de ROS los FGC que tenían Pg con respecto a los negativos para Pg (**Fig. 37**), lo siguiente que nos preguntamos fue si las OMV podrían modular el efecto del fluido sobre las células Tb en la capacidad producción de ROS. Para ello, pretratamos células Tb durante 24h con OMV de Pg y luego las incubamos con FGC durante 24h adicionales. El aumento en la producción de ROS inducido por los FGC fue prevenido completamente cuando pretratábamos a las células Tb con OMV conjuntamente con el FGC o desde 24 h antes (**Fig. 38**). Esto sugiere un efecto modulador de las OMV de Pg frente al ambiente proinflamatorio inducido por el fluido gingival.

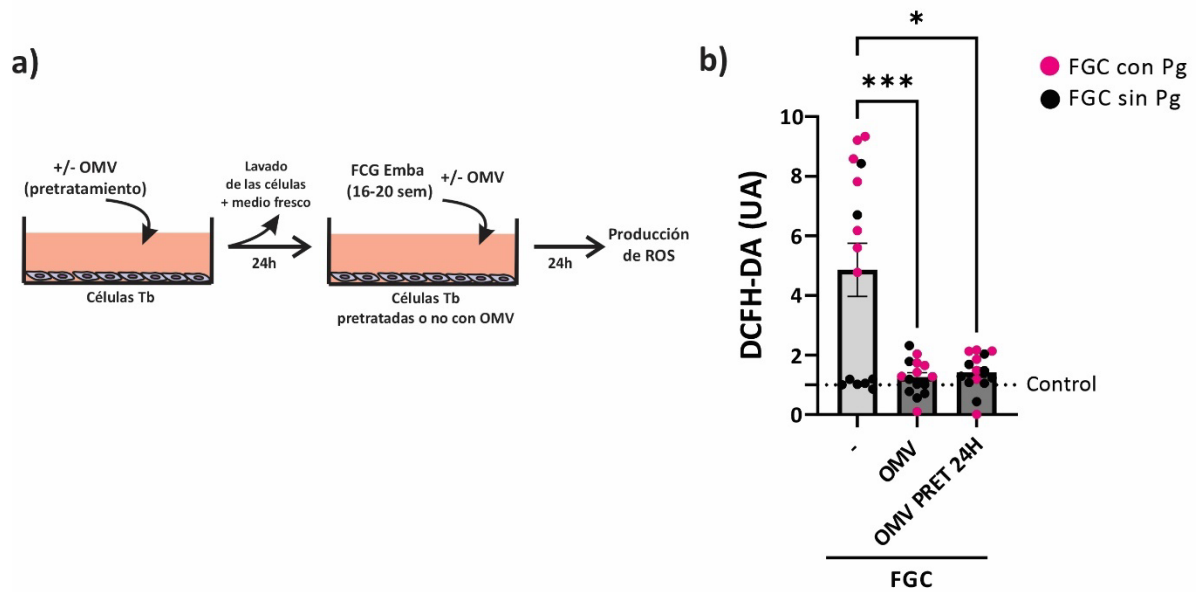


Figura 38. Las OMV de Pg previenen el efecto causado por factores presentes en los FGC de embarazadas sobre células Tb. a) Esquema del protocolo utilizado. Para evaluar la capacidad moduladora de las OMV sobre los efectos de factores presentes en FGC de mujeres embarazadas, se pretrataron células Tb OMV durante 24h (OMV PRET 24H) o se estimularon al mismo tiempo en que se agregaba FGC (OMV), y luego se incubaron 24h más con FGC en dilución 1:5 con DMEM 2% SFB. **b)** La producción de ROS se estudió como previamente. Como control del ensayo se evaluó la producción de ROS en células sin estimular y los resultados se expresaron como unidades arbitrarias respecto a la producción de ROS control (línea punteada). Los fluidos positivos para Pg están en color fucsia, mientras que aquellos negativos para Pg se muestran en negro. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, Prueba de Friedman seguido de comparaciones de Dunn's.

DISCUSIÓN

El desarrollo placentario requiere la interacción coordinada entre las células trofoblásticas de la placenta y distintas poblaciones celulares de la decidua. Las células Tb establecen una interacción sostenida con células inmunes maternas que mantiene un microambiente adecuado para el crecimiento fetal. Estas células tienen gran plasticidad y se adaptan a los cambios en el microambiente permanentemente. En particular, teniendo en cuenta que las células Tb requieren de altas tasas de producción de energía para llevar a cabo estas funciones, los cambios en el acceso a nutrientes o la pérdida de la homeostasis en la placenta por estímulos inflamatorios o infecciosos puede afectar la función trofoblástica y resultar deletéreo para el desarrollo placentario y fetal.

La gingivoperiodontitis es una enfermedad crónica que tiene efectos sobre la salud oral y consecuencias sistémicas: se la asocia con enfermedades del sistema cardiovascular, nervioso y, especialmente enfocado en esta tesis, con complicaciones de la gestación que ponen en riesgo la salud materna y neonatal. *Porphyromonas gingivalis* (Pg), una de las principales bacterias implicadas en esta enfermedad, produce vesículas de membrana externa (OMV) que pueden alcanzar la circulación sistémica y tener efectos deletéreos a distancia dadas sus propiedades patogénicas y su tamaño. Estudios epidemiológicos y metaanálisis indican que existe una asociación entre la enfermedad gingivoperiodontal causada por Pg y complicaciones de la gestación como PE, PP y RCF. Sin embargo, es escasa la información acerca de los mecanismos biológicos involucrados en tales complicaciones y, menos aún, de efectos mediados por componentes bacterianos como las OMV de esta bacteria.

En esta tesis evaluamos efectos de las OMV de Pg sobre las células trofoblásticas, su metabolismo y sus funciones en modelos *in vitro* e *in vivo* de placentación; exploramos el efecto de OMV de Pg sobre la interacción trofoblástica-inmune y endotelial; y analizamos el potencial impacto de las OMV sobre el efecto de componentes del fluido crevicular con o sin Pg provenientes de mujeres gestantes de 16-20 semanas.

En el primer abordaje *in vitro* utilizamos líneas celulares trofoblásticas humanas de primer trimestre para determinar los efectos de las OMV de Pg sobre funciones trofoblásticas como migración e invasión y el impacto en el metabolismo celular, con el objetivo de aportar conocimiento a los mecanismos celulares y moleculares involucrados en los efectos de las OMV de Pg.

Uno de los primeros hallazgos de esta tesis fue que las células Tb son capaces de internalizar OMV de Pg de manera dependiente de la concentración y el tiempo, mediante endocitosis mediada por caveolina y clatrina, sin comprometer la viabilidad celular. Este comportamiento ha sido reportado en otros tipos celulares, como células epiteliales gingivales y neurales, donde la incorporación de OMV

se ha vinculado a su capacidad de adhesión, determinada por la acumulación de factores de virulencia en su superficie ²³⁴ y por moléculas bioactivas contenidas en su lumen que modulan rutas intracelulares específicas ^{25,235}. En particular, se ha descrito que en células epiteliales gingivales las OMV de Pg ingresan mayormente por endocitosis dependiente de balsas lipídicas, mediada por fimbrias bacterianas que interactúan con receptores de la membrana celular ²⁹. Sin embargo, otros estudios han reportado vías alternativas, como endocitosis dependiente de caveolina, pero no de clatrina ²³⁶. En este trabajo, mediante el uso de inhibidores específicos como la nistatina y monensina que inhibe la endocitosis mediada por caveolina y clatrina respectivamente, observamos una disminución significativa en la incorporación de OMV en células Tb, indicando que ambas vías están involucradas.

La divergencia entre los mecanismos de incorporación descritos en distintos modelos celulares puede explicarse, en parte, por el tamaño de las OMV aisladas, ya que las distintas rutas endocíticas tienen limitaciones estructurales específicas ²³⁷. Las OMV utilizadas en este estudio presentaron un tamaño promedio de 108 nm, lo cual se sitúa en el rango compatible con múltiples mecanismos de internalización (clatrina: 120 nm; caveolina: 60 nm; balsas lipídicas: 90 nm). Además, diferencias en la composición molecular de las OMV tanto en su superficie como en sus cargos internos podrían contribuir a la selectividad de las vías de ingreso y a las respuestas funcionales que desencadenan.

Por otro lado, a diferencia de lo reportado en otros modelos como células epiteliales o de neuroblastoma, donde la incorporación de OMV puede inducir estrés celular o apoptosis ^{238–240}, en células Tb no observamos alteraciones en la viabilidad ni en la proliferación. Estos resultados sugieren que las OMV de Pg pueden interactuar activamente con las células Tb sin comprometer su supervivencia, lo que permite estudiar su impacto funcional sobre procesos clave de la placentación temprana como invasión, modulación inmune y comunicación intercelular.

A continuación, determinamos que la incorporación de OMV de Pg afecta el metabolismo de las células Tb, con una drástica disminución de las vías glucolíticas como se desprende de las siguientes observaciones.

En primer lugar, la incorporación de glucosa y la expresión de sus transportadores GLUT1 y GLUT3 disminuyeron luego del estímulo con OMV de Pg. Una menor incorporación de glucosa consistente con menor consumo de la misma para la síntesis de glucógeno se observó en células hepáticas que incorporaron OMV de Pg según fue reportado por ²⁴¹. Una vez que se incorpora, la glucosa puede ser metabolizada hacia la vía de las pentosas fosfato (PPP) y hacia la glucólisis, donde

el producto final piruvato puede por un lado oxidarse e ingresar a la mitocondria para fosforilación oxidativa (OXPHOS) o generar lactato por acción de enzimas citoplasmáticas.

En segundo lugar, encontramos menor expresión de G6PD, enzima limitante que deriva la glucosa hacia la vía de las PPP donde se produce NADPH, una coenzima esencial en procesos biosintéticos como crecimiento celular y detoxificación. La disminución en la expresión de esta enzima está asociada al aumento de estrés oxidativo que se observa en placentas de mujeres con diabetes gestacional ²⁴² con riesgo de PE. Además del poder reductor, en esta vía se producen ROS celulares (no mitocondriales) como subproducto, y en ese sentido encontramos que las ROS estaban fuertemente disminuidas en las células Tb. Las ROS, además de ser esenciales durante procesos infecciosos como primer paso de defensa frente a patógenos, en etapas tempranas del desarrollo placentario pueden desencadenar la activación de VEGF y la inducción de transportadores de glucosa que promueven la angiogénesis ²⁴³. Dependiendo de la cantidad de ROS producidas, su balance determina efectos de protección contra patógenos o de señalización intracelular. Esto es especialmente importante durante el comienzo de la placentación, cuando la pérdida de la homeostasis oxidativa está fuertemente asociada a disfunción trofoblástica, signos frecuentemente asociados a PE y RCF.

En tercer lugar, vimos que junto con la menor captación de glucosa tuvo lugar una disminución de la expresión de las enzimas implicadas en la glucólisis HK1 y PKM2, y una menor liberación de lactato al medio. Numerosas evidencias demuestran que cambios en el metabolismo de la glucosa están estrechamente relacionados con complicaciones gestacionales ^{196,244,245}. En este sentido, el lactato se considera una molécula de señalización crucial para establecer la tolerancia hacia el feto y promover la remodelación vascular al inicio del embarazo, y su desregulación en células Tb se vio asociada a casos de aborto en el primer trimestre ²⁴⁴. En un trabajo donde se investigaba la regulación de la infección con Pg sobre el metabolismo de células de fibroblasto gingival, se encontró que la infección con la bacteria aumenta drásticamente la expresión de HK2 y causa mayor producción de ROS dependiente de la glucólisis. Interesantemente, en ese trabajo encontraron que la producción de lactato no se modulaba ³⁰. Por otra parte, la infección de macrófagos humanos y murinos con Pg o sus OMV aumenta las vías glucolíticas en ambos casos en detrimento de vías metabólicas mitocondriales, con una mayor expresión de GLUT1 y HK, y una mayor liberación de lactato ²⁴⁶. En nuestro modelo de interfase materno-fetal temprana, los cambios metabólicos que se observan en las células Tb al ser estimuladas con OMV de Pg podrían estar modificando el entorno metabólico, proporcionando un medio adecuado para la infección bacteriana y la desregulación de la respuesta inmune. Un entorno así favorecería que las bacterias puedan escapar de su eliminación por parte de las células inmunes. Por ejemplo, en la cavidad oral se ha observado que las OMV de Pg favorecen la agregación de otro

patógeno periodontal, *Annerella forsythia*, y su adhesión e invasión de células epiteliales, aunque no se ha estudiado la relación de estos eventos con el entorno metabólico^{246,247}. En este sentido, el hecho de que las OMV redujeran fuertemente la producción total de ROS en las células trofoblásticas podría ser uno de esos condicionamientos metabólicos de la célula huésped por parte de las OMV de Pg para un posterior proceso de invasión e infección bacteriana. Esto es válido especialmente para bacterias anaerobias como Pg, cuyas estrategias para la detoxificación de ROS y la regulación de redes de defensa antioxidante han sido ampliamente descritas²⁴⁷. Es interesante destacar que los efectos de OMV de Pg sobre el metabolismo de células Tb observados en el modelo de interfase materno-fetal humana *in vitro* tuvieron un correlato en tejidos murinos *ex vivo*, donde las OMV de Pg añadidas en cultivo de explantes de placenta modificaron la incorporación de glucosa y la liberación de lactato en forma similar a lo observado en células humanas.

El estrés oxidativo ocurre cuando hay un desequilibrio entre la generación de ROS y la defensa antioxidante, y su desregulación se ha reportado en células Tb de primer trimestre alterando su función²⁴⁸. Teniendo en cuenta la disminución en las ROS, interpretada como la capacidad de las OMV de Pg para regular la respuesta al estrés oxidativo, nos resultó sorprendente el aumento observado en la actividad catalasa de las células Tb. Sin embargo, cuando expusimos a las células Tb al estrés oxidativo causado por rotenona vimos que el pretratamiento con OMV de Pg logró disminuir la producción de ROS a niveles basales, reafirmando la hipótesis de que las OMV de Pg ejercen una regulación del sistema antioxidante de las células Tb que podría favorecer su persistencia en las mismas.

Con el fin de investigar si la disminución de las vías glucolíticas causada por las OMV de Pg induce una reprogramación metabólica compensatoria, en una serie de experimentos evaluamos el metabolismo lipídico y mitocondrial, el cual efectivamente se vio aumentado por el tratamiento con OMV de Pg como se discutirá a continuación. Aunque la glucosa y el oxígeno han sido considerados como las principales fuentes de combustible para el metabolismo mitocondrial, la placenta también utiliza ácidos grasos que pueden ingresar a la mitocondria tras su oxidación o ser almacenados en forma de gotas lipídicas. Respecto a los ácidos grasos de cadena larga, encontramos que las células Tb incorporan mayor cantidad tras 4h de ser estimuladas con OMV de Pg, mientras que a las 24h no se vieron cambios. De hecho, el estímulo con OMV generó la disminución en la expresión génica del transportador FATP2, altamente expresado en placenta e importante para la acilación, transporte y tráfico de ácidos grasos de cadena larga²⁴⁹. El hecho de que las células Tb incorporen más ácidos grasos en tiempos cortos y que no se modifique la proporción de gotas lipídicas presentes, que de hecho tienden a disminuir en tiempos largos de estimulación, sugiere que las células los metabolizan por β -oxidación como una fuente alternativa de combustible para satisfacer la demanda energética,

en mayor medida que su almacenado como gotas lipídicas. Sin embargo, se requieren más estudios para afirmar el predominio de un proceso sobre el otro en el mantenimiento de los niveles de energía y la diversidad de funciones celulares.

El estudio de la función mitocondrial utilizando la tecnología Seahorse[®] nos permitió evaluar varios parámetros metabólicos. Encontramos que las OMV de Pg inducían un aumento de la respiración basal y la respiración máxima. Estos incrementos apoyan la hipótesis que las células experimentan una reprogramación metabólica donde la energía para satisfacer las demandas metabólicas celulares se produce mediante OXPHOS dada la disminución en el uso de vías glucolíticas. Asimismo, el aumento en la capacidad de reserva mitocondrial, que indica la capacidad de las mitocondrias para aumentar la producción de ATP bajo condiciones de estrés más allá de su actividad basal, sugiere que las mitocondrias están en un estado metabólico muy activo, que se adapta al estrés celular causado por las OMV de Pg, para suplir la alta demanda energética de funciones celulares cruciales como la migración e invasión trofoblástica. También para la detoxificación de especies reactivas de oxígeno, que si se altera puede dar lugar a defectos en el desarrollo placentario.

Vale destacar que los efectos de las OMV de Pg sobre el metabolismo celular parecen depender del tipo celular y el contexto. Por ejemplo, en modelos donde estudian el rol de los macrófagos durante la periodontitis, el estímulo con OMV de Pg causó una reprogramación metabólica de OXPHOS a glucólisis, con la consecuente reducción de la expresión de enzimas mitocondriales asociadas al TCA y un aumento en la producción de mediadores proinflamatorios³⁰. En cambio, nuestros resultados muestran que las OMV de Pg no solo promueven el metabolismo mitocondrial sino también aumentaron la expresión de la enzima mitocondrial SDHb, que en otros modelos de infección con Pg se vio aumentada tanto su expresión como su actividad, asociada a la producción de ROS mitocondriales²⁰⁰.

Durante la función mitocondrial normal, cerca del 2% de los electrones de la cadena de transporte de electrones se fugan de la mitocondria e interactúan con oxígeno, formando aniones superóxido que constituyen las ROS mitocondriales (mtROS)²⁵⁰. Considerando el estado metabólico adaptable de las mitocondrias de las células Tb frente a las OMV de Pg, es posible que la mayor producción de mtROS observada se deba a que las mitocondrias se encuentran hiperactivadas. Un punto importante a considerar es que las mtROS ejercen efectos deletéreos sobre funciones celulares como la fusión o fisión mitocondrial (causando disfunción mitocondrial), la autofagia y señalización celular²⁵¹. De acuerdo con esto, se ha demostrado que la disfunción mitocondrial induce un aumento extremo en los niveles de mtROS y contribuye a complicaciones gestacionales²⁵². Asimismo, varios

estudios demostraron que el exceso en la acumulación de ROS inhibe la capacidad de invasión de las células Tb a través de la disminución en la expresión de FOXO1 e integrina b3 ²⁵³.

Teniendo en cuenta lo reportado en la retinopatía diabética asociada a periodontitis, donde se vio en las células endoteliales de la microvasculatura de la retina que las OMV de Pg aumentaron la producción de ROS asociada a disfunción mitocondrial ²⁵⁴, nos preguntamos si la viabilidad mitocondrial podría estar afectada en las células Tb. Para evaluar eso, estudiamos la masa mitocondrial (mtM) y el potencial de membrana mitocondrial (mtΨ), que son indicadores de salud y función mitocondrial, y se encuentran alterados en la disfunción mitocondrial ²⁵⁵. No encontramos alteraciones en esos parámetros en las células Tb estimuladas con OMV, por lo que concluimos que las mitocondrias están hiperactivas y funcionales.

Otra consideración importante es que la función mitocondrial está estrechamente asociada con la morfología ^{256,257}. En ese sentido, cuando visualizamos las mitocondrias al microscopio confocal utilizando la sonda que marca el mtΨ, encontramos que en comparación a las células Tb sin tratar, las mitocondrias de células tratadas con OMV emitían mayor fluorescencia y, a su vez, adquirirían una morfología levemente diferente al control. Sin embargo, se requieren de estudios específicos como la cuantificación de proteínas mitocondriales involucradas en la fusión o fisión mitocondrial, entre otros, para determinar si las mitocondrias de las células Tb se estaban fusionando o fisionando frente al estímulo de OMV de Pg.

Durante la formación de la placenta, las células Tb migran e invaden el estroma decidual y establecen una conexión directa con los vasos sanguíneos maternos. Estas funciones requieren de altas tasas de producción de energía debido a que involucran la adquisición de un fenotipo invasivo que, además, implica la secreción de factores solubles como metaloproteinasas que promueven la invasión e inhibidores de las mismas que regulan la homeostasis tisular durante el proceso. En línea con una asociación estrecha entre esas funciones críticas de las células Tb y el metabolismo celular, numerosas evidencias muestran que la desregulación de la glucólisis está asociada a embarazos patológicos ^{244,245}. Así, hipotetizamos que los cambios metabólicos que inducen las OMV de Pg impactan sobre las funciones de migración e invasión trofoblástica y encontramos que efectivamente se encuentran disminuidas en el modelo *in vitro*. Estos resultados fueron coherentes con lo reportado por ²⁵⁸ sobre factores presentes en el sobrenadante de cultivos de Pg, como las OMV, que inhiben la invasión trofoblástica en la línea celular HTR-8. Por otro lado, la disminución en la expresión y producción de IL-6 observada podría estar impactando negativamente en la invasión trofoblástica, debido a que IL-6 no solo favorece el proceso invasivo ²²⁰, sino también está involucrada en la inducción de la expresión de metaloproteinasas como la MMP-9 ²⁵⁹, la cual también vimos disminuida

en las células Tb tratadas con OMV. La menor invasividad de las células Tb por efecto de las OMV de Pg podría impactar en su interacción con células inmunes y endoteliales, como se discutirá más adelante, lo que llevaría a una placentación deficiente.

En cuanto a los mecanismos patogénicos de las bacterias periodontales en complicaciones gestacionales, un punto interesante a destacar es que a pesar de que inhiben la migración e invasión de células trofoblásticas *in vitro*, el ciclo celular y la viabilidad no se alteran. Esto es consistente con un efecto moderado y persistente de la gingivoperiodontitis a lo largo del embarazo, que no compromete el resultado final del mismo, pero desafía la homeostasis inmunológica y afecta la función placentaria convergiendo estos procesos en complicaciones como las reportadas.

La autofagia es un proceso celular catabólico que mantiene la homeostasis celular al permitir que las células se adapten a estresores intracelulares o extracelulares, teniendo un rol importante en el destino celular. Este proceso puede ser no selectivo, es decir que puede activarse frente a la falta de nutrientes o cambios en el metabolismo celular, donde la célula encapsula sus componentes intracelulares para degradarlos y obtener energía de ese modo. Por el otro lado, la autofagia puede ser activada de forma selectiva, por ejemplo, ante la presencia de organelas dañadas o proteínas mal plegadas que causan estrés oxidativo, así como también ante la presencia de bacterias que invaden las células como primera línea de defensa ²⁶⁰. Teniendo en cuenta que la autofagia al comienzo de la placentación modula la invasión trofoblástica y el remodelado vascular ²⁰¹, y que alteraciones en la autofagia de las células Tb están asociadas con la placentación deficiente de la PE ²⁶¹, y considerando los cambios metabólicos y funcionales que ejercen las OMV sobre las células Tb, lo siguiente que hicimos fue evaluar el impacto de las OMV de Pg sobre la autofagia de las células Tb.

En primer lugar, utilizando el inhibidor de la acidificación lisosomal Bafilomicina A1, que permite evaluar la acumulación de marcadores de autofagosomas LC3 y p62 debido a que no se pueden fusionar con los lisosomas y degradarse, encontramos que el flujo autofágico se encontraba disminuido tras el estímulo con OMV de Pg, evidenciado por una falta en la acumulación de estos marcadores. En segundo lugar, las OMV también redujeron el área ocupada por lisosomas en las células Tb y alteraron la expresión de LAMP2. Tanto LAMP1 como LAMP2 constituyen alrededor del 50% de las proteínas que conforman la membrana lisosomal, siendo en particular LAMP2 una de las proteínas que más se expresa en placenta humana y, además, necesaria para la fusión entre autofagosomas y lisosomas ²²².

Estos resultados están en línea con lo reportado en otros trabajos donde estudian los efectos de la infección con Pg sobre la modulación de la autofagia en células endoteliales y epiteliales gingivales ^{262–264}. En dichos trabajos, demuestran que luego de ingresar en las células, Pg se internaliza

en vesículas autofágicas evitando la fusión de los autofagosomas con los lisosomas. Los trabajos sugieren que de esta manera Pg evita el reconocimiento por receptores autofágicos previniendo su eliminación, y que utiliza los autofagosomas como nicho para replicar. Además, se demostró que la infección con Pg disminuye el flujo autofágico en células epiteliales gingivales debido a una disminución en la cantidad de lisosomas. En particular, en dicho trabajo vieron que Pg indujo una disminución en la expresión de LAMP2, mientras que el sobrenadante de Pg lo aumentó comparable a niveles basales ²⁶⁴. Si bien en dicho trabajo reportaron diferencias en los efectos sobre la modulación de la autofagia causada por la infección con Pg o su sobrenadante, que puede contener OMV, y aunque se ha descrito que muchas bacterias son capaces de modular la autofagia para su propio beneficio, en particular a través de la secreción de toxinas que liberan o están contenidas en OMV, hasta la fecha un solo estudio ²⁶⁵ informa el papel de las OMV en la inhibición de la autofagia. En ese trabajo, ven que OMV provenientes de una cepa patogénica de *Escherichia coli* inhibe el flujo autofágico en células intestinales al bloquear la maduración de los autofagosomas y su acidificación al impedir la fusión con lisosomas, siendo esta inhibición causada por la expresión diferencial de factores de virulencia en las OMV de esa cepa bacteriana.

Otros estudios sobre la modulación de las OMV bacterianas sobre la autofagia en distintos tipos celulares sugieren que las OMV pre-activan a las células eucariotas para hacerlas susceptibles a una futura invasión bacteriana, induciendo la expresión de quinasas involucradas en los primeros pasos de la autofagia, pero sin activar el mecanismo autofágico para evitar un gasto de energía innecesario y la eliminación indiscriminada de los componentes citoplasmáticos ²⁶⁰. El hecho de que las OMV de Pg inhiban el flujo autofágico en las células Tb, junto con la observación de la infección con Pg inhibe el flujo autofágico en distintos modelos celulares, y que la inhibición farmacológica de la autofagia usando 3-MA en células epiteliales gingivales infectadas con Pg disminuye su persistencia ²⁶³, es una evidencia sólida de un mecanismo adaptativo de la bacteria. En ese mecanismo, las OMV facilitarían la maquinaria autofágica para la replicación bacteriana en el curso de la infección. Sin embargo, se requieren más estudios para poder afirmar esta sugerencia.

En tercer lugar, considerando que las OMV de Pg disminuyeron la capacidad migratoria de las células Tb y teniendo en cuenta el rol de la autofagia sobre esta función trofoblástica, que también se encontraba alterada por las OMV, evaluamos el impacto de la modulación de la autofagia por las OMV de Pg sobre la capacidad migratoria de las células Tb. Nuestros resultados confirmaron que la inhibición de la autofagia al utilizar 3-MA se asocia con una disminución en la migración trofoblástica, lo que está en línea con lo reportado en células trofoblásticas HTR-8 donde la inhibición de la autofagia repercute negativamente sobre su capacidad invasiva ²⁶⁶. Mas aun, al utilizar el inductor de la autofagia rapamicina, pudimos demostrar que la migración trofoblástica se recuperaba a niveles

basales tras la disminución de la autofagia causada por las OMV de Pg. Estos resultados sugieren que la modulación de las OMV sobre el flujo autofágico está, al menos parcialmente, asociado con la disminución en la migración trofoblástica.

Un informe reciente que muestra que OMV de bacterias anaerobias alcanzan eficazmente la placenta en embarazos normales ha puesto de relieve la relevancia de los efectos mediados por OMV en embarazos normales y patológicos ⁵³. A la luz de esta observación y de estos resultados, es concebible que los efectos deletéreos de Pg durante la placentación en embarazos asociados a periodontitis estén relacionados con la liberación de OMV y su papel promotor de la posterior infección por Pg o la alteración de la función de las células Tb.

Para el abordaje de mecanismos biológicos implicados en complicaciones gestacionales asociadas a gingivoperiodontitis se han utilizado varios modelos animales ^{60,61,267}. Considerando las diferencias con la gestación humana, se ha intentado modelar algunos signos de estas complicaciones para comprender los mecanismos etiopatogénicos involucrados en la disfunción placentaria y contribuir con el conocimiento de estos para hallar biomarcadores o blancos terapéuticos. Existen modelos murinos donde la infección con *Porphyromonas gingivalis* induce parto pretérmino y crías con bajo peso al nacer ^{60,267,268}. Por otro lado, la capacidad de las vesículas de Pg para diseminarse por vía sistémica y acumularse en tejidos distantes ha sido reportada previamente, particularmente en contextos de enfermedades metabólicas e inflamatorias ²⁴¹.

En nuestro estudio utilizamos el siguiente modelo: las hembras preñadas fueron inyectadas con OMV de Pg en el día 6,5 de gestación, momento post-implantación, pero previo a una placentación completa ²¹⁰. Confirmamos que las OMV de Pg alcanzan de manera eficiente los sitios de implantación 6h post inyección. Estos resultados van en concordancia con un estudio reciente que muestra que las OMV de bacterias anaerobias llegan efectivamente a la placenta en embarazos normales y ha resaltado la relevancia de los efectos mediados por OMV en embarazos saludables y patológicos ⁵³.

Al día 14,5 de gestación, las hembras tratadas mostraron una disminución del peso fetal y placentario, junto con una menor eficiencia placentaria, lo que indica un compromiso en la capacidad de la placenta para sostener el crecimiento fetal. Desde el punto de vista histológico, el tratamiento con OMV de Pg alteró la estructura placentaria al día 14,5 de gestación. En particular, las células Tb que conforman la zona del laberinto, que representaría a las vellosidades Tb en humanos, mostraron cambios estructurales comparables con hipertrofia trofoblástica. La hipertrofia trofoblástica, aunque pueda parecer un signo de crecimiento compensatorio, también compromete la eficiencia del intercambio materno-fetal al reducir la superficie para el intercambio de nutrientes. Por otro lado, las

OMV causaron dentro de la zona de unión una extensión de las células Tb gigantes con una tendencia a aumentar su espesor. Estas alteraciones se encuentran asociadas con una menor expresión del transportador de glucosa placentario GLUT1.

Es importante mencionar que las OMV no alteraron la duración de la gestación ni modificaron la tasa de reabsorción embrionaria, lo que apoya lo dicho anteriormente sobre que las OMV de Pg no comprometen el desarrollo del embarazo, pero si causan alteraciones de la homeostasis y la función placentaria. El tratamiento *in vivo* con OMV a la dosis utilizada afectó al crecimiento fetal y la integridad placentaria, principalmente de las células trofoblásticas, sin evidencia de cambios vasculares fetales y no indujo reabsorción. De hecho, se necesitó una dosis 10 veces mayor de OMV para inducir aborto en nuestro modelo, mientras que el 10% de la dosis resultó ineficaz, señalando una regulación fina de funciones trofoblásticas por parte de las OMV.

Los mecanismos que operaron *in vivo* en las hembras tratadas con OMV de Pg afectando la homeostasis placentaria y el crecimiento fetal, implicaron cambios estructurales y metabólicos en la placenta de los ratones que fueron coherentes con lo demostrado *in vitro* utilizando la línea celular Tb HTR-8 en la que se alteró el metabolismo y funcionalidad trofoblástica.

Hasta aquí señalamos los efectos directos de OMV de Pg sobre metabolismo y función de las células Tb. Sobre esta base, en una segunda etapa de nuestros estudios testeamos la hipótesis que las OMV también afectan la comunicación entre las células Tb y otras células de la interfase como, en particular, células endoteliales e inmunes maternas.

Vimos que sumado a los cambios metabólicos y funcionales experimentados por las células Tb frente a las OMV de Pg, se alteró la expresión de ARNm de marcadores pro/antiangiogénicos. Este efecto perturbador de las OMV sobre las células Tb fue paralelo con una incapacidad de estas células para modular la función endotelial. Los factores solubles producidos por las células Tb redujeron la migración de células endoteliales y promovieron la producción de ROS y la adhesión de monocitos, reflejando su estado de activación. La transformación de los vasos maternos, crítica durante el remodelado vascular al inicio del embarazo, se produce bajo el estricto control de las células Tb y fallas en este proceso conducen a complicaciones gestacionales asociadas a una mala placentación como la preeclampsia ¹¹⁰. Se han realizado esfuerzos para identificar posibles mecanismos de alteración y biomarcadores tempranos de dichas complicaciones. Entre ellos, el balance de moléculas pro/antiangiogénicas se ha convertido en una herramienta útil ²²⁷.

Sin embargo, los mecanismos subyacentes a la evidencia epidemiológica de gingivoperiodontitis asociada a complicaciones del embarazo y su relación con eventos vasculares aún no están claros. La baja abundancia de patógenos periodontales como Pg en la placenta ⁵⁰ junto con el hecho de que Pg libera OMV de pequeño tamaño que pueden propagarse y liberar su carga dentro de las células del huésped en sitios distantes plantea la cuestión de si estas vesículas podrían tener un papel en los resultados adversos del embarazo.

Es interesante destacar que entre los efectos sistémicos más estudiados de las OMV de Pg se encuentran los que refieren daño a nivel vascular, que sería un blanco clave durante la placentación. En efecto, se demostró que las OMV de Pg aumentan la permeabilidad vascular *in vitro* en un modelo de larva de pez cebra y en células endoteliales microvasculares humanas a través de la escisión proteolítica de moléculas de adhesión celular por factores de virulencia contenidos en las OMV ³³, lo cual fue también confirmado *in vivo* en ratones inyectados con OMV de Pg mediante la visualización del colorante azul de Evans en el ensayo de Miles a los 10 minutos post inyección ³⁶. La posibilidad de que los factores derivados de Pg modulen la función de las células Tb tras la internalización de sus OMV, afectando la transformación vascular y aumentando así la susceptibilidad a desarrollar complicaciones del embarazo, está fuertemente respaldada por los presentes resultados y por observaciones previas en otras enfermedades sistémicas ^{32,33,241}.

Entre las principales células de la respuesta inmune innata que intervienen en la regulación temprana de la respuesta inflamatoria en esta tesis estudiamos a los monocitos, los neutrófilos y las células dendríticas.

Específicamente, los neutrófilos han captado creciente atención en el contexto del embarazo en los últimos años, ya que en condiciones fisiológicas participan activamente en la comunicación con las células trofoblásticas y contribuyen a procesos clave como la angiogénesis y la regulación inmunológica en la interfase materno-fetal. Sin embargo, en determinadas situaciones, su activación excesiva o desregulada puede resultar perjudicial para el desarrollo gestacional ^{173,176,228,269,270}. Como mencionamos previamente, se sabe que durante la enfermedad periodontal y más aún en embarazos complicados por PE ^{175,229,271,272} los neutrófilos exhiben un perfil proinflamatorio asociado a la producción de ROS, la liberación de NETs y producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias ^{273–276}. En cuanto a la quimioatracción de neutrófilos, se sabe que es un proceso finamente regulado que permite su reclutamiento hacia sitios específicos como la decidua durante el embarazo o sitios de inflamación. Este fenómeno está mediado por quimioquinas como IL-8 y diversas señales derivadas del endotelio, de células inmunes activadas, células deciduales o trofoblásticas entre otras. En trabajos previos reportamos que los medios condicionados de células trofoblásticas, que tienen alta

concentración de IL-8, eran capaces de atraer en más de 20 veces a los neutrófilos, comparado con un medio control. Aquí, encontramos que los factores secretados por las células Tb estimuladas con OMV de Pg (MC OMV) promovían aún más la quimioatracción de neutrófilos. Este resultado es coherente con lo observado previamente en estudios del laboratorio ⁶⁵ en los cuales se vio que el MC de células trofoblásticas previamente estimuladas con fluido gingival crevicular de mujeres embarazadas de 16-20 semanas de gestación indujo la quimioatracción de neutrófilos.

Considerando que en otros estudios del laboratorio se demostró que los MC de células Tb desactivan a los neutrófilos activados con PMA al inhibir la formación de ROS y liberación de NETs ²²⁵, en esta tesis observamos que el MC OMV perdió la capacidad de desactivar a los neutrófilos cuando eran expuestos a PMA en comparación a los neutrófilos que habían sido pre-condicionados con el MC control. Un mecanismo posible que explica este efecto es que el MC OMV indujo una mayor expresión de la subunidad de membrana de la NADPH oxidasa gp91^{phox} y de las subunidades citosólicas p47^{phox} y p67^{phox}. Está ampliamente descripta una conexión entre la regulación de la actividad de la NADPH oxidasa, las vías metabólicas durante la activación de los neutrófilos y las cantidades de ROS liberadas ¹⁶⁷. De hecho, existe una relación estrecha entre la generación de poder reductor mediante la incorporación de glucosa derivada hacia la vía de las PPP para la generación de ROS en neutrófilos y la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa que lo producen ²⁷⁷. No obstante, este vínculo en el contexto del embarazo y la función inmunomoduladora de las células Tb, y más aún en el contexto de gingivoperiodontitis materna, aún requiere más investigación. En línea con nuestro objetivo de profundizar en el estudio del perfil de activación de los neutrófilos, estudiamos la expresión de citoquinas en los mismos. Encontramos que el tratamiento con MC OMV aumentaba la expresión de IL-8 y TNF- α , citoquinas proinflamatorias de respuesta temprana.

Estos resultados sugieren que las OMV de Pg impactan de forma negativa en la interacción trofoblasto-neutrófilo, alterando el perfil de activación de los neutrófilos y por ende la homeostasis inmunológica contribuyendo al establecimiento de un ambiente desfavorable que podría alterar el curso normal del embarazo.

Durante el comienzo de la gestación los monocitos son altamente reclutados a la interfase materno fetal donde, por su plasticidad inherente, pueden diferenciarse en macrófagos ¹²⁴ o en células dendríticas ²³³ bajo el control de las células Tb. Una vez allí, adquieren un perfil funcional específico que contribuye con el remodelado vascular y el establecimiento de la tolerancia inmune hacia el feto ²⁷⁸. Teniendo en cuenta que nuestros resultados mostraron que las OMV de Pg indujeron la expresión de MCP-1 y GM-CSF en las células Tb, ambos factores conocidos por modular funciones mieloides y promover la migración y activación de monocitos ^{279,280}, en primer lugar, evaluamos la quimioatracción

de monocitos hacia los factores solubles presentes en los medios condicionados de células Tb tratadas o no con OMV de Pg. Encontramos que el MC OMV inducía un aumento en la migración de los mismos respecto al MC control.

En líneas generales, luego de su reclutamiento los monocitos se pueden activar en tres perfiles que ejercen diferentes funciones incluyendo fagocitosis, liberación de ROS, secreción de citoquinas y quimioquinas, reclutamiento de neutrófilos, presentación antigénica y modulación de la actividad de linfocitos T. Estos perfiles poseen una expresión diferencial de marcadores: los monocitos clásicos que se caracterizan por ser CD14⁺⁺ y CD16⁻, los monocitos intermedios (CD14⁺⁺CD16⁺) y los monocitos no clásicos (CD14⁻ CD16⁺⁺) ^{147,281}. Durante el embarazo normal, se observa un aumento en el número de monocitos sanguíneos y su activación, con un cambio en la proporción de subpoblaciones monocíticas sanguíneas, que es altamente heterogénea según el momento de la gestación en el que se estudian ²⁷⁸. Por ejemplo, algunos autores indican que en gestaciones saludables los monocitos son principalmente clásicos, caracterizados por una alta expresión de CD14, el receptor de MCP-1 (CCR-2) y mayor expresión de CD86 que los no clásicos. Otros autores en contraposición indican que los monocitos que predominan son los intermedios ¹⁴⁷. Sin embargo, los mecanismos exactos por los cuales los monocitos se activan durante embarazos normales y patológicos como los que desarrollan PE se desconocen, y probablemente dependan de los factores liberados por la placenta. Se describió que la interacción trofoblasto-monocito debe ser estrictamente regulada para que los monocitos adquieran un perfil funcional específico que promueva la tolerancia inmunológica y un desarrollo placentario adecuado. De hecho, monocitos activados, tanto clásicos como no clásicos, pueden infiltrarse en la decidua dando lugar a un aumento de macrófagos con fenotipo M1 proinflamatorio, situación observada en la decidua de mujeres con preeclampsia ²⁸².

Cuando analizamos la expresión de algunos marcadores en los monocitos incubados con los MC de las células Tb tratadas o no con OMV de Pg con el objetivo de explorar el perfil que adquirirían, pudimos corroborar que el MC mostró una tendencia a aumentar el porcentaje de monocitos IL-10⁺ y reducir la expresión de CD86, consistente con promover un perfil antiinflamatorio. En este sentido, en trabajos previos del laboratorio se demostró que el MC de células Tb de primer trimestre indujo la quimioatracción de monocitos y contribuyó con la adquisición de un perfil antiinflamatorio sin cambios en la expresión del marcador de activación CD86 asociado a un aumento en la expresión de IL-10 ²⁸³. Sin embargo, en nuestros ensayos, el efecto del MC de células Tb sin tratar tiende a perderse cuando los monocitos fueron expuestos a MC OMV, allí se evidenció una tendencia a menor porcentaje de células IL-10⁺ sin cambios en CD86. El resultado fue coherente con lo reportado previamente en el laboratorio ^{284,285}, en que factores solubles liberados por células Tb modulan diferencialmente la

migración y la expresión de quimioquinas y sus receptores en monocitos luego de la incubación con los MC y en placentas de primer trimestre humanas.

Retomando lo dicho previamente, la inducción de signos característicos de la placenta que se detectan en PE se asocian a la activación proinflamatoria de los monocitos. Por ejemplo, en un modelo de ratas preñadas se vio que la hipertensión y proteinuria solo se inducían luego del tratamiento con LPS de *E. coli*²⁸⁶ y no así utilizado el LPS de *P. gingivalis*²⁸⁷, a pesar del hecho de que los monocitos son activados con ambos LPS. La respuesta inmune ejercida y específicamente la activación de los monocitos es diferente en las diferentes infecciones, es decir depende del estímulo. De hecho, las diferencias en la respuesta a la activación de monocitos de mujeres embarazadas con LPS de *E. coli* o LPS de *P. gingivalis* se deben en parte a las diferencias en la producción de citoquinas por parte de los monocitos²⁸⁸. Estas observaciones pueden explicar por qué ante ciertas infecciones en el tracto urinario o la periodontitis puede aumentar el riesgo de PE, mientras que otras infecciones no lo hacen²⁸⁹.

El microambiente inmunológico de la interfase materno- fetal es crítico para un embarazo exitoso, y como se mencionó antes, las células Tb están involucradas en el mantenimiento de la homeostasis inmune a través de la interacción con los leucocitos maternos allí presentes²³³. En este sentido, trabajos previos del laboratorio demostraron que las células Tb inducen la diferenciación de monocitos y células dendríticas hacia perfiles regulatorios y tolerogénicos respectivamente^{136,284}. Las CD tolerogénicas confieren tolerancia inmune a través de la expansión de células Treg, limitando la proliferación de células T efectoras e induciendo su apoptosis²⁹⁰, y su papel en el mantenimiento del embarazo es crucial^{164,291,292}. Considerando que previamente vimos que los factores solubles liberados por células Tb tratadas con OMV inducían la activación de los neutrófilos y que además tendían perder la capacidad de inducir monocitos antiinflamatorios a diferencia de los monocitos incubados con MC control, evaluamos el efecto de los factores presentes en el MC OMV sobre la diferenciación de monocitos hacia células dendríticas (CD). Como esperábamos, el MC previno la diferenciación a un perfil de CD inmaduro clásico e indujo en cambio la adquisición de un perfil tolerogénico CD1a⁺CD14⁺ similar al de las CD deciduales, mientras que los factores liberados por células Tb cuando eran estimuladas con OMV de Pg perdieron la capacidad de inducir este perfil, generando CD inmaduras. Las CD presentes en la decidua materna expresan un fenotipo único²⁹³ y la desregulación en su diferenciación puede conducir a la pérdida de la tolerancia inmune materna. En efecto, cuando analizamos la expresión de los marcadores clásicos de maduración y activación encontramos que el MC OMV previno la diferenciación de las CD hacia un perfil tolerogénico evidenciado por la disminución en la frecuencia de células CD83⁺/CD86^{low} respecto al MC control. Asimismo, también causó una disminución en la producción de IL-10 por parte de estas CD y una tendencia a la

disminución en la expresión de HLA-G respecto al MC. En línea con este resultado, otros reportes mostraron una frecuencia alterada en células dendríticas DC-10 (que se caracterizan por producir altos niveles de IL-10 y expresar HLA-G) y otros *subsets* de células tolerogénicas presentes en la decidua de pacientes con pérdida recurrente del embarazo, reafirmando el rol de las CD tolerogénicas en el mantenimiento de la gestación ^{162,294,295}.

El estado de maduración y activación de las CD determina su capacidad para responder ante estímulos proinflamatorios. Por ejemplo, en un estudio se demostró el papel de los factores inmunomoduladores presentes en las OMV de Pg y de otros patógenos periodontales en la maduración de CD orales y la capacidad de estas para inducir células T efectoras ²⁹⁶. Con el objetivo de entender los procesos involucrados en la maduración de las CD debido el impacto de las OMV de Pg en el contexto de la gestación, evaluamos el papel de los factores presentes en el MC OMV en el estado de maduración de las CD y su capacidad de responder ante el LPS. Encontramos que estas CD respondían con una mayor activación evidenciada por un aumento en la frecuencia de células CD86⁺ similar al de las CD maduras y una alta proporción de células CD83⁺CD86⁺, respecto a las CD diferenciadas en presencia de MC control que mostraron una menor activación.

El hecho de que las CD diferenciadas en presencia de MC no respondan al desafío con LPS refuerza su perfil tolerogénico, evidenciado por la disminución en la expresión de marcadores de activación. Este comportamiento es coherente con el mantenimiento de tolerancia inmune en la interfase materno-fetal y con lo reportado previamente que las CD presentes en decidua de primer trimestre CD83⁺ permanecen en bajo número y presentan una capacidad deficiente para estimular células inmunes en co-cultivo *ex vivo* ¹⁶¹. Por otro lado, el hecho de que las CD diferenciadas en presencia de factores liberados por células Tb tratadas con OMV presenten mayor cantidad de células maduras CD83⁺ CD86⁺ como respuesta a la exposición a estímulos proinflamatorios sugiere que las células Tb pierden la capacidad de promover un microambiente adecuado desarrollo fetal. Por último, respecto a la característica fenotípica de las DC-10, la producción de esta citoquina por parte de las CD está involucrada en el control de la activación de las poblaciones inmunes en la interfase materno fetal ²³³, por lo que la tendencia a la disminución en su expresión por parte de las CD diferenciadas en presencia de MC OMV tanto antes como luego de su maduración con LPS podría explicar en parte los mecanismos patogénicos de las OMV de Pg sobre la interacción entre las células Tb y las CD en el mantenimiento de la tolerancia fetal.

Los resultados de los modelos *in vitro* e *in vivo* discutidos hasta aquí están en línea con las observaciones realizadas en placenta humana en embarazos que cursan con complicaciones como PE, RCF y PP, donde la gingivoperiodontitis se asocia a déficit placentario y del crecimiento fetal pero no

genera una respuesta inflamatoria excesiva y descontrolada que desencadene la pérdida completa del embarazo. Si bien las OMV afectaron la función trofoblástica en cuanto a la capacidad de migración e invasión en cultivo *in vitro*, no comprometieron el ciclo celular. Lo mismo ocurrió en el modelo *in vivo* en ratón, si bien las OMV de Pg modificaron la integridad funcional de la placenta, con cambios estructurales y metabólicos, tampoco comprometieron el curso de la gestación; se mantuvo tanto la duración de la gestación como el número de crías por camada. Es más, en el modelo murino se pudo demostrar la presencia de OMV en los sitios de implantación tan tempranamente como 6 horas post inyección, un tiempo similar al observado en otros modelos de alteraciones sistémicas por OMV de Pg en sistema nervioso²⁴¹, sugiriendo un efecto local en tejidos blanco y entre los cuales el tejido vascular parece tener cierta preeminencia. Distinta es la situación si la infección por bacterias anaerobias alcanza niveles mayores que no son contrarrestadas por la respuesta inmune materna y que, en algunos casos, podría derivar en infección de la cavidad amniótica y pérdida del embarazo. Como se discutió antes, en el modelo de ratón vimos que si se aumenta la dosis de OMV hay una alta tasa de reabsorción fetal.

Por otro lado, vale destacar que no basta con que las vesículas de bacterias se encuentren en el tejido blanco para desencadenar una respuesta proinflamatoria. De hecho, se ha informado la presencia de vesículas extracelulares de bacterias en placentas humanas a término, en embarazos que no han tenido complicaciones, embarazos normales en su desarrollo y en el crecimiento fetal⁵³. En ese trabajo, los autores proponen que las bacterias alcanzan el lecho placentario a través de diseminación hematológica desde sitios maternos que albergan un microbioma característico como por ejemplo la placa subgingival, el intestino o las vías urogenitales. Lo notable de este hallazgo es que esas vesículas que se aíslan de placenta en embarazos normales no inducen una respuesta proinflamatoria *in vitro*. Efectivamente, en ensayos *ex vivo* con vesículas aisladas de dichas placentas donde se estimulan monocitos humanos (línea promonocítica humana THP-1), los autores vieron que los monocitos no aumentaron la expresión de moléculas características de perfiles proinflamatorios o de perfiles M1 en macrófagos, excepto que las OMV fueran agregadas en muy alta concentración, la cual no podrían alcanzar, o al menos no se registra en esa medida, en las muestras de placenta. Y nuevamente, estos resultados remiten a lo que vimos en el modelo en ratón con dosis muy alta (10x) de OMV de Pg y aumento de reabsorción fetal. Más aún, los autores refieren que, en ensayos realizados en paralelo con las OMV extraídas de placenta sobre cultivos de células placentarias humanas, las células de la placenta no expresaron mayores niveles de citoquinas proinflamatorias, como podría predecirse por el hecho que una alta cantidad de vesículas fue incorporada en dichas células placentarias⁵³. Será importante en el futuro analizar si esa falta de respuesta tiene alguna relación con efectos metabólicos inducidos por OMV de Pg como los que observamos en el modelo *in*

vitro. O si se requiere la presencia combinada de OMV de Pg y la propia bacteria para inducir inflamación en células de la placenta.

Con el objetivo de extender los resultados obtenidos en diseños *in vitro* y modelo murino a la gestación humana, utilizamos un diseño de interacción *ex vivo* en el que células trofoblásticas humanas fueron expuestas a componentes del fluido gingival crevicular de pacientes gestantes, con el fin de simular un entorno más parecido o que remedara algunos aspectos de la interacción *in vivo* entre dichos componentes y las OMV durante el embarazo. En este contexto, se evaluó por un lado el efecto del FGC sobre la función de las células trofoblásticas, con especial atención a la presencia o ausencia de *P. gingivalis*. Por otro lado, probamos la hipótesis de una eventual interferencia de las OMV con el efecto de dichos fluidos sobre la activación de células Tb.

En primer lugar, vimos que la gingivoperiodontitis en la población estudiada de mujeres gestantes de 16-20 semanas tiene características de inflamación gingival moderada, similar en todas las pacientes, y en ningún caso se detectó periodontitis agresiva. Las muestras de fluido gingival se distribuyeron según presencia o no de Pg generando dos grupos con similar número de pacientes. Al realizar los ensayos de migración con células Tb en condiciones similares a las usadas con las OMV (Capítulo 1), vimos que los fluidos con Pg disminuyen en mayor medida la migración que los que no tienen Pg. Este resultado, similar a lo observado con las OMV en el modelo de interfase *in vitro*, si bien era esperado en términos de asemejar los efectos, parece indicar una prevalencia de los efectos de Pg por encima del efecto de otros componentes del fluido cuando se analiza la función de migración en células Tb. Más aún, sugiere que ambas, Pg y sus OMV, podrían participar en el efecto, considerando que el fluido no solo contiene las bacterias sino también puede contener sus OMV, algo que estamos analizando en muestras de fluidos actualmente.

En línea con esta hipótesis, se detectaron altas concentraciones de vesículas extracelulares de patógenos periodontales en fluido gingival crevicular en embarazos complicados o no por diabetes gestacional con mayor concentración en pacientes con hiperglucemia ^{66,297}. Es interesante destacar que un análisis de *Gene ontology* en las vesículas extracelulares del fluido gingival crevicular de pacientes gestantes con periodontitis reveló la presencia de proteínas que participan en respuestas inflamatorias, en el metabolismo de la glucosa y en los mecanismos de respuesta a insulina ⁶⁶, apoyando las observaciones de esta tesis en cuanto al impacto de estas estructuras en la bioquímica y función celular en el contexto de embarazo. Nuevos estudios con muestras de FGC de pacientes donde se determine simultáneamente la presencia de Pg, la concentración de OMV de Pg y las vías metabólicas implicadas en la migración e invasión Tb como también en la interacción con células deciduales permitirán profundizar en estas hipótesis.

Otro efecto que analizamos fue la producción de ROS en células Tb expuestas al fluido gingival crevicular. En este caso, los fluidos con Pg indujeron un aumento significativo de los niveles de ROS cuando se compararon con la producción basal. También vimos una tendencia a mayor producción de ROS con las muestras que tenían Pg comparado con las negativas para Pg. Aunque este aumento difiere de lo observado con las OMV, teniendo en cuenta que el aumento de ROS es una clara señal de activación inflamatoria y de estrés oxidativo, es esperable que la variedad de factores presentes en el FGC aumente este parámetro, asociado o no a Pg.

Con el fin de profundizar en este resultado y la eventual interferencia de las OMV, diseñamos un ensayo pretratando a las células Tb con OMV previo o simultáneo al agregado de FGC. Notablemente, las OMV inhibieron el efecto de los FGC para aumentar ROS en la misma medida cualquiera fuera el diseño, sugiriendo una fuerte incidencia de la capacidad de las OMV para reducir la producción de estas especies por sobre los componentes del FGC. Y esto fue así tanto en el caso que los FGC fueran positivos o negativos para Pg, pero con mucho mayor efecto en los positivos para Pg, poniendo en evidencia la interacción y reforzando el papel de las OMV como moduladoras de la respuesta oxidativa. Vale comentar que la presencia de Pg en el FGC estuvo asociada a otras especies características como Fn y Aa en una proporción comparable: de las 52 muestras estudiadas, 17 tenían Pg y Aa y 33 tenían Pg y Fn.

La inflamación gingival en etapas tempranas del embarazo en mujeres que mantienen una higiene oral pobre (menos de siete acciones de higiene oral por semana) se definió como un factor de riesgo de la ocurrencia de nacimientos con bajo peso ²⁹⁸. Hasta el momento se desconoce si las complicaciones gestacionales referidas en esta tesis por su asociación con gingivoperiodontitis son el resultado de la acción de los propios patógenos periodontales o sus OMV, o si, en cambio, no son las bacterias ni sus derivados en forma directa sino factores sistémicos maternos asociados a esa respuesta inflamatoria en el surco periodontal los que afectan la función placentaria. En vista de lo observado y discutido hasta aquí sobre las OMV de Pg en el modelo de interfase *in vitro* y en el modelo en ratón, y teniendo en cuenta las observaciones clínicas citadas a lo largo de este trabajo, el escenario más probable es que concurren ambos fenómenos para afectar la función placentaria: en esa hipótesis, la acción de los patógenos periodontales se vería favorecida y/o modificada por un ambiente proinflamatorio originado por la respuesta inmune sistémica materna y/o por factores inflamatorios generados en la cavidad oral. En ese ambiente inflamatorio se potenciaría la acción deletérea de las bacterias o de sus OMV que llegan a la placenta. También podría ocurrir que las OMV predispongan a las células placentarias metabólicamente y así modifiquen su respuesta frente a estímulos inflamatorios.

En cuanto a los ensayos con muestras de fluido crevicular de pacientes gestantes, más allá de analizar la implicancia de la presencia de la bacteria en el fluido para generar los efectos deletéreos en células trofoblásticas (menor migración y aumento de ROS), lo que aparece más relevante en el marco de esta tesis es que el condicionamiento previo de células trofoblásticas con OMV de Pg modifica la activación oxidativa de dichos fluidos sobre las células trofoblásticas *in vitro*. De hecho, ese condicionamiento les impide a las células trofoblásticas generar los niveles de ROS inducidos por el FGC. Teniendo en cuenta que varias de las bacterias periodontales implicadas en las complicaciones gestacionales, en particular Pg, son anaerobias, y que los niveles altos de ROS afectarían su capacidad de infectar a las células trofoblásticas, el efecto de limitar la producción de ROS inducida por los fluidos que observamos con las OMV sugiere que dichas vesículas podrían modular la infección de células de la placenta controlando la respuesta oxidativa. Los resultados sobre una interacción entre las OMV y la bacteria en el marco proinflamatorio del fluido crevicular son promisorios y se encuentran en marcha nuevos ensayos en diseños *ex vivo* con FGC para definir las características de dicha interacción, como también para elucidar si las OMV de Pg modifican la infectividad por Pg de las células Tb.

Como conclusión, en este trabajo se demuestra el papel de las OMV de Pg en los cambios metabólicos de las células trofoblásticas y su impacto sobre funciones clave de estas células durante la placentación. Nuestros resultados muestran que las OMV reprograman el metabolismo de las células trofoblásticas humanas reduciendo las vías glucolíticas y la producción total de ROS con una actividad mitocondrial sostenida, manteniéndolas en un estado metabólico de reposo en el que funciones centrales como migración e invasión se ven fuertemente reducidas. Por otro lado, probamos que las OMV de Pg alteran la expresión de mediadores pro y antiangiogénicos y pro y antiinflamatorios en la interacción de células trofoblásticas con células inmunes y endoteliales. Asimismo, encontramos que los factores solubles liberados por las células Tb luego de ser estimuladas con OMV de Pg, atraen y activan neutrófilos, monocitos y CD en perfiles consistentes con una pérdida de la homeostasis inmunológica. Por último, las OMV de Pg fueron capaces de modular en células Tb la producción de ROS inducida por factores presentes en los FGC de pacientes embarazadas de 16-20 semanas de gestación.

REFERENCIAS

1. Curtis MA, Diaz PI, Van Dyke TE. The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2020;83(1):14–25. <https://doi.org/10.1111/prd.12296>
2. Hajishengallis G. Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(1):30–44. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3785>.
<https://doi.org/10.1038/nri3785>
3. Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nature Reviews Immunology*. 2021. <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-00488-6>. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00488-6>
4. Rafiei M et al. Study of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal diseases: A systematic review and meta-analysis. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*. 2017;31(1).
<https://doi.org/10.14196/mjiri.31.62>
5. Xu W, Zhou W, Wang H, Liang S. Roles of *Porphyromonas gingivalis* and its virulence factors in periodontitis. Vol 120 Elsevier Ltd; 2020. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.12.001>.
<https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.12.001>
6. Wang Z et al. Periodontitis & preeclampsia: were outer membrane vesicles a potential connection? *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2023;36(1).
<https://doi.org/10.1080/14767058.2023.2183767>
7. Liu S et al. *Porphyromonas gingivalis* and the pathogenesis of Alzheimer’s disease. *Critical Reviews in Microbiology*. 2023. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2022.2163613>
8. Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: Towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontology* 2000. 2012;60(1):15–39.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00425.x>
9. Cardoso EM, Reis C, Manzanares-Céspedes MC. Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases. *Postgraduate Medicine*. 2018;130(1):98–104.
<https://doi.org/10.1080/00325481.2018.1396876>
10. Jia L et al. Laura --- Pathogenesis of Important Virulence Factors of *Porphyromonas gingivalis* via Toll-Like Receptors. 2019;9(July):1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00262>
11. Gui MJ et al. Spheres of influence: *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. *Molecular Oral Microbiology*. 2016;31(5):365–378. <https://doi.org/10.1111/omi.12134>
12. Wu Z et al. Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis*: recent advances in pathogenicity and associated mechanisms. *Frontiers in Microbiology*. 2025;16.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1555868>
13. Cecil JD, Sirisaengtaksin N, O’Brien-Simpson NM, Krachler AM. Outer Membrane Vesicle-Host Cell Interactions. *Microbiology Spectrum*. 2019;7(1):1–11.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.psib-0001-2018>
14. Xie H. Biogenesis and function of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. 2015.

15. Kulp A, Kuehn MJ. Biological Functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annual Review of Microbiology*. 2010;64:163–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073413>
16. Manning AJ, Kuehn MJ. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiology*. 2011;11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-258>
17. Mao H et al. Bacterial growth stage determines the yields, protein composition, and periodontal pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2023;13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1193198>
18. Zhang Z et al. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles inhibit the invasion of *Fusobacterium nucleatum* into oral epithelial cells by downregulating FadA and FomA. *Journal of Periodontology*. 2022;93(4):515–525. <https://doi.org/10.1002/JPER.21-0144>
19. Veith PD et al. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles exclusively contain outer membrane and periplasmic proteins and carry a cargo enriched with virulence factors. *Journal of Proteome Research*. 2014;13(5):2420–2432. <https://doi.org/10.1021/pr401227e>
20. Veith PD et al. The Type IX Secretion System and Its Role in Bacterial Function and Pathogenesis. *Journal of Dental Research*. 2022;101(4). <https://doi.org/10.1177/00220345211051599>
21. Veith PD et al. Outer Membrane Vesicle Proteome of *Porphyromonas gingivalis* Is Differentially Modulated Relative to the Outer Membrane in Response to Heme Availability. *Journal of Proteome Research*. 2018;17(7). <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00153>
22. Okamura H et al. Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis*: Novel communication tool and strategy. *Japanese Dental Science Review*. 2021;57:138–146. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2021.07.003>. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2021.07.003>
23. Han E et al. Extracellular RNAs in periodontopathogenic outer membrane vesicles promote TNF- α production in human macrophages and cross the blood – brain barrier in mice. 2019:1–11. <https://doi.org/10.1096/fj.201901575R>
24. Bitto NJ et al. Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. *Scientific Reports*. 2017;7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07288-4>
25. Choi J, Kim S, Hong S, Lee H. Secretable Small RNAs via Outer Membrane Vesicles in Periodontal Pathogens. 2017. <https://doi.org/10.1177/0022034516685071>
26. Alpdundar Bulut E et al. Human Gut Commensal Membrane Vesicles Modulate Inflammation by Generating M2-like Macrophages and Myeloid-Derived Suppressor Cells. *The Journal of Immunology*. 2020;205(10):2707–2718. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000731>
27. Rodriguez B V., Kuehn MJ. *Staphylococcus aureus* secretes immunomodulatory RNA and DNA via membrane vesicles. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1–22. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75108-3>. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75108-3>
28. Zhang Z et al. The Role of *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles in Periodontal Disease and Related Systemic Diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021;10(January):1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.585917>

29. Furuta N et al. Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles enter human epithelial cells via an endocytic pathway and are sorted to lysosomal compartments. *Infection and Immunity*. 2009;77(10):4187–4196. <https://doi.org/10.1128/IAI.00009-09>
30. Fleetwood AJ et al. Metabolic remodeling, inflammasome activation, and pyroptosis in macrophages stimulated by Porphyromonas gingivalis and its outer membrane vesicles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017;7(AUG). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00351>
31. Cecil JD et al. Outer membrane vesicles prime and activate macrophage inflammasomes and cytokine secretion in vitro and in vivo. *Frontiers in Immunology*. 2017;8(AUG):1–22. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01017>
32. Yoshida S et al. Porphyromonas gingivalis Administration Induces Gestational Obesity, Alters Gene Expression in the Liver and Brown Adipose Tissue in Pregnant Mice, and Causes Underweight in Fetuses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022;11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.745117>
33. Farrugia C, Stafford GP, Murdoch C. Porphyromonas gingivalis Outer Membrane Vesicles Increase Vascular Permeability. *Journal of Dental Research*. 2020;99(13):1494–1501. <https://doi.org/10.1177/0022034520943187>
34. Seyama M et al. Outer membrane vesicles of Porphyromonas gingivalis attenuate insulin sensitivity by delivering gingipains to the liver. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2020;1866(6). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165731>
35. Chopra A, Radhakrishnan R, Sharma M. Porphyromonas gingivalis and adverse pregnancy outcomes: a review on its intricate pathogenic mechanisms. *Critical Reviews in Microbiology*. 2020;46(2):213–236. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1747392>
36. Mekata M et al. Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles increase vascular permeability by inducing stress fiber formation and degrading vascular endothelial-cadherin in endothelial cells. *FEBS Journal*. 2024 Apr 1. <https://doi.org/10.1111/febs.17349>
37. Zhang Y et al. Periodontal Disease and Adverse Neonatal Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Pediatrics*. 2022;10. <https://doi.org/10.3389/fped.2022.799740>
38. Duley L. The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia. *Seminars in Perinatology*. 2009;33(3). <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2009.02.010>
39. Alkema L et al. Global, regional, and national levels and trends in maternal mortality between 1990 and 2015, with scenario-based projections to 2030: A systematic analysis by the un Maternal Mortality Estimation Inter-Agency Group. *The Lancet*. 2016;387(10017). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00838-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00838-7)
40. Burton GJ, Jauniaux E. Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2018;218(2). <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.11.577>
41. Chen P, Hong F, Yu X. Prevalence of periodontal disease in pregnancy: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry*. 2022 [accessed 2025 Feb 27];125:104253. <https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2022.104253>

42. Bobetsis YA, Graziani F, Gürsoy M, Madianos PN. Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes. *Periodontology* 2000. 2020;83(1):154–174. <https://doi.org/10.1111/prd.12294>
43. Le QA et al. Periodontitis and Preeclampsia in Pregnancy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Maternal and Child Health Journal*. 2022;26(12):2419–2443. <https://doi.org/10.1007/s10995-022-03556-6>
44. Yang I et al. Subgingival Microbiome in Pregnancy and a Potential Relationship to Early Term Birth. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022;12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.873683>
45. Figuero E, Han YW, Furuichi Y. Periodontal diseases and adverse pregnancy outcomes: Mechanisms. *Periodontology* 2000. 2020;83(1). <https://doi.org/10.1111/prd.12295>
46. Madianos PN, Bobetsis YA, Offenbacher S. Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: Pathogenic mechanisms - dibujo. *Journal of Clinical Periodontology*. 2013;40(SUPPL. 14):170–181. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12082>
47. Mysorekar IU, Cao B. Microbiome in parturition and preterm birth. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2014;32(1):50–55. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1361830>
48. Park JS et al. Differences in maternal subgingival microbiome between preterm and term births: The MOHEPI study. *Journal of Periodontal Research*. 2024 Oct 1. <https://doi.org/10.1111/jre.13292>
49. Gómez LA et al. Porphyromonas gingivalis Placental Atopobiosis and Inflammatory Responses in Women With Adverse Pregnancy Outcomes. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.591626>
50. Aagaard K et al. The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine*. 2014;6(237). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
51. Weckman AM et al. The impact of infection in pregnancy on placental vascular development and adverse birth outcomes. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01924>
52. Puertas A et al. Association of periodontitis with preterm birth and low birth weight: a comprehensive review. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2018;31(5):597–602. <http://dx.doi.org/10.1080/14767058.2017.1293023>. <https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1293023>
53. Menon R et al. Amplification of microbial DNA from bacterial extracellular vesicles from human placenta. *Frontiers in Microbiology*. 2023;14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1213234>
54. León R et al. Detection of Porphyromonas gingivalis in the Amniotic Fluid in Pregnant Women With a Diagnosis of Threatened Premature Labor . *Journal of Periodontology*. 2007;78(7):1249–1255. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060368>
55. Barak S et al. Evidence of Periopathogenic Microorganisms in Placentas of Women With Preeclampsia. *Journal of Periodontology*. 2007;78(4):670–676. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060362>

56. Vanterpool SF et al. Porphyromonas gingivalis within placental villous mesenchyme and umbilical cord stroma is associated with adverse pregnancy outcome. PLoS ONE. 2016;11(1):1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146157>
57. Gómez LA et al. Porphyromonas gingivalis Placental Atopobiosis and Inflammatory Responses in Women With Adverse Pregnancy Outcomes. Frontiers in Microbiology. 2020;11(December). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.591626>
58. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: One syndrome, many causes. 2014;345(6198).
59. Amarasekara R, Jayasekara RW, Senanayake H, Dissanayake VHW. Microbiome of the placenta in pre-eclampsia supports the role of bacteria in the multifactorial cause of pre-eclampsia. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. 2015;41(5):662–669. <https://doi.org/10.1111/jog.12619>
60. Ao M et al. Dental infection of Porphyromonas gingivalis induces preterm birth in mice. PLoS ONE. 2015;10(8):1–16. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0137249>. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137249>
61. Stockham S et al. Abnormal pregnancy outcomes in mice using an induced periodontitis model and the haematogenous migration of Fusobacterium nucleatum sub-species to the murine placenta. PLoS ONE. 2015;10(3):1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120050>
62. Tanai A et al. P. gingivalis–Infected Macrophage Extracellular Vesicles Cause Adverse Pregnancy Outcomes. Journal of Dental Research. 2024 Jan 1. <https://doi.org/10.1177/00220345241285132>
63. Abouzaid M et al. The potential role of the gingival crevicular fluid biomarkers in the prediction of pregnancy complications. Frontiers in Medicine. 2023;10. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1168625>
64. Chaparro A et al. Gingival Crevicular Placental Alkaline Phosphatase Is an Early Pregnancy Biomarker for Pre-Eclampsia. Diagnostics. 2021;11(4):661. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11040661>
65. Hauk V et al. Gingival crevicular fluid from pregnant women impairs trophoblast cell function and trophoblast-neutrophil interaction. American Journal of Reproductive Immunology. 2022 Aug 1. <https://doi.org/10.1111/aji.13558>
66. Mizgier ML et al. Proteomic Insights Into Gingival Crevicular Extracellular Vesicles in Periodontitis and Gestational Diabetes: An Exploratory Study. Journal of Clinical Periodontology. 2024 Feb 1. <https://doi.org/10.1111/jcpe.14083>
67. Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: Strategies for successful pregnancy. Nature Medicine. 2012;18(12):1754–1767. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3012>. <https://doi.org/10.1038/nm.3012>
68. Munoz-Suano A, Hamilton AB, Betz AG. Gimme shelter: The immune system during pregnancy. Immunological Reviews. 2011;241(1):20–38. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01002.x>
69. Betts JG et al. Anatomy & Physiology -OpenStax. 2013. <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/1-introduction>

70. Errol R. Norwitz, M.D., Danny J. Schust, M.D., And Susan J. Fisher PhD. IMPLANTATION AND THE SURVIVAL OF EARLY PREGNANCY. 2001;345(19):1400–1408.
71. Firmin J, Maître JL. Morphogenesis of the human preimplantation embryo: bringing mechanics to the clinics. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2021;120. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.07.005>
72. Maître JL et al. Asymmetric division of contractile domains couples cell positioning and fate specification. *Nature*. 2016;536(7616). <https://doi.org/10.1038/nature18958>
73. Nikas G, Psychoyos A. Uterine pinopodes in peri-implantation human endometrium. Clinical relevance. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 816. 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb52136.x>
74. Kimber SJ. Molecular interactions at the maternal-embryonic interface during the early phase of implantation. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2000;18(3). <https://doi.org/10.1055/s-2000-12562>
75. Nejatbakhsh R et al. Subcellular localization of L-selectin ligand in the endometrium implies a novel function for pinopodes in endometrial receptivity. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2012;10. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-46>
76. Ochoa-Bernal MA, Fazleabas AT. Physiologic events of embryo implantation and decidualization in human and non-human primates. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(6). <https://doi.org/10.3390/ijms21061973>
77. Lunghi L et al. Control of human trophoblast function. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2007;5:1–14. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-5-6>
78. Salamonsen LA, Nie G, Hannan NJ, Dimitriadis E. The importance of endometrial receptivity. *Reproduction, Fertility and Development*. 2009;21(7):923–934. <https://doi.org/10.1071/RD09145>
79. Dey SK et al. Molecular cues to implantation. *Endocrine Reviews*. 2004;25(3):341–373. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0020>
80. Zhang T, Shen H, Qin X, Li M. The metabolic characteristic of decidual immune cells and their unique properties in pregnancy loss. *Immunological Reviews*. 2022 May 18. <https://doi.org/10.1111/imr.13085>
81. Meixiang Ma. Effect of blastocyst development on hatching and embryo implantation. 2024.
82. Gauster M et al. Early human trophoblast development: from morphology to function. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022;79(6). <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04377-0>
83. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: Challenging the current hypothesis. *Hypertension*. 2008;51(4 PART 2 SUPPL.):970–975. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.107607>
84. Singh H, Nardo L, Kimber SJ, Aplin JD. Early stages of implantation as revealed by an in vitro model. *Reproduction*. 2010;139(5). <https://doi.org/10.1530/REP-09-0271>
85. Feng Y et al. Role of selectins and their ligands in human implantation stage. *Glycobiology*. 2017;27(5). <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx009>

86. Cuman C et al. Human Blastocyst Secreted microRNA Regulate Endometrial Epithelial Cell Adhesion. *EBioMedicine*. 2015;2(10). <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.09.003>
87. Cuman C et al. Preimplantation human blastocysts release factors that differentially alter human endometrial epithelial cell adhesion and gene expression relative to IVF success. *Human Reproduction*. 2013;28(5). <https://doi.org/10.1093/humrep/det058>
88. Fowden AL, Forhead AJ, Coan PM, Burton GJ. The placenta and intrauterine programming. *Journal of Neuroendocrinology*. 2008;20(4):439–450. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01663.x>
89. Forstner D et al. Platelet-derived factors impair placental chorionic gonadotropin beta-subunit synthesis. *Journal of Molecular Medicine*. 2020;98(2). <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01866-x>
90. Abrahams VM, Mor G. Toll-like receptors and their role in the trophoblast. *Placenta*. 2005;26(7):540–547. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.08.010>
91. Racicot K et al. Understanding the complexity of the immune system during pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2014;72(2):107–116. <https://doi.org/10.1111/aji.12289>
92. Liu Y et al. Single-cell RNA-seq reveals the diversity of trophoblast subtypes and patterns of differentiation in the human placenta. *Cell Research*. 2018;28(8). <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0066-y>
93. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research*. 2004;114(5-6 SPEC. ISS.). <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.06.038>
94. Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. Pathology of the human placenta, sixth edition. 2012. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-23941-0>
95. Carlson BM. Human Embryology and Developmental Biology: Fifth Edition. 2013.
96. HAMILTON WJ, BOYD JD. Development of the human placenta in the first three months of gestation. *Journal of anatomy*. 1960;94.
97. Hempstock J et al. Intralobular differences in antioxidant enzyme expression and activity reflect the pattern of maternal arterial bloodflow within the human placenta. *Placenta*. 2003;24(5). <https://doi.org/10.1053/plac.2002.0955>
98. Evain-Brion D, Malassine A. Human placenta as an endocrine organ. *Growth Hormone and IGF Research*. 2003;13(SUPPL. A). [https://doi.org/10.1016/S1096-6374\(03\)00053-4](https://doi.org/10.1016/S1096-6374(03)00053-4)
99. Aplin JD, Lewis RM, Jones CJP. Development of the Human Placental Villus. In: Reference Module in Biomedical Sciences. 2018. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.99857-x>
100. Jones CJP, Fox H. Ultrastructure of the normal human placenta. *Electron Microscopy Reviews*. 1991;4(1). [https://doi.org/10.1016/0892-0354\(91\)90019-9](https://doi.org/10.1016/0892-0354(91)90019-9)
101. Enders AC, Blankenship TN, Fazleabas AT, Jones CJP. Structure of anchoring villi and the trophoblastic shell in the human, baboon and macaque placenta. *Placenta*. 2001;22(4). <https://doi.org/10.1053/plac.2001.0626>

102. Enders AC. Fine structure of anchoring villi of the human placenta. *American Journal of Anatomy*. 1968;122(3). <https://doi.org/10.1002/aja.1001220302>
103. Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M. The Uterine Spiral Arteries In Human Pregnancy: Facts and Controversies. *Placenta*. 2006;27(9–10). <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.12.006>
104. Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB, Brosens I. Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta*. 1980;1(1). [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(80\)80012-9](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(80)80012-9)
105. Pollheimer J et al. Regulation of placental extravillous trophoblasts by the maternal uterine environment. *Frontiers in Immunology*. 2018;9(NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02597>
106. Moffett A, Chazara O, Colucci F. Maternal allo-recognition of the fetus. *Fertility and Sterility*. 2017;107(6). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.05.001>
107. Robson A et al. Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. *FASEB Journal*. 2012;26(12). <https://doi.org/10.1096/fj.12-210310>
108. Zhou Y et al. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate: A strategy for successful endovascular invasion? *Journal of Clinical Investigation*. 1997;99(9). <https://doi.org/10.1172/JCI119387>
109. Wallace AE, Fraser R, Cartwright JE. Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: A remodelling partnership. *Human Reproduction Update*. 2012;18(4). <https://doi.org/10.1093/humupd/dms015>
110. Aplin JD, Myers JE, Timms K, Westwood M. Tracking placental development in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*. 2020;(Vol. 16, Issue 9). <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41574-020-0372-6>
111. Roberts VHJ et al. Early first trimester uteroplacental flow and the progressive disintegration of spiral artery plugs: New insights from contrast-enhanced ultrasound and tissue histopathology. *Human Reproduction*. 2017;32(12). <https://doi.org/10.1093/humrep/dex301>
112. KHONG TY, LIDDELL HS, ROBERTSON WB. Defective haemochorial placentation as a cause of miscarriage; a preliminary study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 1987;94(7). <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1987.tb03169.x>
113. Burton GJ, Jauniaux E, Charnock-Jones DS. Human Early Placental Development: Potential Roles of the Endometrial Glands. *Placenta*. 2007;28(SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2007.01.007>
114. Burton GJ et al. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2002;87(6). <https://doi.org/10.1210/jcem.87.6.8563>
115. Knöfler M et al. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019;76(18):3479–3496. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03104-6>

116. Moffett A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6(8):584–594. <https://doi.org/10.1038/nri1897>
117. Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: Clues from mouse models. *Nature Reviews Genetics*. 2006;7(3):185–199. <https://doi.org/10.1038/nrg1808>
118. Ander SE, Diamond MS, Coyne CB. Immune responses at the maternal-fetal interface. 2019;6114(January).
119. Ain R, Konno T, Canham LN, Soares MJ. Phenotypic analysis of the rat placenta. *Methods in molecular medicine*. 2006;121. <https://doi.org/10.1385/1-59259-983-4:293>
120. Bevilacqua E, Lorenzon AR, Bandeira CL, Hoshida MS. Biology of the Ectoplacental Cone. In: *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394445-0.00010-2>
121. Soares MJ et al. Rat placentation: An experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. *Placenta*. 2012;33(4):233–243. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2011.11.026>
122. Carter AM. Animal Models of Human Placentation - A Review. *Placenta*. 2007;28(SUPPL.):41–47. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2006.11.002>
123. Clark DA. The use and misuse of animal analog models of human pregnancy disorders. *Journal of Reproductive Immunology*. 2014;103(1):1–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2014.02.006>. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2014.02.006>
124. Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nature Reviews Immunology*. 2017;17(8):469–482. <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2017.64>. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.64>
125. Cervantes O et al. Role of hormones in the pregnancy and sex-specific outcomes to infections with respiratory viruses*. *Immunological Reviews*. 2022;308(1). <https://doi.org/10.1111/imr.13078>
126. Muyayalo KP, Li ZH, Mor G, Liao AH. Modulatory effect of intravenous immunoglobulin on Th17/Treg cell balance in women with unexplained recurrent spontaneous abortion. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2018;80(4). <https://doi.org/10.1111/aji.13018>
127. McIntire RH, Ganacias KG, Hunt JS. Programming of human monocytes by the uteroplacental environment. *Reproductive Sciences*. 2008;15(5). <https://doi.org/10.1177/1933719107314065>
128. Abrahams VM et al. Divergent Trophoblast Responses to Bacterial Products Mediated by TLRs. *The Journal of Immunology*. 2004;173(7):4286–4296. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.7.4286>
129. Abrahams VM. Pattern recognition at the maternal-fetal interface. *Immunological Investigations*. 2008;37(5–6):427–447. <https://doi.org/10.1080/08820130802191599>
130. Mor G, Cardenas I. The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2010;63(6):425–433. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x>

131. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: The role of the immune system at the implantation site. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1221(1):80–87. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x>
132. Adamo KB et al. Physically active pregnancies: Insights from the placenta. *Physiological Reports*. 2024;12(11). <https://doi.org/10.14814/phy2.16104>
133. Mor G, Koga K. Macrophages and pregnancy. *Reproductive Sciences*. 2008;15(5):435–436. <https://doi.org/10.1177/1933719108317253>
134. Yoshinaga K. Review of factors essential for blastocyst implantation for their modulating effects on the maternal immune system. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2008;19(2). <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2007.10.006>
135. Ramhorst R et al. Decoding the chemokine network that links leukocytes with decidual cells and the trophoblast during early implantation. 2016;6918(February). <https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1135285>
136. Salamone G et al. Trophoblast cells induce a tolerogenic profile in dendritic cells. 2012;27(9):2598–2606. <https://doi.org/10.1093/humrep/des208>
137. Bulmer JN, Williams PJ, Lash GE. Immune cells in the placental bed. *International Journal of Developmental Biology*. 2010;54(2–3). <https://doi.org/10.1387/ijdb.082763jb>
138. Faas MM, De Vos P. Innate immune cells in the placental bed in healthy pregnancy and preeclampsia. *Placenta*. 2018;69. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.04.012>
139. Gomez-Lopez N, Guilbert LJ, Olson DM. Invasion of the leukocytes into the fetal-maternal interface during pregnancy. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010;88(4):625–633. <https://doi.org/10.1189/jlb.1209796>
140. Kuroki K, Maenaka K. Immune modulation of HLA-G dimer in maternal-fetal interface. *European Journal of Immunology*. 2007;37(7). <https://doi.org/10.1002/eji.200737515>
141. Hanna J et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature Medicine*. 2006;12(9). <https://doi.org/10.1038/nm1452>
142. Lash GE et al. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *Journal of Leukocyte Biology*. 2006;80(3). <https://doi.org/10.1189/jlb.0406250>
143. Zhang J, Chen Z, Smith GN, Croy BA. Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth 2011;(June 2010):1–11. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.38>
144. Gaynor LM, Colucci F. Uterine natural killer cells: Functional distinctions and influence on pregnancy in humans and mice. *Frontiers in Immunology*. 2017;8(APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00467>
145. Vacca P et al. myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression. 2010:1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001749107/-/DCSupplemental>. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1001749107

146. Ziegler-Heitbrock L et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16). <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>
147. Faas MM, Spaans F, De Vos P. Monocytes and macrophages in pregnancy and pre-eclampsia. *Frontiers in Immunology*. 2014;5(JUN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00298>
148. Lash GE et al. Decidual macrophages: key regulators of vascular remodeling in human pregnancy. *Journal of Leukocyte Biology*. 2016;100(2). <https://doi.org/10.1189/jlb.1a0815-351r>
149. Houser BL et al. Two Unique Human Decidual Macrophage Populations. *The Journal of Immunology*. 2011;186(4). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003153>
150. Hazan AD et al. Vascular-leukocyte interactions: Mechanisms of human decidual spiral artery remodeling in vitro. *American Journal of Pathology*. 2010;177(2). <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091105>
151. Gomez-Lopez N et al. Immune cells in term and preterm labor. *Cellular and Molecular Immunology*. 2014;11(6):571–581. <http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2014.46>. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.46>
152. Huynh M-LN, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 2002;109(1). <https://doi.org/10.1172/jci11638>
153. Norwitz ER et al. Molecular regulation of parturition: The role of the decidual clock. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2015;5(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023143>
154. Liu S et al. The role of decidual immune cells on human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*. 2017;124. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2017.10.045>
155. Erlebacher A. Immunology of the Maternal-Fetal Interface. *Annual Review of Immunology*. 2013;31(1):387–411. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100003>
156. Guerin LR, Prins JR, Robertson SA. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: A new target for infertility treatment? *Human Reproduction Update*. 2009;15(5). <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp004>
157. Pollard JW. Uterine DCs are essential for pregnancy. *Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(12). <https://doi.org/10.1172/JCI37733>
158. Leno-Durán E, Muñoz-Fernández R, García Olivares E, Tirado-González I. Liaison between natural killer cells and dendritic cells in human gestation. *Cellular and Molecular Immunology*. 2014;11(5). <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.36>
159. Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(8). <https://doi.org/10.1038/nri2132>
160. Amodio G et al. HLA-G expressing DC-10 and CD4+ T cells accumulate in human decidua during pregnancy. *Human Immunology*. 2013;74(4):406–411. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.11.031>

161. Gregori S et al. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood*. 2010;116(6):935–944. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-234872>
162. Gregori S, Amodio G, Quattrone F, Panina-Bordignon P. HLA-G orchestrates the early interaction of human trophoblasts with the maternal niche. *Frontiers in Immunology*. 2015;6(MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00128>
163. Amodio G et al. HLA-G expression levels influence the tolerogenic activity of human DC-10. *Haematologica*. 2015;100(4):548–557. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.113803>
164. Gori S et al. Decidualization Process Induces Maternal Monocytes to Tolerogenic IL-10-Producing Dendritic Cells (DC-10). *Frontiers in Immunology*. 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01571>
165. Amulic B et al. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annual Review of Immunology*. 2012;30(1):459–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074942>
166. Nguyen GT, Green ER, Meccas J. Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017;7(AUG). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00373>
167. Paclet MH, Laurans S, Dupré-Crochet S. Regulation of Neutrophil NADPH Oxidase, NOX2: A Crucial Effector in Neutrophil Phenotype and Function. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022;10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.945749>
168. Pillay J et al. In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*. 2010;116(4). <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-259028>
169. Gabelloni ML, Trevani AS, Sabatté J, Geffner J. Mechanisms regulating neutrophil survival and cell death. *Seminars in Immunopathology*. 2013;35(4):423–437. <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0364-x>
170. Greenlee-Wacker MC. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunological Reviews*. 2016;273(1):357–370. <https://doi.org/10.1111/imr.12453>
171. Vento-Tormo R et al. Single-cell reconstruction of the early maternal–fetal interface in humans. *Nature*. 2018;563(7731):347–353. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0698-6>
172. Cemgil Arikan D, Aral M, Coskun A, Ozer A. Plasma IL-4, IL-8, IL-12, interferon- γ and CRP levels in pregnant women with preeclampsia, and their relation with severity of disease and fetal birth weight. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2012;25(9). <https://doi.org/10.3109/14767058.2011.648233>
173. Amsalem H et al. Identification of a Novel Neutrophil Population: Proangiogenic Granulocytes in Second-Trimester Human Decidua. *The Journal of Immunology*. 2014;193(6):3070–3079. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303117>
174. Nadkarni S et al. Neutrophils induce proangiogenic T cells with a regulatory phenotype in pregnancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(52):E8415–E8424. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611944114>

175. Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Hahn S. Neutrophil NETs: A novel contributor to preeclampsia-associated placental hypoxia? *Seminars in Immunopathology*. 2007;29(2):163–167. <https://doi.org/10.1007/s00281-007-0073-4>
176. Giaglis S et al. Multimodal regulation of NET formation in pregnancy: Progesterone antagonizes the pro-NETotic effect of estrogen and G-CSF. *Frontiers in Immunology*. 2016;7(DEC):1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00565>
177. Cadden KA, Walsh SW. Neutrophils, but not lymphocytes or monocytes, infiltrate maternal systemic vasculature in women with preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy*. 2008;27(4). <https://doi.org/10.1080/10641950801958067>
178. Laresgoiti-Servitje E. A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia. *Journal of Leukocyte Biology*. 2013;94(2). <https://doi.org/10.1189/jlb.1112603>
179. Gardiner C, Vatish M. Impact of haemostatic mechanisms on pathophysiology of preeclampsia. *Thrombosis Research*. 2017;151. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(17\)30067-1](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(17)30067-1)
180. Muralimanoharan S, Maloyan A, Myatt L. Mitochondrial function and glucose metabolism in the placenta with gestational diabetes mellitus: Role of miR-143. *Clinical Science*. 2016;130(11). <https://doi.org/10.1042/CS20160076>
181. Austdal M et al. Metabolic profiles of placenta in preeclampsia using HR-MAS MRS metabolomics. *Placenta*. 2015;36(12). <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.10.019>
182. Winterhager E, Gellhaus A. Transplacental nutrient transport mechanisms of intrauterine growth restriction in rodent models and humans. *Frontiers in Physiology*. 2017;8(NOV). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00951>
183. Lager S, Powell TL. Regulation of nutrient transport across the placenta. *Journal of Pregnancy*. 2012;2012. <https://doi.org/10.1155/2012/179827>
184. Aye ILMH, Aiken CE, Charnock-Jones DS, Smith GCS. Placental energy metabolism in health and disease—significance of development and implications for preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2022;226(2):S928–S944. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.11.005>
185. Chassen S, Jansson T. Complex, coordinated and highly regulated changes in placental signaling and nutrient transport capacity in IUGR. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2020;1866(2). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.12.024>
186. Kolahi KS, Valent AM, Thornburg KL. Cytotrophoblast, Not Syncytiotrophoblast, Dominates Glycolysis and Oxidative Phosphorylation in Human Term Placenta. *Scientific Reports*. 2017;7. <https://doi.org/10.1038/srep42941>
187. Burton GJ, Jauniaux E, Murray AJ. Oxygen and placental development; parallels and differences with tumour biology. *Placenta*. 2017;56:14–18. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.01.130>
188. Vota D et al. Zika virus infection of first trimester trophoblast cells affects cell migration, metabolism and immune homeostasis control. 2020;(October). <https://doi.org/10.1002/jcp.30203>

189. Day PEL et al. Partitioning of glutamine synthesised by the isolated perfused human placenta between the maternal and fetal circulations. *Placenta*. 2013;34(12).
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.10.003>
190. Illsley NP, Baumann MU. Human placental glucose transport in fetoplacental growth and metabolism☆. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis>
191. Jansson T, Cowley EA, Illsley NP. Cellular localization of glucose transporter messenger rna in human placenta. *Reproduction, Fertility and Development*. 1995;7(6).
<https://doi.org/10.1071/RD9951425>
192. Brown K, Heller DS, Zamudio S, Illsley NP. Glucose transporter 3 (GLUT3) protein expression in human placenta across gestation. *Placenta*. 2011;32(12).
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.09.014>
193. 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. *Molecular Human Reproduction*. 2015;21(10):803–815. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav043>
194. Liang X et al. Effect of 2-deoxyglucose-mediated inhibition of glycolysis on migration and invasion of HTR-8/SVneo trophoblast cells. *Journal of Reproductive Immunology*. 2023;159.
<https://doi.org/10.1016/j.jri.2023.104123>
195. TeSlaa T, Ralser M, Fan J, Rabinowitz JD. The pentose phosphate pathway in health and disease. *Nature Metabolism*. 2023;5(8). <https://doi.org/10.1038/s42255-023-00863-2>
196. Gao L et al. Trophoblast-derived Lactic Acid Orchestrates Decidual Macrophage Differentiation via SRC/LDHA Signaling in Early Pregnancy. *International Journal of Biological Sciences*. 2022;18(2):599–616. <https://doi.org/10.7150/ijbs.67816>
197. Ma LN et al. Lactic Acid: A Novel Signaling Molecule in Early Pregnancy? *Frontiers in Immunology*. 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00279>
198. Divakaruni AS, Brand MD. The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology (Bethesda, Md.)*. 2011;26(3). <https://doi.org/10.1152/physiol.00046.2010>
199. Ye L, Jiang Y, Zhang M. Crosstalk between glucose metabolism, lactate production and immune response modulation. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2022;68:81–92.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2022.11.001>
200. Su W et al. Porphyromonas gingivalis triggers inflammatory responses in periodontal ligament cells by succinate-succinate dehydrogenase–HIF–1 α axis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020;522(1):184–190. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.11.074>
201. Nakashima A et al. Current understanding of autophagy in pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(9). <https://doi.org/10.3390/ijms20092342>
202. Vota D et al. Vasoactive Intestinal Peptide modulates trophoblast-derived cell line function and interaction with phagocytic cells through autocrine pathways. *Scientific Reports*. 2016;6(May):1–12.
<http://dx.doi.org/10.1038/srep26364> <https://doi.org/10.1038/srep26364>

203. Kafer D et al. Targeting first trimester trophoblast cell metabolism modulates its susceptibility to Zika virus infection. *Journal of Cellular Physiology*. 2023 Apr 1. <https://doi.org/10.1002/jcp.30970>
204. Aebi H. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*. 1984;105(C). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
205. Andrioli NB et al. Genotoxic effects induced for sub-cytotoxic concentrations of tebuconazole fungicide in HEp-2 cell line. *Chemico-Biological Interactions*. 2023;373. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110385>
206. Bookout AL, Mangelsdorf DJ. Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. *Nuclear Receptor Signaling*. 2003;1(1):nrs.01012. <https://doi.org/10.1621/nrs.01012>
207. Blidberg KR et al. Increased neutrophil migration in smokers with or without chronic obstructive pulmonary disease. 2012;(2012):854–860. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2012.02181.x>
208. Nahmod KA et al. Control of dendritic cell differentiation by angiotensin II. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(3). <https://doi.org/10.1096/fj.02-0755fje>
209. Hauk V. Vasoactive Intestinal Peptide Induces an Immunosuppressant Microenvironment in the Maternal – Fetal Interface of Non-Obese Diabetic Mice and Improves Early Pregnancy Outcome. 2014. <https://doi.org/10.1111/aji.12167>
210. Hauk V et al. Trophoblast VIP deficiency entails immune homeostasis loss and adverse pregnancy outcome in mice. *FASEB Journal*. 2019;33(2):1801–1810. <https://doi.org/10.1096/fj.201800592RR>
211. Ardavín C et al. Mouse Tissue-Resident Peritoneal Macrophages in Homeostasis, Repair, Infection, and Tumor Metastasis. *Advanced Science*. 2023;10(11). <https://doi.org/10.1002/advs.202206617>
212. Merech F et al. Growth impairment, increased placental glucose uptake and altered transplacental transport in VIP deficient pregnancies: Maternal vs. placental contributions. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2021;1867(10). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166207>
213. Ye C et al. Unculturable and culturable periodontal-related bacteria are associated with periodontal inflammation during pregnancy and with preterm low birth weight delivery. *Scientific Reports*. 2020;10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72807-9>
214. Vander Haar EL, So J, Gyamfi-Bannerman C, Han YW. *Fusobacterium nucleatum* and adverse pregnancy outcomes: Epidemiological and mechanistic evidence. *Anaerobe*. 2018;50:55–59. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.01.008>
215. Avila-Calderón ED et al. Outer Membrane Vesicles of Gram-Negative Bacteria: An Outlook on Biogenesis. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12(March). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.557902>
216. O'Donoghue EJ, Krachler AM. Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cellular Microbiology*. 2016;18(11):1508–1517. <https://doi.org/10.1111/cmi.12655>

217. Mansell E et al. Mitochondrial Potentiation Ameliorates Age-Related Heterogeneity in Hematopoietic Stem Cell Function. *Cell Stem Cell*. 2021;28(2). <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.018>
218. Rocha ER, Owens G. J, Smith CJ. The redox-sensitive transcriptional activator OxyR regulates the peroxide response regulon in the obligate anaerobe *Bacteroides fragilis*. *Journal of Bacteriology*. 2000;182(18). <https://doi.org/10.1128/JB.182.18.5059-5069.2000>
219. Wu J, Lin X, Xie H. OxyR is involved in coordinate regulation of expression of fimA and sod genes in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiology Letters*. 2008;282(2). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01116.x>
220. Jovanović M, Vićovac L. Interleukin-6 Stimulates Cell Migration, Invasion and Integrin Expression in HTR-8/SVneo Cell Line. *Placenta*. 2009;30(4). <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.01.013>
221. Tan HX, Yang SL, Li MQ, Wang HY. Autophagy suppression of trophoblast cells induces pregnancy loss by activating decidual NK cytotoxicity and inhibiting trophoblast invasion. *Cell Communication and Signaling*. 2020;18(1). <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00579-w>
222. Xu J et al. The role of lysosomal membrane proteins in autophagy and related diseases. *FEBS Journal*. 2023. <https://doi.org/10.1111/febs.16820>
223. Huppertz B. Traditional and new routes of trophoblast invasion and their implications for pregnancy diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010289>
224. Ramhorst R et al. Control of the inflammatory response during pregnancy: Potential role of VIP as a regulatory peptide. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2019;1437(1):15–21. <https://doi.org/10.1111/nyas.13632>
225. Calo G et al. Trophoblast cells inhibit neutrophil extracellular trap formation and enhance apoptosis through vasoactive intestinal peptide-mediated pathways. *Human Reproduction*. 2017;32(1):55–64. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew292>
226. Calo G et al. Interplay between neutrophils and trophoblast cells conditions trophoblast function and triggers vascular transformation signals. *Journal of Cellular Physiology*. 2020;235(4):3592–3603. <https://doi.org/10.1002/jcp.29247>
227. Zeisler H et al. Predictive Value of the sFlt-1:PlGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(1):13–22. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1414838>
228. Petty HR, Kindzelskii AL, Espinoza J, Romero R. Trophoblast Contact Deactivates Human Neutrophils 1. Vol 176 2006. <http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/176/5/3205/1214920/3205.pdf>
229. Hahn S, Giaglis S, Hoesli I, Hasler P. Neutrophil NETs in reproduction: From infertility to preeclampsia and the possibility of fetal loss. *Frontiers in Immunology*. 2012;3(NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00362>

230. Zhan Y, Lew AM, Chopin M. The Pleiotropic Effects of the GM-CSF Rheostat on Myeloid Cell Differentiation and Function: More Than a Numbers Game. *Frontiers in Immunology*. 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02679>
231. Matsuguchi T, Lilly MB, Kraft AS. Cytoplasmic domains of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor β chain (h β c) responsible for human GM-CSF-induced myeloid cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(31). <https://doi.org/10.1074/jbc.273.31.19411>
232. Bardou M et al. Systemic increase in human maternal circulating CD14+CD16 - MCP-1+ monocytes as a marker of labor. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2014;210(1). <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.08.031>
233. Zhao L et al. Human monocytes undergo functional re-programming during differentiation to dendritic cell mediated by human extravillous trophoblasts. *Scientific Reports*. 2016;6. <https://doi.org/10.1038/srep20409>
234. Rothenberger CM et al. An outer membrane vesicle specific lipoprotein promotes *Porphyromonas gingivalis* aggregation on red blood cells. *Current Research in Microbial Sciences*. 2024;7. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2024.100249>
235. Bitto NJ et al. *Staphylococcus aureus* membrane vesicles contain immunostimulatory DNA, RNA and peptidoglycan that activate innate immune receptors and induce autophagy. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2021;10(6). <https://doi.org/10.1002/jev2.12080>
236. Tsuda K et al. Molecular dissection of internalization of *Porphyromonas gingivalis* by cells using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicle. *Cell structure and function*. 2005;30(2). <https://doi.org/10.1247/csf.30.81>
237. Amano A, Takeuchi H, Furuta N. Outer membrane vesicles function as offensive weapons in host-parasite interactions. *Microbes and Infection*. 2010;12(11). <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.05.008>
238. Chuang WC et al. The mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*-derived outer membrane vesicles-induced neurotoxicity and microglia activation. *Journal of Dental Sciences*. 2024;19(3):1434–1442. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2024.04.002>
239. Fan R et al. *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles Promote Apoptosis via msRNA-Regulated DNA Methylation in Periodontitis. *Microbiology Spectrum*. 2023 Jan 11. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03288-22>
240. Izui S et al. Archives of Oral Biology Inhibitory effects of curcumin against cytotoxicity of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. *Archives of Oral Biology*. 2021;124(September 2020):105058. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105058>
241. Seyama M et al. Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* attenuate insulin sensitivity by delivering gingipains to the liver. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2020;1866(6). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165731>

242. Steyn A et al. Epigenetic modification of the pentose phosphate pathway and the IGF-axis in women with gestational diabetes mellitus. *Epigenomics*. 2019;11(12). <https://doi.org/10.2217/epi-2018-0206>
243. Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2010;42(10). <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.06.001>
244. Gou R et al. Low level of lactate and trophoblast dysfunction mediated by SNAI1/PDK1 contributes to miscarriage. *Placenta*. 2025;165:33–41. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2025.03.022>
245. Gou R, Zhang X. Glycolysis: A fork in the path of normal and pathological pregnancy. *FASEB Journal*. 2023;37(12). <https://doi.org/10.1096/fj.202301230R>
246. Inagaki S, Onishi S, Kuramitsu HK, Sharma A. *Porphyromonas gingivalis* vesicles enhance attachment, and the leucine-rich repeat BspA protein is required for invasion of epithelial cells by “*Tannerella forsythia*.” *Infection and Immunity*. 2006;74(9):5023–5028. <https://doi.org/10.1128/IAI.00062-06>
247. Lemire J et al. Metabolic defence against oxidative stress: the road less travelled so far. *Journal of Applied Microbiology*. 2017;123(4):798–809. <https://doi.org/10.1111/jam.13509>
248. Tang CL et al. Cyclosporin A protects trophoblasts from H₂O₂-induced oxidative injury via FAK-Src pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019;518(3). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.07.118>
249. 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*. 2016;11(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153522>
250. Hebert JF, Myatt L. Placental mitochondrial dysfunction with metabolic diseases: Therapeutic approaches. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2021;1867(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165967>
251. Mannaerts D et al. Oxidative stress in healthy pregnancy and preeclampsia is linked to chronic inflammation, iron status and vascular function. *PLoS ONE*. 2018;13(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202919>
252. Zsengellér ZK et al. Trophoblast mitochondrial function is impaired in preeclampsia and correlates negatively with the expression of soluble fms-like tyrosine kinase 1. *Pregnancy Hypertension*. 2016;6(4). <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2016.06.004>
253. Chen CP, Chen CY, Wu YH, Chen CY. Oxidative stress reduces trophoblast FOXO1 and integrin β 3 expression that inhibits cell motility. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018;124. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.006>
254. Huang S et al. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles exacerbate retinal microvascular endothelial cell dysfunction in diabetic retinopathy. *Frontiers in Microbiology*. 2023;14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1167160>

255. Widlansky ME et al. Altered mitochondrial membrane potential, mass, and morphology in the mononuclear cells of humans with type 2 diabetes. *Translational Research*. 2010;156(1). <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2010.04.001>
256. Riva A et al. Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2005;289(2 58-2). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00866.2004>
257. Yoon Y. Regulation of mitochondrial dynamics: another process modulated by Ca²⁺ signals? *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2005;2005(280). <https://doi.org/10.1126/stke.2802005pe18>
258. Hirohata N et al. *Porphyromonas gingivalis* Suppresses Trophoblast Invasion by Soluble Factors. *Journal of Periodontology*. 2017;88(12):1366–1373. <https://doi.org/10.1902/jop.2017.170193>
259. Meisser A et al. Effects of interleukin-6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells. *Molecular Human Reproduction*. 1999;5(11). <https://doi.org/10.1093/molehr/5.11.1055>
260. Pin C, David L, Oswald E. Modulation of Autophagy and Cell Death by Bacterial Outer-Membrane Vesicles. *Toxins*. 2023;15(8). <https://doi.org/10.3390/toxins15080502>
261. Nakashima A et al. Impaired autophagy by soluble endoglin, under physiological hypoxia in early pregnant period, is involved in poor placentation in preeclampsia. *Autophagy*. 2013;9(3). <https://doi.org/10.4161/auto.22927>
262. Bélanger M, Rodrigues PH, Dunn WA, Progulske-Fox A. Autophagy: A highway for *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells. *Autophagy*. 2006;2(3):165–170. <https://doi.org/10.4161/auto.2828>
263. Leea K et al. *Porphyromonas gingivalis* traffics into endoplasmic reticulum-rich autophagosomes for successful survival in human gingival epithelial cells. *Virulence*. 2018;9(1):845–859. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1454171>
264. Liu M et al. *Porphyromonas gingivalis* Evades Immune Clearance by Regulating Lysosome Efflux. *Journal of Dental Research*. 2023;102(5):555–564. <https://doi.org/10.1177/00220345221146097>
265. David L et al. Outer membrane vesicles produced by pathogenic strains of *Escherichia coli* block autophagic flux and exacerbate inflammasome activation. *Autophagy*. 2022;18(12):2913–2925. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2054040>
266. Meng-Ying Li. Targeting mTOR/autophagy axis: a double-edged sword of rapamycin in spontaneous miscarriage. 2024.
267. Tavarra T, Phillips PL, Wu X jun, Reyes L. Fetal growth restriction is a host specific response to infection with an impaired spiral artery remodeling-inducing strain of *Porphyromonas gingivalis*. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71762-9>
268. Miyauchi M et al. Galectin-3 Plays an Important Role in Preterm Birth Caused by Dental Infection of *Porphyromonas gingivalis*. 2018;(January):1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21072-y>

269. Calo G et al. Trophoblast cells inhibit neutrophil extracellular trap formation and enhance apoptosis through vasoactive intestinal peptide-mediated pathways. *Human Reproduction*. 2017;32(1):55–64. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew292>
270. Calo G et al. Pregnancy Entails a Metabolic Rewiring of Maternal Circulating Neutrophils. *Journal of Cellular Physiology*. 2024 Jan 1. <https://doi.org/10.1002/jcp.31502>
271. Aly AS et al. Neutrophils are stimulated by syncytiotrophoblast microvillous membranes to generate superoxide radicals in women with preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004;190(1). <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2003.07.003>
272. Tsukimori K, Nakano H, Wake N. Difference in neutrophil superoxide generation during pregnancy between preeclampsia and essential hypertension. *Hypertension*. 2007;49(6). <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.086751>
273. Leik CE, Walsh SW. Neutrophils infiltrate resistance-sized vessels of subcutaneous fat in women with preeclampsia. *Hypertension*. 2004;44(1). <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000130483.83154.37>
274. Moonen CGJ et al. Oral neutrophils characterized: Chemotactic, phagocytic, and neutrophil extracellular trap (NET) formation properties. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00635>
275. Nicu EA et al. Characterization of oral polymorphonuclear neutrophils in periodontitis patients: A case-control study. *BMC Oral Health*. 2018;18(1). <https://doi.org/10.1186/s12903-018-0615-2>
276. Shah TJ, Walsh SW. Activation of NF- κ B and expression of COX-2 in association with neutrophil infiltration in systemic vascular tissue of women with preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2007;196(1). <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2006.08.038>
277. Bodac A, Meylan E. Neutrophil metabolism in the cancer context. *Seminars in Immunology*. 2021;57. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2021.101583>
278. Melgert BN et al. Pregnancy and Preeclampsia Affect Monocyte Subsets in Humans and Rats. *PLoS ONE*. 2012;7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045229>
279. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 2009;29(6). <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
280. Lee KMC, Achuthan AA, Hamilton JA. GM-CSF: A promising target in inflammation and autoimmunity. *ImmunoTargets and Therapy*. 2020;9. <https://doi.org/10.2147/ITT.S262566>
281. Li C et al. Comprehensive analysis of human monocyte subsets using full-spectrum flow cytometry and hierarchical marker clustering. *Frontiers in Immunology*. 2024;15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1405249>
282. Vishnyakova P, Elchaninov A, Fatkhudinov T, Sukhikh G. Role of the monocyte–macrophage system in normal pregnancy and preeclampsia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(15). <https://doi.org/10.3390/ijms20153695>

283. Paparini D et al. Trophoblast cells primed with vasoactive intestinal peptide enhance monocyte migration and apoptotic cell clearance through $\alpha\beta 3$ integrin portal formation in a model of maternal-placental interaction. *Molecular Human Reproduction*. 2015;21(12):930–941. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav059>
284. Grasso E et al. Differential migration and activation profile of monocytes after trophoblast interaction. *PLoS ONE*. 2014;9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097147>
285. Paparini DE et al. Vasoactive intestinal peptide shapes first-trimester placenta trophoblast, vascular, and immune cell cooperation. *British Journal of Pharmacology*. 2019;176(7):964–980. <https://doi.org/10.1111/bph.14609>
286. Kunnen A et al. The effect of porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide on pregnancy in the rat. *Oral Diseases*. 2014;20(6). <https://doi.org/10.1111/odi.12177>
287. Kunnen A et al. Cytokine production induced by non-encapsulated and encapsulated *Porphyromonas gingivalis* strains. *Archives of Oral Biology*. 2012;57(11). <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.07.013>
288. Faas MM et al. *Porphyromonas Gingivalis* and *E-coli* induce different cytokine production patterns in pregnant women. *PLoS ONE*. 2014;9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086355>
289. Conde-Agudelo A, Villar J, Lindheimer M. Maternal infection and risk of preeclampsia: Systematic review and metaanalysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2008;198(1). <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.07.040>
290. Steinman RM. Decisions about dendritic cells: Past, present, and future. *Annual Review of Immunology*. 2012;30. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-100311-102839>
291. Plaks V et al. Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. 2008;118(12). <https://doi.org/10.1172/JCI36682DS1>
292. Barrientos G et al. The impact of dendritic cells on angiogenic responses at the fetal-maternal interface. *Journal of Reproductive Immunology*. 2009;83(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.07.011>
293. Gardner L, Moffett A. Dendritic cells in the human decidua. *Biology of Reproduction*. 2003;69(4). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017574>
294. Askelund K et al. CD83+ dendritic cells in the decidua of women with recurrent miscarriage and normal pregnancy. *Placenta*. 2004;25(2–3). [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(03\)00182-6](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(03)00182-6)
295. Qian Z Da, Huang LL, Zhu XM. An immunohistochemical study of CD83- and CD1a-positive dendritic cells in the decidua of women with recurrent spontaneous abortion. *European Journal of Medical Research*. 2015;20(1). <https://doi.org/10.1186/s40001-014-0076-2>
296. Lim Y, Kim HY, An SJ, Choi BK. Activation of bone marrow-derived dendritic cells and CD4+ T cell differentiation by outer membrane vesicles of periodontal pathogens. *Journal of Oral Microbiology*. 2022;14(1). <https://doi.org/10.1080/20002297.2022.2123550>

297. Monteiro LJ et al. Oral extracellular vesicles in early pregnancy can identify patients at risk of developing gestational diabetes mellitus. PLoS ONE. 2018;14(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218616>
298. Erchick DJ et al. Risk of preterm birth associated with maternal gingival inflammation and oral hygiene behaviours in rural Nepal: A community-based, prospective cohort study. BMJ Open. 2020;10(8):1–11. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-036515>