



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología

Universidad de Granada

# **LAS CÉLULAS DECIDUALES ESTROMALES HUMANAS Y SU PARTICIPACIÓN EN LA TOLERANCIA MATERNO-FETAL**

OSMANY BLANCO MUÑOZ

Granada, 20 de noviembre de 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Osmany Blanco Muñoz  
D.L.: GR 3104-2010  
ISBN: 978-84-693-3290-0

## AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS

**D. ENRIQUE GARCÍA OLIVARES**, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III E INMUNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

**D<sup>a</sup>. M. CARMEN RUIZ RUIZ**, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III E INMUNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

**CERTIFICAN:** que la presente tesis titulada “**LAS CELULAS DECIDUALES ESTROMALES HUMANAS Y SU PARTICIPACIÓN EN LA TOLERANCIA MATERNO FETAL**”, de la que es autora **OSMANY BLANCO MUÑOZ**, superó el programa de doctorado “Inmunología Celular y molecular” y que ha sido dirigida bajo su dirección en la Unidad de Inmunología del departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología de la Universidad de Granada.

Revisado el presente trabajo, los directores consideran que tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el tribunal que se designe al efecto,

Por lo que:

**AUTORIZAN** la presentación de la referida tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en la legislación vigente.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expedimos la presente certificación en Granada.

Dr. Enrique Garcia Olivares

Dra. M. Carmen Ruiz Ruiz



*Al más hermoso de los hombres  
“Jesucristo”, tus labios son  
fuentes de elocuencia, ya que Dios  
te ha bendecido para siempre.*

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera darles mis agradecimientos a muchas personas que han contribuido que mis pasos hayan podido llegar hasta aquí.

A mí amado hijo Sebastián por tenerme mucha paciencia y haberme ayudado a terminar esta tesis. Hijo me has impulsado a seguir caminando, muchas gracias.

A mis jefes: Dr. Enrique García y la Dra. M Carmen Ruiz, por haberme dirigido la tesis durante estos años, por la confianza y dedicación que han depositado en mí, mil gracias. Enrique por sus sabios consejos que hasta ahora me han ayudado mucho en mi vida profesional. A M. Carmen por haberme aguantado durante estos años y por haberme enseñado mucho en el área profesional, gracias por haberte interesado en mí.

Al grupo de profesores Dr. Ignacio Molina por haberme aceptado en el departamento y también por sus grandes contribuciones en esta tesis, a la Dra. Ana Abadía, por resolver mis dudas y sus consejos, al Dr. Paco Martín “mi ángel”, por su sabiduría y la amistad durante estos años.

A José Antonio Galindo, por sus consejos, su eficiente colaboración y la amistad durante estos años.

Al grupo de compañeros de trabajo los que están presentes y los que se han ido también, Api que aunque este lejos quiero darle las gracias por haberme escuchado y apoyado en muchos momentos de mi vida, también por los tintitos de verano. A las niñas de Enrique Irene, Estercita, Claudia y Raquel por haberme ayudado tanto y por su amistad.

A María José por sus consejos, Virginia por su ayuda incondicional, Zulema, Sarita, Alejandro, Domingo, Lucia, Marta, por sus apoyos incondicionales y amistades, muchas gracias.

También quisiera darles las gracias a mis pastores Ester y Miguel por los sabios consejos y el apoyo en sus oraciones y a otras amigas queridas que también me han apoyado en oración y emocionalmente Teresa, Mariene, Ester, Marcia, Lucas y Diana, muchas gracias.

A mi familia que aunque estén lejos siempre los llevo conmigo en mi corazón. Gracias papá, aprovecho para decirte la gran admiración que siento por ti. A ti mamá porque sin ti nada hubiera podría existir en mi vida, muchas gracias. A todos mis hermanos y familia en especial mi tía Marta por estar aquí conmigo.

A la Fundación Hospital Clínico, gracias por su colaboración

A la Junta de Andalucía por su colaboración dándome la beca que me hizo posible realizar esta tesis.

## INDÍCE

1	RESUMEN.....	13
2	Introducción.....	15
2.1	La decidua .....	16
	2.1.1 Células inmunitarias de la decidua .....	18
	2.1.2 Factores reguladores locales .....	23
2.2	Las células deciduales estromales.....	24
	2.2.1 Fenotipo antigénico de las células deciduales estromales .....	26
	2.2.2 Relación de las células deciduales estromales y las células foliculares dendríticas.....	28
	2.2.3 Producción de citocinas y otras moléculas biológicamente activas por las células deciduales estromales. ....	28
	2.2.4 Las células deciduales estromales como células fagocíticas .....	29
	2.2.5 Las células deciduales estromales como presentadoras de antígeno .....	30
	2.2.6 Las células deciduales humanas expresan $\alpha$ -SM (smooth muscle) actina y presentan características ultraestructurales de los miofibroblastos.....	30
	2.2.7 Decidualización.....	31
2.3	Antígeno leucocitario humano (HLA-G).....	33
	2.3.1 Localización genómica y su descubrimiento .....	33
	2.3.2 Estructura del gen del HLA-G .....	34
	2.3.3 Polimorfismo del HLA-G .....	35
	2.3.4 Isoformas del HLA-G .....	36

2.3.5	Expresión del HLA-G .....	38
2.3.6	Función del HLA-G .....	39
2.3.7	Interacciones del HLA-G con las células T .....	40
2.3.8	HLA-G y la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO).....	41
2.3.9	HLA-G en la reproducción .....	42
2.4	Apoptosis.....	44
2.4.1	Caspasas .....	44
2.4.2	Vías de inducción de apoptosis.....	45
2.4.3	Proteínas inhibidoras de apoptosis.....	48
2.4.4	Proteínas activadoras de la apoptosis.....	49
2.4.5	CD95 y su ligando en el endometrio.....	50
2.4.6	Papel de la apoptosis en el mantenimiento del privilegio inmunológico en la interfase materno-fetal .....	51
2.5	Referencias bibliográficas de la introducción .....	54
3	Objetivos .....	81
4	Las células deciduales estromales humanas expresan HLA-G. Efectos de citocinas y decidualización.....	83
4.1	Resumen .....	83
4.1.1	Antecedentes .....	83
4.1.2	Métodos y Resultados .....	84
4.1.3	Conclusiones .....	84
4.2	Introducción.....	84
4.3	Materiales y métodos.....	85
4.3.1	Tejidos.....	85
4.3.2	Aislamiento y cultivo de las DSC .....	85
4.3.3	Aislamiento de células deciduales estromales frescas .....	87



4.3.4	Reactivos.....	87
4.3.5	Tratamiento de células deciduales .....	87
4.3.6	Análisis de citometría de flujo .....	87
4.3.7	Microscopía de fluorescencia .....	88
4.3.8	Preparación de ADN y PCR a tiempo real.....	88
4.3.9	SDS/PAGE, Western Blot .....	89
4.3.10	Determinación de IL-10 y prolactina en sobrenadantes de cultivos	90
4.3.11	Análisis estadístico.....	90
4.4	Resultados .....	90
4.4.1	Expresión de HLA-G por DSC cultivadas.....	90
4.4.2	Expresión de HLA-G por las células deciduales estromales frescas	92
4.4.3	Modulación por citocinas y decidualización de la expresión de HLA-G en DSC cultivadas .....	93
4.5	Discusion.....	97
4.6	Bibliografía.....	101
5	Las células deciduales estromales humanas protegen a los linfocitos de la apoptosis.....	107
5.1	Resumen.....	107
5.2	Introducción.....	108
5.3	Materiales y métodos.....	110
5.3.1	Aislamiento de las células deciduales estromales en cultivo.....	110
5.3.2	Aislamiento de linfocitos en cultivo .....	110
5.3.3	Líneas de células tumorales .....	111
5.3.4	Reactivos y anticuerpos .....	111
5.3.5	Análisis por citometría de flujo de moléculas de superficie.....	112

5.3.6	Análisis de células apoptóticas .....	112
5.3.7	Experimentos de cocultivo.....	113
5.3.8	Análisis estadístico.....	113
5.4	Resultados .....	113
5.4.1	Expresión de receptores y ligandos de muerte en líneas de DSC...	113
5.4.2	Función de los receptores y ligandos de muerte en líneas de DSC	114
5.4.3	Células DSC protegen a las células jurkat de la apoptosis mediada por receptores de muerte.....	118
5.4.4	El efecto protector de células DSC no requiere del contacto célula- célula.....	121
5.4.5	Células DSC mejoran la supervivencia de los linfocitos primarios..	121
5.4.6	El co-cultivo con DSC no protege de otros estímulos apoptóticos diferentes a los ligandos de muerte.....	123
5.5	Discusión .....	124
5.6	Bibliografía.....	129
6	Bases moleculares de la actividad protectora de la apoptosis de las DSC .....	136
6.1	Introducción.....	136
6.2	Materiales y métodos.....	136
6.2.1	Reactivos.....	136
6.2.2	Aislamiento y cultivo de DSC .....	137
6.2.3	Mantenimiento y cultivo de células Jurkat .....	137
6.2.4	Determinación del ciclo celular .....	137
6.2.5	Análisis de proteínas mediante Western Blot.....	137
6.2.6	Purificación de ARN total.....	138
6.2.7	PCR ARRAY .....	138
6.3	Resultados .....	140

6.3.1	Regulación de la expresión y activación de caspasas en células Jurkat cocultivadas con DSC.....	140
6.3.2	Expresión de proteínas pro y anti-apoptóticas en células Jurkat cocultivadas con DSC.....	141
6.3.3	Regulación de la expresión de genes relacionados con apoptosis en células Jurkat cocultivadas con DSC.....	143
6.3.4	El efecto protector de las células DSC sobre la viabilidad de los linfocitos no está mediado por la IL-6.....	147
6.4	Bibliografía de los Resultados.....	149
7	Discusión general .....	150
7.1	Bibliografía de la discusión.....	154
8	Conclusiones .....	158
Anexos		159

## Listado de ABREVIATURAS utilizadas

**Ang-2:** angiopietina-2

**Apaf-1:** factor activador de la apoptosis -1

**APC:** células presentadoras de antígeno

**BH:** Bcl-2 homólogo

**cAMP:** 3'5' AMP cíclico

**CARD:** dominio de reclutamiento y activación de caspasas

**CD:** células dendríticas

**CRDs:** dominios ricos en cisteínas

**cFLIP:** Proteína inhibidora de FLICE

**CTLA-4:** Citotoxy T-Lymphocyte Antigen 4

**DSC:** células deciduales estromales

**dNK:** Natural Killer decidual

**dATP:** desoxiadenosina trifosfato

**DD:** dominio de muerte

**DED:** dominio efector de muerte

**DISC:** complejo de señalización de inducción de muerte

**EGF:** factor de crecimiento epidermal

**ESC:** células estromales endometriales

**ERK:** quinasas activadas por señales extracelulares

**FADD:** proteína adaptadora con dominio de muerte asociada a Fas

**FDC:** células foliculares dendríticas

**FOXP3:** forkhead box P3

**GCP:** proteína quimioatrayente de granulocitos

**GM-CSF:** factor estimulador de colonias granulocíticas macrofágicas

**HCMV:** citomegalovirus humano

**HLA:** antígeno leucocitario humano

**IAPs:** Proteínas inhibidoras de apoptosis

**IDO:** Indolamida-2,3-dioxigenasa

**IGFBP-1:** proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina -1

**IL:** interleuquina

**IFN:** interferón

**IP-10:** proteína inducible por IFN- $\gamma$  - 10

**LGG:** linfocitos granulares grandes

**LIF:** factor inhibidor de leucemia

**LPS:** lipopolisacárido  
**M-CSF:** factor estimulador de colonias macrofágicas  
**MCP:** proteína quimioatrayente del monocito  
**MIP1 $\beta$ :** proteína inflamatoria del macrófago 1 $\beta$   
**MHC:** complejo principal de histocompatibilidad  
**NK:** natural killer  
**PARP:** Poli (ADP-ribosa) polimerasa  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa  
**PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas  
**PGE2:** prostaglandina E2  
**PIBF:** factor bloqueante inducido por progesterona  
**PKA:** proteína quinasa A  
**PLGF:** factor de desarrollo de la placenta  
**PRL:** prolactina  
**PT:** poro de permeabilidad transitoria  
**RANTES:** regulated upon activation, normal cell T  
**ROS:** especie reactiva de oxígeno  
**RT-PCR:** transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa  
**SCF:** factor de células totipotenciales  
**SDF:** factor derivado de células estromales  
**TCR:** receptor de linfocitos T  
**TGF:** factor de crecimiento transformante  
**TNF:** factor de necrosis tumoral  
**TRADD:** dominio de muerte asociado a TNF-R1  
**TRAIL:** tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand  
**T<sub>reg</sub>:** células T reguladoras  
**uNK:** células natural killer uterinas  
**VAD:** vimentina, actina y desmina  
**VDAC:** canal iónico dependiente de voltaje de la membrana mitocondrial  
**VEGFC:** factor de crecimiento endotelial vascular C

# 1 RESUMEN

Durante el embarazo, el feto semialógeno es normalmente aceptado por el sistema inmunitario materno. Inicialmente el contacto entre las células del feto y las células de la madre tienen lugar en la decidua.

La decidua es el tejido materno en el que se han demostrado mecanismos inmunológicos que determinan la tolerancia de la madre hacia el feto (éxito del embarazo) o de activación inmunológica frente al trofoblasto (aborto espontáneo). La decidua está dramáticamente poblada por una variedad de células inmunitarias, aunque las células deciduales estromales DSC (decidual stromal cells) constituyen el principal componente celular.

Está demostrado que las células DSC participan en la inmunoregulación materno-fetal, pero su relevancia en la decidua para el éxito de la implantación del embrión aún permanece por esclarecer. Sin embargo, nuestro grupo ha demostrado que las DSC desarrollan diversas actividades inmunitarias {Ruiz, 1997} {Olivares, 1997}, aunque proceden de un precursor estromal de médula ósea {García-Pacheco, 2001} y están relacionadas fenotípicamente con los miofibroblastos {Oliver, 1999} {Kimatrai, 2005}, células con actividad contráctil.

El objetivo de esta tesis es el de estudiar la participación de las DSC humanas en la interrelación inmunológica entre la madre y el feto. Es por esto que hemos analizado mediante citometría de flujo, RT-PCR, western blot, e inmunofluorescencia la expresión de HLA-G en las DSC. Nosotros observamos que tanto las DSC cultivadas como frescas expresan HLA-G y que esta expresión aumenta por efecto de la progesterona y citocinas como la IL-10 e INF- $\gamma$ .

También hemos determinado como las DSC participan en la regulación de los linfocitos T maternos. En nuestros experimentos observamos que las DSC protegen de la apoptosis a los linfocitos T y esta protección es mediada por la regulación de proteínas que participan en la ruta de apoptosis. Este efecto generalizado de las DSC sobre los linfocitos lo determinamos mediante el análisis del ciclo celular, en el cual encontramos que la línea de células T Jurkat y linfocitos deciduales en presencia de DSC mejoran su viabilidad celular; a la vez mediante western blot observamos como las DSC regulan la expresión de proteínas

pro-apoptóticas, favoreciendo así la supervivencia de la célula. Además, mediante PCR array analizamos genes que nos ayudan aún más a confirmar estos datos experimentales.

Es importante tener en cuenta que las DSC expresan CD95, pero a pesar de ello son resistentes a inducción de apoptosis con anticuerpos anti-CD95. En general nuestros datos nos llevan a pensar que estas células secretan factores paracrinos que hacen a los linfocitos deciduales, e incluso a ellas mismas, resistentes a la inducción de apoptosis. Este resultado es paradójico ya que la tendencia fisiológica de las DSC es morir por apoptosis.

Estos resultados nos permiten deducir:

- 1) Que la expresión de HLA-G por las DSC podría ser un mecanismo de inhibición de la actividad lítica de las NK deciduales y que esta expresión es regulada por diversas sustancias presentes en el embarazo.
- 2) Que las DSC lejos de inducir apoptosis, pueden ser relevantes en la regulación de este fenómeno de muerte celular en la interfase materno-fetal.

## 2 Introducción

Durante el embarazo humano el sistema inmunitario materno sufre una serie de modificaciones con el fin de que el feto no sea rechazado. Las células del feto (trofoblasto) migran hacia el tejido uterino con la finalidad de invadirlo e implantarse en él. La invasión del trofoblasto asegura el anclaje de la placenta dentro del epitelio uterino, que a su vez le garantiza al feto los requerimientos necesarios para su nutrición y desarrollo. Este contacto íntimo entre las células inmunológicas maternas y las células fetales está restringido en la “decidua”, tejido materno que va a estar en íntimo contacto con el trofoblasto fetal; en ella se van a desencadenar mecanismos de tolerancia materna para el caso de embarazo normal o de activación inmunológica para el caso de aborto espontáneo.

La decidua contiene las células deciduales estromales “DSC”; estas células constituyen el principal componente celular y adquieren la capacidad de regular la invasión del trofoblasto, de resistir a los daños inflamatorios causados por el estrés oxidativo y de disminuir la respuesta inmunológica local. La decidua también contiene una población muy rica de leucocitos maternos que a pesar de estar en contacto con células del feto son incapaces de reconocerlas como extrañas, favoreciendo su desarrollo. Por tanto en humanos una de las razones por la cual sucede el aborto espontáneo es que hay un fracaso o desequilibrio en el sistema inmunitario decidual materno.

También las células del trofoblasto extravellocistario, que son las células que migran hacia la decidua, ejecutan varios mecanismos para no ser reconocidas por los leucocitos presentes en la decidua. La expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I por parte de estas células constituye uno de estos mecanismos en la interfase materna fetal. Algunos receptores específicos del MHC de clase I se encuentran en las células Natural Killer deciduales (dNK). La unión del MHC de clase I a sus receptores inhibidores específicos de las dNK, puede bloquear su acción lítica y por tanto favorecer el desarrollo del trofoblasto.

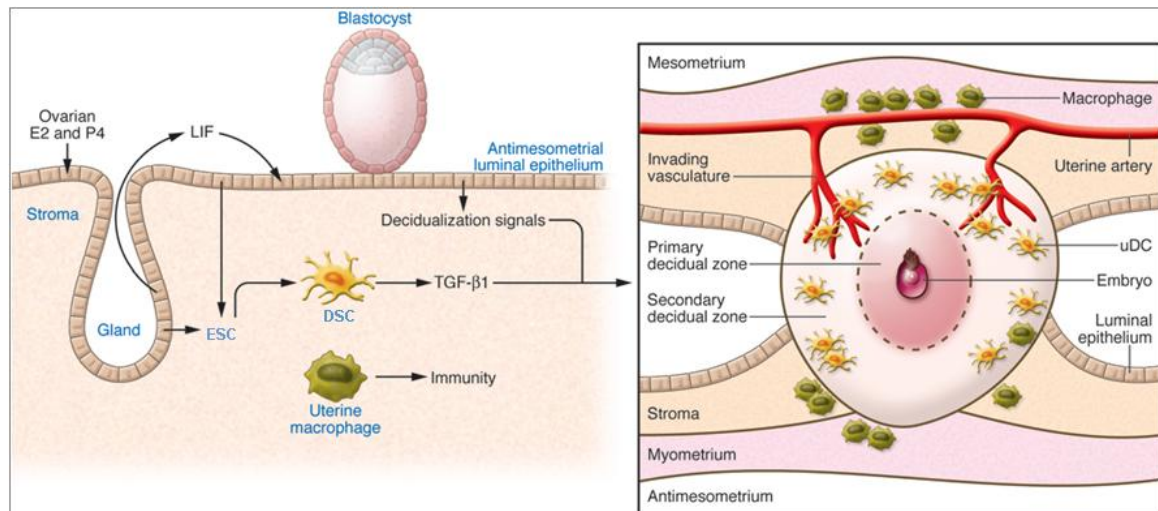


Dentro de la población leucocitaria que se encuentran en la decidua están las dNK ya mencionadas, los linfocitos T, T<sub>reg</sub>, B y macrófagos, que van a interactuar con las DSC bajo la influencia de la progesterona para conseguir el éxito del embarazo.

## 2.1 La decidua

La decidua es el tejido materno que constituye una especie de barrera física capaz de crear un ambiente de citocinas local que promueva más el anclaje del trofoblasto que la invasión de este [1, 2]. Por tanto la decidua es el tejido materno que tapiza el útero gestante encontrándose en contacto con las células del feto y formando parte de la denominada interfase materno-fetal.

La decidua comienza a formarse cuando el blastocisto se implanta en el epitelio uterino, de tal forma que las células del trofoblasto penetran las capas del útero llegando hasta conectar con las células estromales endometriales (ESC). Rápidamente estas células experimentan un cese de proliferación y una diferenciación hacia células DSC; también en este ambiente comienza a formarse lo que conocemos como la zona decidual primaria. Después de varios días, en este lugar del endometrio comienza a formarse una matriz muy densa debido a que hay una masiva influencia de leucocitos especialmente de células dNK. Las células DSC recién convertidas, que inicialmente tiene un aspecto alargado, adquieren otra forma redondeada o poligonal, experimentando poliploidia. Aquí, bajo los efectos de la progesterona, la zona decidual primaria desaparecería y se formaría la zona decidual secundaria, que está constituida por las DSC ya propiamente dichas y con capacidad funcional activa. Estas células constituyen el principal componente celular de la decidua, secretan citocinas, factores de crecimiento, hormonas y proteasas bajo la influencia de la progesterona [3]. Figura 2-1.



**Figura 2-1** Al comienzo del embarazo las hormonas progesterona (P4) y estradiol (E2) estimulan la síntesis de factores de crecimiento que regulan y coordinan la invasión del blastocisto. Las ESC se transforman en DSC. Se forman las diferentes zonas de la decidua compuesta por diferentes células inmunológicas. Las DSC secretan TGF- $\beta$ 1. Adaptada de Jeffrey W. Pollard. J. Clin Invest. Doi: 10.1172/JCI37733 [4]

Las DSC constituyen el objetivo de nuestro estudio, por lo que más adelante hablaremos de ellas con más detalle.

A la decidua se le han atribuido varias funciones: **a)** controla la invasión del trofoblasto, **b)** le proporciona nutrición al embrión, **c)** previene la reacción inmunológica de la madre hacia el feto, **d)** genera factores autocrinos y paracrinos que controlan el establecimiento y mantenimiento del embarazo.

La decidua, tal como el epitelio estromal del timo o la médula ósea, es un sitio de migración, desarrollo y funcionamiento de un grupo de leucocitos: dNK, células dendríticas (CD), macrófagos, células T y células B.

A lo largo de todo el embarazo, existen variaciones significativas en el número de leucocitos presentes en la decidua: las dNK comprenden alrededor del 70%, los macrófagos comprenden alrededor del 20% y el resto consiste en células T  $\gamma\delta$  especializadas, células T CD4<sup>+</sup>, células T CD8<sup>+</sup>, granulocitos, células dendríticas y linfocitos B, siendo la presencia de estos últimos poco común en el endometrio y en la decidua [5, 6].

## 2.1.1 Células inmunitarias de la decidua

### 2.1.1.1 Células NK de la decidua

La principal población de leucocitos encontrados en la decidua humana, así como en ratones durante los primeros meses del embarazo, son las dNK, presentando fenotipo  $CD56^{\text{bright}}CD16^-$  y teniendo una morfología de linfocitos granulares grandes (LGG).

En el endometrio no gestante se encuentran las NK uterinas (uNK); el número de estas células varía a través del ciclo menstrual de modo que durante la fase pre-ovulatoria las uNK aparecen en escasa cantidad, son más pequeñas y sin granulaciones, mientras que en la fase post-ovulatoria proliferan se hacen más grandes y adquieren una granulación patente [7].

Aproximadamente dos días antes de la menstruación (cuando los niveles de la progesterona decaen como consecuencia de la regresión del cuerpo lúteo), los cambios nucleares de las uNK son indicativos de que se está produciendo la muerte celular (aunque las características típicas de la apoptosis estén ausentes), primer signo indicativo de la menstruación, a no ser que se produzca la implantación del blastocisto [8].

Si ocurre el embarazo, en la fase temprana de éste aparecen las dNK en una proporción de un 20% que a medida que va progresando el embarazo aumenta hasta comprender el 40% del total de las células de la decidua y luego van desapareciendo hasta hacerse totalmente ausentes en el embarazo a término. Es destacable que su presencia sea coincidente con el periodo de invasión trofoblástica [9].

Conforme progresa el embarazo, aparecen en la decidua células NK con un fenotipo clásico  $CD16^+CD56^{\text{dim}}$  que son las preponderantes a término [10]. Todavía no está documentado a ciencia cierta cual es el origen de las dNK pero, se piensa que podrían proceder de una población sanguínea, que se infiltrara en el útero [11] y se diferenciara atendiendo a un microambiente determinado [12]. De hecho, el propio trofoblasto es capaz de producir determinados factores que funcionan como quimio-atrayentes de células dNK y que podrían contribuir a modular el microambiente de citocinas local [7, 13, 14].

Otra posibilidad es que las células dNK procedan de un progenitor hematopoyetico local que se diferencie en células uNK, presentes en el endometrio no gestante, y posteriormente cuando ocurre el embarazo y las DSC comienzan a secretar IL-15, los altos niveles de esta citocina harían que se diferenciara las células uNK en dNK [7, 15, 16].

### **Propiedades reguladoras de las células NK deciduales**

Las actividades funcionales de las dNK fueron demostradas por Landmark y Croy, quienes comprobaron que ratones TgH26 (deficientes en células NK y T) y ratones Rag2<sup>-/-</sup>J<sup>-/-</sup> (deficientes en células NK, T y B) tenían problemas para formar las glándulas metriales durante el embarazo e incluso, algunos, dificultades para que se produjera la decidualización y los cambios en el tejido uterino posteriores a la implantación que permiten que la gestación llegue a término [8, 17]. Además, el mismo grupo de Croy demostró que las células dNK son la principal fuente de IFN $\gamma$  en el lugar de la implantación, sabiéndose que ratonas IFN $\gamma$  -knockout presentan elevadas tasas de aborto [8, 18] y que además esta misma citocina contribuye al inicio del remodelado vascular uterino de los roedores, la integridad de la decidua y la maduración de las propias dNK, lo que sería vital para conseguir un embarazo exitoso [13].

Estos resultados pueden enlazar con el hecho de que la preeclampsia está relacionada con defectos vasculares en el embarazo que se asocian, a su vez, con una inadecuada invasión por parte del trofoblasto a la decidua [19]. Además de la producción de IFN $\gamma$ , las células dNK pueden producir otro tipo de citocinas, como la IL-10, que impulsan el sistema inmunitario antiinflamatorio [20]. También producen moléculas relacionadas con la angiogénesis y estabilidad vascular: **a)** el factor de crecimiento vascular endotelial C (VEGFC), **b)** el factor de crecimiento de la placenta (PLGF), **c)** angiopoietina-2 (Ang-2) y **d)** NKG5 [13, 21]. Estos productos funcionan como importantes reguladores vasculares en las primeras etapas del embarazo.

Un estudio reciente ha demostrado que las dNK también pueden secretar IL-8 e IP-10 (interferon  $\gamma$ - inducible protein 10), quimioquinas que, unidas a sus receptores expresados por el trofoblasto invasivo, pueden causar la migración del trofoblasto [13].

## **Células NK deciduales y su entorno**

Las propiedades únicas de las células dNK probablemente resulten de su intensa comunicación con las DSC y con las diferentes citocinas secretadas por estas, creando así un microambiente especial en este tejido.

Las células dNK expresan receptores de fibronectina ( $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha 5\beta 1$ ) y también el receptor de laminina ( $\alpha 1\beta 1$ ). Estos receptores sirven para unirse a las DSC [22]. También se ha visto que las DSC expresan ligandos aún no identificados para los receptores de las dNK NKp30 y NKp44 [13].

Las células dNK también poseen receptores inhibidores de la citotoxicidad, [23, 24] como veremos en el apartado dedicado al HLA-G. Sabemos que algunas de las moléculas de HLA de clase I son expresadas por las células del trofoblasto y la decidua (ver apartado del HLA-G). La expresión de estas moléculas hace que las células dNK sean incapaces de matar a las células del trofoblasto y esto es debido a la expresión del heterodímero inhibitorio NKG2A/CD94 por parte de las dNK, que interactúa con HLA-E del trofoblasto [25].

Por otro lado estas células también expresan otros receptores inhibidores de la citotoxicidad, como son LIR-1 y KIR2DL4, que unidos al HLA-G del trofoblasto bloquean su actividad citolítica [26]. Aunque la expresión de KIR2DL4 es muy discutida, ya que podría ejercer algunas funciones activadoras [27, 28].

### **2.1.1.2 Células T reguladoras**

Los linfocitos T comprenden sólo el 10% de la población leucocitaria en la decidua. De la población  $CD3^+$ , la mayoría son  $CD8^+TCR\alpha\beta$  aunque algunos son  $TCR\gamma\delta$ . Una menor proporción son linfocitos T  $CD4^+$ , y de estos, algunos presentan el fenotipo de células T reguladoras ( $T_{reg}$ ) con la expresión  $CD3^+ CD25^{high} FOXP3^+$  [29, 30, 31]. Las células  $T_{reg}$ , como ya se ha comentado, se encuentran normalmente en la decidua, pero en casos de aborto espontáneo recurrentes y pre-eclampsia se ha encontrado que estas células no son funcionales y que aparecen en una proporción mucho menor, si se comparan con el embarazo normal [32].

Por otro lado también se ha visto en ratones preñados y mujeres embarazadas que las células  $T_{reg}$  expresan CTLA-4 (Citotoxy T-Lymphocyte Antigen 4), que interacciona con el receptor B7 de las células dendríticas de la decidua y consecuentemente se produce la secreción deIDO (Indolamida-2,3-dioxigenasa) por parte de las células dendríticas deciduales [31, 33]. La regulación deIDO puede originar una depleción del triptófano en la interfase materno-fetal, y por tanto no habrá activación de los linfocitos T y NK maternos y estos a su vez no atacarán a las células fetales semialogénicas.

La deficiencia de estas células  $T_{reg}$  podría estar asociada a la pérdida de embarazos tempranos post-implantatorios y a abortos espontáneos en modelos animales; y bajos niveles de las mismas podrían asociarse a abortos recurrentes en humanos. Es decir, que estas células podrían tener un papel fundamental en la inducción y mantenimiento de la tolerancia materno-fetal [31].

### **2.1.1.3 Macrófagos deciduales**

Además de las células NK, otras células inmunitarias innatas, especialmente los macrófagos, también se encuentran en la decidua. En humanos, durante el embarazo, los macrófagos están dispersos por todo el útero, incluyendo la decidua materna [34 - 36].

En la decidua, el número de macrófagos constituye cerca del 15-20% de todos los leucocitos presentes [37]. Los macrófagos deciduales se cree que desempeñan un papel importante para que no haya reacción inmunitaria en contra de la placenta; y esto es por la limitada capacidad que tienen para presentar antígenos y por sus bajos niveles de CD86, en comparación con los monocitos  $CD14^+$  de sangre periférica de mujeres gestantes y no gestantes, siendo una especie de macrófagos “deprimidos”, que además expresanIDO y moléculas de carácter anti-inflamatorio como IL-10 [38, 39].

La cantidad de IL-10 que secretan los macrófagos deciduales es significativamente más elevada que la producida por los monocitos sanguíneos u otros tipos de macrófagos [40, 41]. Los macrófagos deciduales también tienen un papel fagocítico, ya que pueden estar implicados en la eliminación de células y restos de tejidos asociados con la invasión del trofoblasto. Por otro lado, también se ha sugerido que estos macrófagos producen otras citocinas como  $TNF\alpha$ ,  $TNF\beta$  y factores estimuladores de colonias [41, 42].

#### 2.1.1.4 Células dendríticas

La decidua humana contiene otro potente componente celular presentador de antígeno (APC), que son las células dendríticas (CD). En el endometrio decidualizado existen dos poblaciones de células dendríticas: las células dendríticas maduras CD83<sup>+</sup>, que comprende el 1% de la población decidual; [43] y las células dendríticas inmaduras CD83<sup>-</sup> DC-SIGN<sup>+</sup> [44, 45]. Estas células están reguladas por diferentes factores incluyendo citocinas y hormonas que se secretan en la decidua. Por ejemplo, los estrógenos influyen sobre las CD para que no ejerzan el papel de estimular la proliferación y diferenciación de las células T hacia un perfil Th1/Th2 mientras que la progesterona, interactuando a su vez con laIDO y otras moléculas (TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF), hace que las CD adquieran un fenotipo maduro con propiedades tolerogénicas [46]. Además las moléculas del MHC, como el HLA-G y HLA-E, modulan la secreción de citocinas por CD y el HLA-G promueve el desarrollo tolerogénico de las CD derivadas de monocitos a través de los receptores inhibidores expresados por las CD en estudios *in vitro* [47].

Durante el embarazo, las CD tienen una función reguladora de las células NK deciduales a través de la secreción de citocinas como IL-15, IL-12, IL-18 e IFN- $\gamma$  que promueven la diferenciación y proliferación de las NK [38, 48]. Además, las NK activadas inducen diferenciación y maduración de las CD, aunque también los microorganismos (virus y bacterias) cambian el estado inmaduro de las CD hacia un estado maduro y funcional [38, 49,].

Por otro lado las células CD inmaduras son especialmente sensibles a la citotoxicidad mediada por las células NK activadas, de hecho parece que esta susceptibilidad está mediada por los receptores activadores Nkp30 de las NK, mientras que las CD maduras están protegidas por una alta expresión de MHC de clase I [38, 50]. También se ha visto que las CD, cuando están en contacto con las NK, modulan algunos receptores activadores de la citotoxicidad disminuyéndolos (como el NKG2D) y a la vez aumentan la expresión del receptor inhibidor NKG2A [38]. Todos estos datos revelan que las CD presentes en el embarazo normal pueden ser potentes candidatas para regular la actividad de las células NK deciduales y mediar la respuesta antigénica durante el embarazo.

## 2.1.2 Factores reguladores locales

### 2.1.2.1 El paradigma Th1/Th2

Los linfocitos T en la decidua producen diferentes tipos de citocinas tanto Th1 como Th2 [51, 52]. Como se sabe, las citocinas de tipo Th1 favorecen el aborto por impedir la invasión del trofoblasto en la decidua materna: el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) estimula la apoptosis en las células del trofoblasto, el IFN- $\gamma$  incrementa la muerte mediada por el TNF- $\alpha$  [53-55] y la IL-2 inhibe la decidualización e incrementa la contractilidad de las DSC [56]. Estas citocinacitocinas también pueden inhibir el desarrollo de las células del trofoblasto *in vitro*, [57, 58] permitir su expulsión y estimular la actividad de los macrófagos resultando en el daño del embrión [59, 60].

Las citocinas Th2 en cambio estimulan el desarrollo e invasión del trofoblasto [61-64]. Se ha visto que en la decidua, así como en sangre periférica, durante el embarazo predominan las Th2 [65-69].

Para que exista un embarazo exitoso debe existir un balance entre Th1/Th2, que estará fuertemente inclinado hacia la actividad Th2, por lo que cuando predominan las Th1 ocurre el aborto [52]. Experimentos realizados en el primer trimestre de embarazos normales han mostrado que los linfocitos de sangre periférica de mujeres embarazadas secretan *in vitro* más citocinas Th2 (IL-4, IL-10 e IL-6) y menos Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ) comparados con mujeres no embarazadas [55, 70]. El balance hacia la producción de citocinas Th2 también fue confirmado *in vivo* con la sobreexpresión de genes para IL-4 e IL-6 y una expresión menor de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  en linfocitos de sangre periférica. Además, el número de linfocitos que secretan IL-4 se incrementa progresivamente en el transcurso del embarazo.

Por otro lado las citocinas IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ , el factor de desarrollo derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento epidermal (EGF) pueden inducir la secreción del factor inhibidor de leucemia (LIF) por parte de las células deciduales. Hacemos mención del LIF como apartado especial ya que al igual que las otras citoquinas mencionadas es de gran importancia en el periodo pre-implantatorio y junto con el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) facilitaría los siguientes procesos: la invasión del trofoblasto [71, 72], la decidualización del endometrio [72, 73], regularía la interacción entre linfocitos



deciduales y las células del trofoblasto y controlaría la angiogénesis dentro de las vellosidades trofoblásticas [72, 74]. Algunos de los procesos descritos son dependientes de progesterona [69].

En relación a la progesterona, llamada la hormona del embarazo, influencia la red de citocinas Th2 por disminución de la actividad Th1. La progesterona parece que estimula a los linfocitos a producir el factor bloqueante inducido por progesterona (PIBF) el cual tiene la capacidad de intensificar la producción de citocinas Th2 *in vitro* (IL-3, IL-4, IL-10) y reduce la secreción de citocinas Th1. La progesterona también es un factor beneficioso para la producción de GM-CSF y TGF- $\beta$ . Por otra parte la actividad incrementada de Th2 es acompañada por una predominancia en el número de células Th2 y las células Th1 son más vulnerables al mecanismo de apoptosis dependiente de Fas-FasL en sangre periférica durante el embarazo [75, 76].

Diversos autores cuestionan el paradigma Th1-Th2 en el embarazo. El fundamento de esta crítica radica en el hecho de que las citocinas inflamatorias son importantes en la implantación y en que el IFN- $\gamma$ , citocina proinflamatoria, puede conducir a las células hacia perfiles inmunosupresores cuando se une con otros moduladores, y por tanto, paradójicamente servir como una citocina antiinflamatoria [77]. También se ha visto en ratones que la producción IFN- $\gamma$  por las células uNK, favorece el desarrollo de arterias uterinas, la integridad de la decidua y la maduración de las propias uNK, [55, 78] lo que indicaría que las citocinas Th1, no serían tan negativas para el embarazo como ha sido propuesto [53].

## **2.2 Las células deciduales estromales humanas**

Las DSC constituyen un tipo particular de célula que aparece en el endometrio uterino de los mamíferos durante el embarazo, usualmente justo después de la implantación del blastocisto. Se originan de la proliferación y diferenciación (decidualización) de un precursor estromal de aspecto fibroblástico que se detecta en el endometrio no gestante. Durante la fase lútea del ciclo menstrual, o si se produce embarazo, este precursor se decidualiza por efecto de la progesterona. Las células decidualizadas se vuelven redondeadas, expresan desmina en su citoplasma y secretan prolactina [79-81].

El hecho de que las DSC acumulen una gran cantidad de mucina (procedente de una elevada actividad del epitelio glandular), llenándose de vacuolas que contienen glucógeno, mucopolisacáridos ácidos y neutros, proteínas, lípidos neutros y fosfatídicos, ha propiciado que tradicionalmente, aunque no se sepa a ciencia cierta la función, linaje celular u origen de éstas células, se les haya supuesto un **rol nutricional**. Por otra parte, en presencia de progesterona, las DSC secretan prolactina, lo que sugiere que tienen una función endocrina a nivel local (**paracrino**) [81]. No obstante, diversos autores han demostrado que las DSC humanas y de ratón, así como su equivalente endometrial las células endometriales estromales (ESC), están implicadas en distintas funciones inmunológicas tales como la presentación de antígenos [82] y la fagocitosis [83].

En cuanto a la presentación antigénica, Imai et al. en 1992 publican la expresión de CD10 y CD13 por las DSC. Posteriormente nuestro grupo [82, 84] confirman la expresión de esos antígenos y de otros antígenos asociados a precursores estromales de médula ósea como la expresión de STRO-1 y CD34 [85]. La detección en las DSC de antígenos HLA-II, CD80 y CD86, típicos de células presentadoras de antígenos (antigen presenting cells, APC), así como la capacidad de estas células estromales de estimular células T alogénicas sugiere que las DSC podrían actuar de APC a nivel local [82]

Otras funciones inmunológicas detectadas en la DSC son: actividad fagocítica [83] producción de citocinas tales como IL-6 e IL-8 [86-89] y sustancias inmuno-reguladoras como la prostaglandina E2 (PGE2). Las citocinas Th1 incrementan estas actividades inmunológicas, [83, 86, 90] pero a la vez inhiben el proceso de decidualización, más adelante explicaremos este concepto [91-93].

Por otro lado, las funciones inmunológicas sufren un marcado descenso por efecto de la progesterona, la hormona responsable del fenómeno de la decidualización [83, 84, 91].

Las DSC tienen una morfología fusiforme, tienen capacidad para producir proteínas de la matriz extracelular y son capaces de autorrenovarse por lo que, como ya se ha mencionado, han sido consideradas clásicamente células similares a los fibroblastos. La relación entre las DSC y los fibroblastos se ha visto fundamentada por el hecho de que los fibroblastos de la dermis secretan prolactina, una actividad que ya hemos comentado la pueden realizar las células deciduales [94, 95]. Cabe señalar que el antígeno Thy-1, expresado por los

fibroblastos, se encuentra presente en todas las DSC [96]. Ultraestructuralmente encontramos grandes semejanzas con los miofibroblastos, células fibroblásticas con actividad contráctil que participan en la retracción de cicatrices [97].

Podemos sustentar la hipótesis aún más al comprobar la presencia de vimentina y desmina en las DSC [95, 98], dos proteínas del citoesqueleto que también se hallan en los miofibroblastos, así como de  $\alpha$ -SM-actina, otro microfilamento contráctil marcador de miofibroblastos [97]. Nuestro grupo ha demostrado además que las DSC presentan actividad contráctil in vitro [56] y que están emparentadas con el precursor estromal de la médula ósea [85].

### **2.2.1 Fenotipo antigénico de las células deciduales estromales**

Las DSC en cultivo, presentan una combinación de antígenos asociados a diferentes tipos de células hematopoyéticas y células mesenquimales tal y como se aprecia en la Tabla 2-1 [84, 94, 95, 98, 99].

Esta combinación de antígenos asociados a células hematopoyéticas expresados por las DSC, ha propiciado que algunos autores las hayan considerado pertenecientes al linaje hematopoyético [100]. El hecho de que la mayoría de las células DSC humanas expresen los antígenos CD10 y CD13, que son peptidasas expresadas por las células de la línea mielomonocítica [84, 101], corroboraría esta adscripción. Estos datos han sido debatidos ya que recientemente se ha publicado que las células deciduales también expresan marcadores específicos de células mesenquimales y que estas células tienen la capacidad de diferenciarse a otros linajes celulares [99].

El CD10 es un antígeno expresado tan intensamente por ESC y DSC [101] que se utiliza para identificar a estas células en la decidua en procesos patológicos como endometriosis [84]. No obstante, CD10 es expresado también por los neutrófilos, aunque las diferencias morfológicas y antigénicas permiten distinguir fácilmente estos dos tipos celulares [101]. La función de CD10 y CD13 podría consistir en modular el metabolismo de los diferentes péptidos bioactivos contribuyendo, bien al normal desarrollo del embarazo, o bien al rechazo del mismo, pudiendo utilizarse como marcadores de superficie del endometrio [101].

Tabla 2-1 Fenotipo antigenico de las células deciduales estromales cultivadas. (\*) Resultados entre paréntesis correspondientes a prolactina y desmina tras el tratamiento con progesterona.

FENOTIPO ANTIGENICO DE LAS CÉLULAS DECIDUALES ESTROMALES CULTIVADAS	
ANTIGENO	CITOMETRIA DE FLUJO/ INMUNOHISTOQUIMICA
<b>FILAMENTOS INTERMEDIOS</b>	
Vimentina	+++
Citoqueratina	-
Desmina	-(+)*
Alfa-SM-actina	+++
<b>LINAJE HEMATOPOYÉTICO</b>	
CD45	-/±
<b>LINAJE DE CÉLULAS T</b>	
CD1a	++
CD3	-
CD7	-
<b>LINAJE DE CÉLULAS B</b>	
CD20	++
CD21	+
CD22	-
CD24	+
<b>LINAJE DE NATURAL KILLER</b>	
CD56	-/+++
<b>LINAJE MIELOMONOCITICO</b>	
CD11b	++
CD13	+++
CD14	-/+
CD15	-
CD16	+++
CD33	-
CD36	++
<b>CELULAS PRESENTADORAS DEL ANTÍGENO</b>	
HLA-DR	+
CD80	++
CD86	++
<b>CELULAS FOLICULARES DENDRITICAS</b>	
CD21	++
CD23	++
CD35	+
DRC-1	++
HJ2	++
<b>CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES</b>	
CD10	+++
CD29	+++
CD34	+
CD54	++
CD71	+++
CD73	+++
CD90	+++
CD106	+
STRO-1	+
<b>OTROS</b>	
Prolactina	-(+++)*

### **2.2.2 Relación de las células deciduales estromales y las células foliculares dendríticas.**

Las FDC se encuentran en los folículos de los órganos linfoides y una de sus funciones es la de rescatar de la apoptosis a las células B presentes en los centros germinales de los folículos linfoides, propiciando la formación de clones de células B memorias y células productoras de anticuerpos [102]. Las FDC comparten ciertas características con las DSC: la morfología idéntica fusiforme y la asociación de antígenos mielomonocíticos y de células B, incluyendo los receptores del complemento (CR2, CR3), así como la expresión de HLA de clase II, que recuerda a la batería antigénica de las células foliculares dendríticas de los folículos linfoides (FDC, follicular dendritic cell) [103].

La relación de las DSC con las FDC se confirma por la expresión de un marcador específico de FDC, el antígeno DRC-1 [104]. También al igual que las DSC, expresan  $\alpha$ -SM-actina y tiene la capacidad de contraerse y relajarse cuando son tratadas en cultivo con diferentes citocinas. Por otro lado algunos experimentos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que las FDC en presencia de progesterona combinada con cAMP secretaban prolactina (datos no publicados).

### **2.2.3 Producción de citocinas y otras moléculas biológicamente activas por las células deciduales estromales.**

Desde hace años se ha venido constatando la capacidad de las DSC para producir y secretar citocinas. Entre ellas encontramos citocinas proinflamatorias, como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ 1, leptina y oncostatina M [105]. De todas estas citocinas mencionadas sólo el TNF $\beta$ 1 ejerce funciones de inmunosupresión. Se conoce que la IL-1 actúa en las ESC inhibiendo la expresión del ARNm de la conexina 43 (la proteína principal en las uniones intercelulares del músculo cardíaco y del músculo liso), que llevaría aparejado un descenso en la comunicación de las células endometriales estromales con otras células [106].

También la IL-1 y TNF $\alpha$ , inhiben la decidualización [91, 92]. Además de estas citocinas las DSC secretan otras como IL-11, inducida por progesterona, relaxina y prostaglandina E2. La IL-11 prepara al endometrio humano para una posible implantación. La

neutralización de la IL-11 endógena con un anticuerpo anti- IL-11 inhibe la diferenciación de las células estromales uterinas, reduce la presencia de los marcadores de decidualización (PRL e IGFBP-1) y causa fallos en el embarazo de ratones [107, 108].

Dentro de las citocinas antiinflamatorias que secretan las DSC se encuentra la IL-10, citocina que también la producen las células del trofoblasto [109, 110] y que se perfila como un mediador crucial en el mantenimiento del embarazo [111], siendo capaz de prevenir los abortos inducidos por elevados niveles de Th1 en ratonas, a la vez que la administración de un anticuerpo monoclonal anti-IL10 produce en estas mismas el aborto [61]. Otras citocinas que se secretan son IL8, M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), MCP-1, MCP-2 (monocyte chemoattractant protein-1,2) y RANTES [105].

Las DSC secretan proteínas quimiotácticas de granulocitos (granulocyte chemotactic protein-2 (GCP-2), producción que se estimula con IL-1, TNF $\alpha$  y LPS, pero no con IFN- $\gamma$ , pudiendo estar involucrados los niveles de GCP-2 en el desarrollo de los procesos patológicos ó fisiopatológicos del embarazo, al regular el tráfico de neutrófilos en el endometrio [112]. Tras la decidualización, las DSC también producen factores proangiogénicos como LIF (factor inhibidor de leucemias), VEGF (vascular endothelial growth factor), EGF, TPO, MCSF, SCF y SDF-1 [105].

#### **2.2.4 Las células deciduales estromales como células fagocíticas**

Aunque en un principio Searle et al. (1991) publicaron que la actividad fagocítica en la decidua era debida a la presencia de macrófagos, parecía existir otro conjunto celular presentador de antígenos (diferente a los macrófagos) que se identificó como una población similar a las células dendríticas [113] y que necesitaría internalizar los antígenos para posteriormente mostrarlos en superficie [83]. Esas células podían ser las DSC, ya que eran, capaces de fagocitar partículas, siendo ésta una actividad que desciende con la maduración celular durante la decidualización bajo el efecto de la progesterona [84, 91].

La IL-1 activa la fagocitosis de las DSC mientras que la progesterona la reduce. Hay resultados que sugieren la existencia de una red inmunológico-endocrina que involucra a las DSC, y según la cual la IL-1 y el TNF $\alpha$  primarían las funciones inmunológicas de las mismas para la defensa contra una posible infección ó inclusive la eliminación del

trofoblasto en situaciones patológicas, mientras que la progesterona favorecería el crecimiento fetal y el estado gestacional por inhibición de las funciones mencionadas [83].

### **2.2.5 Las células deciduales estromales como presentadoras de antígeno**

Las células estromales uterinas del tejido decidual de ratón son capaces de procesar antígenos administrados intravenosamente y presentarlos en una forma reconocible para los linfocitos T *in vivo*, habilidad que se reduce cuando se administra TGF- $\beta$  o estradiol [114]. Además las DSC humanas purificadas expresan CD80, CD86 y HLA de clase II, tres moléculas expresadas por las APC. El hecho de que las DSC, además, sean capaces de estimular células T alogénicas confirma esta posibilidad. [82]. La actividad fagocítica, también demostrada en las DSC [83] es un dato más que favorece esta hipótesis.

Por otro lado las ESC humanas, también son capaces de estimular eficientemente la proliferación de linfocitos T, estímulo que se ve inhibido si tratamos con un anticuerpo anti-HLA clase II [113].

### **2.2.6 Las células deciduales humanas expresan $\alpha$ -SM (smooth muscle) actina y presentan características ultraestructurales de los miofibroblastos.**

Aunque las actividades y fenotipo inmunológicos descritos para las DSC y ESC, [83, 86, 87, 115] así como el posible origen en la médula ósea de las DSC murinas [100], sugerían que estas células eran auténticas células de carácter hematopoyético [84, 100], la morfología fusiforme de las DSC y su capacidad para producir proteínas de la matriz extracelular, así como para auto-renovarse, han propiciado que tradicionalmente se las haya considerado células similares a los fibroblastos, es decir, células estromales [116].

La relación DSC-fibroblasto poco a poco se ha visto sustentada por diferentes funciones que ambos tipos de células comparten, por ejemplo la capacidad que tienen los fibroblastos de la dermis para secretar PRL [117], como ya hemos dicho que hacen las células estromales decidualizadas [94, 95]. Más aún, el antígeno Thy-1, expresado por fibroblastos [118], se detecta en todas las DSC [96]. Además, las DSC son positivas para la alfa-SM-actina, como ya se ha mencionado, microfilamento detectado sólo en células de origen

mesenquimal, [119] lo que claramente demuestra un linaje de tipo mesenquimal más que hematopoyético, en contra de lo defendido por diversos autores [100, 87].

La desmina es otro filamento citoesquelético, que se encuentra solamente en ciertas células mesenquimales, para el que son positivas las DSC [95, 98]. La expresión de vimentina (V) y  $\alpha$ -SM-actina (A) en pre-DSC (fenotipo VA) y de vimentina,  $\alpha$ -SM-actina y desmina (D) en DSC (fenotipo VAD) relaciona estas células con un tipo particular de fibroblasto, el miofibroblasto, que presenta tanto el fenotipo VA como el VAD, así como con células vasculares de músculo liso y pericitos (VAD+) [120]. Además, el hecho de que las pre-DSC se localicen circundando las arteriolas uterinas [121], lugar donde típicamente se sitúan los pericitos [120], confirmaría la relación entre estos tipos celulares.

Las actividades inmunológicas de las DSC y la expresión de antígenos hematopoyéticos no contradicen esta relación entre DSC y miofibroblastos en cuanto al posible origen mesenquimal de las células deciduales estromales, pues los fibroblastos también expresan antígenos asociados a células hematopoyéticas [122, 123], secretan citocinas [123], coestimulan la proliferación de los linfocitos T [123] y parecen estar implicados en el rechazo de tejidos transplantados [124].

Los miembros de la familia de los miofibroblastos presentan actividades contráctiles, (por ejemplo, el papel de los miofibroblastos en la retracción de las heridas ó la modulación del flujo sanguíneo por los pericitos), junto a ciertas actividades inmunológicas [124, 125]. En el caso de las DSC, las actividades de carácter inmunológico sí aparecen recogidas en la bibliografía [83, 86, 87, 100, 115,] y se ha demostrado que tienen actividad contráctil [56, 126,].

### **2.2.7 Decidualización**

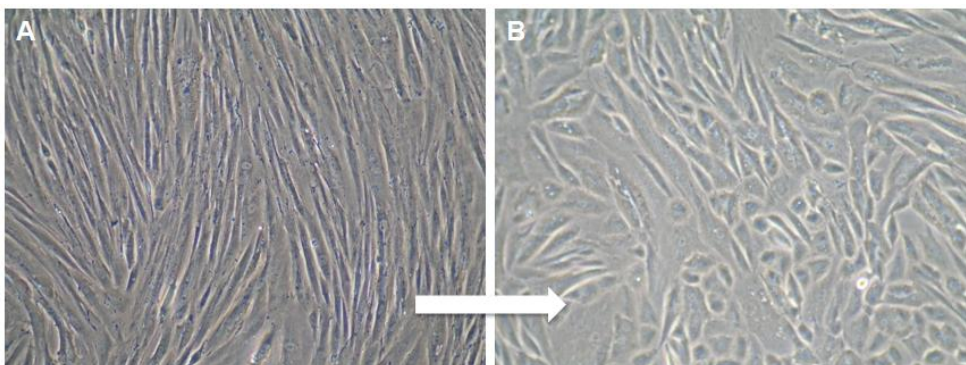
La decidualización puede ser definida como un proceso postovulatorio en el que ocurre la remodelación del endometrio, con la finalidad de prepararlo para el embarazo. Esto incluye cambios de secreción en las glándulas uterinas, diferenciación de las ESC a DSC, proliferación de las células NK uterinas y remodelación de los vasos capilares periféricos uterinos.



El proceso de decidualización ocurre en la gran mayoría de los mamíferos. En humanos, es decir en la mujer, es independiente de la implantación del blastocisto. Este proceso comienza desde el día 23 ó 28 del ciclo menstrual, por lo que si hay embarazo el precursor de las pre-DSC se decidualiza por efecto de la progesterona convirtiéndose en células DSC que secretan a su vez prolactina, IGFBP-1 (Insulin growth factor binding proteína-1) y expresando desmina en su citoplasma. Estos componentes constituyen el mejor marcador fenotípico de las células decidualizadas. Si no existe el embarazo, la caída de los niveles de progesterona desencadenan una cascada de eventos que resulta en la proteólisis del endometrio superficial, hemorragia focal y muerte celular [5, 127] culminando de esta forma en menstruación.

En el embarazo la decidualización comienza cuando el blastocisto se adhiere al estroma endometrial, específicamente en la zona donde las DSC se encuentran rodeando las arterias espirales maternas, para ser posteriormente propagado por todo el endometrio. Histológicamente estas preDSC que tiene un aspecto inicialmente alargado se convertirían en DSC y adquirirían una forma redondeada (

Figura 2-2). La decidualización es esencial que ocurra para permitir el éxito del embarazo. Se ha visto que cuando ocurren fallos en el proceso de decidualización del endometrio gestante, se originan una variedad de desórdenes en el embarazo como abortos recurrentes, disfunción útero-placentar, infertilidad, endometriosis y cáncer endometrial.



**Figura 2-2 Diferenciación de las Pre-DSC a DSC in vivo. (A) Células Pre-DSC no diferenciadas con morfología fibroblástica. (B) Cambio en la morfología (redonda) de las DSC tras el tratamiento con progesterona combinada con cAMP (decidualizadas).**

Las ESCs diferenciadas, o sea, las DSC en la decidua, cultivadas y en presencia de progesterona combinada con cAMP, secretan una variedad de factores como MIP1 $\beta$ , IL-11 e IL-15 las cuales podrían proveer señales de diferenciación, proliferación y factores quimiotácticos a las células inmune especializadas [128]. Por otro lado, la remodelación de la matriz extracelular en las DSC, caracterizada por la producción de laminina, colágeno tipo IV, fibronectina, proteoglicanos sulfatados y heparina críticamente regulan y coordinan la invasión y diferenciación del trofoblasto [129-131].

La iniciación de los procesos de decidualización requiere una elevada concentración de cAMP intracelular y la activación de la ruta de PKA (proteína kinasa A) [132]. La progesterona es el inductor principal fisiológico de la decidualización en mujeres. *In vitro* la decidualización también puede ser iniciada por otras sustancias como la prostaglandina E2 (PGE2), por la hormona leuteinizante (LH), y el factor estimulante del folículo (FSH) [133]. También existen otros componentes que promueven la decidualización como la relaxina [134], muchos factores paracrinos que están expresados a lo largo del ciclo, incluyendo la hormona liberadora de corticotropina (CRH) [135], y activin A [136-138].

Recientemente se ha demostrado que la grelina junto con su receptor GHS-R y la relaxina activan la PKA incrementando la producción de prolactina y de IGFBP-1 durante la decidualización inducida por progesterona, sugiriendo un papel en la progresión de decidualización posiblemente por sincronizar con la progesterona [139, 140].

## **2.3 Antígeno leucocitario humano (HLA-G)**

Es una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), no clásica de clase Ib, que a diferencia de las moléculas clásicas de clase I se caracteriza por presentar un bajo polimorfismo, además su distribución se encuentra restringida en los tejidos [141].

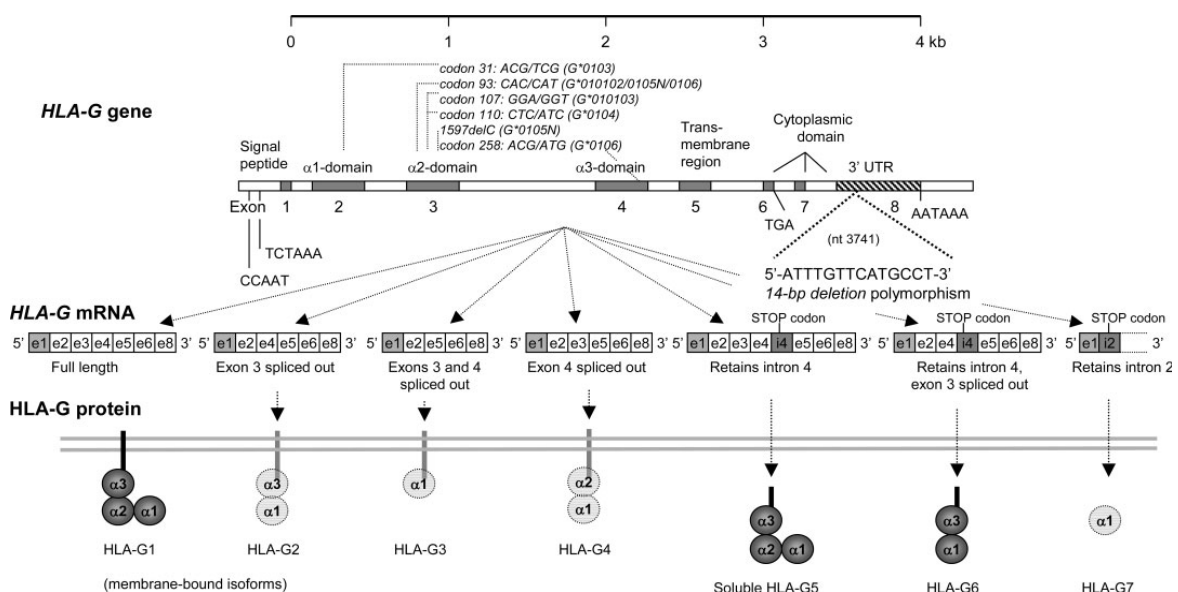
### **2.3.1 Localización genómica y su descubrimiento**

El locus del HLA-G, fue descrito por primera vez por Geraghty 1987, denominándolo inicialmente como HLA-6.0. Este se identificó durante una investigación de genes similares de la clase Ia. Para ello, clonaron el DNA genómico que codificaba para un gen

clase I (no codificaba ni para HLA-A, -B o -C) localizado en el fragmento de restricción de 6.0 Kb, generados por una enzima Hind-III. Este gen tenía homología con el HLA-A y -B, excepto en el exón 7, con un codón de terminación en la región citoplasmática en el exón 6 [142, 143]. El HLA-G se localizó en la región telomérica 6p21.3, muy cerca al locus del HLA-A [144].

### 2.3.2 Estructura del gen del HLA-G

La secuencia y estructura del gen del HLA-G tiene gran similitud con los genes HLA de clase I clásicos, teniendo ocho exones, siete intrones y la región 3'UTR. El exón 1 (73pb), el exón 2 (270pb), el exón 3 (276pb), el exón 4 (276pb), el exón 5 (114pb), los exones 6-8 (105pb), codifican para los dominios alfa 1, alfa 2 y alfa 3, la región transmembranal y el dominio citoplasmático. Sin embargo, presenta un codón de parada en el exón 6 que difiere con los genes HLA clase I clásicos (Figura 2-3), [142, 145,146].



**Figura 2-3. Gen y expresión del antígeno leucocitario humano (HLA-G).** El gen de HLA-G tiene casi la misma estructura de los genes de HLA clase Ia. Sin embargo el HLA-G tiene un corto dominio citoplasmático y un polimorfismo limitado, aunque genera siete isoformas por splicing alternativo. Adaptado [147], basado [142, 148-152]

### 2.3.3 Polimorfismo del HLA-G

Las moléculas de clase I se caracterizan por presentar un elevado polimorfismo, cosa que no ocurre con el HLA-G, que es casi monomórfico presentando una limitada heterogeneidad de secuencias y con pocos alelos descritos [153, 154]. Quince alelos del HLA-G se han reportado, 14 de los cuales se asignaron por la nomenclatura del HLA [155]. El primer alelo descrito por Geraghty, el G\*01011 (salvaje), es predominante en casi todas las poblaciones, con una secuencia variable de un 32% en poblaciones alemanas/croatas en contraste a un 83% en poblaciones de Ghana. El alelo HLA-G G\*01011 no involucra sustituciones en comparación con otros alelos como el G\*0103 (Thr31Ser), G\*0102 (Gln 54Arg), G\*01013 (Phe241Ser), G\*0141, G\*0142, y G\*01043 (Leu110Iso) [156].

El G\*0105N es el primer alelo nulo de HLA-G descrito, presentando una delección de una citosina en la tercera base del codón 129 o en la primera base del codón 130, lo que causa un cambio estructural que altera la secuencia de aminoácidos en el exón 3 (domino  $\alpha$  2) y genera un codón de parada prematuro en el exón 4. El HLA-G\*0105N se encontró en una variedad de grupos étnicos con una frecuencia del 11.1% en poblaciones africanas, a un 0,6% en poblaciones danesas. No ha sido encontrado en poblaciones caucásicas americanas o japonesas [153, 155]. La descripción de individuos sanos homocigóticos para el alelo HLA-G\*0105N indica que el HLA-G1 no es necesario para supervivencia fetal [157, 158].

Tabla 2-2, indica la distribución del alelo en las diferentes poblaciones étnicas.

Matte y colaboradores en el año 2000 reportaron, en 108 mujeres africanas, una frecuencia de un 39.3% para el alelo HLA-G\*01011, el más predominante en la población de estudio, seguido por el alelo G\*01041 (20.4%), con frecuencias similares a las reportadas en japoneses (38%), y poblaciones Hutterite (20%), y se encontró el alelo nulo G\*0105N con una frecuencia relativamente alta de 11.1% en la población africana que históricamente posee una gran cantidad de patógenos, lo que hace especular que la reducción en la expresión del HLA-G podría estar asociada con un aumento en el número de células T uterinas maternas, siendo beneficioso en infecciones intrauterinas [155,166].

**Tabla 2-2 Antígeno leucocitario humano HLA-G, frecuencia de alelos en diferentes poblaciones étnicas. N. Número de cromosomas testados, \* basados en secuencias de exones 2 y3. Tabla copiada de [147]**

<i>Alelos del HLA-G</i>	<i>Afro-americanas</i>	<i>África</i>	<i>Ghanaian</i>	<i>Danesas</i>	<i>Finlandesas</i>	<i>Alemanas</i>	<i>Huterite</i>	<i>Norte de India</i>	<i>Japonesas</i>
G*010101	70	83	62	58	32	46	10	33	
G*010102	6	2.4	27	38	36	20	16	16	
G*010103	2.4	0	5.1	4.8	6.8	2	5	6	
G*010104	-	-	-	-	-	4.4	8	-	
G*010105	-	-	-	-	-	-	0	-	
G*010106	-	-	-	-	-	-	-	-	
G*010107	-	-	-	-	1.9	-	0	-	
G*010108	-	-	-	-	9.1	-	0	-	
G*0102	-	-	-	-	-	-	1	-	
G*0103	-	-	-	-	2.3	2.7	24	-	
G*010401	13	9.5	4.5	-	6.1	13	18	45	
G*010402	-	-	-	-	-	-	-	-	
G*010403	-	-	-	-	-	-	-	-	
G*0105N	8.3	4.8	0.6	-	2.3	-	15	-	
G*0106	-	-	-	-	-	-	3	-	
Otros	-	-	-	-	3.1	12	-	-	
N	84	84	144	104	264	160	240	108	
<b>Referencias</b>	[159]	[159]	[160]	[161]	[162]	[163]	[164]	[165]	

### 2.3.4 Isoformas del HLA-G

El gen del HLA-G adopta siete isoformas que se originan de un empalme alternativo de un mismo RNA precursor, donde cuatro se encuentran unidas a la membrana de la célula (HLA-G1, -G2, -G3 y -G4) y otras tres aparecen en forma soluble (HLA-G5, -G6 y -G7) [152, 156] (Figura 2-4). Los mecanismos inusuales para generar las proteínas solubles alternas del HLA-G incluyen un codón de parada en el intrón 4 para las isoformas HLA-G5 y -G6 [149], mientras que el -G7 presenta un codón de parada en el intrón 2. El HLA-G1 y el HLA-G5 son muy parecidos, presentan una cadena pesada con los dominios alfa 1, alfa 2, alfa 3 (asociado con la beta 2 microglobulina) que codifican para el dominio extracelular, unidos al dominio transmembrana y un codón de parada en el exón 6, teniendo una estructura similar a los antígenos de clase I a clásicos. Los otros transcritos presentan estructuras más sencillas como el HLA-G2, -G3 -G4, que no incluyen el exón 3,

exón 3 y 4, o el exón 4, respectivamente, generando las isoformas truncadas. La isoforma -G3 sólo presenta el dominio alfa 1, la isoforma -G2 el dominio alfa 1 y alfa 3, la isoforma -G4 el dominio alfa 1 y alfa 2. Las isoformas HLA- G1, G2, G3, y G4 tiene en común la región transmembranal [148, 152].

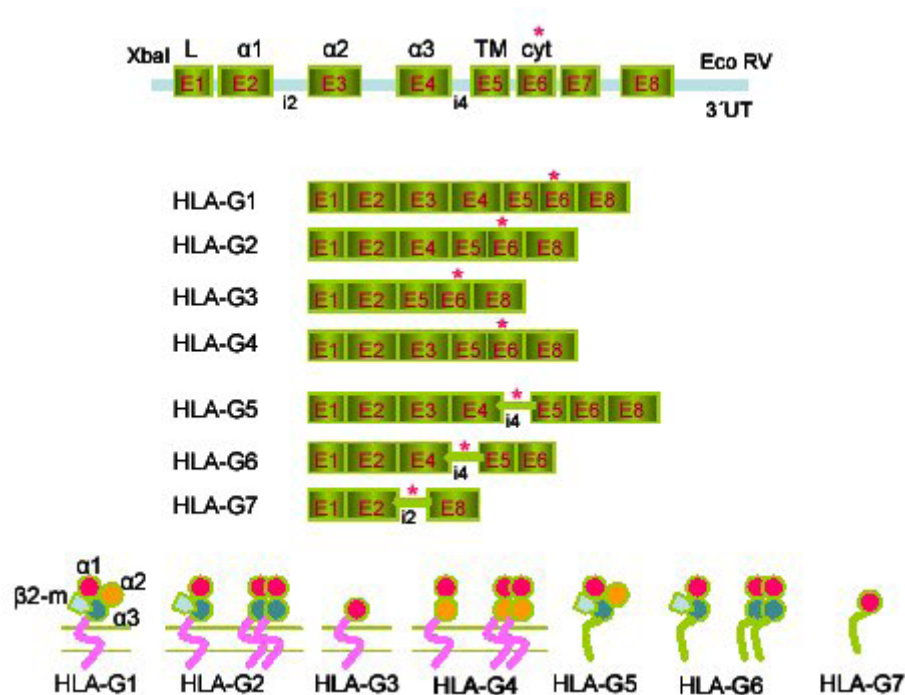


Figura 2-4. Diagrama esquemático de las isoformas transcritas del HLA-G unidas a membrana (G1-G4) e isoformas solubles (G5-G7). E1: secuencia líder, E2, E3 y E4: dominios externos,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , y  $\alpha 3$ ; E5: dominio transmembrana; E6: dominio citoplásmico; E8: 3' región no transcrita; i2: intrón 2; i4: intrón 4; \*: codón stop. Figura tomada de [167]

La molécula soluble HLA-G5 contiene el péptido líder, los dominios alfa 1 alfa 2 y alfa 3; la isoforma truncada HLA-G6 no tiene el dominio alfa 2, mientras que la isoforma -G7 sólo contiene el dominio alfa 1; las tres isoformas excluyen el dominio transmembranal. En la Figura 2-4 podemos ver que todas las isoformas del HLA-G, tanto unidas a membrana como solubles, tiene en común el dominio alfa; este dominio contiene los amino ácidos necesarios para la interacción con KIR que son receptores inhibidores de las NK, siendo este el motivo por el cual se le ha atribuido el ser responsable en la protección de la lisis de células de la línea leucémica humana (K562), sensibles a la lisis por natural killer. Esta línea genera sólo isoformas -G1 y -G2, por lo que ambas isoformas inhiben la actividad

lítica de las NK. Pero resalta el hecho que las dos isoformas contengan en común el dominio alfa [168].

### **2.3.5 Expresión del HLA-G**

Los diferentes transcritos se encuentran en varios tipos de líneas celulares, pero son más abundantes en el tejido placentario y en células JEG-3, línea de coriocarcinoma humano del trofoblasto. Conocemos que la expresión de HLA-G es muy restringida en los tejidos pero se ha detectado en fibras musculares, tejido hepático y en células del epitelio renal [169-171]. También se ha encontrado su expresión en leucocitos, especialmente en macrófagos, células dendríticas, células epiteliales del timo, en la cámara anterior del ojo, así como en varios tipos de tumores y células de estroma durante condiciones de inflamación y malignidad [172]. La presencia de moléculas solubles en plasma y líquido amniótico [173], en biopsia de tumores [174] y en suero de pacientes transplantados [175], podrían implicar que el HLA-G actúa como mediador de la tolerancia inmune durante el embarazo, la progresión de tumores y trasplantes [176-178]. Aunque también se ha detectado en otros sitios como en células de médula adulta tímica [179].

También el HLA-G tiene una expresión constitutiva en córnea [180], islotes pancreáticos [181], precursores de células endoteliales y eritroides [182], y recientemente en células mesenquimales [179].

Lila y colaboradores reportaron que el HLA-G se detectó en pacientes que sufrieron trasplante de corazón y el porcentaje de rechazo agudo fue más bajo en pacientes que expresaban HLA-G, indicando que la expresión de HLA-G puede contribuir a la aceptación del trasplante por inhibición de la lisis mediada por las NK y linfocitos T citotóxicos, y a su vez por la supresión de la respuesta alogénica proliferativa [153, 175].

La expresión del HLA-G también se extiende a otros tejidos en diferentes condiciones, como durante las infecciones virales y procesos inflamatorios. Onno y colaboradores demostraron que los antígenos del HLA-G son producidos durante la reactivación vírica en macrófagos generados después de la estimulación alogénica de HCMV (citomegalovirus humano) latente de monocitos de sangre periférica infectados. Estos datos sugieren que la inducción de las moléculas del HLA-G podría ser un mecanismo adicional que ayuda al

HCMV a subvertir las defensas del huésped. Por otro lado también se observó en células fibroblásticas que este citomegavirus logró inducir la expresión de HLA-E, siendo que este es otro ligando para los receptores de las NK. En este caso el HLA-E expresado por las células fibroblásticas se unió al receptor inhibitor CD94/NKG2D expresado por las NK bloqueando la actividad lítica de estas células [183]. *In vivo*, la secreción de las moléculas del HLA-G podría favorecer la diseminación del virus y exacerbar la severidad de las enfermedades HCMV [153, 184].

En los procesos inflamatorios la expresión del HLA-G se reportó en enfermedades cutáneas y psoriasis. Además, el HLA-G se expresa en fibras musculares, en varias miopatías inflamatorias. También el IFN- $\gamma$  induce expresión en la superficie y sobrerregula los transcritos mRNA correspondientes a las diferentes isoformas del HLA-G [156].

### **2.3.6 Función del HLA-G**

Funcionalmente el HLA-G tiene un efecto inhibitor directo en la función citolítica de las NK de sangre periférica y NK uterinas [168,185], en los linfocitos T citotóxicos, en la respuesta aloproliferativa de las células T CD4<sup>+</sup>, en la inhibición de la proliferación de las células T y células NK de sangre periféricas y en la maduración y función de las células dendríticas (Tabla 2-3).

El HLA-G inhibe la citolisis de las NK por dos vías: directa o indirecta. Por vía directa, el HLA-G puede interactuar con los siguientes receptores inhibitor naturales: ILT2/LIR1 (CD85j, LIR-1), presente en células B, algunas NK, algunas T, y en todas las células dendríticas y monocíticas. ILT4/LIR2 (CD85d, LIR-2), es específico de células mieloides y selectivamente expresado por monocitos, macrófagos y células dendríticas. p49, presente en células NK deciduales. KIR2DL4 (CD 158d) expresado en NK CD56 bright y linfocitos T.

Estos receptores ILT2, ILT4 y p49 pueden interactuar con otras moléculas de clase I del HLA y son receptores inhibitor [153, 156]. Mientras que KIR2DL4 puede actuar enviando señales de activación o inhibición y solamente se une al HLA-G [26, 187].



**Tabla 2-3 Funciones del HLA-G. Adaptado de [186]**

<i>Células efectoras, la función del HLA-G</i>	<i>Receptores implicados</i>
<b>Células NK</b>	
La inhibición de la función citotóxica	ILT2, KIR2DL4
La inhibición indirecta	CD94/NKG2A
La inhibición de la proliferación	ILT2
Apoptosis	CD8
Aumento de la proliferación y producción de INF.	KIR2DL4 Internalizado
Aumento de la secreción de factores pro-angiogénicos	KIR2DL4
La inhibición de la migración transendotelial	ILT2
<b>Los linfocitos T CD8+</b>	-
La inhibición de la función citotóxica	-
La inhibición de la proliferación	ILT2
Generación de células reguladoras TCD8low	-
Apoptosis	CD8
<b>Linfocitos T CD4+</b>	-
Inhibición de la alo reactividad	ILT2, ILT4
La inhibición de la proliferación	-
Generación de células T reguladoras CD4low	-
<b>Células APC</b>	-
Inhibición de la maduración de las APC	ILT4
Secreción de citocinas Th2 por las PBMC	CD160

El segundo mecanismo, vía indirecta, consiste en la interacción del receptor CD94/NKG2, miembro de la superfamilia de las lectinas tipo C expresado en la superficie de las NK, con su ligando HLA-E que contiene un péptido líder derivado del HLA-G, inhibiendo así la actividad de las NK. El HLA-E está involucrado en la regulación positiva y negativa de la citotoxicidad de las NK [156, 188]. Rouas-Freiss y colaboradores encontraron que la transfección de las isoformas truncadas HLA-G2, -G3, y -G4 pueden inhibir la actividad lítica de las NK, esto podría ser muy importante durante los procesos patológicos y fisiológicos en los cuales la expresión del HLA-G1 se encuentre alterada [168].

### **2.3.7 Interacciones del HLA-G con las células T**

Le Gal y colaboradores fueron los primeros en demostrar que el HLA-G inhibe la actividad citotóxica de los linfocitos T [189]. Esta molécula inhibe la proliferación de las células T durante la reacción primaria alogénica. Además, el HLA-G puede reconocer y unirse a la molécula CD8 del linfocito T, actuando como supresor citotóxico de las células T [172].

También se demostró que el HLA-G5 inhibe la proliferación de las células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> [190]. El HLA-G5 disminuye la expresión de las ciclinas D2, E, A y B, a su vez induce a la acumulación de p27kip en células T activadas [190]. Las ciclinas son proteínas que intervienen positivamente en el ciclo celular y p27kip es un regulador negativo de la fase G1 del ciclo celular.

El HLA-G 1 y el HLA-G 5 que expresan las CD, induce diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> hacia células T supresoras. Esta caracterización mostró que las células T supresoras tenían una expresión disminuida en los correceptores CD4 y CD8 (CD4<sup>low</sup> CD8<sup>low</sup>) que son cruciales para la activación de la célula. Estas células ejercen una función supresora a través de la secreción de IL-10 y como sabemos, la IL-10 tiene un papel relevante en embarazo [191].

El HLA-G 1 y HLA-G5 inducen la apoptosis *in vitro* de las células T CD8<sup>+</sup> activadas de una forma indirecta; esto lo hacen ya que el dominio alfa 3 de la molécula del HLA interacciona con la molécula CD8 del linfocito. [192]. A su vez trae como consecuencia la fosforilación de p56lck, una proteína tirosina quinasa (PTK) asociada al dominio citoplasmático CD8, lo que desencadena la translocación nuclear de NF-κB que estimula la transcripción del RNA mensajero de CD95L, incrementando sus niveles y por último induciendo apoptosis mediada por interacción CD95/CD95L [192].

También se ha visto que el HLA-G5 y -G6 estimulan a las células U937 (línea mielomonocítica) a producir citocinas inmunosupresoras como el TGF-β1 [193]. Esta citocina está implicada en la tolerancia de los linfocitos de sangre periférica, al igual que promueve la diferenciación y desarrollo de las células de la placenta [194, 195], indicando por tanto que podría actuar a través de múltiples vías para generar un privilegio inmune y apoyar el desarrollo de la placenta.

### **2.3.8 HLA-G y la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO)**

La IDO es una enzima que cataliza la degradación oxidativa del triptófano al romper la unión del doble enlace en la posición 2,3 en el anillo indólico, y da lugar a la L-formilquinurenina, que es rápidamente metabolizada a quinurenina. Esta última posteriormente se metaboliza a ácido 3-hidroxi-antranílico y finalmente a ácido quinólico. El HLA-G y la

IDO presentan propiedades comunes con respecto a la expresión, función y regulación. De hecho, en humanos la expresión de IDO y HLA-G se ha demostrado en la placenta, en órganos transplantados, y pueden ser expresados ectópicamente por tumores [196]. La expresión de ambas moléculas contribuye al mantenimiento de la tolerancia materno-fetal, a la aceptación del trasplante así como al escape tumoral [197, 198].

### **2.3.9 HLA-G en la reproducción**

En el trofoblasto podemos distinguir distintos tejidos: a) El sincitiotrofoblasto, se desarrolla a partir de la agregación de células citotrofoblásticas que se fusionan para formar un sincitio; es la capa más externa de las vellosidades coriónicas y está en contacto con la sangre materna del espacio intervelloso. b) El trofoblasto, que constituye las propias vellosidades o trofoblasto intravelloso. c) El trofoblasto extraveloso, es el que emigra a la decidua y el que nos interesa fundamentalmente desde el punto de vista inmunológico, ya que va a estar en contacto con diferentes leucocitos maternos de la decidua, principalmente con NK, células T y macrófagos [199, 200]. Derivado del trofoblasto extraveloso, procede el trofoblasto endovascular, que reemplaza las células endoteliales de las arterias espirales maternas y controla la irrigación sanguínea de la interfase. De ahí cabe esperar que la respuesta inmunitaria periférica sea adaptada a la presencia de las células semialogénicas del trofoblasto extraveloso. La interrelación, aún no totalmente entendida, entre los leucocitos deciduales de la madre y el trofoblasto extraveloso, es fundamental para el desarrollo normal del embarazo, ya que en enfermedades como la pre-eclampsia existe una deficiente invasión trofoblástica relacionada con una inadecuada respuesta inmunitaria [201].

Existen varios mecanismos que se supone que el trofoblasto utiliza para el escape del ataque del sistema inmunitario materno. Uno de estos elementos es la expresión de moléculas no clásicas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase Ib, como es el HLA-G. Esta expresión es única en el trofoblasto pues durante el embarazo el trofoblasto extraveloso, incluyendo las columnas del citotrofoblasto, trofoblasto intersticial, endovascular y celular, es decir el trofoblasto que se encuentra en contacto con las células inmunitarias de la decidua materna, no expresan HLA-A y B, pero si una débil expresión de HLA-C y antígenos HLA no clásicos, casi monomórficos de clase Ib, HLA-

G, E y F [202, 203]. El sincitiotrofoblasto y citotrofoblasto intravellositario son siempre negativos [204, 205].

YW Loke, junto con Shirley Ellis, Suzan Kovats, y los respectivos colaboradores, fueron los primeros en identificar el HLA-G en el trofoblasto [142]. El HLA-G en el embarazo se expresa desde los primeros días que ocurre la fecundación, sobre todo cuando el óvulo se implanta en la cavidad uterina [149, 175].

Estudios de patologías gestacionales han presentado alteraciones de expresión del HLA-G en el trofoblasto, con un déficit de la proteína en pacientes con pre-eclampsia [206], además se ha demostrado la ausencia o reducción de la expresión del HLA-G mediante hibridización in situ [207].

Se ha demostrado que la IL-10 aumenta los niveles de HLA-G en células del trofoblasto y monocitos de sangre periférica [208].

Al estar el HLA-G en relación con la actividad de las células NK y al ser estas células probablemente responsables del control de la invasión trofoblástica, un déficit en la expresión de HLA-G en pre-eclampsia determinaría una mayor actividad citolítica de las células NK y una menor invasión del trofoblasto, resultando una inadecuada remodelación de los vasos sanguíneos uterinos y perfusión de la placenta [201].

Otras de las complicaciones asociadas con el HLA-G es el aborto, uno de los desórdenes más comunes del embarazo. Es de resaltar que hay pocos estudios de HLA-G y aborto, los estudios disponibles incluyen análisis genéticos incompletos con muestras pequeñas, cada uno con menos de 40 parejas de abortos recurrentes, [209, 210] que dificultan obtener conclusiones.

Pfeiffer y colaboradores en el año 2001 encontraron un aumento de la frecuencia de los alelos del HLAG\*01013 y HLA-G\*0105N en 78 parejas con aborto recurrente y en comparación con 52 controles [154].

Aldrich y colaboradores en el año 2001 reportaron una asociación para los alelos HLA-G\*0104 y HLAG\*0105N con aborto recurrente no explicado en parejas mediante etiologías genéticas específicas. La presencia del alelo\*0105N fue un dato inesperado

debido a que esta población es predominantemente caucásica y este alelo se encuentra ausente en descendientes europeos, además, es común en poblaciones africanas. Estos resultados indican que este alelo es un factor de riesgo para el aborto recurrente. Además, el alelo \*0104 también confiere un fenotipo de riesgo para esta complicación. La frecuencia de estos dos alelos fue más alta en 35 parejas con una historia clínica de 5 o más abortos en comparación con 78 parejas con 2 o 3 abortos [211].

## **2.4 Apoptosis**

La apoptosis es un proceso genéticamente controlado por el que la célula induce su propia muerte en respuesta a determinados estímulos. Constituye un mecanismo fundamental para el mantenimiento de la homeostasis del organismo.

La apoptosis se caracteriza por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos entre los que se encuentran: condensación de la cromatina nuclear, desintegración nucleolar, disminución del tamaño nuclear, degradación del ADN en fragmentos oligonucleosomales (180 pb) o múltiplos de éstos, compactación del citoplasma, alteraciones del citoesqueleto y dilatación del retículo endoplásmico dando lugar a la formación de vesículas que se unen a la membrana plasmática y adquieren un aspecto de “burbujas”. Finalmente la célula se fragmenta dando lugar a los denominados cuerpos apoptóticos, que son fagocitados sin evidencia de reacción inflamatoria [212, 213]. La regulación de la apoptosis es compleja y está mediada por diversas familias de proteínas que pueden promover o inhibir este proceso.

### **2.4.1 Caspasas**

Las caspasas (cysteine aspartyl-specific proteases) [214], son proteasas que están constitutivamente expresadas en las células como zimógenos (pro-caspasas) con ninguna o muy poca actividad [215]. Son un componente esencial de la maquinaria de inducción de apoptosis al ser las principales enzimas responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren durante este proceso de muerte celular.

Basándose en su función dentro de la cascada apoptótica, las caspasas se han clasificado en dos grupos: caspasas iniciadoras y caspasas efectoras o ejecutoras.

**Las caspasas iniciadoras:** son las que primero se activan tras un estímulo apoptótico. Poseen dominios de interacción proteína-proteína como pueden ser los dominios efectores de muerte (DED) o los dominios de activación y reclutamiento de caspasas (CARD). Dentro de este grupo se encuentran las caspasas -8, -9, -10, -2, -1, -4 y -5, aunque las tres últimas constituyen una subclase especial dentro de este grupo puesto que están implicadas en apoptosis pero su función principal es el control de ciertas respuestas inflamatorias.

**Las caspasas efectoras o ejecutoras:** cortan múltiples sustratos celulares necesarios para la supervivencia de la célula como proteínas del citoesqueleto (ej. actina, fodrina y plectina), proteínas reguladoras de la reparación del DNA (como PARP) etc. A diferencia de las iniciadoras, estas caspasas poseen un prodominio corto y no contienen dominios DED o CARD. Las caspasas ejecutoras son la -3, -6 y -7. Son normalmente procesadas y activadas por las caspasas iniciadoras.

## **2.4.2 Vías de inducción de apoptosis**

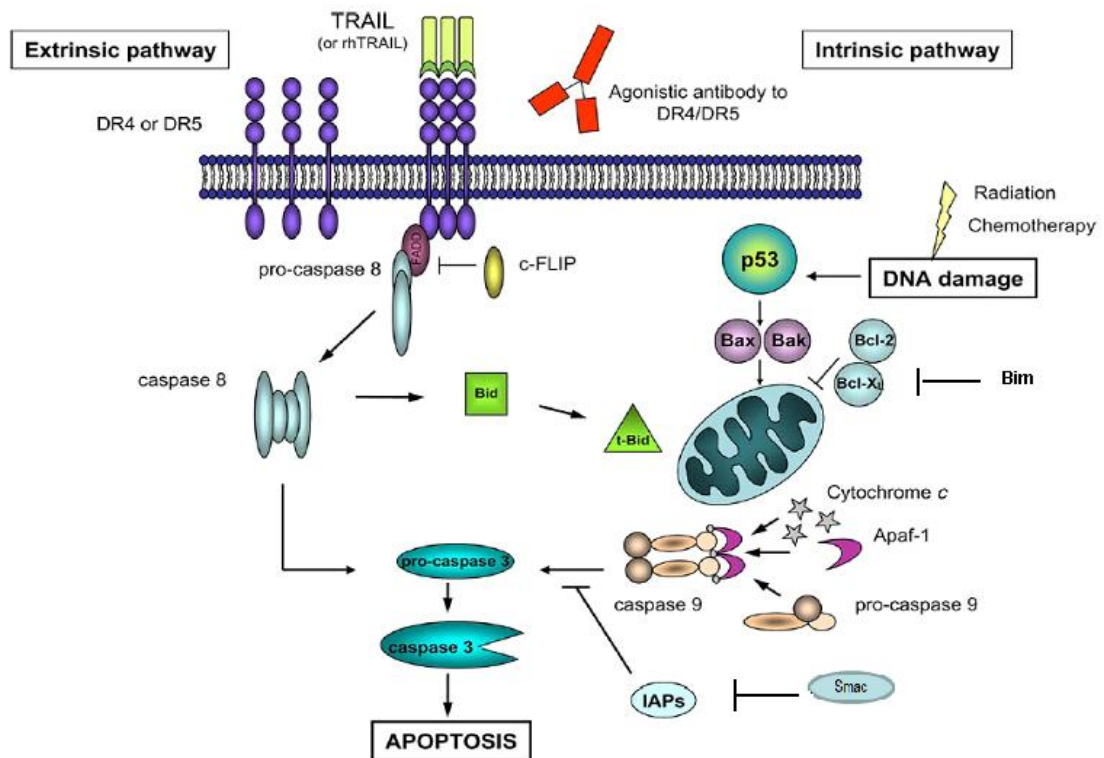
Existen dos vías principales de inducción de muerte celular por apoptosis:

- La vía de receptores de muerte o vía extrínseca.
- La vía mitocondrial o intrínseca.

### **2.4.2.1 Vía de receptores de muerte o vía extrínseca de inducción de apoptosis**

Los receptores de muerte son proteínas transmembrana tipo I, que pertenecen a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). Se caracterizan porque en la parte intracelular contienen un dominio de interacción con otras proteínas denominado dominio de muerte (DD). Dicho dominio consta de 80 aminoácidos y es fundamental para la transmisión del impulso apoptótico, sirviendo de anclaje para una serie de proteínas señalizadoras que también poseen este dominio DD. Además del dominio de muerte intracelular, los receptores de muerte en su parte extracelular poseen entre dos y cuatro

dominios ricos en cisteínas (CRDs), a los que se unen los ligandos específicos. Los ligandos de estos receptores, llamados ligandos de muerte, también pertenecen a la superfamilia del TNF y se caracterizan porque son proteínas de membrana tipo II (extremo N-terminal en el espacio intracelular). Se unen a sus receptores a través de la región de 150 aminoácidos en el extremo C-terminal denominada dominio de homología a TNF.



**Figura 2-5. Diferentes rutas de inducción de apoptosis: vía extrínseca e intrínseca.**

La unión de los ligandos a sus receptores provoca la trimerización de estos y permite el reclutamiento de proteínas citoplasmáticas específicas en el DD intracelular del receptor, formando el complejo de señalización de inducción de muerte (DISC). En el DISC se reclutan las proteínas adaptadoras FADD o TRADD a través de su DD. FADD, a su vez, posee otro dominio de interacción proteína-proteína en el extremo N-terminal denominado dominio efector de muerte (DED). Dicho dominio es necesario para el reclutamiento de las caspasas -8 ó -10 a través de su dominio DED. Las caspasas en el DISC son capaces de

activarse por autoproteólisis, y una vez activas pueden procesar directamente caspasas efectoras (caspasa-3 y -7) o cortar a Bid para activar la ruta mitocondrial [216].

#### **2.4.2.2 Ruta mitocondrial o intrínseca**

La mitocondria tiene un papel principal en la ruta intrínseca de la apoptosis. Numerosas moléculas señalizadoras de la apoptosis, así como estímulos patológicos, convergen en la mitocondria induciendo la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la liberación de proteínas que normalmente se encuentran en el espacio intermembrana de la mitocondria. Antes, durante o después de la permeabilización de la membrana mitocondrial ocurre, normalmente, la disipación del potencial de la membrana interna mitocondrial. El mecanismo a través del cual ocurre la permeabilización de la membrana mitocondrial externa durante la apoptosis, es todavía un tema discutido. Se proponen dos clases de mecanismos que podrían funcionar en circunstancias diferentes: aquellos en que la membrana mitocondrial interna participa y aquellos en que no lo hace.

**a)** El primer mecanismo es un modelo hipotético y consistiría en un poro que se abre en la membrana interna, permitiendo el paso de agua y moléculas de hasta aproximadamente 1.5kDa. Este poro, el poro de permeabilidad transitoria (PT), postula un papel para el transportador de nucleótidos de adenina en la membrana interna y del canal de aniones voltaje dependiente (VDAC) en la membrana externa [217].

**b)** El segundo mecanismo está mediado por proteínas pertenecientes a la familia de Bcl-2 que actúan directamente en la membrana mitocondrial externa. Los miembros pro-apoptóticos de esta familia generarían aperturas al formar canales proteicos por homo o heterodimerización. La permeabilización de la membrana mitocondrial externa precipita a la célula a la muerte a través de tres mecanismos: desbaratamiento de la cadena de transporte de electrones, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y liberación de proteínas del espacio intermembranal de la mitocondria. La liberación de estas proteínas induce apoptosis bien activando caspasas o bien neutralizando inhibidores citosólicos de este proceso.

Una de las proteínas que se libera de la mitocondria y que contribuye de forma importante al proceso de muerte por apoptosis es el citocromo c. Una vez liberado al citosol, el



citocromo c se une a la proteína Apaf-1 permitiendo la unión del nucleótido dATP o ATP. La interacción de estas proteínas da lugar a la formación de un complejo llamado apoptosoma, donde se recluta y se activa la procaspasa-9. La caspasa-9 activada es capaz de cortar y activar caspasas efectoras, como la caspasa-3.

### **2.4.3 Proteínas inhibidoras de apoptosis**

IAPs: son una familia de proteínas inhibidoras de las caspasas, capaces de regular la actividad tanto de las caspasas efectoras como de las iniciadoras. Entre ellas se encuentran XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP y survivina. La capacidad de unión e inhibición de caspasas reside en los llamados dominios BIR (Bucoloviral IAP Repeat). También contienen dominios RING, que actúan como ubiquitín-ligasa induciendo la autodegradación de la propia proteína [218] y posiblemente también la degradación de la caspasa unida a ella.

La proteína XIAP es capaz de unirse y secuestrar a la caspasa-3 activa, así como a la caspasa-9 en el apoptosoma, inhibiendo de esta manera su activación y bloqueando la cascada proteolítica [219]. Uno de los antagonistas de XIAP y de otros miembros de la familia de los IAPs (c-IAP1, c-IAP2, survivina y Op-IAP), es la proteína mitocondrial Smac/DIABLO, que se libera junto con el citocromo c, tras la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y que es capaz de unirse e inactivar a dichos IAPs [220].

c-FLIP: es una proteína inhibidora de la activación de caspasa -8 y -10. [221]. Existen dos isoformas, la larga c-FLIP<sub>L</sub> y la corta c-FLIP<sub>S</sub> [222]. Ambas isoformas contienen dos dominios DED, iguales a los de las caspasas-8 y -10, a través de los cuales pueden unirse a la proteína adaptadora FADD en el complejo DISC, compitiendo así con la unión de dichas caspasas. La isoforma larga contiene además un dominio pseudocaspasa inactivo que puede ser cortado por la caspasa -8, pero que, al no tener actividad proteasa, el corte no es recíproco y el resultado final es una inhibición de la activación de la caspasa -8 y por tanto de la apoptosis [223].

Otro grupo de proteínas inhibidoras de apoptosis son los miembros anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2. La proteína Bcl-2, oncoproteína descubierta en un linfoma folicular humano que le da nombre a esta familia, normalmente se localiza en el retículo

endoplasmático, núcleo y mayoritariamente en la membrana externa mitocondrial. La familia de proteínas Bcl-2 esta conformada por 15 miembros, algunos de los cuales inhiben (Bcl-2, Bcl-x1, Bcl-w, A1, Mcl-1) mientras que otros activan (Bad, Bik, Blk, Hrk, Bid, Bim) la ruta de la apoptosis. La proteína anti-apoptotica Bcl-2 está codificada por el proto-oncogen Bcl-2 que se ubica en el cromosoma 18q21. Contiene 4 dominios denominados BH, los cuales son necesarios para ejercer su función anti-apoptótica. Cuando Bcl-2 se encuentra en concentración suficiente en la membrana externa mitocondrial, se une con Bax y Bad, secuestrándolos e impidiendo su acción, mateniendo la integridad de la membrana y evitando así la apoptosis. Por otro lado, esta proteína antiapoptótica también forma complejos con la proteína Apaf-1, formando un heterotrímero Bcl-2-Apaf-1-caspasa -9 que bloquea la unión del citocromo c a Apaf-1 en respuesta al estímulo apoptotico. El estudio de esta proteína ha tenido gran relevancia en la interfase materno-fetal, ya que varios investigadores han encontrado un aumento de expresión de Bcl-2 en la decidua de ratas y ratones en los primeros estadíos de gestación, pero que esta expresión no es mantenida a medida que progresa el embarazo [224, 225]. De hecho, la expresión de Bcl-2 disminuye en la decidua cuando estas células son tratadas con hormonas [226].

También está descrito que Bcl-2 puede alterar el estado redox en células de cáncer ya que incita a las células a producir pequeñas cantidades de ROS, los cuales se ha demostrado que en bajos niveles pueden promover la superviviencia de la célula [227].

#### **2.4.4 Proteínas activadoras de la apoptosis**

Los miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2 se dividen en dos clases: **a)** los tipo Bax, que contienen los dominios BH1- BH3 y son Bax, Bak y Bok [228] **b)** Los “BH3 only” que solo comparten entre ellos mismos y con los otros miembros de la familia el dominio BH3; en este grupo se encuentran Bad, Bik, Blk, Hrk, Bid, Bim y Noxa, entre otros.

Los miembros pro-apoptóticos tipo Bax se encuentran unidos, o se unen tras el estímulo apoptótico, a la membrana mitocondrial externa, sufren un cambio conformacional que los activa, se produce su homo- o heterodimerización y se insertan de manera estable en la membrana [229]. Una vez insertadas, estas proteínas formarán canales o interaccionarán

con proteínas formadoras de canales, para aumentar la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa [229]. Las proteínas anti-apoptóticas de esta familia, como ya se ha comentado, pueden unirse a Bax y a Bak impidiendo su acción formadora de canales en la mitocondria.

Normalmente Bid se encuentra inactivo en el citosol de la célula. Cuando es cortado y activado por la caspasa 8 se forma Bid truncado (Bidt) que se trasloca a la membrana mitocondrial permitiendo la activación de las proteínas proapoptóticas presentes en esta como Bax y Bak. Estas a su vez forman canales que alteran la permeabilidad de la membrana permitiendo la liberación del citocromo c e iniciando la activación de la ruta de apoptosis. La activación de Bax y Bak es posible siempre y cuando existan otras proteínas pro-apoptóticas, como Bid que induce dicha activación, o como Bad que forma complejos con Bcl-2 u otras anti-apoptóticas bloqueando su unión a los miembros pro-apoptóticos de esta familia [230].

#### **2.4.5 CD95 y su ligando en el endometrio**

CD95 (Apo-1, Fas) es una proteína transmembrana de tipo I, miembro prototipo de los receptores de muerte pertenecientes a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF). Su ligando CD95L (FasL) pertenece a la familia génica del factor de necrosis tumoral y es una glicoproteína de superficie celular homotrimérica de tipo II. Estas proteínas forman parte de una vía apoptótica ampliamente utilizada por el sistema inmunológico durante la linfopoyesis e inmunopoyesis. Implicada en la renovación celular, eliminación de células tumorales, respuesta antiviral y protección de determinados tejidos contra linfocitos potencialmente agresivos [231], esta vía también se activa durante la delección clonal de células autoinmunes dentro de los órganos linfoides centrales y periféricos, así como en la vía citolítica de las NK, células Th1 y células T citotóxicas.

En la mujer, el útero es el órgano de la reproducción y está caracterizado por el recambio cíclico de las células endometriales, las cuales sufren apoptosis en respuesta a cambios hormonales. El endometrio es la capa interna del útero, que se caracteriza por contener glándulas y estroma. Durante la fase reproductiva, las hormonas ováricas inducen un crecimiento ordenado de las células estromales del endometrio (ESC) mientras que en la

fase postovulatoria los niveles de progesterona aumentan y a su vez inducen cambios en estas células con el fin de prepararlas para la implantación del blastocisto. En ausencia de embarazo, los niveles de las hormonas disminuyen y las células del endometrio mueren conllevando a la menstruación. Inicialmente la menstruación se asoció con un proceso de necrosis, pero estudios por microscopía electrónica han revelado la presencia de cuerpos apoptóticos en el epitelio endometrial humano durante la fase secretora [232]. Usando microscopía electrónica y mediante técnicas inmunohistoquímicas, Yamashita y colaboradores descubrieron la expresión de Fas y bajos niveles FasL en el endometrio humano normal [233]. Además estos autores demostraron que las proteínas Fas y FasL se encuentran en el aparato de Golgi y en vesículas de las células endometriales durante la fase proliferativa, fase en la que predominan los estrógenos, y en la que también se han encontrado niveles elevados de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 [234]. En la fase secretora, fase en que predomina la progesterona, Fas y FasL se expresan en la membrana de las células endometriales estromales y de las células glandulares endometriales [233]. La retirada de la progesterona en cultivos de células endometriales induce un aumento en la expresión de Fas y FasL, observándose al mismo tiempo la apoptosis en estas células [235]. Por tanto la progesterona y los estrógenos representan factores de supervivencia celular por impedir la expresión de proteínas pro-apoptóticas.

#### **2.4.6 Papel de la apoptosis en el mantenimiento del privilegio inmunológico en la interfase materno-fetal**

Durante la gestación, el útero y la placenta son zonas inmunológicamente privilegiadas, en las cuales la actividad inmunológica disminuye [236].

En las primeras etapas del embarazo, el trofoblasto extravellocitario cambia de proliferativo a invasivo, y migra al endometrio decidualizado, en donde se encuentran las DSC. Este endometrio decidualizado es la parte materna que está en íntimo contacto con las células del trofoblasto, donde además se encuentran leucocitos maternos que pueden reconocer los antígenos MHC heredados del padre [236]. Sin embargo, a pesar de que existan leucocitos maternos que puedan reconocer antígenos paternos, el trofoblasto logra invadir el endometrio decidualizado por lo que utiliza mecanismos para evadir la respuesta inmunológica de la madre evitando así ser destruido. Unos de estos mecanismos parece ser

la expresión de FasL por parte de las células del trofoblasto que puede inducir apoptosis en los linfocitos T activados maternos que expresan Fas [237]. Vacchio y colaboradores en el año 2005 encontraron que se requiere la expresión de FasL en el feto para la delección de células T maternas durante el embarazo murino [238]. Sin embargo, se ha visto que fetos de ratones *gld* (que no expresan FasL funcional), se desarrollaron con normalidad, [239] por lo que el papel de FasL expresado por las células del trofoblasto sigue siendo aún controvertido.

Es de destacar que, aunque las células trofoblásticas son en parte positivas para Fas, aparentemente estas no sufren las consecuencias típicas de la apoptosis. [240] Esta expresión podría tener un papel crucial en la limitación de la invasión exacerbada del trofoblasto [240-242]. El sistema Fas/FasL también es expresado por las células de la decidua. Estudios recientes en la interfase materno-fetal revelaron una relación inversa entre la expresión de FasL en las células deciduales y la de Fas en los leucocitos maternos, sugiriendo que FasL expresado por las células deciduales controla la infiltración de los leucocitos deciduales que expresan Fas y también podría controlar la invasión del trofoblasto [243].

FasL también existe en forma soluble, siendo secretado a partir de microvesículas de las células del trofoblasto [244]. Aunque las funciones fisiológicas de este FasL soluble no se conocen completamente, se le atribuye un papel en la regulación de la función del sistema inmunitario. La expresión del FasL soluble es una cuestión en conflicto, ya que se ha encontrado una concentración elevada en mujeres con preeclampsia y en aquellas que presentan restricción de desarrollo fetal, aunque también se han descrito concentraciones elevadas en embarazos normales [240, 241, 245].

Pero no toda la muerte de los linfocitos en la interfase materno-fetal puede ocurrir por la interacción de Fas/FasL. También existe otro inductor de muerte que se ha visto que tiene una participación importante en la tolerancia de la interfase materno-fetal. Este es el ligando de muerte TRAIL que, al igual que FasL, es un miembro de la familia TNF y por medio de la unión a sus receptores pro-apoptóticos, TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5, puede inducir apoptosis. Existen otros dos receptores para TRAIL, DcR1/TRAIL-R3 y DcR2/TRAIL-R4, que actúan como reclamo o señuelo ya que no tienen dominio de muerte

y por tanto no pueden transmitir la señal de apoptosis al interior de la célula. Esta molécula, junto con sus cuatro receptores, se ha identificado en la placenta humana [246, 247]. Además la proteína TRAIL aparece de forma abundante en la capa del sincitiotrofoblasto, capa que se encuentra en contacto directo con la sangre materna lo que indica que la expresión de TRAIL puede ser un mecanismo por el que estas células se defienden del ataque de los linfocitos maternos [248].

Por otro lado también se ha visto que Bax y Bcl-2 están involucrados en la regulación de la apoptosis de la célula decidual en ratas pseudopreñadas [249]. Dai et al pudieron demostrar que la regresión de las células deciduales en la región mesometrial hacia la mitad del embarazo está relativamente correlacionada con los niveles de expresión de Bax y de Bcl-2; también el descenso de la expresión de Bcl-2 que va acompañado de un aumento de expresión de Bax en la decidua caracteriza el fallo de las gestaciones durante el primer trimestre [249]. Este balance es regulado por la progesterona ya que cuando se usó un antagonista de esta hormona se vió que existía más cantidad de Bax en comparación con los niveles de Bcl-2 y que había más células deciduales apoptóticas. Además, como se ha mencionado anteriormente en el apartado de Bcl-2, las DSC de ratonas pseudopreñadas, a partir del octavo día del embarazo y debido al aumento de la progesterona, muestran un incremento en el receptor del TNF $\alpha$  y una disminución de la proteína Bcl-2, conllevando por tanto a la inevitable apoptosis celular.

## **2.5 Referencias bibliográficas de la introducción**

- [1] Graham, C.H. and Lala, P.K. (1992). Mechanisms of placental invasion of the uterus and their control. *Biochem Cell Biol* 70, 867-74.
- [2] Gellersen, B., Brosens, I.A. and Brosens, J.J. (2007). Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med* 25, 445-53.
- [3] Das, S.K. (2009). Cell cycle regulatory control for uterine stromal cell decidualization in implantation. *Reproduction* 137, 889-99.
- [4] Pollard, J.W. (2008). Uterine DCs are essential for pregnancy. *J Clin Invest* 118, 3832-5.
- [5] Critchley, H.O., Kelly, R.W., Brenner, R.M. and Baird, D.T. (2001). The endocrinology of menstruation--a role for the immune system. *Clin Endocrinol (Oxf)* 55, 701-10.
- [6] Sentman, C.L., Wira, C.R. and Eriksson, M. (2007). NK cell function in the human female reproductive tract. *Am J Reprod Immunol* 57, 108-15.
- [7] Manaster, I. and Mandelboim, O. (2008). The unique properties of human NK cells in the uterine mucosa. *Placenta* 29 Suppl A, S60-6.
- [8] Anne Croy, B., van den Heuvel, M.J., Borzychowski, A.M. and Tayade, C. (2006). Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunol Rev* 214, 161-85.
- [9] Moffett-King, A. (2002). Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2, 656-63.
- [10] Abadia-Molina, A.C., Ruiz, C., Montes, M.J., King, A., Loke, Y.W. and Olivares, E.G. (1996). Immune phenotype and cytotoxic activity of lymphocytes from human term decidua against trophoblast. *J Reprod Immunol* 31, 109-23.

- [11] Sentman, C.L., Meadows, S.K., Wira, C.R. and Eriksson, M. (2004). Recruitment of uterine NK cells: induction of CXC chemokine ligands 10 and 11 in human endometrium by estradiol and progesterone. *J Immunol* 173, 6760-6.
- [12] Keskin, D.B., Allan, D.S., Rybalov, B., Andzelm, M.M., Stern, J.N., Kopcow, H.D., Koopman, L.A. and Strominger, J.L. (2007). TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3378-83.
- [13] Hanna, J. et al. (2006). Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 12, 1065-74.
- [14] Wu X, L.D., Yuan MM, Zhu Y, Wang MY. (2004). The expression of chemokine receptors in CD56(bright) CD16- natural killer cells and the mechanism of their recruitment in decidua. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 84, 1018-23.
- [15] Becknell, B. and Caligiuri, M.A. (2005). Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv Immunol* 86, 209-39.
- [16] Lynch, L., Golden-Mason, L., Eogan, M., O'Herlihy, C. and O'Farrelly, C. (2007). Cells with haematopoietic stem cell phenotype in adult human endometrium: relevance to infertility? *Hum Reprod* 22, 919-26.
- [17] Ashkar, A.A. and Croy, B.A. (2001). Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy. *Semin Immunol* 13, 235-41.
- [18] Goodridge, J.P., Lathbury, L.J., John, E., Charles, A.K., Christiansen, F.T. and Witt, C.S. (2009). The genotype of the NK cell receptor, KIR2DL4, influences INF{gamma} secretion by decidual natural killer cells. *Mol Hum Reprod*
- [19] Hiby, S.E., Walker, J.J., O'Shaughnessy K, M., Redman, C.W., Carrington, M., Trowsdale, J. and Moffett, A. (2004). Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 200, 957-65.



- [20] Eriksson, M., Meadows, S.K., Wira, C.R. and Sentman, C.L. (2004). Unique phenotype of human uterine NK cells and their regulation by endogenous TGF-beta. *J Leukoc Biol* 76, 667-75.
- [21] Kalkunte, S.S., Mselle, T.F., Norris, W.E., Wira, C.R., Sentman, C.L. and Sharma, S. (2009). Vascular Endothelial Growth Factor C Facilitates Immune Tolerance and Endovascular Activity of Human Uterine NK Cells at the Maternal-Fetal Interface. *Journal of Immunology* 182, 4085-4092.
- [22] Burrows, T.D., King, A. and Loke, Y.W. (1995). The role of integrins in adhesion of decidual NK cells to extracellular matrix and decidual stromal cells. *Cell Immunol* 166, 53-61.
- [23] Verma, S., King, A. and Loke, Y.W. (1997). Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine natural killer cells. *Eur J Immunol* 27, 979-83.
- [24] Hiby, S.E., King, A., Sharkey, A.M. and Loke, Y.W. (1997). Human uterine NK cells have a similar repertoire of killer inhibitory and activatory receptors to those found in blood, as demonstrated by RT-PCR and sequencing. *Mol Immunol* 34, 419-30.
- [25] Navarro, F., Llano, M., Bellon, T., Colonna, M., Geraghty, D.E. and Lopez-Botet, M. (1999). The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol* 29, 277-83.
- [26] Hofmeister, V. and Weiss, E.H. (2003). HLA-G modulates immune responses by diverse receptor interactions. *Semin Cancer Biol* 13, 317-23.
- [27] Rajagopalan, S., Fu, J. and Long, E.O. (2001). Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol* 167, 1877-81.
- [28] Tilburgs, T., van der Mast, B.J., Nagtzaam, N.M., Roelen, D.L., Scherjon, S.A. and Claas, F.H. (2009). Expression of NK cell receptors on decidual T cells in human pregnancy. *J Reprod Immunol* 80, 22-32.

- [29] Heikkinen, J., Mottonen, M., Alanen, A. and Lassila, O. (2004). Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol* 136, 373-8.
- [30] Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M. and Betz, A.G. (2004). Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 5, 266-71.
- [31] Saito, S., Shima, T., Nakashima, A., Shiozaki, A., Ito, M. and Sasaki, Y. (2007). What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy? *J Assist Reprod Genet* 24, 379-86.
- [32] Arruvito, L., Sanz, M., Banham, A.H. and Fainboim, L. (2007). Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J Immunol* 178, 2572-8.
- [33] Miwa, N., Hayakawa, S., Miyazaki, S., Myojo, S., Sasaki, Y., Sakai, M., Takikawa, O. and Saito, S. (2005). IDO expression on decidual and peripheral blood dendritic cells and monocytes/macrophages after treatment with CTLA-4 or interferon-gamma increase in normal pregnancy but decrease in spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod* 11, 865-70.
- [34] Khong, T.Y. (1987). Immunohistologic study of the leukocytic infiltrate in maternal uterine tissues in normal and preeclamptic pregnancies at term. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 15, 1-8.
- [35] Bulmer, J.N., Morrison, L. and Smith, J.C. (1988). Expression of class II MHC gene products by macrophages in human uteroplacental tissue. *Immunology* 63, 707-14.
- [36] Mor, G. and Koga, K. (2008). Macrophages and pregnancy. *Reprod Sci* 15, 435-6.
- [37] Vince, G.S., Starkey, P.M., Jackson, M.C., Sargent, I.L. and Redman, C.W. (1990). Flow cytometric characterisation of cell populations in human pregnancy decidua and isolation of decidual macrophages. *J Immunol Methods* 132, 181-9.
- [38] Laskarin, G., Kammerer, U., Rukavina, D., Thomson, A.W., Fernandez, N. and Blois, S.M. (2007). Antigen-presenting cells and materno-fetal tolerance: an emerging role for dendritic cells. *Am J Reprod Immunol* 58, 255-67.

- [39] Heikkinen, J., Mottonen, M., Komi, J., Alanen, A. and Lassila, O. (2003). Phenotypic characterization of human decidual macrophages. *Clin Exp Immunol* 131, 498-505.
- [40] Lidstrom, C., Matthiesen, L., Berg, G., Sharma, S., Ernerudh, J. and Ekerfelt, C. (2003). Cytokine secretion patterns of NK cells and macrophages in early human pregnancy decidua and blood: implications for suppressor macrophages in decidua. *Am J Reprod Immunol* 50, 444-52.
- [41] Gustafsson, C., Hummerdal, P., Matthiesen, L., Berg, G., Ekerfelt, C. and Ernerudh, J. (2006). Cytokine secretion in decidual mononuclear cells from term human pregnancy with or without labour: ELISPOT detection of IFN-gamma, IL-4, IL-10, TGF-beta and TNF-alpha. *J Reprod Immunol* 71, 41-56.
- [42] Redline, R.W., McKay, D.B., Vazquez, M.A., Papaioannou, V.E. and Lu, C.Y. (1990). Macrophage functions are regulated by the substratum of murine decidual stromal cells. *J Clin Invest* 85, 1951-8.
- [43] Kammerer, U., Schoppet, M., McLellan, A.D., Kapp, M., Huppertz, H.I., Kampgen, E. and Dietl, J. (2000). Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells. *Am J Pathol* 157, 159-69.
- [44] Kammerer, U., Eggert, A.O., Kapp, M., McLellan, A.D., Geijtenbeek, T.B., Dietl, J., van Kooyk, Y. and Kampgen, E. (2003). Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *Am J Pathol* 162, 887-96.
- [45] Blois, S.M., Alba Soto, C.D., Tometten, M., Klapp, B.F., Margni, R.A. and Arck, P.C. (2004). Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. *Biol Reprod* 70, 1018-23.
- [46] Xiao, B.G., Liu, X. and Link, H. (2004). Antigen-specific T cell functions are suppressed over the estrogen-dendritic cell-indoleamine 2,3-dioxygenase axis. *Steroids* 69, 653-9.

- [47] Ristich, V., Liang, S., Zhang, W., Wu, J. and Horuzsko, A. (2005). Tolerization of dendritic cells by HLA-G. *Eur J Immunol* 35, 1133-42.
- [48] Ferlazzo, G. et al. (2004). Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16606-11.
- [49] Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E. and Valiante, N.M. (2002). Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 195, 335-41.
- [50] Ferlazzo, G., Tsang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M. and Munz, C. (2002). Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195, 343-51.
- [51] Chaouat, G., Menu, E., Clark, D.A., Dy, M., Minkowski, M. and Wegmann, T.G. (1990). Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *J Reprod Fertil* 89, 447-58.
- [52] Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L. and Mosmann, T.R. (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 14, 353-6.
- [53] Yui, J., Garcia-Lloret, M., Wegmann, T.G. and Guilbert, L.J. (1994). Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* 15, 819-35.
- [54] Hill, J.A., Polgar, K. and Anderson, D.J. (1995). T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *Jama* 273, 1933-6.
- [55] Murphy, S.P., Tayade, C., Ashkar, A.A., Hatta, K., Zhang, J. and Croy, B.A. (2009). Interferon gamma in successful pregnancies. *Biol Reprod* 80, 848-59.
- [56] Kimatrai, M., Oliver, C., Abadia-Molina, A.C., Garcia-Pacheco, J.M. and Olivares, E.G. (2003). Contractile activity of human decidual stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 844-9.

- [57] Berkowitz, R.S., Hill, J.A., Kurtz, C.B. and Anderson, D.J. (1988). Effects of products of activated leukocytes (lymphokines and monokines) on the growth of malignant trophoblast cells in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 158, 199-203.
- [58] Haimovici, F., Hill, J.A. and Anderson, D.J. (1991). The effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages on blastocyst implantation events in vitro. *Biol Reprod* 44, 69-75.
- [59] Baines, M.G., Duclos, A.J., Anteck, E. and Haddad, E.K. (1997). Decidual infiltration and activation of macrophages leads to early embryo loss. *Am J Reprod Immunol* 37, 471-7.
- [60] Haddad, E.K., Duclos, A.J., Lapp, W.S. and Baines, M.G. (1997). Early embryo loss is associated with the prior expression of macrophage activation markers in the decidua. *J Immunol* 158, 4886-92.
- [61] Chaouat, G., Assal Meliani, A., Martal, J., Raghupathy, R., Elliott, J.F., Mosmann, T. and Wegmann, T.G. (1995). IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN- $\tau$ . *J Immunol* 154, 4261-8.
- [62] Saito, S. et al. (1996). Interleukin 4 (IL-4) blocks the IL-2-induced increase in natural killer activity and DNA synthesis of decidual CD16-CD56<sup>bright</sup> NK cells by inhibiting expression of the IL-2 receptor  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ . *Cell Immunol* 170, 71-7.
- [63] Goodwin, V.J., Sato, T.A., Mitchell, M.D. and Keelan, J.A. (1998). Anti-inflammatory effects of interleukin-4, interleukin-10, and transforming growth factor- $\beta$  on human placental cells in vitro. *Am J Reprod Immunol* 40, 319-25.
- [64] Das, C., Kumar, V.S., Gupta, S. and Kumar, S. (2002). Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells. *J Reprod Immunol* 53, 257-68.
- [65] Piccinni, M.P. and Romagnani, S. (1996). Regulation of fetal allograft survival by a hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines. *Immunol Res* 15, 141-50.

- [66] Saito, S., Tsukaguchi, N., Hasegawa, T., Michimata, T., Tsuda, H. and Narita, N. (1999). Distribution of Th1, Th2, and Th0 and the Th1/Th2 cell ratios in human peripheral and endometrial T cells. *Am J Reprod Immunol* 42, 240-5.
- [67] Ho, H.N., Chao, K.H., Chen, H.F., Chen, S.U., Wu, M.Y. and Yang, Y.S. (2001). Distribution of Th1 and Th2 cell populations in human peripheral and decidual T cells from normal and anembryonic pregnancies. *Fertil Steril* 76, 797-803.
- [68] Wilczynski, J.R. (2005). Th1/Th2 cytokines balance--yin and yang of reproductive immunology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 122, 136-43.
- [69] Saito, S. (2000). Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol* 47, 87-103.
- [70] Marzi, M., Vigano, A., Trabattoni, D., Villa, M.L., Salvaggio, A., Clerici, E. and Clerici, M. (1996). Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 106, 127-33.
- [71] Senturk, L.M. and Arici, A. (1998). Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Am J Reprod Immunol* 39, 144-51.
- [72] McEwan, M., Lins, R.J., Munro, S.K., Vincent, Z.L., Ponnampalam, A.P. and Mitchell, M.D. (2009). Cytokine regulation during the formation of the fetal-maternal interface: focus on cell-cell adhesion and remodelling of the extra-cellular matrix. *Cytokine Growth Factor Rev* 20, 241-9.
- [73] Arici, A., MacDonald, P.C. and Casey, M.L. (1996). Modulation of the levels of interleukin-8 messenger ribonucleic acid and interleukin-8 protein synthesis in human endometrial stromal cells by transforming growth factor-beta 1. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 3004-9.
- [74] Jauniaux, E., Gulbis, B., Schandene, L., Collette, J. and Hustin, J. (1996). Distribution of interleukin-6 in maternal and embryonic tissues during the first trimester. *Mol Hum Reprod* 2, 239-43.

- [75] Ramsdell, F., Seaman, M.S., Miller, R.E., Picha, K.S., Kennedy, M.K. and Lynch, D.H. (1994). Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death. *Int Immunol* 6, 1545-53.
- [76] Walch, K.T. and Huber, J.C. (2008). Progesterone for recurrent miscarriage: truth and deceptions. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 22, 375-89.
- [77] Wood, K.J. and Sawitzki, B. (2006). Interferon gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo. *Trends Immunol* 27, 183-7.
- [78] Ashkar, A.A., Di Santo, J.P. and Croy, B.A. (2000). Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med* 192, 259-70.
- [79] Reis, F.M., Vigano, P., Arnaboldi, E., Spritzer, P.M., Petraglia, F. and Di Blasio, A.M. (2002). Expression of prolactin-releasing peptide and its receptor in the human decidua. *Mol Hum Reprod* 8, 356-62.
- [80] Korgun, E.T., Cayli, S., Asar, M. and Demir, R. (2007). Distribution of laminin, vimentin and desmin in the rat uterus during initial stages of implantation. *J Mol Histol* 38, 253-60.
- [81] Brosens, J.J. and Gellersen, B. (2006). Death or survival--progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma. *J Mol Endocrinol* 36, 389-98.
- [82] Olivares, E.G., Montes, M.J., Oliver, C., Galindo, J.A. and Ruiz, C. (1997). Cultured human decidual stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. *Biol Reprod* 57, 609-15.
- [83] Ruiz, C., Montes, M.J., Abadia-Molina, A.C. and Olivares, E.G. (1997). Phagocytosis by fresh and cultured human decidual stromal cells: opposite effects of interleukin-1 alpha and progesterone. *J Reprod Immunol* 33, 15-26.
- [84] Montes, M.J., Aleman, P., Garcia-Tortosa, C., Borja, C., Ruiz, C. and Garcia-Olivares, E. (1996). Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with hematopoietic cells. *J Reprod Immunol* 30, 53-66.

- [85] Garcia-Pacheco, J.M., Oliver, C., Kimatrai, M., Blanco, F.J. and Olivares, E.G. (2001). Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related to bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod* 7, 1151-7.
- [86] Dudley, D.J., Chen, C.L., Branch, D.W., Hammond, E. and Mitchell, M.D. (1993). A murine model of preterm labor: inflammatory mediators regulate the production of prostaglandin E2 and interleukin-6 by murine decidua. *Biol Reprod* 48, 33-9.
- [87] Montes, M.J., Tortosa, C.G., Borja, C., Abadia, A.C., Gonzalez-Gomez, F., Ruiz, C. and Olivares, E.G. (1995). Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am J Reprod Immunol* 34, 188-94.
- [88] Nasu, K., Narahara, H., Matsui, N., Kawano, Y., Tanaka, Y. and Miyakawa, I. (1999). Platelet-activating factor stimulates cytokine production by human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 5, 548-53.
- [89] Iwabe, T., Harada, T., Tsudo, T., Nagano, Y., Yoshida, S., Tanikawa, M. and Terakawa, N. (2000). Tumor necrosis factor-alpha promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 824-9.
- [90] Arima, K., Nasu, K., Narahara, H., Fujisawa, K., Matsui, N. and Miyakawa, I. (2000). Effects of lipopolysaccharide and cytokines on production of RANTES by cultured human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 6, 246-51.
- [91] Kariya, M., Kanzaki, H., Takakura, K., Imai, K., Okamoto, N., Emi, N., Kariya, Y. and Mori, T. (1991). Interleukin-1 inhibits in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 73, 1170-4.
- [92] Jikihara, H. and Handwerger, S. (1994). Tumor necrosis factor-alpha inhibits the synthesis and release of human decidual prolactin. *Endocrinology* 134, 353-7.
- [93] Kanda, Y., Jikihara, H., Markoff, E. and Handwerger, S. (1999). Interleukin-2 inhibits the synthesis and release of prolactin from human decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 677-81.



- [94] Riddick, D.H. and Kusmik, W.F. (1977). Decidua: a possible source of amniotic fluid prolactin. *Am J Obstet Gynecol* 127, 187-90.
- [95] Tabanelli, S., Tang, B. and Gurside, E. (1992). In vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42, 337-44.
- [96] Fernandez-Shaw, S., Shorter, S.C., Naish, C.E., Barlow, D.H. and Starkey, P.M. (1992). Isolation and purification of human endometrial stromal and glandular cells using immunomagnetic microspheres. *Hum Reprod* 7, 156-61.
- [97] Oliver, C., Montes, M.J., Galindo, J.A., Ruiz, C. and Olivares, E.G. (1999). Human decidual stromal cells express alpha-smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum Reprod* 14, 1599-605.
- [98] Glasser, S.R. and Julian, J. (1986). Intermediate filament protein as a marker of uterine stromal cell decidualization. *Biol Reprod* 35, 463-74.
- [99] Dimitrov, R., Kyurkchiev, D., Timeva, T., Yunakova, M., Stamenova, M., Shterev, A. and Kyurkchiev, S. (2008). First-trimester human decidua contains a population of mesenchymal stem cells. *Fertil Steril*
- [100] Lysiak, J.J. and Lala, P.K. (1992). In situ localization and characterization of bone marrow-derived cells in the decidua of normal murine pregnancy. *Biol Reprod* 47, 603-13.
- [101] Imai, K. et al. (1992). Human endometrial stromal cells and decidual cells express cluster of differentiation (CD) 13 antigen/aminopeptidase N and CD10 antigen/neutral endopeptidase. *Biol Reprod* 46, 328-34.
- [102] Park, C.S., Yoon, S.O., Armitage, R.J. and Choi, Y.S. (2004). Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form. *J Immunol* 173, 6676-83.
- [103] Schriever, F. and Nadler, L.M. (1992). The central role of follicular dendritic cells in lymphoid tissues. *Adv Immunol* 51, 243-84.

- [104] Naiem, M., Gerdes, J., Abdulaziz, Z., Stein, H. and Mason, D.Y. (1983). Production of a monoclonal antibody reactive with human dendritic reticulum cells and its use in the immunohistological analysis of lymphoid tissue. *J Clin Pathol* 36, 167-75.
- [105] Engert, S., Rieger, L., Kapp, M., Becker, J.C., Dietl, J. and Kammerer, U. (2007). Profiling chemokines, cytokines and growth factors in human early pregnancy decidua by protein array. *Am J Reprod Immunol* 58, 129-37.
- [106] Semer, D., Reisler, K., MacDonald, P.C. and Casey, M.L. (1991). Responsiveness of human endometrial stromal cells to cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 622, 99-110.
- [107] Dimitriadis, E., Robb, L. and Salamonsen, L.A. (2002). Interleukin 11 advances progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 8, 636-43.
- [108] Menkhorst, E., Salamonsen, L.A., Robb, L. and Dimitriadis, E. (2009). IL11 Antagonist Inhibits Uterine Stromal Differentiation, Causing Pregnancy Failure in Mice. *Biol Reprod*
- [109] Dudley, D.J., Edwin, S.S., Dangerfield, A., Jackson, K. and Trautman, M.S. (1997). Regulation of decidual cell and chorion cell production of interleukin-10 by purified bacterial products. *Am J Reprod Immunol* 38, 246-51.
- [110] Trautman, M.S., Collmer, D., Edwin, S.S., White, W., Mitchell, M.D. and Dudley, D.J. (1997). Expression of interleukin-10 in human gestational tissues. *J Soc Gynecol Investig* 4, 247-53.
- [111] Chaouat, G. et al. (1996). The emerging role of IL-10 in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 35, 325-9.
- [112] Mine, S., Nasu, K., Fukuda, J., Sun, B. and Miyakawa, I. (2003). Secretion of granulocyte chemotactic protein-2 by cultured human endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 79, 146-50.

- [113] Oksenberg, J.R., Mor-Yosef, S., Persitz, E., Schenker, Y., Mozes, E. and Brautbar, C. (1986). Antigen-presenting cells in human decidual tissue. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 11, 82-8.
- [114] Wira, C.R. and Rossoll, R.M. (2003). Oestradiol regulation of antigen presentation by uterine stromal cells: role of transforming growth factor-beta production by epithelial cells in mediating antigen-presenting cell function. *Immunology* 109, 398-406.
- [115] Tabibzadeh, S.S., Santhanam, U., Sehgal, P.B. and May, L.T. (1989). Cytokine-induced production of IFN-beta 2/IL-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells. Modulation by estradiol-17 beta. *J Immunol* 142, 3134-9.
- [116] Oliveira, S.F., Nagata, T., Abrahamsohn, P.A. and Zorn, T.M. (1991). Electron microscopic radioautographic study on the incorporation of 3H-proline by mouse decidual cells. *Cell Mol Biol* 37, 315-23.
- [117] Richards, R.G. and Hartman, S.M. (1996). Human dermal fibroblast cells express prolactin in vitro. *J Invest Dermatol* 106, 1250-5.
- [118] Linge, C., Green, M.R. and Brooks, R.F. (1989). A method for removal of fibroblasts from human tissue culture systems. *Exp Cell Res* 185, 519-28.
- [119] Darby, I., Skalli, O. and Gabbiani, G. (1990). Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 63, 21-9.
- [120] Schürch, W.S.T.A.G.G. . Myofibroblast. *Histology for Pathologists*.
- [121] Kelly, R.W., King, A.E. and Critchley, H.O. (2001). Cytokine control in human endometrium. *Reproduction* 121, 3-19.
- [122] Pechhold, K., Patterson, N.B., Craighead, N., Lee, K.P., June, C.H. and Harlan, D.M. (1997). Inflammatory cytokines IFN-gamma plus TNF-alpha induce regulated expression of CD80 (B7-1) but not CD86 (B7-2) on murine fibroblasts. *J Immunol* 158, 4921-9.

- [123] Sempowski, G.D., Chess, P.R. and Phipps, R.P. (1997). CD40 is a functional activation antigen and B7-independent T cell costimulatory molecule on normal human lung fibroblasts. *J Immunol* 158, 4670-7.
- [124] Pedagogos, E., Hewitson, T.D., Walker, R.G., Nicholis, K.M. and Becker, G.J. (1997). Myofibroblast involvement in chronic transplant rejection. *Transplantation* 64, 1192-7.
- [125] Roberts, A.I., Nadler, S.C. and Ebert, E.C. (1997). Mesenchymal cells stimulate human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 113, 144-50.
- [126] Kimatrai, M., Blanco, O., Munoz-Fernandez, R., Tirado, I., Martin, F., Abadia-Molina, A.C. and Olivares, E.G. (2005). Contractile activity of human decidual stromal cells. II. Effect of interleukin-10. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 6126-30.
- [127] Finn, C.A. (1998). Menstruation: a nonadaptive consequence of uterine evolution. *Q Rev Biol* 73, 163-73.
- [128] Dimitriadis, E., White, C.A., Jones, R.L. and Salamonsen, L.A. (2005). Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* 11, 613-30.
- [129] Fazleabas, A.T., Kim, J.J. and Strakova, Z. (2004). Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment--a review. *Placenta* 25 Suppl A, S26-31.
- [130] Kayisli, U.A., Korgun, E.T., Akkoyunlu, G., Arici, A. and Demir, R. (2005). Expression of integrin alpha5 and integrin beta4 and their extracellular ligands fibronectin and laminin in human decidua during early pregnancy and its sex steroid-mediated regulation. *Acta Histochem* 107, 173-85.
- [131] Maruyama, T. and Yoshimura, Y. (2008). Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. *Endocr J* 55, 795-810.
- [132] Gellersen, B. and Brosens, J. (2003). Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol* 178, 357-72.

- [133] Tang, B. and Gurside, E. (1993). Direct effect of gonadotropins on decidualization of human endometrial stroma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 47, 115-21.
- [134] Huang, J.R., Tseng, L., Bischof, P. and Janne, O.A. (1987). Regulation of prolactin production by progestin, estrogen, and relaxin in human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 121, 2011-7.
- [135] Makrigiannakis, A., Zoumakis, E., Kalantaridou, S., Chrousos, G. and Gravanis, A. (2004). Participation of maternal and fetal CRH in early phases of human implantation: the role of antalarmin. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 4, 75-8.
- [136] Jones, R.L., Salamonsen, L.A. and Findlay, J.K. (2002). Activin A promotes human endometrial stromal cell decidualization in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 4001-4.
- [137] Dimitriadis, E., Stoikos, C., Baca, M., Fairlie, W.D., McCoubrie, J.E. and Salamonsen, L.A. (2005). Relaxin and prostaglandin E(2) regulate interleukin 11 during human endometrial stromal cell decidualization. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 3458-65.
- [138] Sherwood, O.D. (2004). Relaxin's physiological roles and other diverse actions. *Endocr Rev* 25, 205-34.
- [139] Tawadros, N., Salamonsen, L.A., Dimitriadis, E. and Chen, C. (2007). Facilitation of decidualization by locally produced ghrelin in the human endometrium. *Mol Hum Reprod* 13, 483-9.
- [140] Tang, M., Mazella, J., Zhu, H.H. and Tseng, L. (2005). Ligand activated relaxin receptor increases the transcription of IGFBP-1 and prolactin in human decidual and endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 11, 237-43.
- [141] Carosella, E.D., Moreau, P., Lemaoult, J. and Rouas-Freiss, N. (2008). HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol* 29, 125-32.
- [142] Geraghty, D.E., Koller, B.H. and Orr, H.T. (1987). A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9145-9.

- [143] Heinrichs, H. and Orr, H.T. (1990). HLA non-A,B,C class I genes: their structure and expression. *Immunol Res* 9, 265-74.
- [144] Le Bouteiller, P. and Mallet, V. (1997). HLA-G and pregnancy. *Rev Reprod* 2, 7-13.
- [145] Ober, C. (1998). HLA and pregnancy: the paradox of the fetal allograft. *Am J Hum Genet* 62, 1-5.
- [146] Carosella, E.D., Dausset, J. and Kirszenbaum, M. (1996). HLA-G revisited. *Immunol Today* 17, 407-9.
- [147] Hviid, T.V. (2006). HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update* 12, 209-32.
- [148] Ishitani, A. and Geraghty, D.E. (1992). Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3947-51.
- [149] Fujii, T., Ishitani, A. and Geraghty, D.E. (1994). A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol* 153, 5516-24.
- [150] Kirszenbaum, M., Moreau, P., Teyssier, M., Lafon, C., Gluckman, E., Dausset, J. and Carosella, E. (1995). Evidence for the presence of the alternatively spliced HLA-G mRNA forms in human mononuclear cells from peripheral blood and umbilical cord blood. *Hum Immunol* 43, 237-41.
- [151] Hviid TV, M.C., Sørensen S and Morling N. (1998). Co-dominant expression of the HLA-G gene and various forms of alternatively spliced HLAG mRNA in human first trimester trophoblast. *Hum Immunol* 59,, 87–98.
- [152] Paul, P. et al. (2000). Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol* 61, 1138-49.

- [153] Le Bouteiller, P. and Blaschitz, A. (1999). The functionality of HLA-G is emerging. *Immunol Rev* 167, 233-44.
- [154] Pfeiffer, K.A., Fimmers, R., Engels, G., van der Ven, H. and van der Ven, K. (2001). The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod* 7, 373-8.
- [155] Matte, C., Lacaille, J., Zijenah, L., Ward, B. and Roger, M. (2000). HLA-G and HLA-E polymorphisms in an indigenous African population. The ZVITAMBO Study Group. *Hum Immunol* 61, 1150-6.
- [156] Le Bouteiller, P., Solier, C., Proll, J., Aguerre-Girr, M., Fournel, S. and Lenfant, F. (1999). Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? *Hum Reprod Update* 5, 223-33.
- [157] Menier, C., Riteau, B., Dausset, J., Carosella, E.D. and Rouas-Freiss, N. (2000). HLA-G truncated isoforms can substitute for HLA-G1 in fetal survival. *Hum Immunol* 61, 1118-25.
- [158] Castro MJ, M.P., Rojo-Amigo R, Martínez-Laso J, Allende L, Varela, García-Berciano M, Guillen-Perales J, Arnaiz-Villena A. (2000). Homozygous HLA-G\*0105N healthy individuals indicate that membrane-anchored HLA-G1 molecule is not necessary for survival *Tissue Antigens* 56, 232-239.
- [159] Ishitani, A., Kishida, M., Sageshima, N., Yashiki, S., Sonoda, S., Hayami, M., Smith, A.G. and Hatake, K. (1999). Re-examination of HLA-G polymorphism in African Americans. *Immunogenetics* 49, 808-11.
- [160] Hviid, T.V., Meldgaard, M., Sorensen, S. and Morling, N. (1997). Polymorphism of exon 3 of the HLA-G gene. *J Reprod Immunol* 35, 31-42.
- [161] Karhukorpi, J., Ikaheimo, I., Silvennoinen-Kassinen, S. and Tiilikainen, A. (1996). HLA-G polymorphism and allelic association with HLA-A in a Finnish population. *Eur J Immunogenet* 23, 153-5.

- [162] van der Ven K, S.S., Engels G and Krebs D. (1998). HLA-G polymorphisms and allele frequencies in Caucasians. *Hum Immunol* 59, 302–312.
- [163] van der Ven, K., Skrablin, S., Ober, C. and Krebs, D. (1998). HLA-G polymorphisms: ethnic differences and implications for potential molecule function. *Am J Reprod Immunol* 40, 145-57.
- [164] Abbas, A., Tripathi, P., Naik, S. and Agrawal, S. (2004). Analysis of human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphism in normal women and in women with recurrent spontaneous abortions. *Eur J Immunogenet* 31, 275-8.
- [165] Yamashita, T., Fujii, T., Watanabe, Y., Tokunaga, K., Tadokoro, K., Juji, T. and Taketani, Y. (1996). HLA-G gene polymorphism in a Japanese population. *Immunogenetics* 44, 186-91.
- [166] Matte, C., Lacaille, J., Zijenah, L., Ward, B. and Roger, M. (2002). HLA-G exhibits low level of polymorphism in indigenous East Africans. *Hum Immunol* 63, 495-501.
- [167] Ana Sofía López González, C.G.-G., Mónica Cavia Sáiz,, \*Ana López-Muñoz, M.G.-G., María Jesús Coma del Corral, and Rodríguez, P.M. (2007). Inmunotolerancia en tumores gastrointestinales HLA-G e Indolamina 2,3- Dioxigenasa. *Rev Electron Biomed / Electron J Biomed*;3, 59-65.
- [168] Rouas-Freiss, N., Marchal, R.E., Kirszenbaum, M., Dausset, J. and Carosella, E.D. (1997). The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5249-54.
- [169] Wiendl, H., Behrens, L., Maier, S., Johnson, M.A., Weiss, E.H. and Hohlfeld, R. (2000). Muscle fibers in inflammatory myopathies and cultured myoblasts express the nonclassical major histocompatibility antigen HLA-G. *Ann Neurol* 48, 679-84.
- [170] Lila, N. et al. (2002). Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *Circulation* 105, 1949-54.



- [171] Creput, C. et al. (2003). Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. *J Hepatol* 39, 587-94.
- [172] Hunt, J.S., Petroff, M.G., Morales, P., Sedlmayr, P., Geraghty, D.E. and Ober, C. (2000). HLA-G in reproduction: Studies on the maternal-fetal interface. *Human Immunology* 61, 1113-1117.
- [173] Rebmann, V., Pfeiffer, K., Passler, M., Ferrone, S., Maier, S., Weiss, E. and Grosse-Wilde, H. (1999). Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid. *Tissue Antigens* 53, 14-22.
- [174] Paul, P. et al. (1998). HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4510-5.
- [175] Lila, N., Carpentier, A., Amrein, C., Khalil-Daher, I., Dausset, J. and Carosella, E.D. (2000). Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. *Lancet* 355, 2138.
- [176] Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Ferrone, S. and Carosella, E.D. (2005). HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res* 65, 10139-44.
- [177] Rouas-Freiss, N., Naji, A., Durrbach, A. and Carosella, E.D. (2007). Tolerogenic functions of human leukocyte antigen G: from pregnancy to organ and cell transplantation. *Transplantation* 84, S21-5.
- [178] Aractingi, S., Kanitakis, J., Euvrard, S., Le Danff, C. and Carosella, E.D. (2003). Selective expression of HLA-G in malignant and premalignant skin specimens in kidney transplant recipients. *Int J Cancer* 106, 232-5.
- [179] Selmani, Z. et al. (2008). Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Stem Cells* 26, 212-22.

- [180] Le Discorde, M., Moreau, P., Sabatier, P., Legeais, J.M. and Carosella, E.D. (2003). Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Hum Immunol* 64, 1039-44.
- [181] Cirulli, V. et al. (2006). The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. *Diabetes* 55, 1214-22.
- [182] Menier, C., Rabreau, M., Challier, J.C., Le Discorde, M., Carosella, E.D. and Rouas-Freiss, N. (2004). Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. *Blood* 104, 3153-60.
- [183] Ulbrecht, M., Martinozzi, S., Grzeschik, M., Hengel, H., Ellwart, J.W., Pla, M. and Weiss, E.H. (2000). Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *J Immunol* 164, 5019-22.
- [184] Onno, M., Pangault, C., Le Fricq, G., Guilloux, V., Andre, P. and Fauchet, R. (2000). Modulation of HLA-G antigens expression by human cytomegalovirus: specific induction in activated macrophages harboring human cytomegalovirus infection. *J Immunol* 164, 6426-34.
- [185] Rouas-Freiss, N., Goncalves, R.M., Menier, C., Dausset, J. and Carosella, E.D. (1997). Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11520-5.
- [186] Carosella, E.D., Favier, B., Rouas-Freiss, N., Moreau, P. and Lemaoult, J. (2008). Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood* 111, 4862-70.
- [187] Long, S.R.a.E.O. (1999). A Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-G-specific Receptor Expressed on All Natural Killer Cells. *J. Exp. Med.*, Volume 189, Number 7, April 5, 1999 1093-1100.
- [188] Lanier, L.L. (1999). Natural killer cells fertile with receptors for HLA-G? *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5343-5.

- [189] Le Gal, F.A. et al. (1999). HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 11, 1351-6.
- [190] Bahri, R. et al. (2006). Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes. *J Immunol* 176, 1331-9.
- [191] Naji, A. et al. (2007). CD3<sup>+</sup>CD4<sup>low</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup> are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance. *Blood* 110, 3936-48.
- [192] Fournel, S., Aguerre-Girr, M., Huc, X., Lenfant, F., Alam, A., Toubert, A., Bensussan, A. and Le Bouteiller, P. (2000). Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8<sup>+</sup> cells by interacting with CD8. *J Immunol* 164, 6100-4.
- [193] McIntire, R.H., Morales, P.J., Petroff, M.G., Colonna, M. and Hunt, J.S. (2004). Recombinant HLA-G5 and -G6 drive U937 myelomonocytic cell production of TGF-beta1. *J Leukoc Biol* 76, 1220-8.
- [194] Meisser, A., Chardonnens, D., Campana, A. and Bischof, P. (1999). Effects of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha, macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod* 5, 252-60.
- [195] Ingman, W.V. and Robertson, S.A. (2002). Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction. *Bioessays* 24, 904-14.
- [196] Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Menier, C. and Carosella, E.D. (2003). HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system. *Semin Cancer Biol* 13, 325-36.
- [197] Carosella, E.D., Moreau, P., Le Maoult, J., Le Discorde, M., Dausset, J. and Rouas-Freiss, N. (2003) HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. In *Advances in Immunology*, Vol 81 ed. ^eds), pp. 199-+. Elsevier Academic Press Inc, San Diego.

- [198] Mellor, A.L. and Munn, D.H. (2003). Tryptophan catabolism and regulation of adaptive immunity. *Journal of Immunology* 170, 5809-5813.
- [199] Bainbridge, D.R. (2000). Evolution of mammalian pregnancy in the presence of the maternal immune system. *Rev Reprod* 5, 67-74.
- [200] Menier, C. et al. (2003). Characterization of monoclonal antibodies recognizing HLA-G or HLA-E: new tools to analyze the expression of nonclassical HLA class I molecules. *Hum Immunol* 64, 315-26.
- [201] O'Brien, M., Dausset, J., Carosella, E.D. and Moreau, P. (2000). Analysis of the role of HLA-G in preeclampsia. *Hum Immunol* 61, 1126-31.
- [202] Ellis, S.A., Sargent, I.L., Redman, C.W.G. and McMichael, A.J. (1986). Evidence for a Novel Hla-Antigen Found on Human Extravillous Trophoblast and a Choriocarcinoma Cell-Line. *Immunology* 59, 595-601.
- [203] Chumbley, G., King, A., Holmes, N. and Loke, Y.W. (1993). In situ hybridization and northern blot demonstration of HLA-G mRNA in human trophoblast populations by locus-specific oligonucleotide. *Hum Immunol* 37, 17-22.
- [204] Ober, C., Rosinsky, B., Grimsley, C., van der Ven, K., Robertson, A. and Runge, A. (1996). Population genetic studies of HLA-G: allele frequencies and linkage disequilibrium with HLA-A1. *J Reprod Immunol* 32, 111-23.
- [205] Hara, N., Fujii, T., Yamashita, T., Kozuma, S., Okai, T. and Taketani, Y. (1996). Altered expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblasts in preeclampsia: immunohistological demonstration with anti-HLA-G specific antibody "87G" and anti-cytokeratin antibody "CAM5.2". *Am J Reprod Immunol* 36, 349-58.
- [206] Colbern, G.T., Chiang, M.H. and Main, E.K. (1994). Expression of the nonclassic histocompatibility antigen HLA-G by preeclamptic placenta. *Am J Obstet Gynecol* 170, 1244-50.

- [207] Goldman-Wohl, D.S., Ariel, I., Greenfield, C., Hochner-Celnikier, D., Cross, J., Fisher, S. and Yagel, S. (2000). Lack of human leukocyte antigen-G expression in extravillous trophoblasts is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 6, 88-95.
- [208] Moreau, P., Adrian-Cabestre, F., Menier, C., Guiard, V., Gourand, L., Dausset, J., Carosella, E.D. and Paul, P. (1999). IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 11, 803-11.
- [209] Penzes, M., Rajczy, K., Gyodi, E., Reti, M., Feher, E. and Petranyi, G. (1999). HLA-G gene polymorphism in the normal population and in recurrent spontaneous abortion in Hungary. *Transplant Proc* 31, 1832-3.
- [210] Yamashita, T. et al. (1999). Analysis of human leukocyte antigen-G polymorphism including intron 4 in Japanese couples with habitual abortion. *American Journal of Reproductive Immunology* 41, 159-163.
- [211] Aldrich, C.L., Stephenson, M.D., Karrison, T., Odem, R.R., Branch, D.W., Scott, J.R., Schreiber, J.R. and Ober, C. (2001). HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 7, 1167-72.
- [212] Wyllie, A.H. (1994). Apoptosis. Death gets a brake. *Nature* 369, 272-3.
- [213] Wyllie, A.H., Kerr, J.F. and Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- [214] Cryns, V. and Yuan, J. (1998). Proteases to die for. *Genes Dev* 12, 1551-70.
- [215] Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-6.
- [216] Sprick, M.R., Weigand, M.A., Rieser, E., Rauch, C.T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P.H. and Walczak, H. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 12, 599-609.

- [217] Mattson, M.P. and Kroemer, G. (2003). Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med* 9, 196-205.
- [218] Yang, Y.L. and Li, X.M. (2000). The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Research* 10, 169-177.
- [219] Bratton, S.B., Walker, G., Srinivasula, S.M., Sun, X.M., Butterworth, M., Alnemri, E.S. and Cohen, G.M. (2001). Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *Embo J* 20, 998-1009.
- [220] Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
- [221] Bertin, J. et al. (1997). Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1172-6.
- [222] Scaffidi, C., Medema, J.P., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1997). FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J Biol Chem* 272, 26953-8.
- [223] Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P.H. and Kirchhoff, S. (2001). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 276, 20633-40.
- [224] Joswig, A., Gabriel, H.D., Kibschull, M. and Winterhager, E. (2003). Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 44.
- [225] Dai, D., Moulton, B.C. and Ogle, T.F. (2000). Regression of the decidualized mesometrium and decidual cell apoptosis are associated with a shift in expression of Bcl2 family members. *Biol Reprod* 63, 188-95.
- [226] Akcali, K.C., Khan, S.A. and Moulton, B.C. (1996). Effect of decidualization on the expression of bax and bcl-2 in the rat uterine endometrium. *Endocrinology* 137, 3123-31.

- [227] Chen, Z.X. and Pervaiz, S. (2009). BCL-2: pro-or anti-oxidant? *Front Biosci (Elite Ed)* 1, 263-8.
- [228] Nechushtan, A., Smith, C.L., Hsu, Y.T. and Youle, R.J. (1999). Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *Embo J* 18, 2330-41.
- [229] Schinzel, A., Kaufmann, T. and Borner, C. (2004). Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology [corrected]. *Biochim Biophys Acta* 1644, 95-105.
- [230] Chipuk, J.E., Fisher, J.C., Dillon, C.P., Kriwacki, R.W., Kuwana, T. and Green, D.R. (2008). Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20327-32.
- [231] Xerri, L., Devilard, E., Hassoun, J., Mawas, C. and Birg, F. (1997). Fas ligand is not only expressed in immune privileged human organs but is also coexpressed with Fas in various epithelial tissues. *Mol Pathol* 50, 87-91.
- [232] Kokawa, K., Shikone, T. and Nakano, R. (1996). Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 4144-7.
- [233] Yamashita, H., Otsuki, Y., Matsumoto, K., Ueki, K. and Ueki, M. (1999). Fas ligand, Fas antigen and Bcl-2 expression in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 5, 358-64.
- [234] Otsuki, Y. (2001). Apoptosis in human endometrium: apoptotic detection methods and signaling. *Med Electron Microsc* 34, 166-73.
- [235] Song, J., Rutherford, T., Naftolin, F., Brown, S. and Mor, G. (2002). Hormonal regulation of apoptosis and the Fas and Fas ligand system in human endometrial cells. *Mol Hum Reprod* 8, 447-55.
- [236] Streilein, J.W. (1995). Unraveling immune privilege. *Science* 270, 1158-9.

- [237] Mor, G., Gutierrez, L.S., Eliza, M., Kahyaoglu, F. and Arici, A. (1998). Fas-fas ligand system-induced apoptosis in human placenta and gestational trophoblastic disease. *Am J Reprod Immunol* 40, 89-94.
- [238] Vacchio, M.S. and Hodes, R.J. (2005). Fetal expression of Fas ligand is necessary and sufficient for induction of CD8 T cell tolerance to the fetal antigen H-Y during pregnancy. *J Immunol* 174, 4657-61.
- [239] Rogers, A.M., Boime, I., Connolly, J., Cook, J.R. and Russell, J.H. (1998). Maternal-fetal tolerance is maintained despite transgene-driven trophoblast expression of MHC class I, and defects in Fas and its ligand. *Eur J Immunol* 28, 3479-87.
- [240] Neale, D.M. and Mor, G. (2005). The role of Fas mediated apoptosis in preeclampsia. *J Perinat Med* 33, 471-7.
- [241] Thellin, O., Coumans, B., Zorzi, W., Igout, A. and Heinen, E. (2000). Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Curr Opin Immunol* 12, 731-7.
- [242] Payne, S.G., Smith, S.C., Davidge, S.T., Baker, P.N. and Guilbert, L.J. (1999). Death receptor Fas/Apo-1/CD95 expressed by human placental cytotrophoblasts does not mediate apoptosis. *Biol Reprod* 60, 1144-50.
- [243] Qiu, Q., Yang, M., Tsang, B.K. and Gruslin, A. (2005). Fas ligand expression by maternal decidual cells is negatively correlated with the abundance of leukocytes present at the maternal-fetal interface. *J Reprod Immunol* 65, 121-32.
- [244] Frangsmyr, L., Baranov, V., Nagaeva, O., Stendahl, U., Kjellberg, L. and Mincheva-Nilsson, L. (2005). Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. *Mol Hum Reprod* 11, 35-41.
- [245] Hu, W.S., Wang, Z.P., Dong, M.Y. and Wang, H.Z. (2005). [Expression of Fas and FasL in serum and placenta of preeclamptic pregnancy and its significance]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 34, 499-502.



[246] Phillips, T.A., Ni, J., Pan, G., Ruben, S.M., Wei, Y.F., Pace, J.L. and Hunt, J.S. (1999). TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege. *J Immunol* 162, 6053-9.

[247] Pan, G. et al. (1998). Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett* 431, 351-6.

[248] De Falco, M., Penta, R., Laforgia, V., Cobellis, L. and De Luca, A. (2005). Apoptosis and human placenta: expression of proteins belonging to different apoptotic pathways during pregnancy. *J Exp Clin Cancer Res* 24, 25-33.

[249] Lea, R.G., Riley, S.C., Antipatis, C., Hannah, L., Ashworth, C.J., Clark, D.A. and Critchley, H.O. (1999). Cytokines and the regulation of apoptosis in reproductive tissues: a review. *Am J Reprod Immunol* 42, 100-9.

### **3 Objetivos**

En la decidua, tejido materno, se han demostrado mecanismos inmunológicos que determinan la tolerancia de la madre hacia el feto semialogénico (éxito del embarazo) o la activación inmunológica frente al trofoblasto (aborto espontáneo). La decidua está dramáticamente poblada por una variedad de células inmunitarias, en donde las células deciduales estromales DSC (decidual stromal cells) constituyen el principal componente celular.

Está demostrado que estas células participan en la inmunoregulación materno-fetal, pero la relevancia de las DSC en la decidua para el éxito del embarazo aún permanece por esclarecer. Nuestro grupo ha demostrado que las DSC desarrollan diversas actividades inmunitarias {Ruiz, 1997 #253; Olivares, 1997 #178}, aunque proceden de un precursor estromal de médula ósea {Garcia-Pacheco, 2001 #194} y están relacionadas fenotípicamente con los miofibroblastos {Oliver, 1999 #192} {Kimatrai, 2005 #470}, células con actividad contráctil.

La expresión de HLA-G por el trofoblasto constituye un mecanismo de tolerancia materna. Este antígeno, al unirse a los receptores inhibidores de las NK deciduales podría inhibir su actividad citotóxica potencial. Otro mecanismo importante en la tolerancia materno-fetal es el sistema Fas-FasL. Se ha demostrado que el trofoblasto al expresar FasL induce apoptosis en los linfocitos deciduales. De forma equivalente, el ligando de muerte TRAIL parece también intervenir en estos mecanismos de apoptosis cuya consecuencia sería la inhibición del rechazo del injerto fetal por el sistema inmunológico materno.

El objetivo general del presente estudio es determinar la participación de las DSC humanas en la interrelación inmunológica entre la madre y el feto. De forma más concreta, analizar si alguno de los mecanismos del trofoblasto implicados en la tolerancia materno-fetal: expresión de HLA-G, del sistema FasL-Fas y del sistema TRAIL son detectados en las

DSC y si estas células están implicadas en la inducción de apoptosis en los linfocitos. Este objetivo general se desarrollará en los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la expresión de HLA-G en las DSC humanas
2. Estudiar la regulación de la expresión de HLA-G en DSC por citocinas y progesterona.
3. Analizar la expresión y la función de los ligandos y receptores de muerte en las DSC humanas.
4. Observar el efecto que en la inducción de apoptosis de linfocitos tienen las DSC.
5. Determinar las bases moleculares de los efectos de las DSC sobre la inducción de apoptosis en los linfocitos.

## **4 Las células deciduales estromales humanas expresan HLA-G. Efectos de citocinas y decidualización**

Osmany Blanco<sup>1</sup>, Irene Tirado<sup>1</sup>, Raquel Muñoz-Fernández<sup>1</sup>, Ana Clara Abadía-Molina<sup>1</sup>, Jose Marcos García-Pacheco<sup>2</sup>, Jose Peña<sup>3</sup>, y Enrique G Olivares<sup>1, 4, 5</sup>

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular 3 e Inmunología, Facultad de Medicina, Unidad de Inmunología, Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, Universidad de Granada, 18012-Granada, España; <sup>2</sup> Servicio de Inmunología, Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia, España; <sup>3</sup> Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, España; <sup>4</sup> Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario “San Cecilio”, Servicio Andaluz de Salud, Granada, España.

Human Reproduction Vol.23; No 1 pp. 144-152, 2008 doi: 10.1093

Advance Access publication on October 18, 2007

### **4.1 Resumen**

#### **4.1.1 Antecedentes**

Las células deciduales estromales son el principal componente celular de la decidua, tejido materno que se encuentra en íntimo contacto con el trofoblasto fetal. Aunque de origen mesenquimal, las DSC ejercen diferentes funciones que parecen ser relevantes en la relación entre la madre y el feto. HLA-G, un antígeno preferentemente expresado por el trofoblasto, parece participar en la tolerancia inmunitaria de la madre hacia el feto semialogénico.

### **4.1.2 Métodos y Resultados**

Demostramos mediante citometría de flujo, microscopía de fluorescencia, western blotting y RT-PCR que las DSC aisladas y mantenidas en cultivo expresan HLA-G débil pero consistentemente. También detectamos este antígeno en DSC frescas. La IL-10, citocinacitocina asociada con el embarazo normal, incrementó la expresión de HLA-G en las DSC ( $P < 0.00001$ ), mientras que la IL-2, citocina involucrada en el aborto espontáneo, no mostró ningún efecto. La decidualización inducida por progesterona combinada con cAMP, incrementó la expresión de HLA-G en las DSC ( $P < 0.001$ ). El IFN- $\gamma$ , una citocinacitocina implicada en la remodelación vascular de la decidua necesaria para la implantación, también incrementó la expresión de HLA-G en las DSC ( $P < 0.05$ ).

### **4.1.3 Conclusiones**

Este trabajo sugiere la existencia de una conexión entre las hormonas de la gestación y citocinas para regular la expresión de HLA-G en las DSC que puede ser relevante en el mantenimiento de la tolerancia materno-fetal.

## **4.2 Introducción**

El éxito del embarazo ha sido considerado como un ejemplo de aceptación de un trasplante semialogénico, en el que el feto semialogénico es protegido del sistema inmunológico materno. Se cree que las relaciones entre el feto y la madre durante el embarazo tienen lugar en la decidua, tejido materno que está en contacto íntimo con el trofoblasto.

Las células deciduales estromales (DSC) son el principal componente celular de la decidua. Estas células comprenden una clase distintiva cuyo origen y linaje eran hasta hace poco desconocidos. Las DSC ejercen distintas actividades inmunológicas que aparecen para ser de relevancia en la conexión entre la madre y el feto, y que puede conducir a un embarazo normal o al aborto (1-2).

Hemos sido capaces de aislar y mantener las DSC altamente purificadas, lo que nos permitió demostrar que las DSC de humanos están relacionadas con los precursores estromales de la médula ósea (3), y que su morfología, fenotipo y función son similares a

los miofibroblastos, células fibroblásticas con actividad contráctil que participan en la retracción de cicatrices (1-2, 4) y también a la célula folicular dendrítica (5).

Entre los múltiples mecanismos inmunológicos que controlan la tolerancia materno-fetal, el antígeno leucocitario humano -G (HLA-G) parece jugar un papel importante. Este antígeno, que fue descubierto en el trofoblasto, es preferentemente expresado con gran intensidad por este tejido (6). El bajo número de alelos del HLA-G reduce la posibilidad de una reacción alógena al trofoblasto por parte de los linfocitos T citotóxicos maternos (7). Además, es probable que el potencial citotóxico de las células natural killers (NK) contra el trofoblasto sea bloqueado por los receptores inhibidores que unen el HLA-G, expresados por las NK (8-9). Aquí, mostramos que las DSC expresan niveles bajos pero significativos de HLA-G, y que esta expresión puede ser modulada por decidualización y citocinacitocinas.

### **4.3 Materiales y métodos**

#### **4.3.1 Tejidos**

El número de muestras (23) procedieron de mujeres que decidieron interrumpir voluntariamente el embarazo del primer trimestre (6-11 semanas de gestación) y que tenían una edad entre 20 y 30 años. Fueron excluidas mujeres que estuvieran recibiendo alguna medicación o que presentaran alguna infección, enfermedad autoinmune local o sistémica.

Ninguno de los abortos fue inducido farmacológicamente. El espécimen fue obtenido vía vaginal, por legrado, en la Clínica el Sur de Málaga y en la Clínica Ginegranada, en Granada. Se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente.

Este estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario San Cecilio en Granada.

#### **4.3.2 Aislamiento y cultivo de las DSC**

Los tejidos deciduales recogidos y procesados fueron examinados histológicamente para excluir la presencia de alguna posible infección ó reacción inflamatoria que pudieran

influir en los resultados. Dichas muestras de decidua no se mezclaron en ningún momento para evitar cualquier tipo de reacción alógena o alteraciones del fenotipo celular por la secreción de citocinas por parte de los leucocitos que inicialmente contaminan la muestra de cultivo. Las muestras se lavaron intensamente con tampón fosfato (phosphate buffered saline, PBS) y la decidua fue cuidadosamente separada del trofoblasto. A continuación la decidua se desmenuzó cuidadosamente con bisturí en un pequeño volumen de medio RPMI 1640 (Sigma) con 100 IU/ml de penicilina y gentamicina (50 µg/ml), para seguidamente ponerla en una solución de colagenasa tipo IA, (Sigma) (durante 15 minutos) a 37°C. La reacción se detuvo añadiendo medio RPMI 1640 con un 20% de FCS (Gibco, Paisley, UK), se filtró la suspensión por una gasa estéril y se centrifugó a 450 g durante 10 min. El pellet se resuspendió en RPMI y se centrifugó sobre un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia) durante 20 min. a 600 g. Las células de la interfase se recogieron, se resuspendieron y se lavaron en PBS. La suspensión, que contenía fundamentalmente DSC y leucocitos, fue incubada en RPMI 10% FCS durante 1 h permitiendo que los macrófagos, granulocitos y células glandulares se adhirieran al frasco de cultivo. Finalmente se recogió el sobrenadante del frasco de cultivo (formado fundamentalmente por DSC y linfocitos), se volvió a lavar en PBS y se cultivaron las células en medio para fibroblastos, Opti-MEM (Invitrogen, Paisley, UK) suplementado con 100 IU/ml de penicilina, 50 µg/ml de gentamicina y un 2% de FCS. Después de la incubación durante toda la noche, de manera que las DSC se adhirieron al plástico, se cambió el medio y se eliminaron los linfocitos que permanecían en el sobrenadante, dejando las células adheridas que mayormente eran DSC. El medio Opti-MEM se cambió dos veces por semana y en 2-4 semanas las células llegaron a cubrir toda la superficie del frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>. El crecimiento de las DSC en proliferación es superior a otras células que contaminen la muestra, garantizando aún más la pureza del cultivo.

La pureza de las células deciduales fue confirmada mediante citometría de flujo, por la detección de la co-expresión de CD10 y CD29, además de la ausencia de CD45 (que identifica leucocitos) y de citoqueratina (que detecta células epiteliales y del trofoblasto). Los cultivos presentaron entre un 95 y un 100% de pureza de DSC (1-4, 10). Con este procedimiento obtuvimos 18 líneas DSC finitas a las que asignamos nombres individuales. Las células proliferaron en Opti-MEM durante 8 a 12 semanas manteniendo un fenotipo constante.

### **4.3.3 Aislamiento de células deciduales estromales frescas**

Para obtener la suspensión de células DSC se usó un protocolo similar al reportado por Montes et. al. (1996) (10). La muestra de decidua se lavó con PBS y se desmenuzó cuidadosamente con bisturí en un pequeño volumen de RPMI al 10% de FCS. La suspensión celular se filtró a través de gasas estériles, se lavó por centrifugación y se suspendió en medio de cultivo. A continuación se centrifugó sobre un gradiente discontinuo de Percoll al 20% y 30% (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) a 650 g durante 30 min. Las células deciduales se recogieron de la interfase entre el 20% y 30% y se lavaron en PBS. Cinco muestras de decidua fueron analizadas independientemente mediante citometría de flujo.

### **4.3.4 Reactivos**

La IL-10, el IFN- $\gamma$  y la progesterona, junto con el cAMP-8-bromo, fueron compradas a Sigma-Aldrich. La IL-2 humana recombinante fue obtenida a través del programa de referencia e investigación AIDS (National Institute of Health, Rockville, MD).

### **4.3.5 Tratamiento de células deciduales**

Las DSC aisladas y mantenidas en cultivo, como se ha indicado anteriormente, fueron incubadas por 48 horas con IL-10 (10ng/ml), IFN- $\gamma$  (10ng/ml), e IL-2 (50UI/ml); también fueron tratadas con 300 nM de progesterona en combinación con 500uM de cAMP, con el fin de inducir decidualización en estas células. La decidualización se comprobó por el cambio en la morfología de estas células y además se le determinó la secreción de prolactina (PRL).

### **4.3.6 Análisis de citometría de flujo**

Las células DSC cultivadas, fueron lavadas con abundante PBS, luego se despegaron del frasco de cultivo con EDTA al 0.04% a 37°C. Las células despegadas fueron recogidas, y se bloqueó la acción del EDTA con RPMI al 20% de FCS, luego pasaron a ser centrifugadas, el sobrenadante se desechó y el botón celular se resuspendió en PBS a una



concentración de  $10^6$  células/ml. Para el marcaje directo, 100  $\mu$ l de la suspensión celular fueron incubados con 10  $\mu$ l del mAb correspondiente en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después las células fueron lavadas con PBS y se resuspendieron en un volumen de 200  $\mu$ l, para ser inmediatamente analizadas en el citómetro de flujo (Ortho-Cytoron, Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ, USA). Para identificar las células muertas incubamos las DSC con yoduro de propidio (Sigma). El porcentaje de células positivas para cada anticuerpo fue calculado comparando con el control isotipo correspondiente. Para el marcaje doble, seguimos el mismo proceso salvo que se añadió un segundo anticuerpo marcado con una sustancia fluorescente distinta del primero.

Para el marcaje intracitoplasmático las DSC fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a 4°C y permeabilizadas con acetona fría por 10 minutos antes de adicionar el mAb.

Las células deciduales fueron teñidas con los siguientes anticuerpos: HLA-G (MEM-G/9)-FITC (Abcam, Cambridge, UK), CD10 PE-(DAKO, Glostrup, Denmark), CD14-PE, CD45-FITC (Sigma-Aldrich), CD23- FITC (The Binding Site, Birmingham, UK), y CD29-FITC (Caltag, San Francisco, CA). Las células DSC frescas fueron seleccionadas electrónicamente en base a la expresión del antígeno CD10.

#### **4.3.7 Microscopía de fluorescencia**

Se cultivaron células DSC en placas adecuadas con medio Opti-MEM. Después de 24 h, se lavaron las placas con PBS, y se añadió el HLA-G (MEM-G/9) marcado con FITC; como control isotipo fue usada una inmunoglobulina G1- FITC (Sigma-Aldrich). Pasados los 30 minutos de incubación con el anticuerpo, las cámaras fueron lavadas con abundante PBS, se le retiraron las celdillas y se le colocó un cubreobjetos. Las preparaciones fueron observadas con un microscopio de fluorescencia Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) en un cuarto oscuro.

#### **4.3.8 Preparación de ADN y PCR a tiempo real**

El ARN total se extrajo de las células usando el kit Ultraspec, de acuerdo al protocolo proporcionado por la casa comercial (Biotex Laboratories Inc., Houston, TX, USA). La

cadena simple de ADNc se obtuvo partiendo de ARN total, usando hexámeros aleatorios (Pharmacy Biotech, Uppsala, Sweden) y la transcriptasa inversa (moloney murine leukemia virus H, Promega, Madison, WI, USA). Para la desnaturalización se calentó (a 65 °C) la muestra por 5 minutos y acto seguido se enfrió a 4 °C, empleando un termociclador (Geneamp PCR System 9600, Perkin-Elmer, Cetus, Norwalk, CT, USA). La transcripción inversa se realizó a 37 °C durante 1 hora. La mezcla de amplificación (con un volumen final de 12,5ul) se realizó con: un molde inicial de 75 ng de ARN, 10 mM Tris-Cl (trishidroxymethylaminomethane) (pH 8.4), 50 mM KCL, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, gelatina al 0.01%, 0.2 mM- dNTPs, glicerol al 5%, 0.25 mM de cada cebador y 0.02 IU/ml de ADN Taq polimerasa (Promega Corp). Después de la incubación durante 5 minutos (a 96 °C), cada ciclo consistió en 94° C durante 30 s, 57°C por 30 s y 72°C por 30 s, en un total de 32 ciclos. La secuencia de oligonucleótidos para HLA-G fue diseñada de acuerdo a las secuencias disponibles de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>) y sintetizada por Genset (Francia, Paris): 5'-CCACTCCATGAGGTATTTTCAG-3' (sentido) 5'-GGTCCTCGTTCAGGGCGAG-3' (antisentido), que amplifican una banda de 389 pb.

Los productos de PCR fueron separados en base al tamaño en geles de agarosa al 2% y en cada gel corrido se incluyó un patrón de 100 pares de bases de ADN en escalera. La visualización fue llevada a cabo mediante tinción con bromuro de etidio. Un marcador de peso molecular fue incluido en cada gel.

#### **4.3.9 SDS/PAGE, Western Blot**

Las células fueron lisadas con bufer de lisis NP-40 1% y cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich), 100 ul por 10<sup>6</sup> células. También se utilizó un desnaturalizante a una concentración del 2X que contiene los siguientes compuestos: Tris pH 6.8 125mM, dodecyl sulfato de sodio (SDS), glicerol 10%, azul de bromo fenol 0.006% y beta-mercatoetanol 1.8%. Calentamos las muestras por 5 minutos a 95°C en termoblot, cargamos los pocillos con las muestras desnaturalizadas en geles de poliacrilamida preparados al 10% (SDS-PAGE) y fueron electro-transferidas a membranas Hybond-P PVDF (Amersham, Buckinghamshire, England). Las membranas se bloquearon con 5% de leche desgrasada en polvo durante una hora a temperatura ambiente, luego fueron incubadas con un anticuerpo primario monoclonal HLA-G (MEN-G/1) (Abcam) por una

hora a temperatura ambiente, después se realizan varios lavados con PBS-Tween y se incubaron con un anticuerpo secundario marcado con HRPO (Amersham). Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia (ECL, Amersham) y en contacto con una película de autorradiografía (Amersham). Para obtener los controles de carga las membranas, previamente lavadas, se rehibridaron con anti-ERK1/2 (Upstate Biotechnology, UK). Las bandas fueron cuantificadas por densitometría.

#### **4.3.10 Determinación de IL-10 y prolactina en sobrenadantes de cultivos**

En los sobrenadantes de cultivo se determinó PRL. La presencia de PRL fue analizada mediante ensayos de electro quimioluminiscencia (Roche, Indianápolis, IN). La determinación de la IL-10 también fue determinada en sobrenadante a través de ELISA (R&D, Minneapolis, MN). Los ensayos fueron realizados de acuerdo a las instrucciones de los Kits y todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

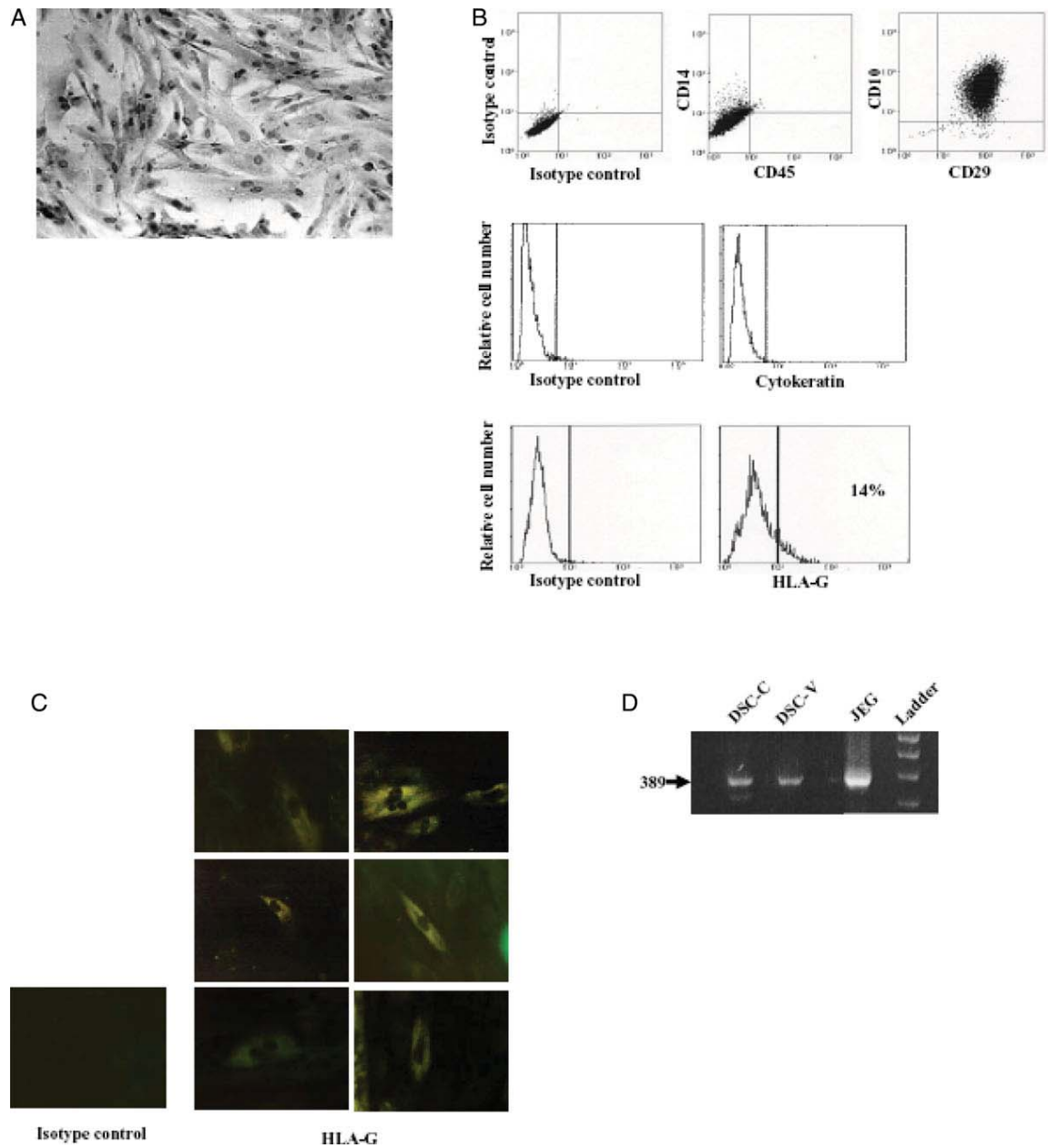
#### **4.3.11 Análisis estadístico**

La expresión constitutiva o inducida de HLA-G en las diferentes líneas de DSC se comparó con Student's t-test. Un valor de  $p$  de 0.05 fue considerado estadísticamente significativo. Los resultados cuantitativos de electroluminiscencia se llevaron a cabo por triplicado o cuadruplicado y expresados como media  $\pm$  SD.

### **4.4 Resultados**

#### **4.4.1 Expresión de HLA-G por DSC cultivadas**

En cultivo, las DSC proliferaron, eliminando cualquier célula no proliferante, consiguiéndose una población prácticamente pura de células de aspecto fibroblástico (Figura 4-1A), descartándose cualquier contaminación con células del trofoblasto y de leucocitos. Líneas de DSC han sido estudiadas en trabajos previos, en los que las características fenotípicas y funcionales de estas células han sido determinadas (1-4, 10). Las líneas de DSC obtenidas en Opti-MEM, con pases semanales, proliferaron por un tiempo de 8 a 12 semanas.



**Figura 4-1.** Expresión de HLA-G por DSC cultivadas. Las DSC de la línea DSC-C cultivada en Opti-MEM mostraron morfología fibroblástica (A). Análisis de citometría de flujo de los antígenos expresados por las células de la línea DSC-C (B). Detección de HLA-G por inmunofluorescencia en células de la línea DSC-C (C). Expresión de mRNA de HLA-G por células de las líneas DSC-C y DSC-V, detectado mediante RT-PCR. Células tumorales de la línea JEG-3 de trofoblasto extravelositario fueron usadas como control positivo (D). Los resultados proceden de un experimento representativo de un total de 10 experimentos.

Mediante citometría de flujo se observó que estas células expresaban CD29, CD10 y carecían de CD45 y citoqueratina. Estas células también expresaron de forma débil pero consistente el antígeno HLA-G (Figura 4-1B). La intensidad de expresión del antígeno

HLA-G varió según las diferentes líneas de DSC (rango 2-20% de positividad). Esta variación era esperable, ya que las DSC son líneas de células normales policlonales, que según se ha demostrado previamente, pueden variar en sus propiedades funcionales (1-2). Mediante inmunofluorescencia, se observaron células con morfología fibroblástica que eran positivas para HLA-G. Estos resultados fueron corroborados por la detección de mRNA del HLA-G en las DSC, analizado mediante RT-PCR (Figura 4-1C, D).

#### **4.4.2 Expresión de HLA-G por las células deciduales estromales frescas**

Las células deciduales estromales frescas fueron aisladas mediante un gradiente de Percoll y posteriormente analizadas mediante citometría de flujo según (10). Bajo estas condiciones experimentales, en las células DSC frescas se ha observado un fenotipo similar a las DSC cultivadas (3,10) (Figura 4-2). La preparación de las DSC frescas, sin embargo, no es tan pura como la de las DSC cultivadas, ya que pueden contener una pequeña proporción de leucocitos (CD45<sup>+</sup>) y células de trofoblasto extravelositario (EVT). Aunque se observó en las preparaciones de DSC frescas, que los leucocitos CD45<sup>+</sup> no expresan HLA-G, las células del trofoblasto expresan este antígeno (datos no mostrados). Ahora bien, para distinguir la expresión de HLA-G por la DSC y no por el trofoblasto se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-CD10. Este antígeno es considerado un marcador de células estromales endometriales (ESC) o deciduales estromales (DSC) (11,12), y no es expresado por el trofoblasto (13). Las DSC fueron seleccionadas electrónicamente mediante citometría de flujo en base a la expresión de CD10. Encontramos una proporción de células DSC CD10<sup>+</sup> que co-expresaban HLA-G en un rango de 12-23% (Figura 4-2).

Las células fueron aisladas mediante gradientes de Percoll y analizadas por citometría de flujo. Las células fueron seleccionadas electrónicamente en base a la expresión de CD10 frente RT-SC. CD29, CD23, antígenos previamente detectados en DSC cultivadas, fueron detectados en las DSC frescas. Se observó en esta preparación una pequeña proporción (6%) de leucocitos, probablemente neutrófilos CD10<sup>+</sup>. Estos resultados muestran un experimento representativo de un total de cinco experimentos realizados.

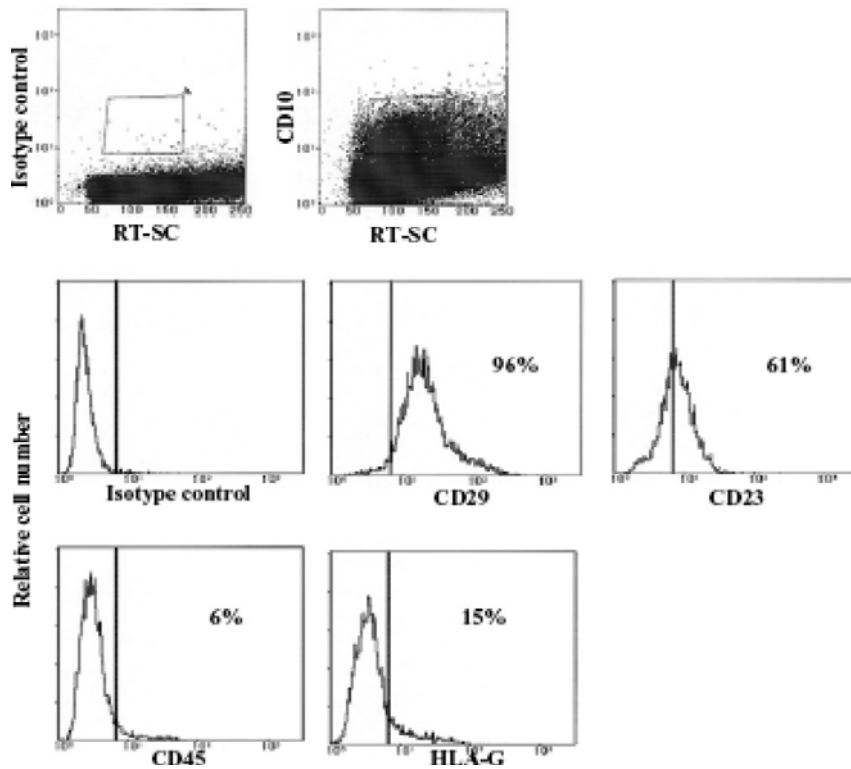
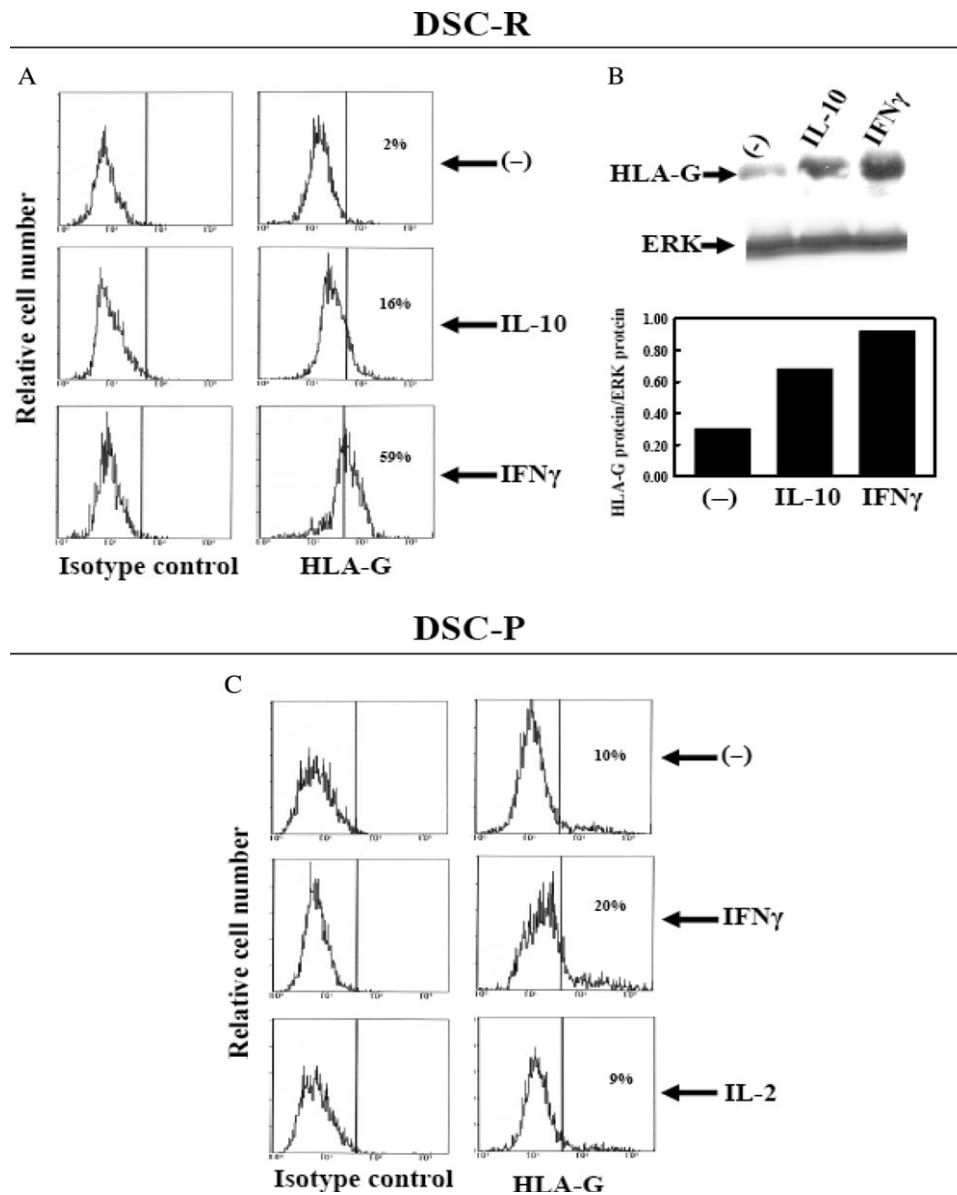


Figura 4-2. Expresión de HLA-G por las DSC frescas. Las células fueron aisladas mediante Percoll y analizadas por citometría de flujo. Las células fueron escogidas en la región por (RT-SC), la expresión de CD10, CD29, CD23, antígenos previamente detectados en cultivos de DSC, que también se encontraron en las DSC frescas. Una pequeña contaminación del 6% con leucocitos, probablemente con neutrófilos CD10 positivos, fue observada en esta preparación. Estos resultados muestran una representación de cinco experimentos realizados.

#### 4.4.3 Modulación por citocinas y decidualización de la expresión de HLA-G en DSC cultivadas

La IL-10 y el IFN- $\gamma$  incrementaron la expresión de HLA-G en las DSC, como se mostró por citometría de flujo y western blotting. Sin embargo, la IL-2 no tuvo ningún efecto (Figura 4-3A, B, C). La progesterona y el cAMP, inductores de decidualización comprobada por la presencia de PRL en sobrenadantes de las DSC, también incrementó la expresión de HLA-G (Figura 4-4A, B, C). Los efectos de las citocinas, progesterona y cAMP fueron cuantificados y representados en la (Figura 4-5). La progesterona puede tener un efecto directo en la expresión del HLA-G por las DSC y en el trofoblasto (14), así como un efecto indirecto, a través de la IL-10, citocina que puede contribuir al aumento de HLA-G, ya que la progesterona y el cAMP incrementaron la secreción de IL-10 por las DSC

(Figura 4-6). Sin embargo, el IFN- $\gamma$  incrementó la expresión de HLA-G, pero disminuyó los niveles de IL-10 en las DSC.



**Figura 4-3.** Efectos de citocinas en la expresión de HLA-G por las DSC. La línea de DSC, DSC-R fue cultivada en Opti-MEM con IL-10 a una concentración de 10ng/ml o con IFN $\gamma$  a 10ng/ml, durante 48 horas, y la expresión de HLA-G fue estudiada por citometría de flujo (A) y western blotting (B). La Mitogen-activated protein kinase extracellular regulated kinase (ERK) fue usada como control de carga en western blotting. Las gráficas de barras mostraron la densitometría cuantificada para los resultados obtenidos de western blotting. La línea DSC-P fue tratada independientemente con IL-2 a una concentración (50UI/ml), o IFN- $\gamma$ (10ng/ml) durante 48 horas, y la expresión de HLA-G fue estudiada por citometría de flujo (C). Los resultados muestran un experimento representativo de un total de cinco experimentos realizados.

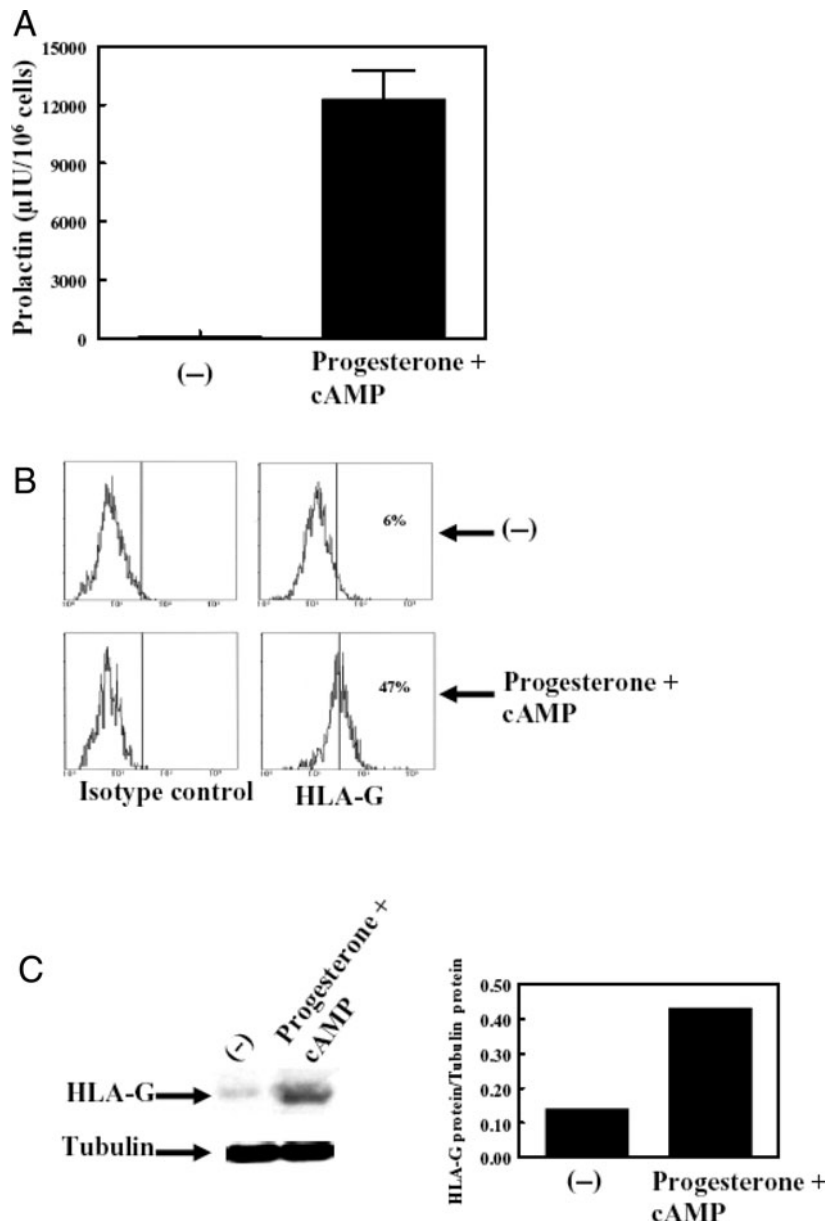


Figura 4-4. Efectos de decidualización en la expresión de HLA-G por las DSC. Las células de la línea DSC-N fueron cultivadas en Opti-MEM con 300nM de progesterona y 500uM de cAMP durante 15 días para inducir decidualización (A). La expresión de HLA-G fue analizada por citometría de flujo (B) y western blotting (C). La alfa tubulina fue usada como control de carga en western blotting. Las graficas de barras muestran la densitometría cuantificada de los resultados obtenidos de western. Estos resultados muestran un experimento representativo de un total de tres experimentos realizados.



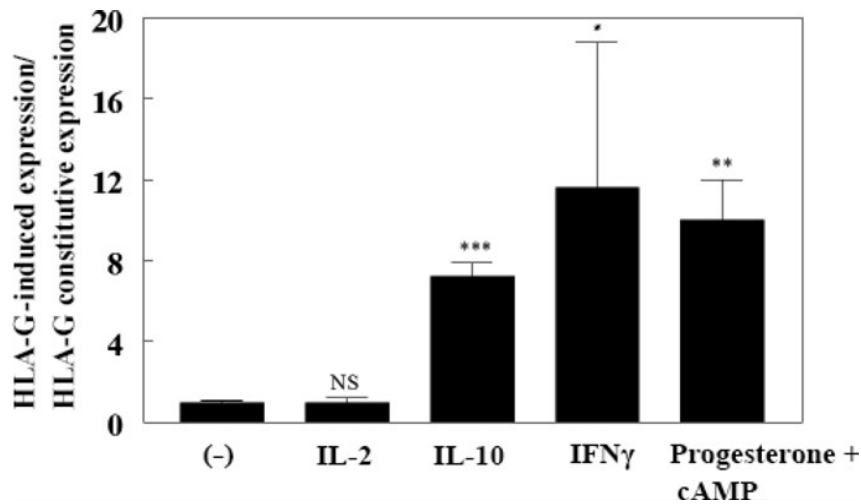


Figura 4-5. Expresión de HLA-G inducida en DSC por diferentes citocinas y progesterona combinada con cAMP. Los resultados de citometría de flujo se muestran como la relación entre la proporción de células HLA-G+ en células tratadas y la de las no tratadas. Las columnas representan la media más la desviación estándar de todos los experimentos realizados de las figura 3 y 4. Los resultados son comparados con controles negativos en DSC (-). NS, no significativo. \*P < 0.05; \*\*P<0.001; \*\*\*P <0.00001 versus control.

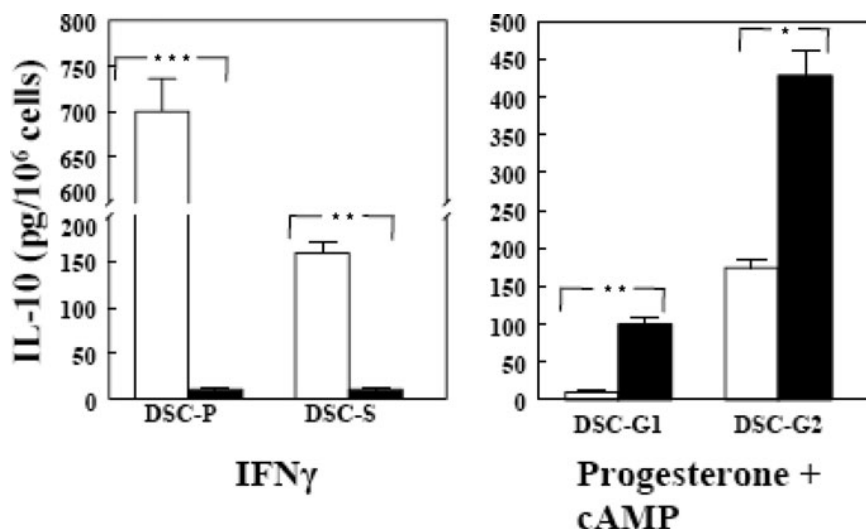


Figura 4-6. Efectos de IFN $\gamma$  (10ng/ml por 48 horas) y tratamiento con progesterona (300nM) combinada con cAMP (500uM) durante 15 días en la secreción de IL-10 por diferentes líneas DSC cultivadas en Opti-MEM. Los resultados muestran un experimento representativo de un total de tres experimentos realizados. Las barras blancas representan la cantidad de IL-10 secretada por cultivos no tratados. Las barras negras representan la cantidad de IL-10 secretada cuando se tratan los cultivos con citocinas \*P, <0.001; \*\*P < 0.0001; \*\*\*P < 0.00001.

## 4.5 Discussion

El HLA-G es un antígeno MHC de clase Ib con poco grado de polimorfismo, que se expresa intensamente solo por el EVT (6). Sin embargo, se han detectado bajos niveles de expresión de este antígeno o del mRNA del HLA-G en diferentes tejidos, cuya expresión fue asociada con la inmunotolerancia (15-16). En nuestras DSC cultivadas, la proteína HLA-G ha sido detectada por citometría de flujo, western blotting e inmunofluorescencia. El mRNA del HLA-G ha sido encontrado por RT-PCR (Figura 4-1D).

Esta expresión, aunque débil, fue modulada por IL-10, IFN- $\gamma$  y progesterona combinada con cAMP, pero no por IL-2 (Figura 4-3). También encontramos HLA-G en una población de DSC frescas (Figura 4-2). La posibilidad de que nuestros resultados se debieran a la contaminación con EVT puede descartarse, ya que es muy improbable que estas células sobrevivieran durante semanas en cultivo como las DSC. Además nuestras líneas de DSC fueron negativas para citoqueratina (Figura 4-1). También, las observaciones con el microscopio de inmunofluorescencia descubrieron células con morfología fibroblástica, típicas de cultivos DSC, que expresaban HLA-G (Figura 4-1).

Aunque la expresión de HLA-G por células de la interfase materno-fetal ha sido estudiada exhaustivamente por métodos inmunohistológicos, su detección en DSC no ha sido previamente reportada. Puede que los métodos inmunohistológicos no hayan sido tan sensibles como la citometría de flujo en distinguir la débil expresión de HLA-G por algunas pero no todas las DSC. Se considera que el HLA-G expresado por EVT tiene un papel clave en la tolerancia materno-fetal. Este antígeno parece unirse al receptor inhibitorio de NK deciduales y células T, conduciendo a la inhibición del potencial de citotoxicidad de estas células frente a tejidos fetales (8-9). La expresión de HLA-G por DSC puede constituir un mecanismo adicional de inhibición de células T citotóxicas.

La IL-10 es una citocina Th2 que está asociada en ratones y humanos a mecanismos maternos de tolerancia en el embarazo normal (17-18). En humanos, una deficiencia de IL-10 en la placenta ha sido detectada en preeclampsia (19), y se ha observado una disminución de IL-10 decidual en abortos espontáneos (20).

Nuestro grupo ha demostrado recientemente que la IL-10 redujo la contractilidad de las DSC y propusimos que este efecto relajante podría favorecer la progresión normal del embarazo (2). Los presentes resultados muestran que la IL-10 además, aumenta la expresión de HLA-G por DSC (Figura 4-3). Este efecto podría potenciar los efectos de inhibición de las DSC sobre las NK citotóxicas. El efecto de IL-10 en la expresión de HLA-G no está limitado a DSC, ya que esta citocina también aumentó la expresión de este antígeno por el trofoblasto (21). Jokhi et al. (1994) (22) encontraron escasas cantidades o ninguna de mRNA de IL-2 en decidua normal y sugirió que esta citocina no jugaba ningún papel en el embarazo. Otros autores, sin embargo, detectaron cantidades significativas de mRNA de IL-2 en embarazo normal (23) y demostraron que esta citocina estaba asociada con el aborto (18,24), lo que sugirió que esta citocina podría estar inducida en esta situación patológica. En relación con esto, la IL-2 bloquea la decidualización (25) e incrementa la contractilidad de las DSC, efectos que podrían contribuir a la expulsión del trofoblasto (1). En el presente estudio esta citocina no tuvo ningún efecto en la expresión de HLA-G en las DSC (Figura 4-3).

Se ha probado que altas concentraciones de citocinas Th1 son perjudiciales para el embarazo en humanos y en murinos, incluyendo aborto recurrente, preeclampsia y retardo en el crecimiento fetal (18,24). En ratones, sin embargo, el IFN- $\gamma$  está involucrado en el remodelamiento vascular necesario para la implantación del embrión y la posterior formación de la placenta (26).

Más aún, el IFN- $\gamma$  normalmente considerado una citocina proinflamatoria, puede conducir a las células hacia perfiles inmunosupresores cuando se une con otros moduladores, y por tanto, podría paradójicamente servir como una citocina antiinflamatoria (27). Esta situación podría ocurrir durante un embarazo normal. En línea con las funciones reguladoras de IFN- $\gamma$ , esta citocina incrementó la expresión de HLA-G en las DSC (Figura 4-3). La progesterona, hormona que ayuda al desarrollo del embarazo, induce la expresión de citocinas Th2 por linfocitos (28), inhibe la producción de citoquinas Th1 (29), diferencia las DSC al estado progestacional y bloquea sus actividades inmunitarias (30-31). En nuestros resultados, la decidualización también incrementó la expresión de HLA-G por las DSC (Figura 4-4). Esto es consistente con los resultados reportados por Yie et al., (2006b) (32), que mostraron que la progesterona aumenta la expresión del gen de HLA-G en células

JEG-3 que son células de coriocarcinoma humano. Aunque parece que la progesterona ejerce un efecto directo en la inducción de la expresión de HLA-G (14), es posible que tenga un efecto indirecto a través de la IL-10, ya que la decidualización incrementa los niveles de IL-10 en las DSC (Figura 4-6). Sin embargo, este efecto indirecto no pudo evidenciarse in vitro, ya que la secreción constitutiva o inducida de IL-10 por las DSC ( $\leq 70$  pg/ml), (Figura 4-6) (2,33), estaba por debajo de la concentración necesaria para inducir un aumento de la expresión de HLA-G en las DSC (10 ng/ml) (Figura 4-3). Por otro lado, esta citocina, localmente secretada por las DSC junto con la secretada por el trofoblasto, que es la principal fuente de IL-10 en la interfase materno-fetal (34), podría determinar que haya una concentración de citocina tan alta como para inducir la expresión del HLA-G in vivo.

El IFN- $\gamma$  así como la progesterona combinada con el cAMP, son capaces de inducir la expresión de HLA-G en las DSC (Figura 4-5). Sin embargo tienen efectos opuestos en la secreción de IL-10 por estas células. La progesterona y el cAMP incrementa la secreción de IL-10, mientras que el IFN- $\gamma$  la inhibe (Figura 4-6).

Aunque tanto la IL-10 como la progesterona favorecen el embarazo, el efecto del IFN- $\gamma$  podría verse no tanto como un factor que favorece el aborto, sino como un mecanismo regulador. De hecho, la progesterona induce la secreción de IL-10 e IL-15 en las DSC (35).y esta última citocina activa las NK deciduales (36), que son la principal fuente de IFN- $\gamma$  (37). El IFN- $\gamma$  por otro lado, podría tener un control local en la secreción de IL-10 en las DSC.

Aunque varios estudios sugieren que el HLA-G controla la citotoxicidad de las NK hacia el trofoblasto (8-9), esta actividad citotóxica es problemática, ya que el trofoblasto es resistente a la lisis mediada por las células NK, independientemente de la expresión de HLA de clase I (38-39). Algunos autores han propuesto que las células NK deciduales en lugar de perjudicar al trofoblasto a través de su actividad citotóxica, en realidad, lo que hacen es favorecer su funcionamiento aumentando su capacidad de invadir la decidua (40). No obstante, la mayoría de los estudios sobre citotoxicidad sólo han analizado la necrosis y no la apoptosis (8, 9, 38,39). Nosotros también hemos confirmado que los linfocitos deciduales eran incapaces de matar al trofoblasto por necrosis, sin embargo, encontramos que ellos inducían la apoptosis en células EVT (41). Observamos también que esta

citotóxicidad apoptótica, que probablemente controla la invasión fisiológica de la decidua por EVT en embarazos normales, está exacerbada durante el aborto espontáneo (41). En relación con esto, las evidencias experimentales sugieren que las células deciduales NK también inducen apoptosis en las DSC bajo situaciones normales y patológicas (37). En ratones sin el receptor de IFN- $\gamma$  se observó una alta incidencia de muerte de las DSC. Esto fue atribuido a que un déficit en la señalización del IFN- $\gamma$  disminuye la expresión de MHC (HLA-G de acuerdo con nuestros datos) a unos niveles muy por debajo de los requeridos para unir los receptores inhibidores de la muerte de las células NK. Por tanto, las NK deciduales son activas asesinas y matan a las DSC (37). Así las células NK deciduales se convierten en líticamente activas y destruyen las DSC (36,42). Además, la secreción de IFN- $\gamma$  por parte de las NK deciduales podría deberse a la interacción del HLA-G en las DSC (43).

De acuerdo con nuestros resultados, esta citocina incrementa la expresión de HLA-G (Figura 4-3), y esto podría jugar un papel en el mecanismo por el cual las DSC se defienden del supuesto ataque citotóxico de las NK previamente activadas. De hecho, la apoptosis en DSC es un evento normal en el embarazo, aunque este mecanismo no es bien entendido (44). El HLA-G y las NK deciduales pueden estar involucrados en este mecanismo. Los experimentos para estudiar la capacidad de las NK deciduales de inducir apoptosis a las DSC están en progreso.

En conclusión, nuestros resultados muestran que las DSC expresan HLA-G. Esta expresión es débil pero es incrementada por IL-10, IFN- $\gamma$  y progesterona combinada con cAMP, que son moléculas promotoras del embarazo normal. La expresión de HLA-G por las DSC podría controlar la actividad citotóxica de las NK hacia el trofoblasto y el deterioro fisiológico (por apoptosis) de las DSC.

## 4.6 Bibliografía

1. Kimatrai M, Oliver C, Abadía-Molina AC, García-Pacheco JM, Olivares EG. Contractile activity of human decidual stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:844–849.
2. Kimatrai M, Blanco O, Muñoz-Fernández R, Tirado I, Martín F, Abadía-Molina AC, Olivares EG. Contractile activity of human decidual stromal cells. II. Effect of interleukin-10. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:6126–6130.
3. García-Pacheco JM, Oliver C, Kimatrai M, Blanco FJ, Olivares EG. Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related with bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod* 2001;7:151–157.
4. Oliver C, Montes MJ, Galindo JA, Ruiz C, Olivares EG. Human decidual stromal cells express  $\alpha$ -smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum Reprod* 1999; 14:1599–1605.
5. Muñoz-Fernández R, Blanco FJ, Frecha C, Martín F, Kimatrai M, Abadía-Molina AC, García-Pacheco JM, Olivares EG. Follicular dendritic cells are related to bone marrow stromal cell progenitors and to myofibroblasts. *J Immunol* 2006; 177:280–289.
6. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 1990;248: 220–223.
7. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J* 2005;19:681–693.

8. Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:11520–11525.
9. Khalil-Daher I, Riteau B, Menier C, Sedlik C, Paul P, Dausset J, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Role of HLA-G versus HLA-E on NK function: HLA-G is able to inhibit NK cytotoxicity by itself. *J Reprod Immunol* 1999;43:175–182.
10. Montes MJ, Alemañ P, Tortosa CG, Borja C, Ruiz C, Olivares EG. Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with hematopoietic cells. *J Reprod Immunol* 1996;30:53–66.
11. Sumathi VP, McCluggage WG. CD10 is useful in demonstrating endometrial stroma at ectopic sites and in confirming diagnosis of endometriosis. *J Clin Pathol* 2002; 55:391–392.
12. Iwase A, Ando H, Nagasaka T, Shibata D, Harata T, Shimomura Y, Goto M, Kikkawa F. Neutral endopeptidase expressed by decidualized stromal cells suppresses Akt phosphorylation and deoxyribonucleic acid synthesis induced by endothelin-1 in human endometrium. *Endocrinology* 2006;147:5153–5159.
13. Toki T, Shimizu M, Takagi Y, Ashida T, Konishi I. CD10 is a marker for normal and neoplastic endometrial stromal cells. *Int J Gynecol Pathol* 2002; 21:41–47.
14. Yie SM, Xiao R, Librach CL. Progesterone enhances HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. *Hum Reprod* 2006a;21: 2538–2544.
15. Le Discorde M, Moreau P, Sabatier P, Legeais JM, Carosella ED. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Hum Immunol* 2003; 64: 1039-1044.

16. Wiendl H, Mitsdoerffer M, Weller M. Hide-and-seeK in the brain: a role for HLA-G mediating immune privilege for glioma cells. *Semin Cancer Biol* 2003;13:343–351.
17. Chaouat G, Assal Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliot J, Mosmann T, Wegmann TG. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBAx DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau. *J Immunol* 1995;154:4261–4268.
18. Marzi M, Vigano A, Trabattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, Clerici M. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1996;106:127–133.
19. Hennessy A, Pilmore HL, Simmons LA, Painter DM. A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. *J Immunol* 1999;163:3491–3495.
20. Plevyak M, Hanna N, Mayer S, Murphy S, Pinar H, Fast L, Ekerfelt C, Ernerudh J, Berg G, Matthiesen L et al. Decency of decidual IL-10 in first trimester missed abortion: A lack of correlation with the decidual immune cell profile. *Am J Reprod Immunol* 2002; 47:242–250.
21. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, Carosella ED, Paul P. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 1999; 11:803–811.
22. Jokhi PP, King A, Sharkey AM, Smith SK, Loke YW. Screening for cytokine messenger ribonucleic acids in purified human decidual lymphocyte populations by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Immunol* 1994;153:4427–4435.



23. von Rango U, Classen-Linke I, Raven G, Bocken F, Beier HM. Cytokine microenvironments in human first trimester decidua are dependent on trophoblast cells. *Fertil Steril* 2003; 79:1176–1186.
24. Lim KJ, Odukoya OA, Ajjan RA, Li TC, Weetman AP, Cooke ID. The role of T-helper cytokines in human reproduction. *Fertil Steril* 2000;73:136–142.
25. Kanda Y, Jikihara H, Markoff E, Handwerger S. Interleukin-2 inhibits the synthesis and release of prolactin from human decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:677–681.
26. Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med* 2000;192: 259–270.
27. Wood KJ, Sawitzki B. Interferon g: a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo. *Trends Immunol* 2006;27:183–187.
28. Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C et al. Progesterone favours the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol* 1995; 155:128–133.
29. Choi BC, Polgar K, Xiao L, Hill JA. Progesterone inhibits in-vitro embryotoxic Th1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2000;15:46–59.
30. Montes MJ, Tortosa CG, Borja C, Abadía AC, González-Gomez F, Ruiz C, Olivares EG. Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am J Reprod Immunol* 1995;34:188–194.

31. Ruiz C, Montes MJ, Abadi'a-Molina AC, Olivares EG. Phagocytosis by fresh and cultured human decidual stromal cells. Opposite effects of interleukin-1a and progesterone. *J Reprod Immunol* 1997; 33:15–26.
32. Yie SM, Li LH, Li GM, Xiao R, Librach CL. Progesterone enhances HLA-G gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and human cytotrophoblasts in vitro. *Hum Reprod* 2006b; 21:46–51.
33. Vigano P, Omigliana E, Angioni S, Vignali S, Vignali M, Di Blasio AM. Expression of interleukin-10 and its receptor is up-regulated in early pregnant versus cycling human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:5730–5736.
34. Roth I, Corry DB, Locksley RM, Abrams JS, Litton MJ, Fisher SJ. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med* 1996; 184:539–548.
35. Okada H, Nakajima T, Sanezumi M, Ikuta A, Yasuda K, Kanzaki H. Progesterone enhances interleukin-15 production in human endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4765–4770.
36. Verma S, Hiby SE, Loke YW, King A. Human decidua natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. *Biol Reprod* 2000; 62:959–968.
37. Ashkar AA, Croy BA. Interferon-g contributes to the normalcy of murine pregnancy. *Biol Reprod* 1999;61:493–502.

38. Avril T, Jarousseau AC, Watier H, Boucraut J, Le Bouteiller P, Bardos P, Thibault G. Trophoblast cell line resistance to NK lysis mainly involves and HLA class I-independent mechanism. *J Immunol* 1999;162: 5902–5909.
39. Zdravkovic M, Aboagye-Mathiesen G, Guimond MJ, Hager H, Ebbesen P, Lala PK. Susceptibility of MHC class I expressing extravillous trophoblast cell lines to killing by natural killer cells. *Placenta* 1999; 20:431–440.
40. Le Bouteiller P, Tabiasco J. Killers become builders during pregnancy. *Nat Med* 2006;12:1065–1074.
41. Olivares EG, Muñoz R, Tejerizo G, Montes MJ, Gómez-Molina F, Abadía-Molina AC. Decidual lymphocytes of human spontaneous abortions induce apoptosis but not necrosis in JEG-3 extravillous trophoblast cells. *Biol Reprod* 2002; 67:1211–1217.
42. King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update* 2000;6:28–36.
43. van der Meer A, Lukassen HG, van Lierop MJ, Wijnands F, Mosselman S, Braat DD, Joosten I. Membrane-bound HLA-G activates proliferation and interferon-gamma production by uterine natural killer cells. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:189–195.
44. Gu Y, Jow GM, Moulton BC, Lee C, Sensibar JA, Park-Sarge OK, Chen TJ, Gibori G. Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization. *Endocrinology* 1994; 135:1272–1279.



## 5 Las células deciduales estromales humanas protegen a los linfocitos de la apoptosis

Osmany Blanco<sup>1</sup>, Ester Leno-Durán<sup>1</sup>, Jorge C. Morales<sup>1</sup>, Enrique G. Olivares<sup>1,2</sup> and Carmen Ruiz-Ruiz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Inmunología, Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, Universidad de Granada, Centro de Investigación Biomédica, 18100 Armilla, Granada, España; <sup>2</sup>Hospital Universitario “San Cecilio”, 18012 Granada, España.

Placenta 30 (2009) 677-685

### 5.1 Resumen

Se ha demostrado que las células deciduales estromales humanas (DSC) están involucradas en diferentes funciones inmunes que pueden ser relevantes para el éxito del embarazo. La expresión de los ligandos de muerte por el trofoblasto fetal y por las células deciduales maternas se ha propuesto como un mecanismo para el establecimiento de la tolerancia materno fetal. La finalidad de este estudio es conocer la interrelación que existe entre las DSC y los linfocitos. Hemos analizado la expresión y función de ligandos y receptores de muerte en DSC mantenidas en cultivo. Dichas DSC expresan CD95 y el receptor de TRAIL (TRAIL- R2), aunque son resistentes a la apoptosis mediada por estos receptores. En cuanto a la expresión de CD95L y de TRAIL, es variable entre las líneas de DSC, aunque ninguna de ellas es capaz de inducir apoptosis en células Jurkat sensibles a ligandos de muerte. Por el contrario, y curiosamente, la mayoría de las líneas DSC reduce la apoptosis inducida en células Jurkat en respuesta al tratamiento con un anticuerpo anti-CD95 o con TRAIL recombinante.

El efecto protector de las DSC se observa cuando son co-cultivadas con células Jurkat en placas Transwell, indicando que las DSC pueden producir factores solubles de importancia

para la supervivencia de los linfocitos. Además, la viabilidad de linfocitos de sangre periférica y de linfocitos deciduales mejora cuando son co-cultivados con DSC.

Nuestros resultados sugieren que las DSC, lejos de inducir la apoptosis, pueden jugar un papel importante en la regulación de la supervivencia de los linfocitos en la interfase materno-fetal.

## **5.2 Introducción**

El embarazo puede considerarse como un ejemplo de aceptación de injerto semialogénico, en el que el feto está protegido del sistema inmunitario de la madre. Las interrelaciones inmunológicas entre la madre y el feto durante el embarazo parecen tener lugar en la decidua, tejido materno que está en contacto íntimo con el trofoblasto fetal. Los principales componentes celulares de la decidua son las células deciduales estromales (DSC), células equivalentes a las células endometriales estromales encontradas en el endometrio no gestante. Estas células constituyen una clase diferente cuyo origen y linaje permanecía desconocido hasta hace poco. Nuestro grupo de trabajo ha podido aislar y mantener cultivos puros de DSC, y con ellos hemos demostrado que las DSC humanas están relacionadas con las células madre mesenquimales (1), y que su morfología, fenotipo y funciones son similares a los de los miofibroblastos (2-4) y las células foliculares dendríticas (5).

La apoptosis es una forma activa de muerte celular que desempeña un papel fundamental en el desarrollo normal, la homeostasis de los tejidos y en situaciones patológicas. La apoptosis también participa en el establecimiento de tolerancia inmune (6). El receptor CD95 / Fas, miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral/ factor de crecimiento nervioso (TNF/NGF), es un potente inductor de apoptosis en el sistema inmunitario tras la interacción con su ligando natural CD95L/FasL, una proteína de membrana tipo II homóloga al TNF $\alpha$  (7-8). Varios estudios han demostrado la importancia del sistema CD95/CD95L en el mantenimiento de la inmunidad en lugares privilegiados, como el ojo y testículo (9). Además, se ha sugerido que CD95L participa en los mecanismos de supervivencia que permiten al embrión o feto semialogénico residir en condiciones de seguridad dentro del vientre materno (10-11). CD95L expresado en la

superficie de las células del trofoblasto puede inducir señales apoptóticas en la población de leucocitos de la interfase materno-fetal que expresan CD95, población que consiste principalmente en células NK uterinas, macrófagos y linfocitos T (12). Sin embargo, recientemente se ha descrito que durante el primer trimestre las células del sincitiotrofoblasto expresan una forma de CD95L intracitoplasmático, almacenado en microvesículas y secretado en forma de exosomas, capaz de inducir apoptosis en las células inmunitarias que expresan CD95 (13-14). Señales de fosforilación y mono-ubiquitinación reguladas por un dominio rico en prolina de la región citosólica de CD95L son las responsables de que este ligando se localice en vesículas lisosómicas secretoras (15-16).

TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) es otro ligando de muerte de la superfamilia del TNF que induce apoptosis al unirse a sus receptores TRAIL-R1 y TRAIL-R2, que contienen dominios de muerte. Al igual que CD95/CD95L, el sistema de TRAIL/ receptores de TRAIL también se expresa en la placenta humana y por tanto puede contribuir al establecimiento del privilegio inmunitario durante el embarazo (17-18).

Las células deciduales estromales ejercen diferentes funciones inmunológicas que parecen ser relevantes en la intercomunicación entre la madre y el feto, pudiendo contribuir al resultado final del embarazo (19-21). Sin embargo, el papel de las DSC en la tolerancia inmunológica materna no se conoce completamente. Diferentes autores han descrito la expresión de CD95L en las DSC maternas, así como su capacidad para inducir apoptosis en leucocitos que expresan CD95 (22-24). Por otro lado, se ha descrito un efecto proliferativo y antiapoptótico de las DSC sobre las NK uterinas (25). Además, se ha sugerido que los leucocitos deciduales no mueren por apoptosis en el embarazo temprano, lo que plantea interrogantes acerca de la contribución que tiene la expresión de CD95L en células de la decidua y del trofoblasto fetal en el mantenimiento del privilegio inmunitario de la interfase materno –fetal (26).

En este estudio nos planteamos clarificar las interrelaciones entre las DSC y los linfocitos. Para ello hemos determinado la expresión de receptores y ligandos de muerte en las DSC. También analizamos la sensibilidad de las DSC a la apoptosis mediada por receptores de muerte, así como su capacidad para inducir apoptosis en linfocitos. Nuestros resultados demuestran que las DSC son altamente resistentes a la inducción de apoptosis. Además, no

son capaces de inducir este tipo de muerte celular en los linfocitos T, sino que, por el contrario, los protegen de ella.

## **5.3 Materiales y métodos**

### **5.3.1 Aislamiento de las células deciduales estromales en cultivo**

Se usaron 15 muestras procedentes de mujeres sanas que decidieron interrumpir voluntariamente el embarazo en el primer trimestre (6-11 semanas de gestación) y que tenían una edad comprendida entre los 20 y los 30 años. Se excluyeron mujeres que estuvieran recibiendo alguna medicación o que padeciesen alguna infección, enfermedad autoinmune, u otra patología local o sistémica. Ninguno de los abortos fue inducido farmacológicamente. Las muestras se obtuvieron mediante legrado vaginal, en la clínica El Sur de Málaga o en la clínica Ginegranada, en Granada, con el consentimiento informado de cada paciente. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario San Cecilio en Granada.

Las líneas celulares de DSC se establecieron siguiendo el protocolo ya descrito (19-20). La pureza de las células deciduales se confirmó mediante citometría de flujo, determinando la co-expresión de CD10 y CD29, y la ausencia de CD45 (marcador de leucocitos) y de citoqueratina (que marca células epiteliales y del trofoblasto) en el 95-100% de la población (1-3). Con este procedimiento se obtuvieron 15 líneas de DSC, a las que se asignaron nombres individuales. Dichas líneas proliferaron en medio Opti-MEM con 3% de FCS durante 8-12 semanas, manteniendo en dicho medio de cultivo un fenotipo antigénico y una actividad funcional estables (1-4).

### **5.3.2 Aislamiento de linfocitos en cultivo**

Para la extracción de linfocitos deciduales, los fragmentos deciduales, obtenidos cómo ya se ha descrito, se resuspendieron en un pequeño volumen de RPMI 1640 y se hicieron pasar a través de un cedazo con un poro de 53 micras; (Gallenkamp, Loughborough, UK). La suspensión resultante de células se lavó con RPMI, y se centrifugó en Ficoll-Histopaque a temperatura ambiente durante 20 minutos, a 600 g. Se recogieron las células de la

interfase, se lavaron con PBS y se resuspendieron en un medio de cultivo completo (RPMI con 10% de FBS, gentamicina 50 g/ml, penicilina 100 UI/ml) para ser incubadas a continuación durante dos horas a 37° C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. De este modo las células adherentes quedaron adheridas al plástico y el sobrenadante, que contiene linfocitos deciduales, se recogió y se analizó mediante citometría de flujo para determinar la pureza de la población (más del 90% CD45+). Finalmente las células se lavaron y se incubaron como se indica.

Los linfocitos de sangre periférica (PBLs) se obtuvieron a partir de muestras de sangre de personas voluntarias sanas con edades comprendidas entre los 20 y los 30 años. Las células mononucleares se aislaron mediante gradiente de densidad de Ficoll-histopaque y los monocitos se adhirieron al plástico de los frascos de cultivos tras incubación a 37° C durante 1 hora. La pureza de los linfocitos del sobrenadante se determinó por citometría de flujo (más del 95% CD45+). Los PBLs se incubaron en medio de cultivo completo durante 6 días, antes de usarse en los experimentos como se indica.

### **5.3.3 Líneas de células tumorales**

La línea de células T leucémicas humanas Jurkat, y la línea de células de carcinoma de mama SKBR3 se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 con 10% de FBS, L-glutamina, penicilina y estreptomina, en un incubador a 37 °C de temperatura y con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **5.3.4 Reactivos y anticuerpos**

Los anticuerpos monoclonales anti-CD95 (conjugado con FITC) y anti-CD95L (conjugado con R-ficoeritrina) se obtuvieron de Caltag Laboratories (Burlingame, CA).

El anticuerpo monoclonal anti-TRAIL y los anticuerpos para los receptores de TRAIL fueron proporcionados por Alexis Biochemical (San Diego, CA). El anticuerpo monoclonal CH11 (IgM) que reacciona con CD95 se obtuvo de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). El ligando TRAIL recombinante se preparó como se ha descrito previamente (27). Las drogas doxorubicina y ácido valpórico se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).



### **5.3.5 Análisis por citometría de flujo de moléculas de superficie**

Células DSC fueron despegadas con EDTA al 0.04% a 37 °C, se centrifugaron y el precipitado de células se resuspendió en PBS a una concentración de  $10^6$  células/ml. El marcaje directo con anticuerpos se realizó añadiendo 10 ul del anticuerpo correspondiente a 100 ul de la suspensión celular e incubando durante 30 minutos a 4 °C en oscuridad. Para el marcaje indirecto las células fueron incubadas primero con el anticuerpo primario (5 ug/ml) a 4 °C durante 30 minutos, a continuación se lavaron con PBS para eliminar el anticuerpo no pegado, y se incubaron con un anticuerpo frente a ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína, a 4 °C durante 30 minutos más en oscuridad.

Las células marcadas finalmente se lavaron y se resuspendieron en PBS para ser analizadas en un citómetro de flujo, FACScan, usando el software Cell Quest (BD Biosciences).

Para detectar CD95L intracitoplasmático, las DSC fueron primeramente lavadas con PBS, luego fijadas con Citofix/citoperm (Pharmingen, San Diego CA), y de nuevo lavadas con PBS/Saponina 0.05%. Seguidamente las células se incubaron con 10 ul de anti-CD95L marcado con ficoeritrina en PBS/Saponina al 0.05% durante 45 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente fueron lavadas dos veces con PBS/Saponina al 0.02%, una vez en PBS y analizadas mediante citometría de flujo

### **5.3.6 Análisis de células apoptóticas**

Las células apoptóticas fueron detectadas mediante citometría de flujo siguiendo los procedimientos ya publicados (28). Brevemente, las células se lavaron con PBS, se fijaron en etanol frío al 70 % y se tiñeron con ioduro de propidio al mismo tiempo que se trataron con ARNasa. El análisis cuantitativo del pico Sub-G1 se realizó con el citómetro de flujo FACScan.

Para analizar la morfología nuclear, las células fueron permeabilizadas con 0.5% de Tween 20 y ácido cítrico 0.2 M durante 5 minutos, antes de teñir con 2 ug/ml de DAPI (4, 6-diamidino-2-fenilindol) en una solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavó la preparación y se agregó el medio de montaje con Vectashield para observarla en el microscopio de fluorescencia.

### **5.3.7 Experimentos de cocultivo**

Células DSC subconfluentes (40%-50%), se crecieron en placas de 6 pocillos, así como en la parte inferior de los pocillos de placas Transwell, durante 1 o 2 días hasta obtener  $2 \times 10^5$  células/pocillo. El medio se cambió y se añadieron las células Jurkat a una proporción de  $1 \times 10^5$  células/pocillo o los linfocitos primarios, provenientes de decidua o de sangre periférica, en una proporción  $2 \times 10^5$ , directamente al cultivo de DSC, o bien en la parte superior de la cámara Transwell. Después de 24 horas de co-incubación, las células Jurkat o los linfocitos primarios se recogieron y se analizó la población de células en apoptosis como se explicó anteriormente.

### **5.3.8 Análisis estadístico**

Estos datos fueron analizados aplicando el tests t de Student para muestras no pareadas de dos colas utilizando el el programa GraphPad Prism 4 para Windows. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos.

## **5.4 Resultados**

### **5.4.1 Expresión de receptores y ligandos de muerte en líneas de DSC**

Varios autores han demostrado la presencia de receptores de muerte y de sus ligandos en la interfase materno fetal en la placenta humana. Para caracterizar el fenotipo de las DSC, determinamos la expresión en superficie de CD95, CD95L, TRAIL y los receptores de TRAIL en DSC cultivadas. Como muestra la Figura 5-1 A, todas las líneas de DSC analizadas expresaban CD95 y TRAIL-R2, en porcentajes situados entre el 20-70% y el 10-40% respectivamente (medias de 44.27% para CD95 y 23.5% para TRAIL-R2). Por el contrario, la expresión del receptor TRAIL-R1 y de TRAIL fue negativa o baja (menos del 15%). En relación con CD95L, la expresión fue negativa en 9 líneas de 15 que fueron analizadas y en las 6 líneas restantes el porcentaje de células positivas variaba de línea a línea (de un 6 a un 80%) (

Figura 5-1 Expresión y función de receptores y ligandos de muerte en DSC. (A) La expresión en la superficie celular de CD95, receptores de TRAIL (R1 y R2), CD95L y TRAIL se determinó mediante citometría de flujo. La figura representa el porcentaje de células positivas y los valores corresponden a la media (SEM) estimada a partir de 15 líneas de DSC. (B) Expresión en la superficie celular en la línea DSC8 (líneas continuas). (C) Expresión en la superficie celular e intracitoplasmática de CD95L en una línea representativa de DSC. Resultados similares fueron observados en cuatro líneas de DSC diferentes. (D) DSC fueron incubadas o no con anti-CD95 mAb CH11 (100 ng/ml) o con TRAIL recombinante (250 ng/ml) durante 24 horas. Para determinar el porcentaje de células apoptóticas las DSC fueron despegadas y teñidas con yoduro de propidio. Como control positivo se emplearon células Jurkat tratadas con 10 ng/ml de CH11 o 100 ng/ml de TRAIL. Las barras de error muestran la media de seis líneas de DSC analizadas. (E) DSC y células Jurkat se cultivaron solas (línea gris) o bien se co-cultivaron (línea negra) durante 24 horas, para determinar la expresión de CD95L en DSC (panel de arriba) y la expresión de CD95 en células Jurkat (panel de abajo) mediante citometría de flujo. Las células Jurkat y las DSC en co-cultivo se recogieron separadamente para ser analizadas. En (B) (C) y (E) los picos sombreados muestran la fluorescencia de fondo con el anticuerpo control de isotipo.

Tabla 5-1). La Figura 5-1B muestra los datos correspondientes a una línea representativa de DSC con una débil expresión de CD95L. Algunos autores han reportado la existencia del CD95L intracitoplasmático que es secretado por microvesículas (13-14). Por ello analizamos los niveles intracelulares de CD95L en líneas de DSC donde habíamos observado una baja expresión de este ligando a nivel de superficie (media de 6.6%). A nivel intracitoplasmático los niveles de CD95L fueron mayores, aunque todavía moderados en dichas DSC (media de 22.5%) (Figura 5-1C).

#### **5.4.2 Función de los receptores y ligandos de muerte en líneas de DSC**

Para conocer el papel o la funcionalidad de los receptores de muerte expresados en células DSC, analizamos su sensibilidad a la apoptosis mediada por CD95 y por TRAIL. Tras el tratamiento con altas dosis del anticuerpo agonista frente a CD95, denominado CH11, o de

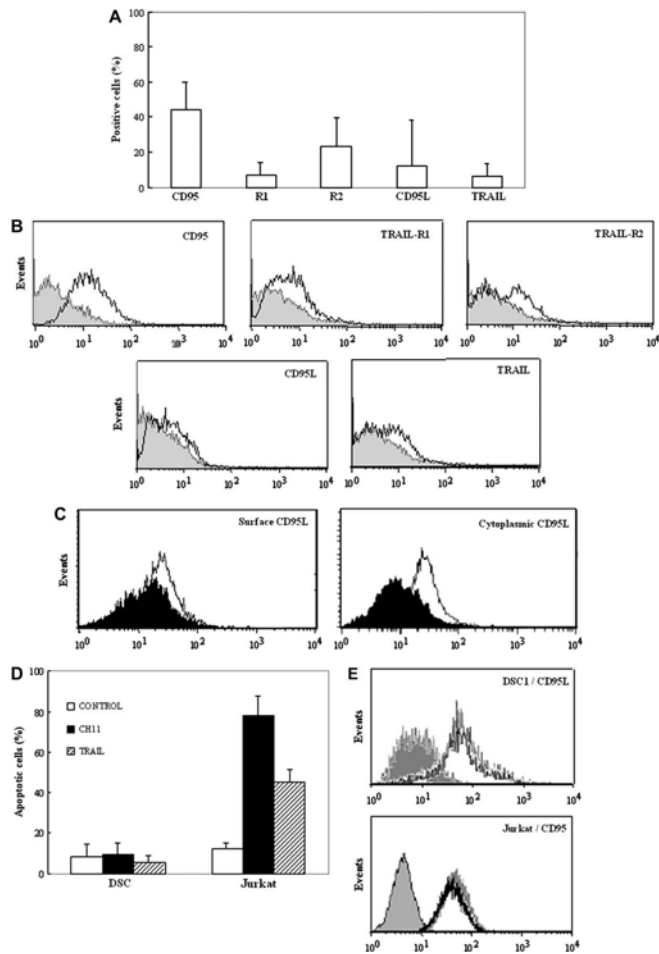
TRAIL recombinante no se observó inducción de apoptosis en ninguna de las líneas DSC, a pesar de expresar CD95 y TRAIL-R2 (Figura 5-1D). En estos experimentos se usaron células Jurkat como control positivo ya que son sensibles a la apoptosis mediada por ligandos de muerte (29,30).

A continuación estudiamos el efecto de las DSC que expresan CD95L sobre linfocitos. Para ello co-incubamos células Jurkat, modelo de célula sensible a CD95L, con líneas de DSC positivas para CD95L. El porcentaje de apoptosis en células Jurkat después de la co-incubación con DSC fue similar al que se encontró en células Jurkat cultivadas solas, a pesar de la expresión de CD95L en las DSC (

Figura 5-1 Expresión y función de receptores y ligandos de muerte en DSC. (A) La expresión en la superficie celular de CD95, receptores de TRAIL (R1 y R2), CD95L y TRAIL se determinó mediante citometría de flujo. La figura representa el porcentaje de células positivas y los valores corresponden a la media (SEM) estimada a partir de 15 líneas de DSC. (B) Expresión en la superficie celular en la línea DSC8 (líneas continuas). (C) Expresión en la superficie celular e intracitoplasmática de CD95L en una línea representativa de DSC. Resultados similares fueron observados en cuatro líneas de DSC diferentes. (D) DSC fueron incubadas o no con anti-CD95 mAb CH11 (100 ng/ml) o con TRAIL recombinante (250 ng/ml) durante 24 horas. Para determinar el porcentaje de células apoptóticas las DSC fueron despegadas y teñidas con yoduro de propidio. Como control positivo se emplearon células Jurkat tratadas con 10 ng/ml de CH11 o 100 ng/ml de TRAIL. Las barras de error muestran la media de seis líneas de DSC analizadas. (E) DSC y células Jurkat se cultivaron solas (línea gris) o bien se co-cultivaron (línea negra) durante 24 horas, para determinar la expresión de CD95L en DSC (panel de arriba) y la expresión de CD95 en células Jurkat (panel de abajo) mediante citometría de flujo. Las células Jurkat y las DSC en co-cultivo se recogieron separadamente para ser analizadas. En (B) (C) y (E) los picos sombreados muestran la fluorescencia de fondo con el anticuerpo control de isotipo.

Tabla 5-1). Incluso, usando ratios superiores de células efectoras: células diana no encontramos cambios significativos en la viabilidad de las células Jurkat (datos no

mostrados). Para explicar estos resultados analizamos si la co-incubación de DSC con células Jurkat modificaba sus niveles de expresión de CD95L y CD95, respectivamente. El resultado en la (Figura 5-1E) indica que no se producía ningún cambio en la expresión de CD95L en DSC o de CD95 en células Jurkat, cuando ambos tipos de células se co-cultivaban durante 24 horas.



**Figura 5-1** Expresión y función de receptores y ligandos de muerte en DSC. (A) La expresión en la superficie celular de CD95, receptores de TRAIL (R1 y R2), CD95L y TRAIL se determinó mediante citometría de flujo. La figura representa el porcentaje de células positivas y los valores corresponden a la media (SEM) estimada a partir de 15 líneas de DSC. (B) Expresión en la superficie celular en la línea DSC8 (líneas continuas). (C) Expresión en la superficie celular e intracitoplasmática de CD95L en una línea representativa de DSC. Resultados similares fueron observados en cuatro líneas de DSC diferentes. (D) DSC fueron incubadas o no con anti-CD95 mAb CH11 (100 ng/ml) o con TRAIL recombinante (250 ng/ml) durante 24 horas. Para determinar el porcentaje de células apoptóticas las DSC fueron despegadas y teñidas con yoduro de propidio. Como control positivo se emplearon células Jurkat tratadas con 10 ng/ml de CH11 o 100 ng/ml de TRAIL. Las barras de error muestran la media de seis líneas de DSC analizadas. (E) DSC y células Jurkat se cultivaron solas (línea gris) o bien se co-cultivaron (línea negra) durante 24 horas, para determinar la expresión de CD95L en DSC (panel de arriba) y la expresión de CD95 en células Jurkat (panel de abajo) mediante citometría de flujo. Las células Jurkat y las DSC en co-cultivo se recogieron separadamente para ser analizadas. En (B) (C) y (E) los picos sombreados muestran la fluorescencia de fondo con el anticuerpo control de isotipo.

**Tabla 5-1 Efecto de las líneas DSC CD95L<sup>+</sup> sobre células Jurkat**

<i>Línea DSC</i>	<i>% de células CD95L<sup>+</sup></i>	<i>% de células Jurkat apoptóticas<sup>a</sup></i>	
		Control	+DSC
DSC 1	70	12	13
DSC 2	11	12	16
DSC 3	12	10	6
DSC 7	80	12	17
DSC 8 <sup>b</sup>	6	10	11
DSC 10	6	10	15

<sup>a</sup> Porcentaje de apoptosis en células Jurkat incubadas solas o coincubadas con DSC durante 24 horas en una proporción 1:2 (diana : efectora).

<sup>b</sup> Porcentaje de células DSC positivas para TRAIL del 13.5%

### **5.4.3 Células DSC protegen a las células jurkat de la apoptosis mediada por receptores de muerte**

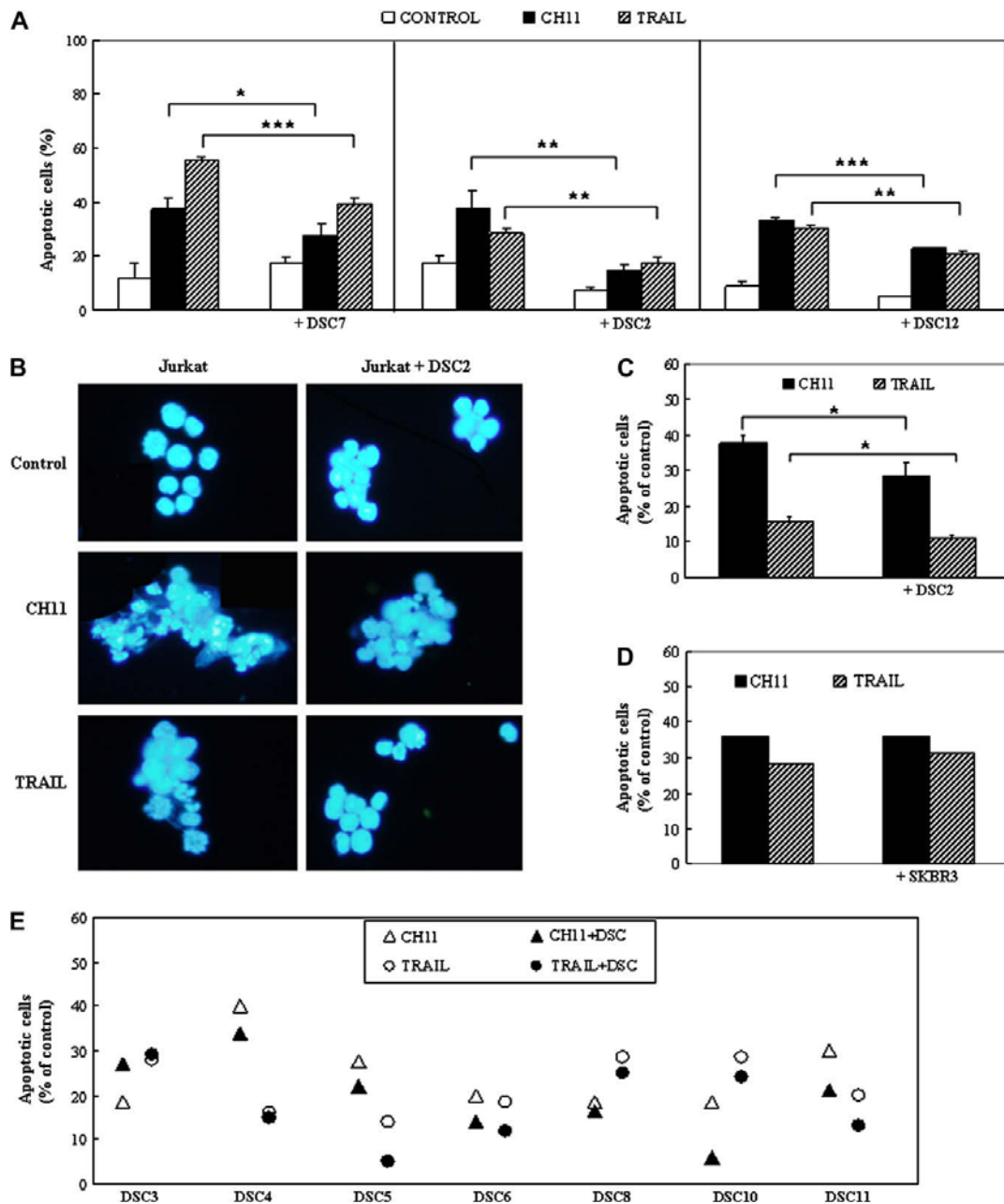
Para tratar de entender por qué las DSC con alta expresión CD95L no eran capaces de inducir apoptosis en células Jurkat analizamos si el co-cultivo con DSC modificaba la sensibilidad de células Jurkat a la apoptosis mediada por CD95.

Para ello se incubaron células Jurkat con el anticuerpo agonista anti-CD95 en presencia o en ausencia de la línea DSC7, que expresa CD95L. Curiosamente, observamos una significativa inhibición de la apoptosis mediada por el anticuerpo anti-CD95 en células Jurkat cuando se incubaron en presencia de DSC7, en comparación con la apoptosis inducida en células Jurkat solas (Figura 5-2A, panel izquierdo). Este efecto también se observó con las líneas DSC2 (en la que el porcentaje de expresión de CD95L era del 11%) y DSC12 (negativa para CD95L), indicando que el efecto inhibitor de la apoptosis de las líneas celulares de DSC es independiente de la expresión de CD95L (Figura 5-2A, paneles central y derecho). Además, la co-incubación con dichas líneas de DSC también disminuyó la apoptosis en células Jurkat mediada por TRAIL (Figura 5-2A). Todos estos datos

sugieren que las DSC presentan un efecto protector generalizado sobre la apoptosis mediada por ligandos de muerte.

Consideramos la posibilidad de que el efecto protector observado pudiera deberse a una competencia entre los receptores de muerte expresados en células Jurkat y los expresados en DSC por la unión al anticuerpo anti-CD95 o a la molécula TRAIL recombinante. Para descartar esta posibilidad se pre-trataron células Jurkat con anti-CD95 o TRAIL durante 30 minutos, y luego se lavaron para eliminar el exceso de reactivo antes de ser co-cultivadas con DSC. Mediante detección del ADN con DAPI y determinación del contenido de ADN en la fase sub-G1 del ciclo celular demostramos una vez más la protección de la apoptosis mediada por receptores de muerte en células Jurkat co-cultivadas con DSC (Figura 5-2B, C). Para fundamentar aún más la especificidad del efecto protector de células DSC, analizamos la inducción de apoptosis en Jurkat co-cultivadas con otras líneas celulares como SKBR3, línea de cáncer de mama que tiene una alta expresión de CD95 y niveles moderados de receptores de TRAIL (31). Como se observa en la Figura 5-2D, la co-incubación con células SKBR3 no tuvo ningún efecto inhibitorio de la apoptosis sobre células Jurkat pretratadas durante 30 minutos con anti-CD95 o TRAIL. El ensayo de siete líneas más de DSC puso de manifiesto que, en mayor o menor medida, todas ellas excepto una (DSC3) eran capaces de proteger de la apoptosis a las células Jurkat pretratadas con ligandos de muerte (Figura 5-2E).

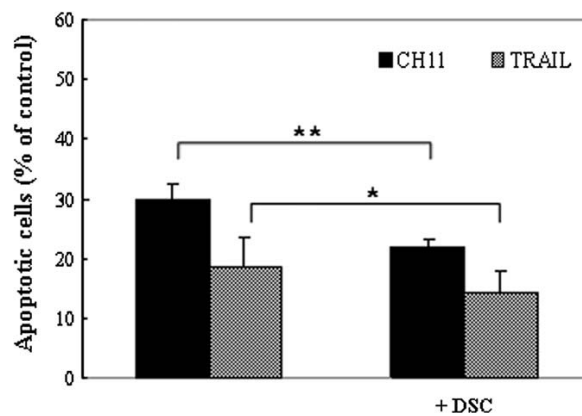




**Figura 5-2** La coincubación con DSC reduce la apoptosis de las células Jurkat mediada por receptores de muerte. (A) Células Jurkat cultivadas solas o con diferentes líneas de DSC. Las células fueron tratadas con 2 ng/ml de CH11, 100 ng/ml de TRAIL o sin ningún agente durante 24 horas para inducir apoptosis. (B-E) Células Jurkat fueron pretratadas con 5 ng/ml de CH11 ó 200 ng/ml de TRAIL recombinante por 30 minutos a 4°C. A continuación fueron lavadas e incubadas solas, con diferentes líneas de DSC (B, C, E) o con una línea de cáncer de mama SKBR3 (D) durante 24 horas. (A, C, D, E) el porcentaje de células apoptóticas en la fase sub G1 fue analizado mediante citometría de flujo. (B) La condensación del núcleo fue observada por microscopía de fluorescencia. Los datos para las diferentes líneas de DSC corresponden a experimentos independientes. Las barras de error muestran la media de triplicados \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.

#### 5.4.4 El efecto protector de células DSC no requiere del contacto célula- célula

Para determinar si la interacción física es necesaria para que las DSC protejan a las células Jurkat de la apoptosis mediada por receptores de muerte, se utilizó un sistema de cámara Transwell que impide el contacto célula-célula entre los dos tipos celulares, pero que al mismo tiempo permite la circulación libre de moléculas solubles. Como se muestra en la Figura 5-3, las DSC todavía ejercen su acción inhibitoria en ausencia de contacto físico con las células Jurkat. Además se observó una protección similar de la apoptosis mediada por receptores de muerte cuando las células Jurkat eran cultivadas con sobrenadantes de cultivo de DSC (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que ciertos factores solubles deben ser los responsables del efecto protector observado.

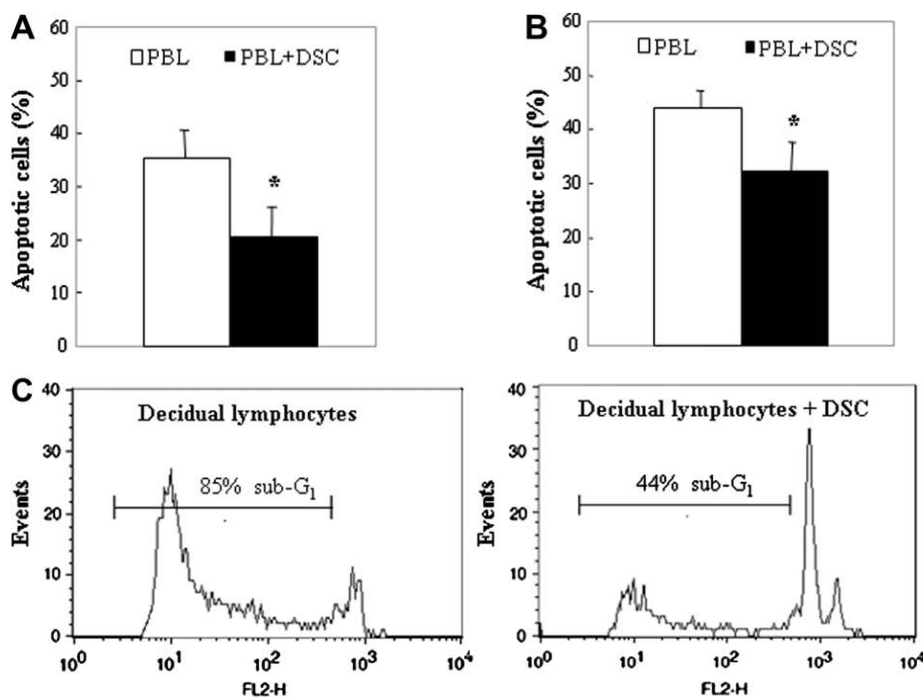


**Figura 5-3 El efecto protector de las DSC se mantiene en ausencia del contacto intercelular. Las células Jurkat fueron pretratadas por 30 minutos con 5 ng/ml de CH11 o 200 ng/ml de TRAIL. Después del tratamiento las células fueron lavadas y cultivadas con o sin DSC en una cámara transwell durante 24 horas. El porcentaje de apoptosis de las células Jurkat fue determinado mediante citometría de flujo. Las barras de error muestran la media de 6 experimentos independientes con diferentes líneas de DSC \*p < 0.05; \*\*p < 0.01.**

#### 5.4.5 Células DSC mejoran la supervivencia de los linfocitos primarios

Como los linfocitos primarios son resistentes a la apoptosis inducida por receptores de muerte (29), analizamos el efecto de las DSC sobre la apoptosis espontánea de linfocitos de sangre periférica en cultivo, para conocer la importancia de la regulación de la apoptosis de linfocitos por DSC en un contexto más fisiológico. Encontramos que la co-incubación durante 24 horas con DSC reduce de forma significativa el porcentaje de linfocitos apoptóticos en cultivo (Figura 5-4A). Una protección similar se observó cuando los

linfocitos fueron co-cultivados con DSC en cámara Transwell, indicando que la protección de la apoptosis espontánea, al igual que la protección de la apoptosis inducida por receptores de muerte, está mediada por factores solubles secretados por las DSC. Además, de este modo descartamos la posibilidad de cualquier respuesta alogénica (Figura 5-4B). También confirmamos el efecto protector de las DSC sobre la viabilidad de linfocitos deciduales humanos purificados tras 24 horas de co-incubación (Figura 5-4C).



**Figura 5-4** La incubación con DSC protege a los linfocitos primarios de la muerte espontánea. Los linfocitos de sangre periférica fueron cultivados por 6 días en ausencia de estímulos para inducir la apoptosis espontánea. A continuación fueron incubados con sin DSC en placas normales (A) ó en cámara Transwell (B), durante 24 horas. (C) Los linfocitos deciduales purificados fueron cultivados solos o coincubados con DSC por 24 horas. El porcentaje de apoptosis de los linfocitos fue determinado mediante citometría de flujo. Las barras de error muestran la media de tres experimentos independientes con diferentes líneas de DSC y muestras de diferentes donadores. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

#### 5.4.6 El co-cultivo con DSC no protege de otros estímulos apoptóticos diferentes a los ligandos de muerte

Las células deciduales estromales producen citocinas, hormonas y otros productos biológicos activos (32). Algunas de estas moléculas secretadas podrían mediar el efecto de supervivencia de las DSC. Para caracterizar mejor este efecto se comparó la respuesta de células Jurkat a otros conocidos inductores de apoptosis, en concreto al inhibidor de histona deacetilasas ácido valpróico (VPA) y a la droga genotóxica doxorubicina, tras co-incubación con o sin DSC. Los resultados en la Figura 5-5A indican que, en contraste con el efecto protector frente a la apoptosis mediada por el anticuerpo anti-CD95, la apoptosis inducida por estos agentes quimioterapéuticos no se inhibe en presencia de DSC.

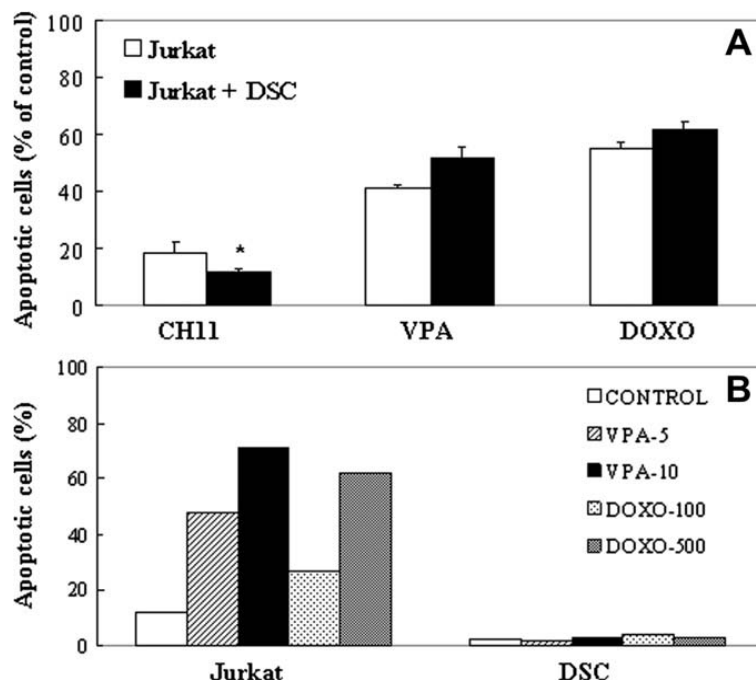


Figura 5-5. Efecto de las DSC en la inducción de apoptosis en células Jurkat por drogas quimioterapéuticas. (A) Células Jurkat fueron incubadas solas o con DSC tratadas con 5 mM de ácido valpróico (VPA) o 250 ng/ml de doxorribucina (DOXO) durante 24 horas. Como control del efecto protector de las DSC, las Jurkat fueron pretratadas con 5 ng/ml de CH11 antes de la incubación con o sin DSC. B) Células Jurkat y DSC fueron tratadas durante 24 horas sin o con diferentes concentraciones de VPA (5 y 10 mM) o DOXO (100 y 500 ng/ml). El porcentaje de apoptosis en células Jurkat (A, B) y DSC (B) se analizó mediante citometría de flujo. Estos datos muestran tres experimentos representativos. Las barras de error indican la media de tres experimentos realizados. \*p < 0.05.

Previamente se ensayaron tanto el VPA como la doxorubicina sobre las DSC para descartar la posibilidad de que a las dosis usadas en estos experimentos pudiesen inducir apoptosis en las propias DSC (Figura 5-5B). Estos hallazgos sugieren que la acción protectora de las DSC no es un efecto generalizado, sino más bien específico frente a algunos estímulos pro-apoptóticos.

## **5.5 Discusión**

En este trabajo hemos usado 15 líneas de DSC independientes, obtenidas del primer trimestre de embarazo, y con ellas demostramos que las DSC protegen a los linfocitos de la apoptosis. En trabajos previos (1-4) nuestro grupo mostró que las DSC en cultivo mantienen un fenotipo estable y funciones similares a las DSC recién obtenidas. Además, el uso de líneas de cultivo de DSC presenta ventajas ya que evita la contaminación con otras células de la decidua tales como leucocitos deciduales o trofoblasto extraveloso (21). Para estudiar la apoptosis mediada por receptores de muerte usamos células Jurkat, modelo ampliamente utilizado en la investigación de la muerte celular de linfocitos (29,30). Esta línea celular también se ha usado en estudios anteriores sobre apoptosis inducida por DSC (22,33).

Los resultados presentados en varios estudios indican que la placenta humana es una fuente rica en ligandos y receptores de la familia de TNF que probablemente desempeñan un papel importante en el mantenimiento del privilegio inmune de la placenta (34). Se ha sugerido que las moléculas CD95L y TRAIL expresadas en células del trofoblasto fetal, inducen apoptosis en las células inmunes maternas activas de la decidua humana, previniendo así el rechazo del feto por parte del sistema inmunológico materno. Además, diferentes autores han descrito la presencia de ligandos de muerte en las DSC humanas y han sugerido que también contribuyen a la tolerancia inmune materno-fetal (18,22,24). Usando cultivos de DSC altamente purificados nosotros demostramos que la expresión de CD95L y TRAIL es muy baja o nula en líneas de DSC, con la excepción de dos de ellas que mostraron altos niveles de CD95L. Por otro lado, también fue encontrada una moderada expresión de CD95L intracitoplasmático. Las diferencias entre nuestros resultados y los de estudios anteriores pueden deberse a los distintos tipos de muestras y de técnicas utilizadas para detectar dichas proteínas (18, 22,24), ya que la mayoría de los

estudios previos observaron la expresión de ligandos de muerte en células deciduales humanas mediante análisis de inmunohistoquímica utilizando secciones de decidua de primer trimestre.

Nuestros experimentos demuestran que, a pesar de los niveles de expresión de CD95L y TRAIL, las DSC no inducen apoptosis ni en células Jurkat sensibles a estos ligandos de muerte ni en linfocitos deciduales o linfocitos de sangre periférica. Por el contrario, ejercen un efecto anti-apoptótico paracrino que coincide con observaciones previas sobre la capacidad de las DSC para influir en la proliferación y la supervivencia de linfocitos NK deciduales (25). En general, los estudios que han sugerido un papel para las DSC en la inducción de apoptosis de linfocitos maternos no aportan ninguna confirmación experimental, sino que proponen este papel en base a la expresión de ligandos de muerte en las DSC (18) o al hallazgo de una relación inversamente proporcional entre la expresión de CD95L en células deciduales y el número de leucocitos que expresan CD95 en la región de la interfase materno-fetal (24). Otros trabajos han observado que las células endometriales estromales tratadas con IL-8 o con gonadotropina coriónica humanas (hCG) incrementan la expresión de CD95L y adquieren la capacidad de inducir apoptosis en células Jurkat (22,23). Sin embargo, no demuestran que CD95L sea el responsable de la inducción de apoptosis.

Los resultados presentados aquí no descartan la posibilidad de que los ligandos de muerte de las DSC puedan interactuar con los receptores de muerte en los linfocitos, pero sugieren que además de las posibles señales pro-apoptóticas, las DSC deben proporcionar señales de supervivencia o reguladoras que previenen la apoptosis de los linfocitos. En concordancia con nuestros resultados se encuentran los obtenidos en los estudios anteriormente mencionados de inducción de apoptosis por células endometriales tratadas con IL-8 o con hCG, en los cuales describen que las células estromales endometriales no tratadas tienen un efecto anti-apoptótico sobre los linfocitos T (22-23). Además, otros autores no han sido capaces de detectar leucocitos apoptóticos al comienzo de embarazos normales (26). Es también interesante el hecho de que estudios con ratones *lpr* y *gld*, que son funcionalmente deficientes en CD95 y CD95L respectivamente, han cuestionado la participación de CD95/CD95L en la tolerancia materno fetal, ya que no han encontrado

efectos adversos en el embarazo en dichos modelos animales (35-36). También es posible que los ligandos CD95L y TRAIL expresados en DSC no sean biológicamente activos.

El efecto protector de las DSC no depende del contacto célula-célula con los linfocitos, ya que se observa cuando usamos cámara Transwell o sobrenadante de cultivo de DSC. Por lo tanto, es probable que citocinas u otros factores solubles secretados por las DSC actúen a través de un mecanismo paracrino proporcionando un microambiente adecuado para la supervivencia de los linfocitos. La secreción de estos factores de supervivencia debe variar entre las diferentes líneas de DSC, ya que el efecto protector de las DSC difiere entre las líneas celulares. Curiosamente, observamos que las DSC no reducían la muerte celular en células Jurkat tratadas con inductores de apoptosis diferentes a los ligandos de muerte.

Este efecto protector selectivo de las DSC podría resultar de la secreción de factores, como formas solubles de CD95/Fas (sFas) y el receptor soluble de TRAIL osteoprotegerina, capaces de impedir la unión del anticuerpo anti-CD95 y de TRAIL a sus respectivos receptores de muerte expresados en la membrana de las células Jurkat. Aunque hemos detectado secreción de osteoprotegerina en sobrenadantes de cultivo de DSC (datos no publicados), estos factores bloqueantes solubles de receptores de muerte no pueden mediar la protección observada en experimentos donde las células Jurkat fueron pretratadas con el anticuerpo anti-CD95 o con TRAIL. Además, estos factores no pueden explicar el efecto protector de las DSC sobre la apoptosis espontánea de linfocitos primarios cultivados *in vitro*, que se debe principalmente a la carencia de citocinas y de factores de supervivencia. Se ha descrito que las DSC producen y secretan varias citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento como IL-1, IL-6, IL-11, factor de células madre (SCF), factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) entre otros (20, 32, 37-41 ). La capacidad que tienen estas moléculas de proteger frente a la apoptosis ha sido descrita en diferentes contextos y se cree que tiene lugar a través de diferentes mecanismos, por ejemplo, activando vías de señalización de supervivencia o incrementando la expresión de factores anti-apoptóticos (42-46).

Por tanto, los factores secretados por las DSC pueden neutralizar o inhibir el efecto apoptótico de los ligandos de muerte y pueden servir como factores de supervivencia para los linfocitos deciduales. En conjunto, nuestros datos muestran que las DSC ejercen un

efecto protector, pequeño pero probado, sobre los linfocitos en ciertas situaciones, como tras la interacción de los receptores de muerte con sus respectivos ligandos. Sin embargo, no podemos descartar que las DSC también puedan desencadenar al mismo tiempo mecanismos pro-apoptóticos (22-24). Aunque no hemos podido demostrar la inducción de apoptosis por DSC positivas para CD95L, estas células podrían inducir otros fenómenos pro-apoptóticos. La supervivencia final de los linfocitos puede ser el resultado de un equilibrio entre fuerzas opuestas que pueden ser reguladas por diferentes factores. Este equilibrio puede ser relevante para las relaciones inmunológicas materno-fetales.

A pesar de la expresión de receptores CD95 y TRAIL-R2 en DSC, nuestros resultados demuestran que estas células son altamente resistentes a la apoptosis mediada por ligandos de muerte. Trabajos anteriores han descrito la resistencia de células endometriales estromales al tratamiento con un anticuerpo anti-CD95, y han sugerido que CD95 media señales de supervivencia en estas células (33,47). Sin embargo, pensamos que esta es la primera vez que se ha analizado la resistencia de las DSC a la apoptosis mediada por TRAIL. De acuerdo con los resultados de Lonergan et al., que detectaron la presencia de los receptores señuelo TRAIL-R3 y TRAIL-R4 en membranas gestantes (48), nosotros hemos observado la expresión de TRAIL-R4 en la membrana plasmática de las DSC (datos no demostrados), lo que podría explicar por qué estas células son resistentes a la inducción de apoptosis por TRAIL. Además demostramos que las DSC son resistentes no sólo a los ligandos de muerte sino también a otros estímulos apoptóticos como las drogas quimioterapéuticas, lo que sugiere que estas células pueden expresar diferentes factores anti-apoptóticos que inducen un estado general de resistencia de apoptosis. Los factores secretados por las DSC, mencionados anteriormente, pueden también interactuar de forma autocrina o paracrina para inducir señales de supervivencia y proteger a las DSC de la inducción de apoptosis. Estos resultados son paradójicos si tenemos en cuenta que la tendencia fisiológica de las DSC durante la gestación en mamíferos es morir por apoptosis (49).

Por el momento, los mecanismos involucrados en la regulación de la sensibilidad de las DSC humanas a la inducción de la muerte celular no han sido identificados. Varios estudios en modelos con ratas y ratones han descrito la expresión de miembros de la familia Bcl-2 en células deciduales así como la implicación de la ratio Bax/Bcl-2 y de la



caspara-9 en la modulación de la regresión del tejido decidual (44,45). Es necesario llevar a cabo nuevos estudios que analicen la expresión de proteínas anti-apoptóticas y la activación de vías de supervivencia en líneas DSC humanas para comprender los mecanismos de resistencia de estas células a la apoptosis.

## 5.6 Bibliografía

1. Garcia-Pacheco JM, Oliver C, Kimatrai M, Blanco FJ, Olivares EG. Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related to bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:1151–7.
2. Kimatrai M, Blanco O, Munoz-Fernandez R, Tirado I, Martin F, Abadia-Molina AC, et al. Contractile activity of human decidual stromal cells. II. Effect of interleukin-10. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:6126–30.
3. Kimatrai M, Oliver C, Abadia-Molina AC, Garcia-Pacheco JM, Olivares EG. Contractile activity of human decidual stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:844–9.
4. Oliver C, Montes MJ, Galindo JA, Ruiz C, Olivares EG. Human decidual stromal cells express alpha-smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum Reprod* 1999; 14:1599–605.
5. Munoz-Fernandez R, Blanco FJ, Frecha C, Martin F, Kimatrai M, Abadia-Molina AC, et al. Follicular dendritic cells are related to bone marrow stromal cell progenitors and to myofibroblasts. *J Immunol* 2006; 177:280–9.
6. Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 1998; 280:243–8.
7. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66:233–43.

8. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 75:1169–78.
9. Green DR, Ferguson TA. The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:917–24.
10. Hammer A, Dohr G. Expression of Fas-ligand in first trimester and term human placental villi. *J Reprod Immunol* 2000; 46:83–90.
11. Uckan D, Steele A, Cherry, Wang BY, Chamizo W, Koutsonikolis A, et al. Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. *Mol Hum Reprod* 1997;3:655–62.
12. Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod* 1991; 6:791–8.
13. Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:55–63.
14. Frangsmyr L, Baranov V, Nagaeva O, Stendahl U, Kjellberg L, Mincheva-Nilsson L. Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. *Mol Hum Reprod* 2005; 11:35–41.
15. Blott EJ, Bossi G, Clark R, Zvelebil M, Griffiths GM. Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail. *J Cell Sci* 2001; 114:2405–16.

16. Zuccato E, Blott EJ, Holt O, Sigismund S, Shaw M, Bossi G, et al. Sorting of Fas ligand to secretory lysosomes is regulated by mono-ubiquitylation and phosphorylation. *J Cell Sci* 2007; 120:191–9.
17. Chen L, Liu X, Zhu Y, Cao Y, Sun L, Jin B. Localization and variation of TRAIL and its receptors in human placenta during gestation. *Life Sci* 2004; 74:1479–86.
18. Phillips TA, Ni J, Pan G, Ruben SM, Wei YF, Pace JL, et al. TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege. *J Immunol* 1999;162:6053–9.
19. Blanco O, Tirado I, Munoz-Fernandez R, Abadia-Molina AC, Garcia-Pacheco JM, Pena J, et al. Human decidual stromal cells express HLA-G: effects of cytokines and decidualization. *Hum Reprod* 2008; 23:144–52.
20. Montes MJ, Tortosa CG, Borja C, Abadia AC, Gonzalez-Gomez F, Ruiz C, et al. Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34:188–94.
21. Olivares EG, Montes MJ, Oliver C, Galindo JA, Ruiz C. Cultured human decidual stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. *Biol Reprod* 1997; 57:609–15.
22. Kayisli UA, Selam B, Guzeloglu-Kayisli O, Demir R, Arici A. Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas–Fas ligand system. *J Immunol* 2003; 171:2305–13.
23. Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Mitsiades N, Margioris A, Chrousos GP, et al. Corticotropin-releasing hormone (CRH) and immunotolerance of the fetus. *Biochem Pharmacol* 2003; 65:917–21.

24. Qiu Q, Yang M, Tsang BK, Gruslin A. Fas ligand expression by maternal decidual cells is negatively correlated with the abundance of leukocytes present at the maternal–fetal interface. *J Reprod Immunol* 2005; 65:121–32.
25. King A, Gardner L, Loke YW. Co-stimulation of human decidual natural killer cells by interleukin-2 and stromal cells. *Hum Reprod* 1999; 14:656–63.
26. Pongcharoen S, Bulmer JN, Searle RF. No evidence for apoptosis of decidual leucocytes in normal and molar pregnancy: implications for immune privilege. *Clin Exp Immunol* 2004; 138:330–6.
27. MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, Alnemri ES. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1997; 272:25417–20.
28. Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem* 1994; 218:314–9.
29. Morales JC, Ruiz-Magana MJ, Ruiz-Ruiz C. Regulation of the resistance to TRAIL-induced apoptosis in human primary T lymphocytes: role of NF-kappaB inhibition. *Mol Immunol* 2007; 44:2587–97.
30. Ruiz-Ruiz C, Robledo G, Font J, Izquierdo M, Lopez-Rivas A. Protein kinase C inhibits CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis by at least two different mechanisms in Jurkat T cells. *J Immunol* 1999; 163:4737–46.
31. Palacios C, Yerbes R, Lopez-Rivas A. Flavopiridol induces cellular FLICE-inhibitory protein degradation by the proteasome and promotes TRAIL-induced early signaling and apoptosis in breast tumor cells. *Cancer Res* 2006; 66:8858–69.

32. Engert S, Rieger L, Kapp M, Becker JC, Dietl J, Kammerer U. Profiling chemokines, cytokines and growth factors in human early pregnancy decidua by protein array. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:129–37.
33. Selam B, Kayisli UA, Garcia-Velasco JA, Akbas GE, Arici A. Regulation of Fas ligand expression by IL-8 in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3921–7.
34. De Falco M, Penta R, Laforgia V, Cobellis L, De Luca A. Apoptosis and human placenta: expression of proteins belonging to different apoptotic pathways during pregnancy. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24:25–33.
35. Chaouat G, Clark DA. FAS/FAS ligand interaction at the placental interface is not required for the success of allogeneic pregnancy in anti-paternal MHC preimmunized mice. *Am J Reprod Immunol* 2001; 45:108–15.
36. Rogers AM, Boime I, Connolly J, Cook JR, Russell JH. Maternal–fetal tolerance is maintained despite transgene-driven trophoblast expression of MHC class I, and defects in Fas and its ligand. *Eur J Immunol* 1998; 28:3479–87.
37. Dimitriadis E, Robb L, Salamonsen LA. Interleukin 11 advances progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:636–43.
38. Sakakibara H, Taga M, Saji M, Kida H, Minaguchi H. Gene expression of epidermal growth factor in human endometrium during decidualization. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:223–6.
39. Simon C, Frances A, Piquette G, Hendrickson M, Milki A, Polan ML. Interleukin-1 system in the materno-trophoblast unit in human implantation: immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:847–54.

40. Sugino N, Kashida S, Karube-Harada A, Takiguchi S, Kato H. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Reproduction* 2002; 123:379–87.
41. Umekage H, Saito S, Morikawa H. Enhancement by stem cell factor of interleukin-2 (IL-2)-induced DNA synthesis in human decidual CD16-CD56bright natural killer cells mediated by increased expression of the IL-2 receptor [alpha] chain. *J Reprod Immunol* 1998; 40:1–24.
42. Drouet M, Mathieu J, Grenier N, Multon E, Sotto JJ, Herodin F. The reduction of in vitro radiation-induced Fas-related apoptosis in CD34<sup>+</sup> progenitor cells by SCF, FLT-3 ligand, TPO, and IL-3 in combination resulted in CD34<sup>+</sup> cell proliferation and differentiation. *Stem Cells* 1999; 17:273–85.
43. Gibson S, Tu S, Oyer R, Anderson SM, Johnson GL. Epidermal growth factor protects epithelial cells against Fas-induced apoptosis. Requirement for Akt activation. *J Biol Chem* 1999; 274:17612–8.
44. Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ. Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology* 2005; 128:2054–65.
45. Kurita-Ochiai T, Ochiai K, Suzuki N, Otsuka K, Fukushima K. Human gingival fibroblasts rescue butyric acid-induced T-cell apoptosis. *Infect Immun* 2002; 70:2361–7.
46. Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, et al. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264:781–8.

47. Tanaka T, Umesaki N. Fas antigen (CD95) mediates cell survival signals to regulate functional cellular subpopulations in normal human endometrial stromal cells. *Int J Mol Med* 2003; 11:757–62.
48. Lonergan M, Aponso D, Marvin KW, Helliwell RJ, Sato TA, Mitchell MD, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TRAIL receptors, and the soluble receptor osteoprotegerin in human gestational membranes and amniotic fluid during pregnancy and labor at term and preterm. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3835–44.
49. Gu Y, Jow GM, Moulton BC, Lee C, Sensibar JA, Park-Sarge OK, et al. Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization. *Endocrinology* 1994; 135:1272–9.



## **6 Bases moleculares de la actividad protectora de la apoptosis de las DSC**

### **6.1 Introducción**

Los resultados anteriormente mostrados indican que las DSC, a pesar de expresar CD95L, no son capaces de inducir apoptosis en linfocitos T. Por el contrario, los protegen de la apoptosis mediada por ligandos de muerte y de la apoptosis espontánea en cultivos in vitro. Hemos demostrado también que este efecto protector no depende del contacto célula-célula con los linfocitos, ya que se observa cuando utilizamos cámara Transwell o sobrenadantes de cultivo de DSC. Esto sugiere que citocinas o factores solubles secretados por las células DSC pueden actuar de forma paracrina regulando genes pro- y/o anti-apoptóticos en los linfocitos, proporcionándoles un microambiente adecuado para su supervivencia.

Nuestro último objetivo en este trabajo ha sido estudiar las bases moleculares del efecto de las DSC sobre la supervivencia de los linfocitos. Para ello, hemos analizado la posible regulación de genes y proteínas implicados en las rutas de inducción de apoptosis en células T Jurkat co-cultivadas en presencia de DSC.

### **6.2 Materiales y métodos**

#### **6.2.1 Reactivos**

IL-6 recombinante humana (Roche)

Mini-Kit de purificación de RNA total (Quiagen)

Kit de PCR Array, Ref. PAHS-012A, Human apoptosis. (RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array System, SABiosciences Corporation)

### **6.2.2 Aislamiento y cultivo de DSC**

Las muestras fueron obtenidas y procesadas según el protocolo convencional. Una vez purificadas, las células DSC se mantuvieron en medio Opti-MEM con 3% de FCS durante 8-12 semanas.

### **6.2.3 Mantenimiento y cultivo de células Jurkat**

Las células Jurkat se mantuvieron en medio RPMI al 10% de FCS e incubadas al 5% de CO<sub>2</sub>. Para llevar a cabo los experimentos, las células fueron cultivadas con o sin DSC en medio Opti-MEM con 3% de FCS durante 24 horas. Pasado este tiempo se recogieron y se procedió a analizarlas.

### **6.2.4 Determinación del ciclo celular**

Las células Jurkat apoptóticas fueron detectadas mediante citometría de flujo siguiendo los procedimientos ya publicados [1]. Brevemente, las células se lavaron con PBS, se fijaron en etanol frío al 70 % y se tiñeron con ioduro de propidio a su vez se trataron con ARNasa. El análisis cuantitativo del pico sub-G1 del ciclo celular se realizó utilizando el citómetro de flujo FACScan.

### **6.2.5 Análisis de proteínas mediante Western Blot**

Para la detección de proteínas citosólicas, las células fueron lisadas con buffer de lisis que contiene 1% NP 40, 150nM NaCl, 50mM Tris-Cl e inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich), durante 30 minutos en hielo. El sobrenadante que contiene las proteínas citosólicas se recogió y se le añadió tampón de carga a una concentración del 2x con los siguientes componentes: Tris pH 6.8 125mM, dodecyl sulfato de sodio (SDS), glicerol 10%, azul de bromo fenol 0.006% y beta-mercaptoetanol 1.8%. Las muestras se calentaron 5 minutos a 95°C y se cargaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. Una vez separadas las proteínas por electroforesis, fueron electro-transferidas a membranas Hybond-P PVDF (Amersham, Buckinghamshire, England). Las membranas se bloquearon con PBS-0.1% Tween-20 conteniendo 5% de leche desnatada en polvo durante una hora a

temperatura ambiente, y se incubaron con los siguientes anticuerpos: policlonales de conejo anti-caspasa-3 (Stress Gen) y anti-Bim (Calbiochem) y monoclonales frente a caspasa-8 (Munster, Germany), PARP, XIAP (ambos de BD Biosciences, San José, CA), Bcl-2 (Dako, Glostrup, Denmark) y  $\beta$ -actina (Sigma-Aldrich). La incubación se llevó a cabo durante una hora a temperatura ambiente, después se realizan varios lavados con PBS-Tween y se incubaron de nuevo las membranas con un anticuerpo secundario (frente a Ig de conejo o de ratón, según el caso) marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (Amersham). La membrana fue revelada por quimioluminiscencia (ECL, Amersham) y en contacto con una película de autorradiografía (Amersham).

### **6.2.6 Purificación de ARN total**

Se recogieron células Jurkat incubadas con o sin DSC, se lavaron dos veces con PBS y el ARN se purificó siguiendo las indicaciones del RNeasy Mini Kit (Qiagen). Brevemente, las células se lisaron con un buffer que contiene  $\beta$ -mercaptoetanol y tiocianato de guanidina, se homogeneizaron en columnas proporcionadas por kit, y se les añadió etanol al 70%. A continuación se realizó una digestión con DNasa, para degradar el ADN, se lavó la columna y finalmente se añadió agua libre de RNasa para recoger el eluido. Una vez obtenido, se midió la cantidad de ARN purificado en un espectrofotómetro.

### **6.2.7 PCR ARRAY**

Para llevar a cabo la retrotranscripción del ARN y la PCR Array se siguieron los siguientes pasos:

#### **Eliminación del ADN genómico**

Para eliminar cualquier posible contaminación de ADN genómico (ADNg) de la muestra, y así evitar falsos positivos, al ARN total purificado se le agregó un buffer de eliminación de ADNg que contiene DNasa (RT<sup>2</sup> First Strand Kit, SABiosciences), luego se incubó durante 5 minutos a 42 °C y pasado este tiempo se enfrió inmediatamente en hielo.

### **Síntesis del ADN complementario (ADNc)**

Se preparó una mezcla con buffer de retrotranscripción, primer poliA, enzima retrotranscriptasa, y agua libre de RNasa, todo ello proporcionado por el kit (RT<sup>2</sup> First Strand Kit.). Esta mezcla se añadió a la muestra de ARN total y el proceso de retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador 2720 Thermal Cycler Applied Biosystems empleando el siguiente programa: 42 °C durante 15 minutos y 95 °C 5 minutos.

### **PCR a tiempo real**

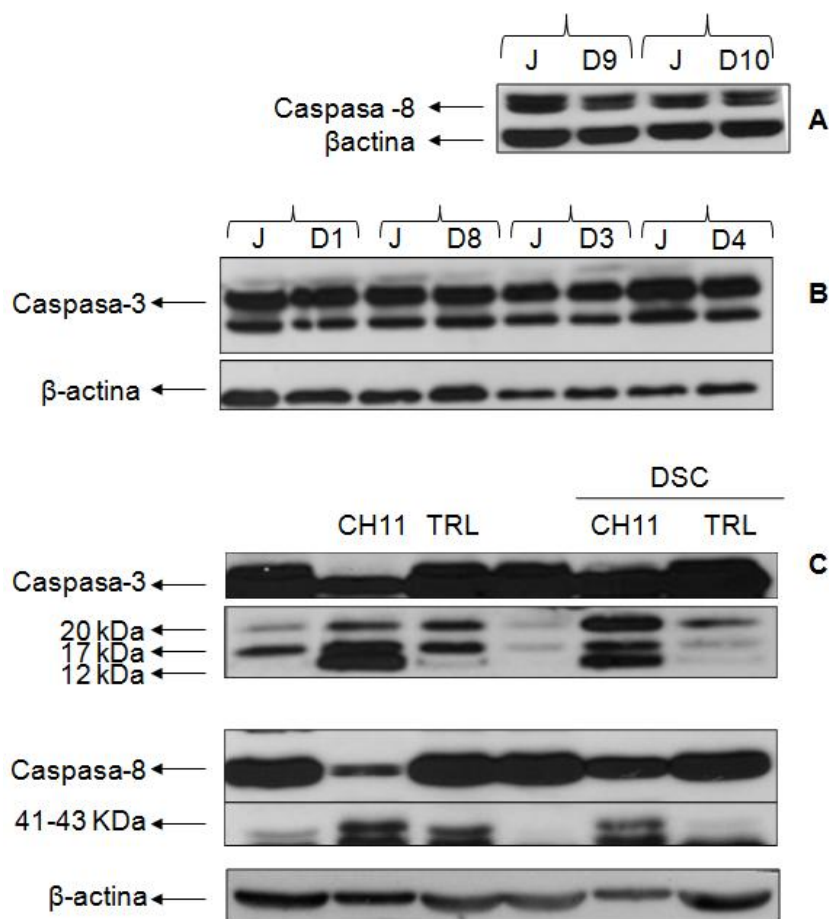
El ADNc, producto de la retrotranscripción, se mezcló con el RT<sup>2</sup> SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (SABiosciences), de acuerdo a las instrucciones facilitadas por el fabricante. A continuación se agregó 25 µl de la mezcla a cada pocillo de la placa de RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array System y se llevó a cabo la PCR en el sistema ABI 7500 de Applied Biosystem, siguiendo los siguientes pasos: 10 minutos a 95 °C y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C.

El agente intercalante SYBR Green se une al ADN de doble cadena inmediatamente después de su síntesis y emite fluorescencia tras su estimulación (absorción a 497 nm y emisión a 520 nm). La emisión es recogida por el sistema detector del equipo en cada uno de los ciclos de PCR, siendo la fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN formado. El ciclo de la PCR en que se comienza a detectar el incremento de la señal se denomina ciclo umbral o Ct (threshold cycle) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN de la muestra. Los valores de Ct de cada muestra se normalizaron con respecto a cinco genes de referencia de expresión estable (“housekeeping”) que incluye el propio kit de PCR Array. La cuantificación relativa de la expresión génica se determinó usando el método comparativo [2] donde el número de veces de inducción es igual a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , siendo  $\Delta\Delta Ct$  la diferencia entre el  $\Delta Ct$  de la muestra problema y el  $\Delta Ct$  de la muestra control (normalizados según la expresión de los genes de referencia).

## **6.3 Resultados**

### **6.3.1 Regulación de la expresión y activación de caspasas en células Jurkat cocultivadas con DSC**

En el apartado anterior hemos demostrado la capacidad de las DSC para reducir la apoptosis mediada por receptores de muerte en células Jurkat. Para caracterizar el mecanismo del efecto protector de las DSC, en primer lugar determinamos la expresión de la caspasa-8 y de la caspasa-3, ambas implicadas en la ruta de señalización de los receptores de muerte, en células Jurkat coincubadas o no con diferentes líneas de DSC. Como se observa en la Figura 6-1 A, B, no encontramos cambios en los niveles de dichas caspasas en ninguno de los casos analizados. Además de la expresión basal, estudiamos también la expresión y activación de las caspasas -8 y -3 en células Jurkat pretratadas con el anticuerpo anti-CD95 o con TRAIL, e incubadas seguidamente con y sin DSC. En este caso observamos que las DSC disminuyen la activación de caspasas en respuesta al tratamiento con los ligandos de muerte en células Jurkat, al apreciarse una clara reducción en la formación de los fragmentos correspondientes a las formas activas de las caspasas -3 y -8 (Figura 6-1 C)

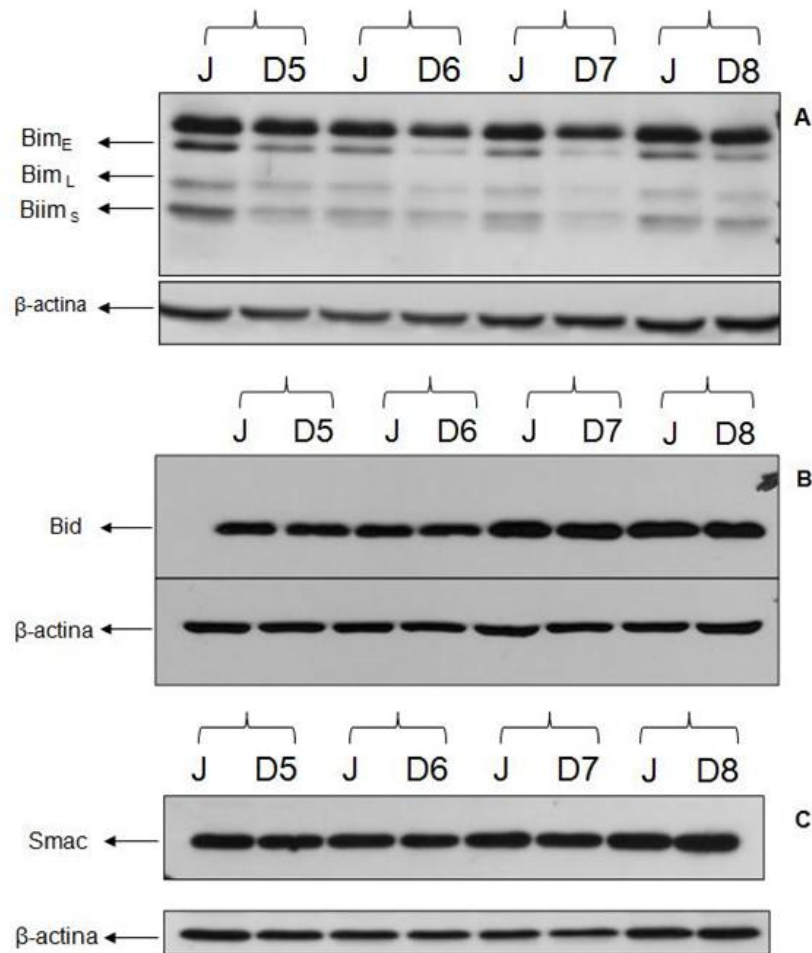


**Figura 6-1.** Expresión de caspasa-3 y caspasa-8 en células Jurkat co-cultivadas con y sin DSC. Células Jurkat fueron co-cultivadas durante 24 h con diferentes líneas de DSC para determinar mediante Western-blot la expresión de caspasa-8 (A) y de caspasa-3 (B). En la figura C las células Jurkat fueron pretratadas con 5 ng/ml del anticuerpo anti-CD95 CH11 ó con 200 ng/ml de TRAIL (TRL) durante 30 minutos a 4 °C, antes de ser cocultivadas con las DSC. Como control de carga se muestra en todos los casos la expresión de  $\beta$ -actina.

### 6.3.2 Expresión de proteínas pro y anti-apoptóticas en células Jurkat cocultivadas con DSC.

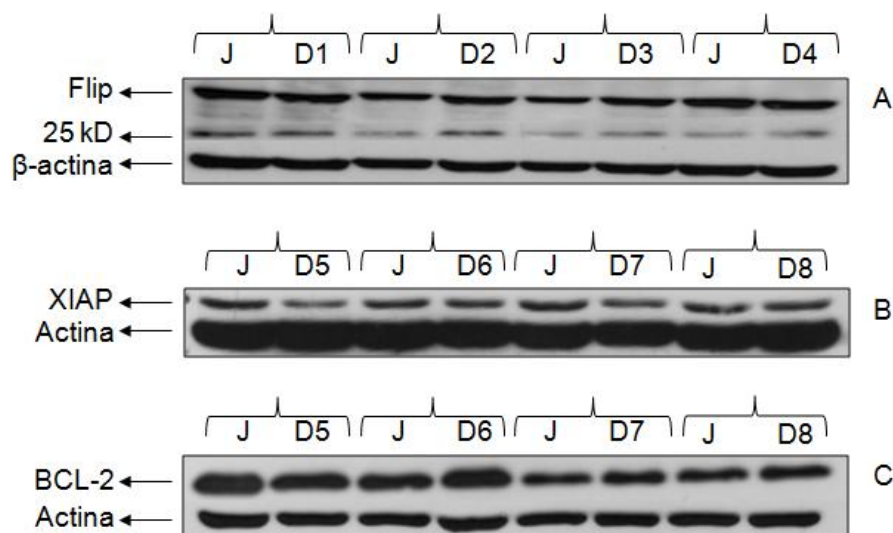
Además de las caspasas-3 y -8, analizamos la expresión de otras proteínas pro-apoptóticas implicadas en la apoptosis mediada por receptores de muerte y en la apoptosis por privación de factores de supervivencia, como Bid, Bim y Smac, en células Jurkat coincubadas con diferentes líneas de DSC (Figura 6-2A, B, C). De estas tres proteínas, solo encontramos cambios significativos y consistentes en el caso de la proteína Bim, para la

que observamos una clara reducción de todas sus isoformas en células Jurkat tras el cocultivo con diferentes líneas de DSC (Figura 6-2A).



**Figura 6-2. Expresión de las proteínas pro-apoptóticas Bim (A), Bid (B) y Smac (C) en células Jurkat cocultivadas sin (J) o con varias líneas de DSC (D5, D6, D7, D8), Como control de carga se muestra en todos los casos la expresión de β-actina.**

También quisimos analizar la regulación de otras proteínas, en este caso inhibidoras de la apoptosis, como c-FLIP, XIAP y Bcl-2, En este caso observamos que las DSC no inducían cambios significativos en la expresión de estas proteínas antiapoptóticas (Figura 6-3A, B, C).



**Figura 6-3.** Expresión de proteínas anti-apoptóticas c-FLIP (A), XIAP (B) y Bcl-2 (C) en células Jurkat cultivadas sin (J) o con diferentes líneas de DSC (D5, D6, D7, D8) durante 24 horas. Como control de carga utilizamos la  $\beta$ -actina en todos los experimentos realizados.

### 6.3.3 Regulación de la expresión de genes relacionados con apoptosis en células Jurkat cocultivadas con DSC.

Para ampliar el análisis de las posibles proteínas relacionadas con la inducción de apoptosis cuya expresión puede ser regulada en células Jurkat cocultivadas con DSC, decidimos realizar un Array de PCR utilizando un kit que permite determinar la expresión de 84 genes diferentes relacionados con este proceso de muerte celular. Para ello, se coincubaron células Jurkat durante 24 horas con una línea de DSC que garantizaba la protección de la apoptosis (línea DSCG2) (Figura 6-4) y se recogieron para extraer el ARN.

El resultado de la expresión de los genes amplificadas y analizados se describe en la (Tabla 6-1) y se representa en forma de barras en la (Figura 6-5). De los 84 genes analizados, solo encontramos cambios del orden de dos veces o superiores en la expresión de CD27, estando este gen regulado negativamente, es decir, que su expresión es menor, en células Jurkat coincubadas con DSC.



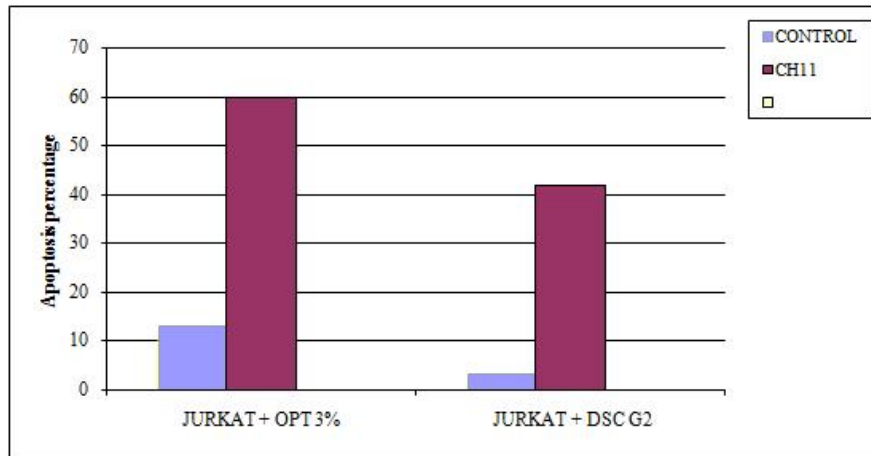


Figura 6-4. La línea DSC G2 reduce la apoptosis mediada por CD95 en células Jurkat. Células Jurkat fueron tratadas o no con anti-CD95 CH11 (2ng/ml) 30 minutos a 4°C, luego lavadas y colocadas en cultivo en ausencia o presencia de DSCG2 durante 24 horas. Para determinar el porcentaje de células apoptóticas las Jurkat fueron recogidas del cultivo y teñidas con yoduro de propidio, para ser analizadas en el citómetro de flujo.

Tabla 6-1 Expresión de genes involucrados en la ruta de apoptosis o de muerte celular programada. El array incluye los ligandos de la familia de TNF y sus respectivos receptores; miembros de las familias de Bcl-2, caspasas, IAP, TRAF, CARD, proteínas con dominio de muerte, proteínas con dominio efector de muerte y de la familia CIDE; así como genes involucrados en las rutas de p53 y ATM.

Símbolo	AVG $\Delta$ Ct (Ct(GOI) - Ave Ct (HKG))		Muestra/ Control
	Muestra	Control	
ABL1	5,58	5,39	-1,15
AKT1	2,60	3,38	1,72
APAF1	4,59	5,39	1,74
BAD	6,60	6,40	-1,15
BAG1	7,58	7,38	-1,15
BAG3	4,57	5,37	1,74
BAG4	4,60	4,38	-1,17
BAK1	5,58	5,37	-1,16
BAX	4,59	4,37	-1,17
BCL10	5,59	5,39	-1,15
BCL2	8,60	8,38	-1,16
BCL2A1	7,60	8,39	1,74
BCL2L1	5,58	5,39	-1,15
BCL2L10	13,69	13,48	-1,15
BCL2L11	5,63	5,43	-1,15

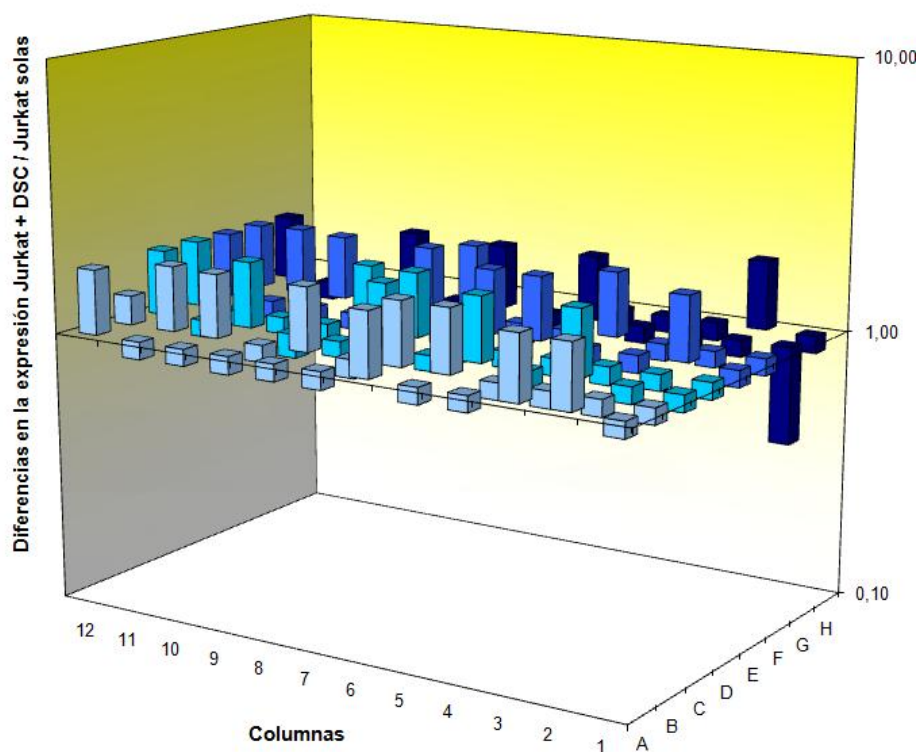
Tabla 6-1 (continuación)

Símbolo	AVG $\Delta$ Ct (Ct(GOI) - Ave Ct (HKG))		Muestra/Control
	Muestra	Control	
BCL2L2	11,58	11,38	-1,15
BCLAF1	4,60	5,38	1,72
BFAR	4,60	5,38	1,73
BID	6,59	6,37	-1,17
BIK	7,62	8,41	1,73
NAIP	6,59	6,39	-1,16
BIRC2	4,60	5,38	1,72
BIRC3	6,59	7,39	1,74
XIAP	6,04	6,39	1,28
BIRC6	6,62	6,42	-1,15
BIRC8	13,69	13,48	-1,15
BNIP1	5,60	6,42	1,76
BNIP2	3,61	3,40	-1,16
BNIP3	3,60	4,40	1,74
BNIP3L	3,59	3,40	-1,14
BRAF	8,61	9,39	1,72
NOD1	7,58	7,38	-1,14
CARD6	13,69	13,39	-1,22
CARD8	7,60	8,41	1,75
CASP1	13,69	13,48	-1,15
CASP10	9,58	10,38	1,74
CASP14	13,69	13,48	-1,15
CASP2	4,58	4,39	-1,15
CASP3	4,61	4,39	-1,17
CASP4	11,58	11,37	-1,16
CASP5	13,69	13,48	-1,15
CASP6	4,61	4,40	-1,16
CASP7	5,58	6,37	1,73
CASP8	9,60	10,41	1,74
CASP9	7,58	7,37	-1,16
CD40	13,69	13,48	-1,15
CD40LG	11,59	11,40	-1,14
CFLAR	7,58	8,38	1,75
CIDEA	13,69	13,48	-1,15
CIDEB	6,62	7,42	1,74
CRADD	5,61	5,39	-1,16
DAPK1	8,60	8,39	-1,16
DFFA	5,60	6,38	1,72

Tabla 6-1 (continuación)

Símbolo	AVG $\Delta$ Ct (Ct(GOI) - Ave Ct (HKG))		Muestra/Control
	Muestra	Control	
FADD	4,58	5,37	1,73
FAS	5,60	5,39	-1,16
FASLG	13,69	13,48	-1,15
GADD45A	11,60	11,40	-1,15
HRK	10,58	10,37	-1,15
IGF1R	6,60	6,39	-1,16
LTA	10,60	11,39	1,73
LTBR	13,69	13,48	-1,15
MCL1	3,59	3,39	-1,15
NOL3	6,60	6,40	-1,15
PYCARD	12,60	13,39	1,74
RIPK2	13,69	13,48	-1,15
TNF	13,69	13,40	-1,22
TNFRSF10A	12,59	13,48	1,86
TNFRSF10B	5,60	6,39	1,73
TNFRSF11B	13,69	13,48	-1,15
TNFRSF1A	11,61	12,40	1,72
TNFRSF21	5,60	6,41	1,75
TNFRSF25	11,60	12,39	1,73
<b>CD27</b>	<b>9,58</b>	<b>8,39</b>	<b>-2,28</b>
TNFRSF9	13,69	13,48	-1,15
TNFSF10	9,58	9,38	-1,15
CD70	8,58	8,37	-1,15
TNFSF8	11,58	12,37	1,73
TP53	7,60	7,39	-1,16
TP53BP2	6,60	7,38	1,72
TP73	13,69	13,48	-1,15
TRADD	5,58	6,38	1,73
TRAF2	5,58	5,38	-1,14
TRAF3	3,60	3,39	-1,16
TRAF4	3,60	4,39	1,73

Los valores mostrados, calculados mediante la fórmula arriba indicada, representan la expresión de los genes indicados en células Jurkat cocultivadas con la línea DSC G2 (muestra) o solas (control) durante 24 horas, así como la relación entre dichos valores (muestra/control). Se resalta el gen CD27 en el cual esta relación es <2.



**Figura 6-5.** Representación gráfica de los valores mostrados en la Tabla 6-1. Las barras muestran la diferencia en la expresión de los genes analizados en las células Jurkat cocultivadas con DSC con respecto a las células Jurkat control (cultivadas sin DSC).

### **6.3.4 El efecto protector de las células DSC sobre la viabilidad de los linfocitos no está mediado por la IL-6**

Las DSC protegen de la apoptosis a las células Jurkat y a los linfocitos primarios sin requerir para ello el contacto célula-célula, como habíamos demostrado con los experimentos realizados en cámaras Transwell. Concluimos por tanto que las DSC secretan factores endógenos solubles que de alguna manera le confieren a los linfocitos resistencia a la apoptosis. La IL-6 es una de las citocinas secretadas por las células DSC [3] y se ha descrito que participa en la activación de la rutas de supervivencia generando resistencia a la apoptosis mediada por ligandos de muerte [4]. Decidimos analizar si el efecto protector de las DSC podía deberse a la producción de IL-6 tratando células Jurkat con diferentes concentraciones de IL-6 recombinante e induciendo apoptosis con el anticuerpo CH11.

Como se observa en la Figura 6-6, la IL-6 no rescata a las células Jurkat de la apoptosis mediada por CD95.

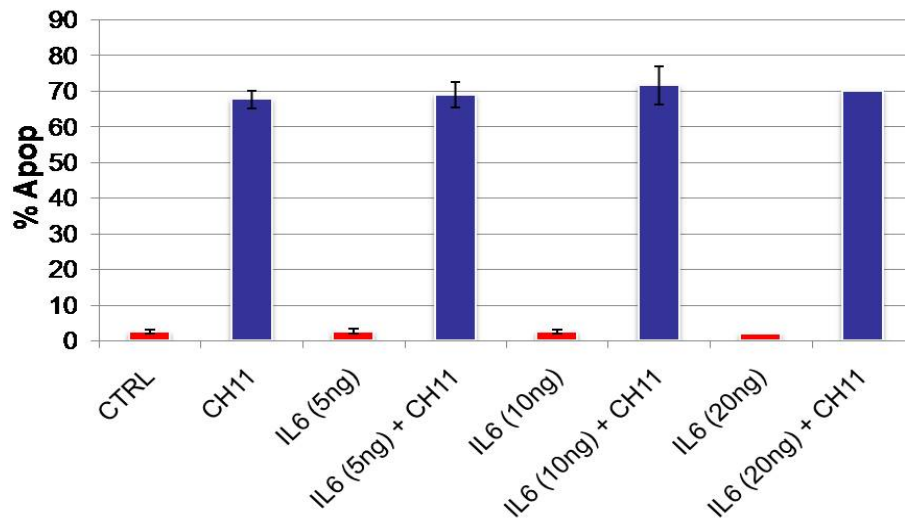


Figura 6-6. Efectos de la IL-6 en células Jurkat. Las células Jurkat fueron cultivadas sin o con diferentes concentraciones de IL-6 recombinante (5, 10, 20ng/ml) y en presencia o ausencia del anticuerpo anti-CD95 CH11 (2ng/ml) durante 24 horas. El porcentaje de células apoptóticas en la fase sub-G1 del ciclo celular fue analizado mediante citometría de flujo.

## 6.4 Bibliografía de los Resultados

- [1] Gong, J., Traganos, F. and Darzynkiewicz, Z. (1994). A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem* 218, 314-9.
- [2] Wang, K.K., Liu, N., Radulovich, N., Wigle, D.A., Johnston, M.R., Shepherd, F.A., Minden, M.D. and Tsao, M.S. (2002). Novel candidate tumor marker genes for lung adenocarcinoma. *Oncogene* 21, 7598-604.
- [3] Montes, M.J., Tortosa, C.G., Borja, C., Abadia, A.C., Gonzalez-Gomez, F., Ruiz, C. and Olivares, E.G. (1995). Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am J Reprod Immunol* 34, 188-94.
- [4] Kobayashi, S., Werneburg, N.W., Bronk, S.F., Kaufmann, S.H. and Gores, G.J. (2005). Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology* 128, 2054-65.

## 7 Discusión general

En nuestros resultados observamos que las DSC expresan HLA-G. Esta expresión ha sido demostrada tanto en células DSC cultivadas como células frescas. El HLA-G es una molécula no clásica de clase Ib del HLA que ha sido encontrada inicialmente en las células el trofoblasto y de la placenta humana [1]. En las últimas décadas ha sido reportado por varios investigadores la expresión de esta molécula en diferentes tejidos, como en el epitelio tímico adulto [2], células endoteliales [3], células monucleares [4], células tumorales [5], mucosas de intestino [6] y muy recientemente en células MSC derivadas de decidua [7]. También se ha visto que esta molécula es modulada por diferentes agentes como hormonas, citocinas y virus. Lafon et al., lograron demostrar que los virus neurotrópicos (Herpes simple tipo I y el de la rabia) estimulan la expresión de HLA-G en las células neuronales humanas [8], mientras que el virus HIV disminuye la expresión del HLA-G en las células de glioma y de macrófagos [9].

Otro aspecto importante en relación con la expresión y función de esta molécula es la acción que tiene diferentes citocinas sobre la expresión de HLA-G; se ha observado que la IL-10 aumenta los niveles de expresión del HLA-G en las células de linfoma cutáneo, y que esta expresión sería la responsable de que estas células escaparan del ataque inmunológico [10]. También se ha observado que líneas de macrófagos y monocitos de sangre periférica que constitutivamente expresaban mARN HLA-G, cuando son tratadas con diferentes dosis de IFN- $\gamma$ , aumentan la expresión del mARN HLA-G y expresan la proteína tanto intracitoplasmática como extracelular [4].

Es interesante destacar que en las células del endotelio humano obtenidas de corazón, que no expresaban constitutivamente HLA-G, cuando fueron tratadas con citocinas (IL-10, IFN- $\gamma$ ), agentes inmunosupresores y progesterona sólo se observó la expresión de HLA-G en las células que habían sido tratadas con progesterona. Esta expresión fue analizada por

citometría de flujo y ELISA. Por tanto, la progesterona induce la expresión de ambas formas de HLA-G tanto soluble como de membrana [11].

Conocemos que la progesterona es la hormona del embarazo y que esta sustancia es la responsable de la regulación y funcionamiento del endometrio gestante. Esta hormona induce la decidualización de las preDSC *in vivo e in vitro*. [12-14]. Por otro lado, la expresión de HLA-G ha sido exhaustivamente investigada en diferentes tejidos de la interfase materno-fetal, en donde la progesterona ha logrado aumentar la expresión del HLA-G en las células JEG-3 (coriocarcinoma del trofoblasto) [15]. Por este motivo es lógico pensar en estudiar la expresión de HLA-G en las células DSC. En nuestros resultados pudimos observar como las citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$  modulaban esta expresión, pero el dato más interesante fue como las células tratadas con progesterona se volvían positivas y en aquellas que normalmente expresaban esta molécula, al ser tratadas aumentaba la expresión de HLA-G. Es difícil explicar el hecho de que antes no se hubiese detectado esta molécula en las DSC, pero creemos que ha sido por los diferentes métodos utilizados para la decidualización de las DSC y para la detección de HLA-G; además la expresión de esta molécula en este tejido es moderada.

En esta tesis también observamos como las DSC protegen de la apoptosis a los linfocitos T humanos, y que esta protección puede deberse a la capacidad que tienen estas células de regular la expresión de ciertas proteínas de la ruta apoptótica y de moléculas de superficie en los linfocitos T Jurkat.

Se ha descrito que durante la gestación, el útero y la placenta humana son zonas inmunológicamente privilegiadas, en las cuales la actividad inmunológica disminuye eficazmente [16].

Se ha observado como las DSC influyen en la proliferación y la supervivencia de las propias NK deciduales [17, 18]. Por otro lado tampoco se han encontrado leucocitos apoptóticos durante las primeras etapas del embarazo [19]. Uno de los mecanismos claves por los que las DSC regulan la supervivencia de las células es por la secreción de diversos factores de crecimiento como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL- $\beta$ , IL-6 e IL-11 entre otros [20-22]. La capacidad que tiene estos factores de proteger de la apoptosis o de influir en la proliferación de diferentes



células está descrita en varios contextos [23]. Esto podría indicar un mecanismo por el que nuestras DSC regulen proteínas que favorezcan la supervivencia de los linfocitos. Se ha visto una alta expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 en las NK uterinas obtenidas del endometrio de la fase secretora en la mujer embarazada. Por lo que el embarazo está asociado a la supervivencia de las células NK uterinas [17].

Nuestros resultados han demostrado que las DSC disminuyen la actividad de las caspasas -3, -8 y la expresión de Bim en los linfocitos T Jurkat. Esto implica que las DSC pueden ejercer una regulación de los mecanismos apoptóticos de otras células. Okada et al., 2000 [24], indicó que la progesterona inducía la secreción de IL-15 en las DSC; otros autores encontraron que esta citocina disminuye la actividad de las caspasa 3- y -8 en los neutrófilos o la expresión de Bim en los linfocitos [25, 26]. En base a nuestros resultados y los hallazgos de estos autores mencionados arriba, podemos sugerir que uno de los mecanismos de inhibición de la apoptosis en los linfocitos es a través de la disminución de la actividad de las caspasas-3, -8 y de la expresión de Bim. Para demostrar que estas proteínas pueden reguladas por la producción de IL-15 por parte de las DSC se requieren futuros estudios. Tal como he mencionado acerca de la IL-15, Masuda et al., 2001 [27] demostró que esta citocina rescata de la apoptosis a los mastocitos cuando previamente han sido tratados con un inductor de apoptosis. No conocemos que otros investigadores hayan detectado en las DSC o su equivalente ESC efectos protectores hacia los linfocitos, pero si se ha descrito que estas células son productoras de citocinas (descritas en esta tesis) que tienen una influencia en la supervivencia de los linfocitos. Recientemente se ha demostrado que la decidua contiene células mesenquimales estromales deciduales (MSCd) [28] las cuales tienen efectos anti-apoptóticos sobre los linfocitos [29,30] y neutrófilos [31] por lo que estos datos apoyarían a un más el efecto protector de las DSC.

Este grupo también logró demostrar que la IL-6 es el principal factor anti-apoptótico de los linfocitos, ya que las MSC producen cantidades significativas de IL-6. La IL-6 fue seleccionada para la realización de nuestros experimentos, siendo que esta es expresada por las DSC [20, 32]. En nuestro modelo la IL-6 recombinante no tuvo ningún efecto anti-apoptótico. Podemos sugerir que la cantidad de IL-6 secretada por las DSC quizás no sea suficiente para ejercer este efecto o puede ser que IL-6 actué sinérgicamente con otras citocinas secretadas por las DSC. Por último observamos que las DSC regulan

negativamente la expresión génica de CD27 en las células Jurkat. CD27 es un miembro de la familia del receptor del TNF y se ha descrito el papel que tiene en la coestimulación, proliferación y diferenciación de las células B y T [33, 34], aunque también se ha descrito que puede inducir apoptosis a ciertos tipos de células T y B activados [35]. Concluyendo las DSC ejercen por diferentes mecanismos la protección y supervivencia de los linfocitos.

## 7.1 Bibliografía de la discusión

- [1] Kovats, S., Main, E.K., Librach, C., Stubblebine, M., Fisher, S.J. and DeMars, R. (1990). A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 248, 220-3.
- [2] Mallet, V. et al. (1999). HLA-G in the human thymus: a subpopulation of medullary epithelial but not CD83(+) dendritic cells expresses HLA-G as a membrane-bound and soluble protein. *Int Immunol* 11, 889-98.
- [3] Blaschitz, A., Lenfant, F., Mallet, V., Hartmann, M., Bensussan, A., Geraghty, D.E., Le Bouteiller, P. and Dohr, G. (1997). Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G. *Eur J Immunol* 27, 3380-8.
- [4] Yang, Y., Chu, W., Geraghty, D.E. and Hunt, J.S. (1996). Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by IFN-gamma. *J Immunol* 156, 4224-31.
- [5] Wiendl, H. et al. (2002). A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J Immunol* 168, 4772-80.
- [6] Torres, M.I., Lopez-Casado, M.A., Luque, J., Pena, J. and Rios, A. (2006). New advances in coeliac disease: serum and intestinal expression of HLA-G. *Int Immunol* 18, 713-8.
- [7] Ivanova-Todorova, E. et al. (2009). HLA-G expression is up-regulated by progesterone in mesenchymal stem cells. *Am J Reprod Immunol* 62, 25-33.
- [8] Lafon, M. et al. (2005). Modulation of HLA-G expression in human neural cells after neurotropic viral infections. *J Virol* 79, 15226-37.
- [9] Derrien, M., Pizzato, N., Dolcini, G., Menu, E., Chaouat, G., Lenfant, F., Barre-Sinoussi, F. and Bouteiller, P.L. (2004). Human immunodeficiency virus 1 downregulates

cell surface expression of the non-classical major histocompatibility class I molecule HLA-G1. *J Gen Virol* 85, 1945-54.

[10] Urosevic, M., Willers, J., Mueller, B., Kempf, W., Burg, G. and Dummer, R. (2002). HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. *Blood* 99, 609-17.

[11] Sheshgiri, R., Rao, V., Tumiati, L.C., Xiao, R., Prodger, J.L., Badiwala, M., Librach, C. and Delgado, D.H. (2008). Progesterone induces human leukocyte antigen-g expression in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circulation* 118, S58-64.

[12] Gellersen, B., Brosens, I.A. and Brosens, J.J. (2007). Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med* 25, 445-53.

[13] Gellersen, B. and Brosens, J. (2003). Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol* 178, 357-72.

[14] Critchley, H.O., Kelly, R.W., Brenner, R.M. and Baird, D.T. (2001). The endocrinology of menstruation--a role for the immune system. *Clin Endocrinol (Oxf)* 55, 701-10.

[15] Yie, S.M., Li, L.H., Li, G.M., Xiao, R. and Librach, C.L. (2006). Progesterone enhances HLA-G gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and human cytotrophoblasts in vitro. *Hum Reprod* 21, 46-51.

[16] Streilein, J.W. (1995). Unraveling immune privilege. *Science* 270, 1158-9.

[17] King, A., Gardner, L. and Loke, Y.W. (1999). Co-stimulation of human decidual natural killer cells by interleukin-2 and stromal cells. *Hum Reprod* 14, 656-63.

[18] Germeyer, A. et al. (2009). Paracrine effects of uterine leucocytes on gene expression of human uterine stromal fibroblasts. *Mol Hum Reprod* 15, 39-48.

- [19] Kayisli, U.A., Selam, B., Guzeloglu-Kayisli, O., Demir, R. and Arici, A. (2003). Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system. *J Immunol* 171, 2305-13.
- [20] Montes, M.J., Tortosa, C.G., Borja, C., Abadia, A.C., Gonzalez-Gomez, F., Ruiz, C. and Olivares, E.G. (1995). Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am J Reprod Immunol* 34, 188-94.
- [21] Engert, S., Rieger, L., Kapp, M., Becker, J.C., Dietl, J. and Kammerer, U. (2007). Profiling chemokines, cytokines and growth factors in human early pregnancy decidua by protein array. *Am J Reprod Immunol* 58, 129-37.
- [22] Dimitriadis, E., Robb, L. and Salamonsen, L.A. (2002). Interleukin 11 advances progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 8, 636-43.
- [23] Lockwood, C.J., Krikun, G., Hickey, M., Huang, S.J. and Schatz, F. (2009). Decidualized human endometrial stromal cells mediate hemostasis, angiogenesis, and abnormal uterine bleeding. *Reprod Sci* 16, 162-70.
- [24] Okada, H., Nakajima, T., Sanezumi, M., Ikuta, A., Yasuda, K. and Kanzaki, H. (2000). Progesterone enhances interleukin-15 production in human endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 4765-70.
- [25] Opferman, J.T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M.D., Ong, C.C. and Korsmeyer, S.J. (2003). Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 426, 671-6.
- [26] Bouchard, A., Rathe, C. and Girard, D. (2004). Interleukin-15 delays human neutrophil apoptosis by intracellular events and not via extracellular factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8. *J Leukoc Biol* 75, 893-900.
- [27] Masuda, A., Matsuguchi, T., Yamaki, K., Hayakawa, T. and Yoshikai, Y. (2001). Interleukin-15 prevents mouse mast cell apoptosis through STAT6-mediated Bcl-xL expression. *J Biol Chem* 276, 26107-13.

- [28] Dimitrov, R., Kyurkchiev, D., Timeva, T., Yunakova, M., Stamenova, M., Shterev, A. and Kyurkchiev, S. (2008). First-trimester human decidua contains a population of mesenchymal stem cells. *Fertil Steril*
- [29] Xu, G., Zhang, Y., Zhang, L., Ren, G. and Shi, Y. (2007). The role of IL-6 in inhibition of lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 361, 745-50.
- [30] Ayroldi, E., Zollo, O., Cannarile, L., F, D.A., Grohmann, U., Delfino, D.V. and Riccardi, C. (1998). Interleukin-6 (IL-6) prevents activation-induced cell death: IL-2-independent inhibition of Fas/fasL expression and cell death. *Blood* 92, 4212-9.
- [31] Raffaghello, L., Bianchi, G., Bertolotto, M., Montecucco, F., Busca, A., Dallegri, F., Ottonello, L. and Pistoia, V. (2008). Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* 26, 151-62.
- [32] Jauniaux, E., Gulbis, B., Schandene, L., Collette, J. and Hustin, J. (1996). Distribution of interleukin-6 in maternal and embryonic tissues during the first trimester. *Mol Hum Reprod* 2, 239-43.
- [33] Hase, H., Kanno, Y., Kojima, H., Morimoto, C., Okumura, K. and Kobata, T. (2002). CD27 and CD40 inhibit p53-independent mitochondrial pathways in apoptosis of B cells induced by B cell receptor ligation. *J Biol Chem* 277, 46950-8.
- [34] Hintzen, R.Q., de Jong, R., Lens, S.M. and van Lier, R.A. (1994). CD27: marker and mediator of T-cell activation? *Immunol Today* 15, 307-11.
- [35] Prasad, K.V., Ao, Z., Yoon, Y., Wu, M.X., Rizk, M., Jacquot, S. and Schlossman, S.F. (1997). CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6346-51.

## **8 Conclusiones**

1. Las DSC humanas expresan HLA-G.
2. La IL-10, el IFN $\gamma$  y la progesterona incrementan los niveles de expresión de HLA-G en las DSC.
3. Las DSC expresan CD95L pero no tienen capacidad de inducir apoptosis en los linfocitos T Jurkat.
4. Las DSC protegen a los linfocitos T Jurkat de la apoptosis inducida por diferentes ligandos de muerte mediante la secreción de factores solubles.
5. Las DSC inhiben la apoptosis espontánea de los linfocitos de sangre periférica y deciduales humanos.
6. Las DSC son resistentes a la inducción de apoptosis mediante ligandos de muerte.

## **Anexos**





# Human decidual stromal cells express HLA-G Effects of cytokines and decidualization

Osmany Blanco<sup>1</sup>, Irene Tirado<sup>1</sup>, Raquel Muñoz-Fernández<sup>1</sup>, Ana Clara Abadía-Molina<sup>1</sup>, Jose Marcos García-Pacheco<sup>2</sup>, Jose Peña<sup>3</sup> and Enrique G. Olivares<sup>1,4,5</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Biología Molecular 3 e Inmunología, Facultad de Medicina, Unidad de Inmunología, Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, Universidad de Granada, 18012-Granada, Spain; <sup>2</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain; <sup>3</sup>Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, Spain; <sup>4</sup>Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario 'San Cecilio', Servicio Andaluz de Salud, Granada, Spain

<sup>5</sup>Correspondence address. Tel: +34-958-243107; Fax: +34-958-249015; E-mail: engarcia@ugr.es

**BACKGROUND:** Decidual stromal cells (DSC) are the main cellular component of the decidua, the maternal tissue in close contact with fetal trophoblast. Although of mesenchymal origin, DSC exert numerous immune functions that seem to be relevant for the immunological relationship between the mother and fetus. HLA-G, an antigen preferentially expressed by trophoblast, appears to participate in the immune tolerance by the mother of the semiallogeneic fetus. **METHODS AND RESULTS:** We show by flow cytometry, fluorescence microscopy, western blotting and RT-PCR that DSC isolated and maintained in culture express HLA-G weakly but consistently. We also detected this antigen by flow cytometry in fresh DSC. Interleukin (IL)-10, a cytokine associated with normal pregnancy, increased the expression of HLA-G by DSC ( $P < 0.00001$ ), whereas IL-2, a cytokine involved in spontaneous abortion, showed no effect. Decidualization by progesterone and cAMP also up-regulated the expression of HLA-G by DSC ( $P < 0.001$ ). Interferon  $\gamma$ , a cytokine implicated in the vascular remodelling of the decidua necessary for embryo implantation, also increased the expression of HLA-G by DSC ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSIONS:** Our results suggest the existence of a network in which hormones together with cytokines regulate the expression of HLA-G by DSC, and that may be of relevance in the maintenance of maternal–fetal tolerance.

**Keywords:** decidual stromal cell; HLA-G; interferon  $\gamma$ ; interleukin-10; progesterone

## Introduction

Successful pregnancy has been considered an example of semi-allogeneic graft acceptance in which the semiallogeneic fetus is protected from the mother's immune system. Immunological interrelations between the mother and fetus during pregnancy are believed to take place in the decidua, the maternal tissue in closest contact with the fetal trophoblast. Decidual stromal cells (DSC) are the main cellular component of the decidua. These cells comprise a distinctive class whose origin and lineage remained unknown until recently. DSC exert different immune activities that appear to be of relevance in the immunological cross-talk between the mother and the fetus, and that may lead to either a normal pregnancy or abortion (Kimatrai *et al.*, 2003, 2005). We have been able to isolate and maintain highly purified cultures of DSC, which allowed us to demonstrate that human DSC are related to bone marrow stromal precursors (García-Pacheco *et al.*, 2001), and that their morphology, phenotype and functions are similar to

those of myofibroblasts, fibroblastic cells with contractile activity which are involved in wound retraction (Oliver *et al.*, 1999; Kimatrai *et al.*, 2003, 2005), and also to follicular dendritic cell (Muñoz-Fernández *et al.*, 2006).

Among the multiple immune mechanisms that control maternal–fetal tolerance during normal pregnancy, human leukocyte antigen G (HLA-G) seems to play a key role. This antigen, which was discovered in trophoblast, is preferentially expressed at high intensity by this tissue (Kovats *et al.*, 1990). The low number of HLA-G alleles reduce the possibility of allogeneic reaction by the maternal cytotoxic T lymphocytes against the trophoblast (Hunt *et al.*, 2005). Furthermore, the potential cytotoxicity of decidual natural killer (NK) cells against trophoblast is probably blocked by inhibitory receptors that bind HLA-G, and that are expressed by these NK cells (Rouas-Freiss *et al.*, 1997; Khalil-Daher *et al.*, 1999). Here, we show that human DSC express low but significant levels of HLA-G, and that this expression can be modulated by cytokines and decidualization.

## Materials and Methods

### Tissues

Twenty-three samples from elective vaginal terminations of first trimester pregnancy (6–11 weeks) from healthy patients aged 20–30 years were used. We excluded women receiving any medication or with infectious, autoimmune or other systemic or local diseases. None of the abortions was pharmacologically induced. The specimens were obtained by vaginal curettage at the Clínica El Sur in Málaga or the Clínica Ginegranada in Granada. Informed consent was obtained from each patient. This study was approved by the research and ethics committee of the Hospital Universitario de San Cecilio in Granada.

### Isolation and culture of DSC lines

To establish DSC lines, decidual tissues were examined histologically to exclude the presence of infection or inflammatory infiltration. Samples of decidua from different patients were not pooled so as to avoid inducing cytokine secretion as a result of the allogeneic reaction of leukocytes that initially contaminate DSC cultures. Tissues were thoroughly washed in phosphate-buffered saline (PBS) solution, and the decidua was carefully freed from the trophoblast. Decidual fragments were finely minced between two scalpels in a small volume of RPMI 1640 medium with 100 U/ml penicillin and 50 µg/ml gentamicin, and put in a solution of 0.5% trypsin and 0.2% EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 15 min at 37°C. The proteolytic reaction of trypsin was stopped by adding cold RPMI with 20% fetal calf serum (FCS) (Life Technologies, Inc., Paisley, UK); the suspension was then filtered through gauze and centrifuged at 425g for 10 min. The supernatant was discarded and the cell pellet was suspended in RPMI and centrifuged on Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) for 20 min at 600 g. Cells were collected from the interface, suspended in PBS, and washed. This suspension was incubated in culture flasks for 1 h in complete RPMI with 10% FCS to allow macrophages and granulocytes to adhere to the flask. The supernatant was washed and incubated in Opti-Minimum Essential Medium (Opti-MEM, Invitrogen, Paisley, UK) with 100 U/ml penicillin and 50 µg/ml gentamicin, and 2% FCS. After overnight incubation to allow DSC to adhere to the flask, non-adherent cells in the supernatant were discarded. The remaining adherent cells were mainly DSC. Opti-MEM was then replaced and changed twice a week, and after 2–4 weeks, adherent cells covered the whole surface of the 25-cm<sup>2</sup> culture flask. Proliferating DSC overgrew other possible contaminant cells such as trophoblast cells or leukocytes, thus further guaranteeing the purity of the cultures. Purity was further confirmed using flow cytometry to detect the co-expression of CD10 and CD29, and the lack of CD45 (which identifies leukocytes) and cytokeratin (which detects epithelial cells and trophoblast) by 95–100% of DSC (Montes *et al.*, 1996; Oliver *et al.*, 1999; Garcia-Pacheco *et al.*, 2001; Kimatrai *et al.*, 2003, 2005). With this procedure we obtained 18 finite DSC lines which were assigned individual names. In Opti-MEM, cell lines proliferated for 8–12 weeks before extinction; during this period their antigen phenotype was stable.

### Isolation of fresh DSC

To obtain a suspension of fresh cells containing DSC, we used a protocol similar to that reported by Montes *et al.* (1996). The decidua was washed in PBS and minced between two scalpels in a small volume of RPMI 1640 with 10% FCS. The cell suspension was filtered through sterile gauze, washed by centrifugation and suspended in culture medium. This suspension was centrifuged at 650g for 30 min over a discontinuous gradient of 20 and 30% Percoll (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden). Cells were

collected from the 20/30% interphase and washed in PBS. Five decidua samples were studied independently by flow cytometry.

### Reagents

Human interleukin (IL)-10, interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), progesterone and 8-Bromo-cAMP were purchased from Sigma-Aldrich. Recombinant human IL-2 was obtained through the acquired immune deficiency syndrome (AIDS) Research and Reference programme (National Institute of Health, Rockville, MD, USA).

### Treatment of DSC

DSC isolated and maintained in culture as indicated above were cultured for 48 h with 10 ng/ml IL-10 or 10 ng/ml IFN $\gamma$  or 50 IU/ml IL-2. To induce decidualization, DSC were treated with 300 nM progesterone and 500 µM cAMP for 15 days. Decidualization was assessed by changes in cell morphology, and secretion of prolactin (PRL).

### Flow cytometry analysis

Cultured DSC were detached from the culture flask by treatment with 0.04% EDTA at 37°C. The cells were centrifuged, the supernatant was discarded, and the pellet was suspended in PBS at 10<sup>6</sup> cells/ml. For direct staining, 100 µl of the cell suspension was incubated with 10 µl of the appropriate monoclonal antibody (mAb) for 30 min at 4°C in the dark. Cells were washed, suspended in 0.5 ml PBS and immediately analysed in a flow cytometer (Ortho-Cyturon, Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ, USA). To identify dead cells we incubated DSC with propidium iodide (Sigma-Aldrich). The percentage of cells that were antibody-positive was calculated by comparison with the appropriate isotype control. For double labelling, we followed the same procedure except that a second mAb with a fluorescent marker different from that of the first mAb was also added. For intracytoplasmic labelling, DSC were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at 4°C and permeabilized with cold acetone for 10 min before the mAb was added. DSC were stained with the following mAbs: HLA-G (MEM-G/9)- fluorescein isothiocyanate (FITC) (Abcam, Cambridge, UK), cytokeratin (CAM 5.2), phycoerythrin (PE) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CD10-PE (DAKO, Glostrup, Denmark), CD14-PE, CD-45-FITC (Sigma-Aldrich), CD23-FITC (The Binding Site, Birmingham, UK) and CD29-FITC (Caltag, San Francisco, CA, USA). Fresh DSC were gated based on side scatter and CD10 antigen expression.

### Immunofluorescence microscopy

DSC were plated onto slides in Opti-MEM. After 24 h cells were washed with PBS, and HLA-G (MEM-G/9)-FITC was added. As negative control, an immunoglobulin G1-FITC isotype control was used (Sigma-Aldrich). Preparations were examined with a Leica microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

### RT-PCR

Total RNA from cells was extracted by the Ultraspec RNA isolation method according to the manufacturer's protocol (Biotecx Laboratories, Inc., Houston, TX, USA). A single-strand complementary DNA copy was made from total RNA using random hexamers (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and Moloney murine leukaemia virus H minus ribonuclease reverse transcriptase (Promega Corp., Madison, WI, USA). After heating to 65°C for 5 min and quickly cooling to 4°C in a thermal cycler (Geneamp PCR System 9600, PerkinElmer/Cetus, Norwalk, CT, USA) for denaturation, reverse transcription was performed for 1 h at 37°C. Starting with the equivalent of 75 ng RNA, amplification was

carried out in a total volume of 12.5  $\mu$ l of the amplification mix, 10 mM Tris (trishydroxymethylaminomethane)-Cl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin, 0.2 mM deoxy-NTPs, 5% glycerol, 0.25 mM of each primer and 0.02 U/ml *Taq* DNA polymerase (Promega Corp.). After incubation for 5 min at 96°C, each cycle consisted of 94°C for 30 s, 57°C for 30 s and 72°C for 30 s, for a total of 32 cycles. Oligonucleotide sequences for HLA-G were designed according to sequences available from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) and synthesized by Genset (Paris, France): 5'-CCACTCCATGAGGTATTTTCAG-3' (forward) and 5'-GGTCCTCGTTCAGGGCGAG-3' (reverse) (389 bp). The PCR products were size-separated on ethidium bromide-stained 2% agarose gels, and a 100-bp DNA ladder was included in each gel.

#### Western immunoblotting

Cells were lysed with 1% Nonidet P-40 lysis buffer containing protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), diluted 1:1 in 2 $\times$  concentrated electrophoresis sample buffer [125 mM Tris pH 6.8, 4% sodium dodecyl sulphate (SDS), 10% glycerol, 0.006% bromophenol blue, 1.8% beta-mercaptoethanol], heated at 95°C for 5 min, resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (10% polyacrylamide gels, reducing conditions) and electrotransferred to Hybond-P polyvinylidene difluoride membranes (Amersham). Membranes were blocked with 5% non-fat milk and probed for 1 h at room temperature with an anti-HLA-G mAb (MEM-G/1) (Abcam) followed by incubation for 1 h at room temperature with horse-radish peroxidase-labelled goat anti-mouse antibody (Caltag). The immune reaction was developed by chemiluminescence (ECL, Amersham) and exposed to autoradiographs (Amersham). Loading controls were carried out by rehybridization of stripped membranes with an anti-extracellular regulated kinase (ERK) polyclonal antibody (anti-mitogen-activated protein kinase one-half, Upstate Biotechnology, UK) or with monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich). Bands were quantified by densitometry.

#### Determination of PRL and IL-10 in the culture supernatants

To determine the concentration of PRL, supernatants from confluent DSC cultures were collected. The presence of PRL was studied with an electrochemiluminescence immunoassay (Roche, Indianapolis, IN, USA). Concentrations of IL-10 in the supernatants of the DSC cultures were determined by a commercially available enzyme immunoassay (R&D, Minneapolis, MN, USA). The assays were performed according to the manufacturer's instructions, and all samples were determined in duplicate.

#### Statistical analysis

Constitutive or induced expression of HLA-G by different DSC lines was compared with Student's *t*-test. A *P*-value of 0.05 was considered statistically significant. Quantitative results of the electroluminescence assay were carried out in triplicate or quadruplicate and expressed as mean  $\pm$  SD.

## Results

#### Expression of HLA-G by cultured DSC

In culture, DSC proliferate and overgrow any non-proliferating cells, leading to a practically pure population of spindle-shaped DSC (Fig. 1), with no contaminating trophoblast, epithelial cells or leukocytes. This procedure has been used to study DSC lines in previous reports in which the phenotypical and functional characteristics of these cells were determined

(Montes *et al.*, 1996; Oliver *et al.*, 1999; Garcia-Pacheco *et al.*, 2001; Kimatrai *et al.*, 2003, 2005). With Opti-MEM, we obtained DSC lines, which with weekly passages, proliferated for 8–12 weeks. By flow cytometry, almost all DSC co-expressed CD29 and CD10 and lacked CD45 and cytokeratin. These cells also expressed HLA-G weakly, although consistently (Fig. 1). The intensity of expression of HLA-G varied among the different DSC lines (range: 2–20% positive cells). This variation was expected, as DSC lines are polyclonal normal cells which, as previously reported, can vary in their functional properties (Kimatrai *et al.*, 2003, 2005). By immunofluorescence, we observed HLA-G-positive cells with the typical fibroblastic morphology. These findings were supported by the detection of mRNA for HLA-G by RT-PCR (Fig. 1).

#### Expression of HLA-G by fresh DSC

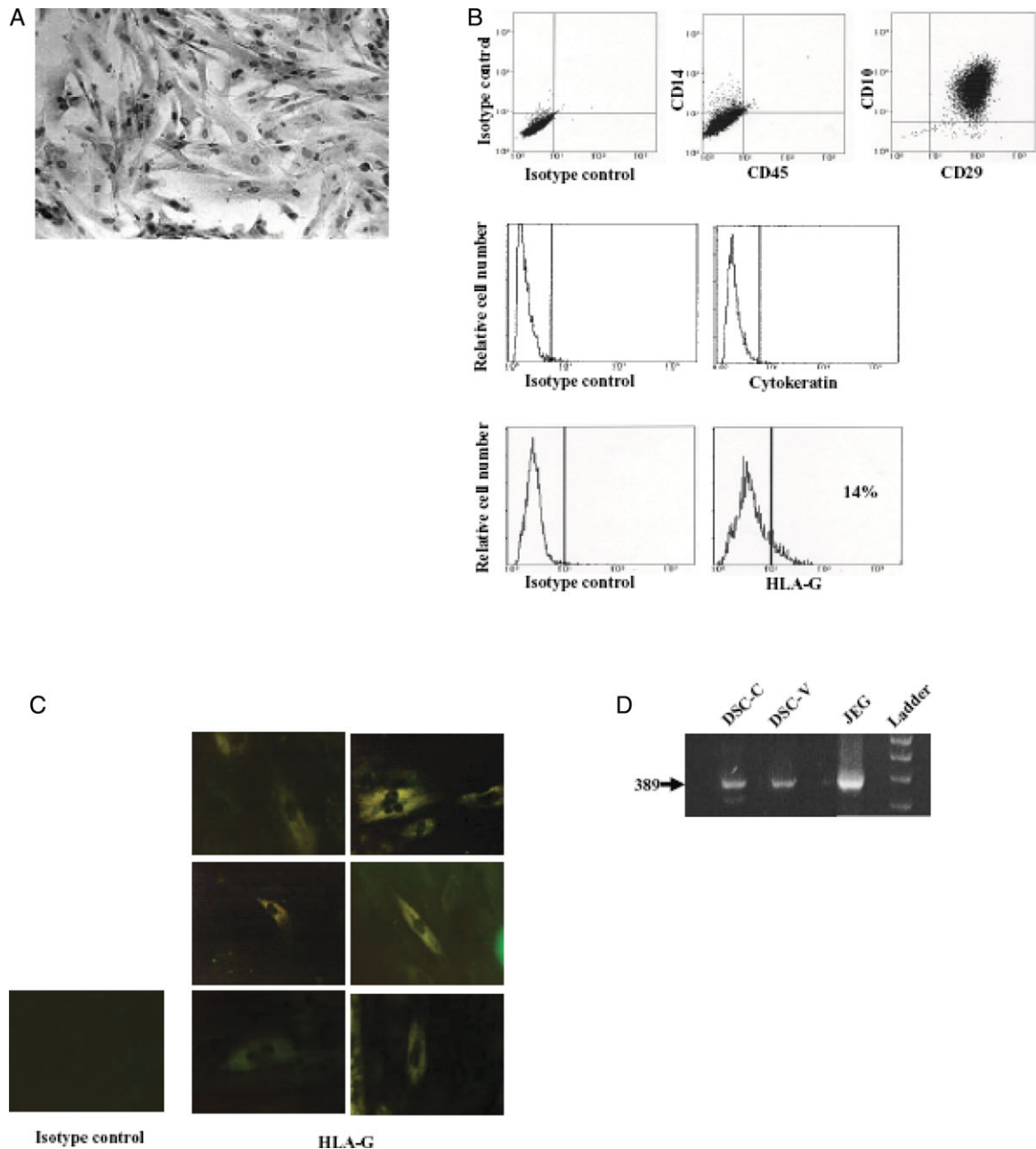
Fresh DSC were isolated on Percoll gradients and analysed by flow cytometry according to Montes *et al.* (1996). Under these experimental conditions, fresh DSC with an antigen phenotype similar to that of cultured DSC have been observed (Montes *et al.*, 1996; Garcia-Pacheco *et al.*, 2001) (Fig. 2). Fresh DSC preparations, however, are not so pure as cultured DSC, as they may contain a small proportion of leukocytes (CD45+ cells) and extravillous trophoblast cells (EVT). Although we observed that in the fresh DSC preparations, CD45+ leukocytes did not express HLA-G, contaminant EVT expressed this antigen (not shown). To distinguish the potentially HLA-G expressing DSC from EVT in fresh preparations, we used a mAb against CD10. This antigen is considered a marker of endometrial stromal cells or DSC (Sumathi and McCluggage, 2002; Iwase *et al.*, 2006) and not expressed by EVT (Toki *et al.*, 2002). Cells were then gated in flow cytometry by the expression of CD10. We found that a proportion of CD10+ DSC co-expressed HLA-G (range: 12–23% positive cells) (Fig. 2).

#### Modulation by cytokines and decidualization of the expression of HLA-G on cultured DSC

IL-10 and IFN $\gamma$  increased the expression of HLA-G by DSC, as shown by flow cytometry and western blotting. IL-2, however, did not have any effect (Fig. 3). Progesterone and cAMP, which induced decidualization as determined by the secretion of PRL by DSC, also up-regulated their expression of HLA-G (Fig. 4). The effects of the cytokines and progesterone and cAMP were quantified and represented in Fig. 5. Progesterone may have a direct effect on the expression of HLA-G by DSC, as it has on trophoblast (Yie *et al.*, 2006a). Furthermore, an indirect effect through the IL-10 may also contribute to the up-regulation of HLA-G, as progesterone and cAMP increase the secretion of IL-10 by DSC (Fig. 6). IFN $\gamma$ , however, up-regulated the expression of HLA-G, but decreased the secretion of IL-10 by DSC (Fig. 6).

## Discussion

HLA-G, a class Ib major histocompatibility complex (MHC) antigen with a low degree of polymorphism, is highly

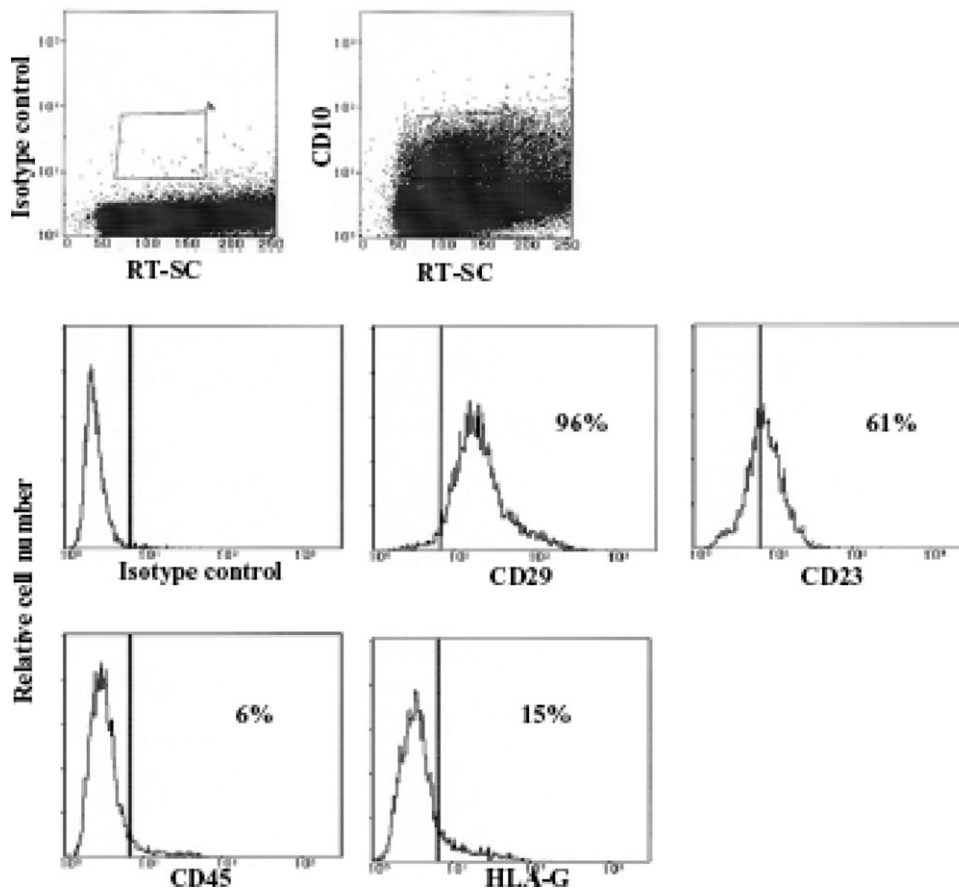


**Figure 1:** Expression of HLA-G by cultured DSC. DSC of the DSC-C line cultured in Opti-MEM showing fibroblast-like morphological features (A). Flow cytometric analysis of the antigens expressed by cells of the DSC-C line (B). Immunofluorescence detection of HLA-G in cells of the DSC-C line (C). Expression of HLA-G mRNA by the DSC-C and DSC-V lines, detected by RT-PCR. The extravillous trophoblast cells tumour line JEG-3 was used as a positive control (D). Results are shown from one representative experiment out of ten.

expressed only by EVT (Kovats *et al.*, 1990). However, lower levels of expression of this antigen or HLA-G mRNA has been detected in many different tissues, in which expression was associated with immunotolerance (Le Discorde *et al.*, 2003; Wiendl *et al.*, 2003). In our cultured DSC, HLA-G protein was detected by flow cytometry, immunofluorescence microscopy and western blotting, and HLA-G mRNA was found by RT-PCR (Figs 1–4). This expression, although weak, was upmodulated by IL-10, INF $\gamma$  and progesterone plus cAMP, but not by IL-2 (Figs 3 and 4). We also found HLA-G in a proportion of fresh DSC (Fig. 2).

The possibility that our results were due to contamination with EVT can be ruled out, since it is highly improbable that these cells survived for weeks in culture as did DSC. Moreover, our DSC lines were negative for cytokeratin (Fig. 1). Furthermore, immunofluorescence microscopic observations disclosed cells with fibroblastic morphology typical of cultured DSC, and which expressed HLA-G (Fig. 1). Although HLA-G expression by cells of the human maternal–fetal interface has been extensively studied by immunohistological methods, the detection of this antigen on DSC has not previously been reported. Immunohistological methods may not have been as sensitive as





**Figure 2:** Expression of HLA-G by fresh DSC

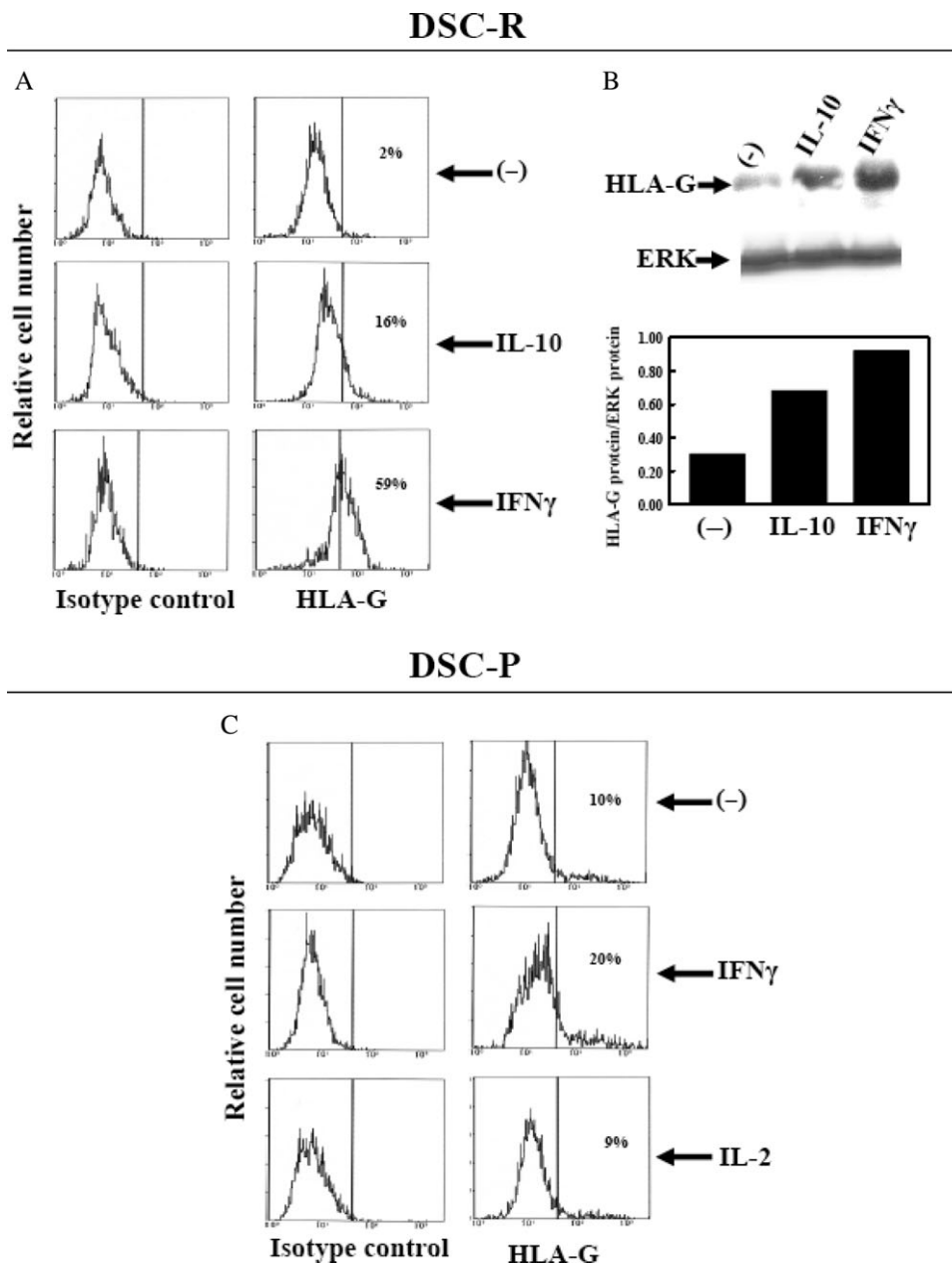
Cells were isolated by Percoll gradients and analysed by flow cytometry. Cells were gated based on CD10 expression versus side scatter (RT-SC). CD29 and CD23, antigens previously detected in cultured DSC, were found on fresh DSC. A small proportion (6%) of contaminant leukocytes, probably CD10+ neutrophils, were observed in this preparation. Results are shown from one representative experiment out of five.

flow cytometry in disclosing the weak expression of HLA-G by some, but not all, DSC. HLA-G expressed by EVT is considered to play a key role in maternal–fetal tolerance. This antigen appears to bind to the inhibitory receptor of decidual NK and T cells, leading to inhibition of the potential cytotoxicity of these cells against fetal tissues (Rouas-Freiss *et al.*, 1997; Khalil-Daher *et al.*, 1999). The expression of HLA-G by DSC may constitute an additional mechanism of inhibition of cytotoxic cells.

IL-10 is a Th2 cytokine which is associated in mice and humans to mechanisms of maternal tolerance of normal pregnancy (Chaouat *et al.*, 1995; Marzi *et al.*, 1996). In humans, a deficiency of placental IL-10 is seen in preeclampsia (Hennessy *et al.*, 1999), and a decrease in decidual IL-10 has been observed in missed abortion (Plevyak *et al.*, 2002). We recently demonstrated that IL-10 reduced the contractility of DSC, and proposed that this relaxing effect would favour the normal progression of pregnancy (Kimatrai *et al.*, 2005). The present results show that IL-10, in addition, increases the expression of HLA-G by DSC (Fig. 3). This effect may potentiate the inhibitory effect of DSC on NK cytotoxicity. The effect of IL-10 on HLA-G expression is not limited to DSC, since this cytokine also increased the expression of this antigen by trophoblast (Moreau *et al.*, 1999).

Jokhi *et al.* (1994) found no or scant amounts of IL-2 mRNA in normal decidua and suggested that this cytokine played no role in pregnancy. Other authors, however, detected significant amounts of IL-2 mRNA in normal pregnancy (von Rango *et al.*, 2003), and found this cytokine to be associated with abortion (Marzi *et al.*, 1996; Lim *et al.*, 2000), which suggested that IL-2 may be induced in this pathological situation. In this connection, IL-2 blocks decidualization (Kanda *et al.*, 1999) and increases the contractility of DSC, effects which may contribute to expulsion of the trophoblast (Kimatrai *et al.*, 2003). In the present study, this cytokine had no effect on the expression of HLA-G by DSC (Fig. 3).

High concentrations of Th1 cytokines have been proved to be deleterious for murine and human pregnancy, including recurrent miscarriages, preeclampsia and fetal growth retardation (Marzi *et al.*, 1996; Lim *et al.*, 2000). In mice, however, IFN $\gamma$  is involved in vascular remodelling necessary for embryo implantation and subsequent placenta formation (Ashkar *et al.*, 2000). Furthermore, IFN $\gamma$ , usually considered a proinflammatory cytokine, can drive cells into immunosuppressive profiles when linked with other modulators, and could therefore paradoxically serve as an anti-inflammatory cytokine (Wood and Sawitzki, 2006). This situation may occur during normal pregnancy. In line with the regulatory

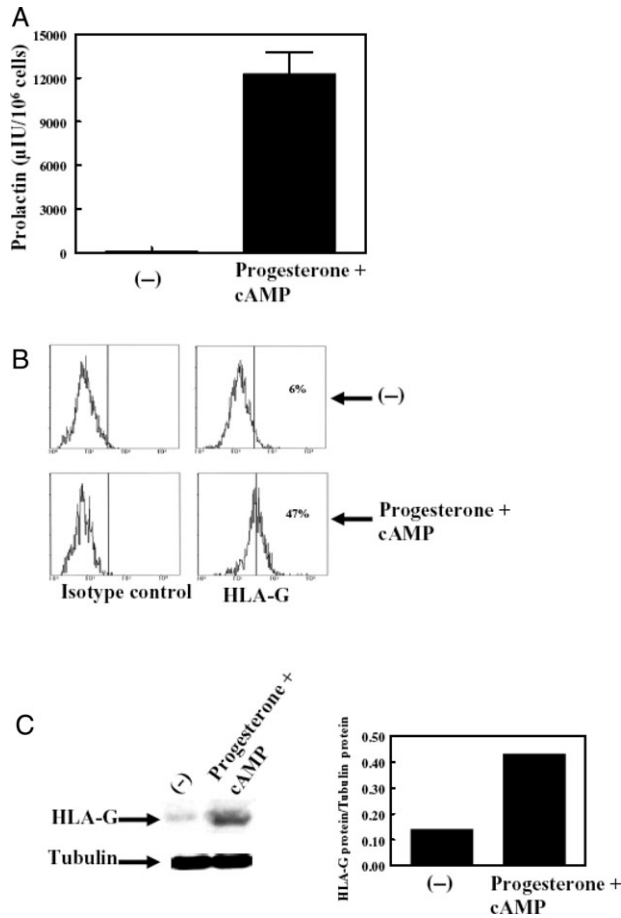


**Figure 3:** Effects of cytokines on the expression of HLA-G by DSC

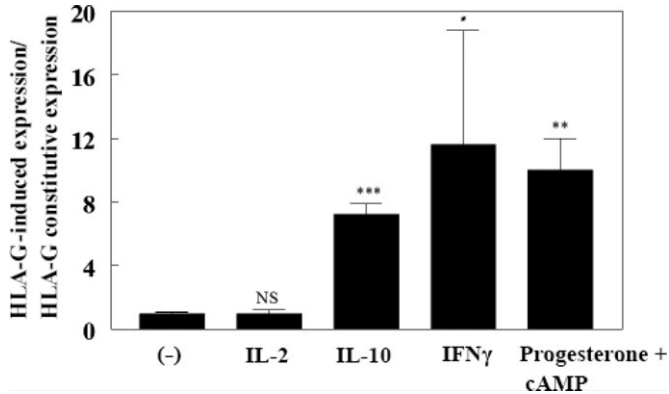
The DSC line DSC-R was cultured in Opti-MEM independently with 10 ng/ml IL-10 or IFN $\gamma$  for 48 h, and the expression of HLA-G was studied by flow cytometry (A) and western blotting (B). Mitogen-activated protein kinase extracellular regulated kinase (ERK) was used as the loading control in western blotting. The bar graph shows the densitometric quantification of western blot results. The DSC line DSC-P was treated independently with 50 IU/ml IL-2 or 10 ng/ml IFN $\gamma$  for 48 h, and the expression of HLA-G was studied by flow cytometry (C). Results are shown from one representative experiment out of five.

functions of IFN $\gamma$ , this cytokine increased the expression of HLA-G by DSC (Fig. 3). Progesterone, a hormone that supports pregnancy, up-regulates the secretion of Th2 cytokines by lymphocytes (Piccinni *et al.*, 1995), inhibits the production of Th1 cytokines (Choi *et al.*, 2000), differentiates DSC to progestational status, and blocks their immune activities (Montes *et al.*, 1995; Ruiz *et al.*, 1997). In our results, decidualization also increased the expression of HLA-G by DSC (Fig. 4). This is consistent with the results reported by Yie *et al.*, (2006b), who showed that progesterone enhanced HLA-G gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and human

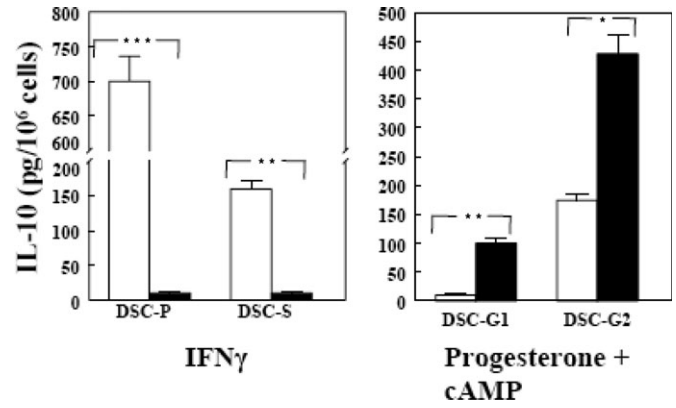
cytotrophoblasts *in vitro*. Although progesterone appears to exert a direct effect on the induction of HLA-G expression (Yie *et al.*, 2006a), an indirect effect through IL-10 on DSC is likely, as decidualization increased the secretion of IL-10 by DSC (Fig. 6). This indirect effect, however, could not be demonstrated *in vitro*, since the constitutive or induced secretion of IL-10 by DSC (<70 pg/ml) (Fig. 6) (Vigano *et al.*, 2002; Kimatrai *et al.*, 2005) was below the concentration necessary to induce an increase in HLA-G expression by DSC (~10 ng/ml) (Fig. 3). Nevertheless, this cytokine, locally secreted by DSC, together with that secreted by the



**Figure 4:** Effect of decidualization on the expression of HLA-G by DSC  
 DSC line DSC-N cells were cultured in Opti-MEM with 300 nM progesterone and 500 µM cAMP for 15 days to induce decidualization. The secretion of PRL was determined to confirm decidualization (A). The expression of HLA-G was analysed by flow cytometry (B) and western blotting (C).  $\alpha$ -tubulin was used as the loading control in western blotting. The bar graph shows the densitometric quantification of western blot results. Results are shown from one representative experiment out of three.



**Figure 5:** Expression of HLA-G induced in DSC by different cytokines and progesterone plus cAMP  
 Results from flow cytometry are shown as the ratio between the proportion of HLA-G-positive treated DSC and the proportion of HLA-G-positive untreated DSC. Columns represent the mean  $\pm$  SD of all experiments from Figs 3 and 4. Results are compared with control (-) DSC. NS, not significant. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.001$ ; \*\*\* $P < 0.00001$  versus control.



**Figure 6:** Effects of IFN $\gamma$  (10 ng/ml for 48 h) and treatment with progesterone (300 nM) and cAMP (500 µM) for 15 days on the secretion of IL-10 by different DSC lines cultured in Opti-MEM. Results are shown from one representative experiment out of three. Open bars represent the amount of IL-10 secreted by untreated cultures. Black bars represent the amount of IL-10 secreted by cytokine-treated cultures. \* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.0001$ ; \*\*\* $P < 0.00001$ .

trophoblast—which is the main source of IL-10 at the maternal–fetal interface (Roth *et al.*, 1996)—may make the concentration of the cytokine high enough to induce the expression of HLA-G *in vivo*.

IFN  $\gamma$ , as well as progesterone plus cAMP are able to induce the expression of HLA-G by DSC (Figs 3–5). However, they have opposite effects on the secretion of IL-10 by these cells: progesterone and cAMP increases it, whereas IFN $\gamma$  decreases it (Fig. 6). Although both IL-10 and progesterone favour gestation, the effect of IFN $\gamma$  can be viewed not so much as a factor that favours abortion, as a regulatory mechanism. In fact, progesterone induces both IL-10 and IL-15 secretion by DSC (Okada *et al.*, 2000), and this latter cytokine activates decidual NK cells (Verma *et al.*, 2000), which are the main source of IFN $\gamma$  (Ashkar and Croy, 1999). IFN  $\gamma$ , on the other hand, may control the local secretion of IL-10 by DSC.

Although several studies suggest that HLA-G controls the cytotoxicity of decidual NK cells against trophoblast (Rouas-Freiss *et al.*, 1997; Khalil-Daher *et al.*, 1999), this cytotoxic activity is controversial, since trophoblast is resistant to NK cell-mediated lysis, regardless of HLA class I expression (Avril *et al.*, 1999; Zdravkovic *et al.*, 1999). Some authors have proposed that decidual NK cells, rather than harming the trophoblast through their cytotoxic activity, actually favour trophoblast functioning by enhancing its ability to invade the decidua (Le Bouteiller and Tabiasco, 2006). Nevertheless, most studies of cytotoxicity have analysed only necrosis, and not apoptosis (Rouas-Freiss *et al.*, 1997; Avril *et al.*, 1999; Khalil-Daher *et al.*, 1999; Zdravkovic *et al.*, 1999). We have also confirmed that decidual lymphocytes were unable to kill trophoblast by necrosis; however, we found that they induced apoptosis in EVT cells (Olivares *et al.*, 2002). We also observed that apoptotic cytotoxicity, which in normal pregnancy probably controls the physiological invasion of the decidua by EVT, is exacerbated during spontaneous abortion (Olivares *et al.*, 2002). In this connection,



experimental evidence suggests that decidual NK cells also induce apoptosis in DSC under normal and pathological situations (Ashkar and Croy, 1999). Mice lacking IFN $\gamma$  receptor  $\alpha$  exhibited a high incidence of dead DSC. This was attributed to an IFN $\gamma$  signalling deficit which would lead to a drop in MHC expression (HLA-G according to our data) to levels below those necessary to engage the killer-inhibitory receptors of NK cells. Thus decidual NK cells become lytically active and destroy the DSC (Ashkar and Croy, 1999). Decidual NK cells proliferate and are activated through their interaction with DSC (King, 2000; Verma *et al.*, 2000). In addition, IFN $\gamma$  secretion by decidual NK cells may be induced by interaction with the HLA-G of DSC (van der Meer *et al.*, 2004). According to our results, this cytokine increases the expression of HLA-G (Fig. 3), and this may play a role in a mechanism by which DSC defend themselves from the putative cytotoxic attack of NK cells they have previously activated. In fact, DSC apoptosis is a normal event in pregnancy, although its mechanism is not fully understood (Gu *et al.*, 2004). HLA-G and NK cells may be involved in this mechanism. Experiments are in progress to study the capacity of decidual NK cells to induce apoptosis in DSC.

In conclusion, our results show that DSC express HLA-G. This expression is weak but is up-regulated by IL-10, IFN $\gamma$  and progesterone and cAMP, which are molecules that promote normal pregnancy. The expression of HLA-G by DSC may control the cytotoxic activity of NK cells against trophoblast and the physiological decay (by apoptosis) of DSC.

### Acknowledgements

We are grateful to Dr S. Jordán from the Clínica el Sur (Málaga) and Dr F. Garcia Gallego from the Clínica Ginegranada (Granada) for providing us with decidual specimens. We thank K. Shashok for improving use of English in the manuscript.

### Funding

This work was funded by the following Grants: SAF2003-06799; SAS PFI 3/02, TCMR 0010/2006.

### References

- Ashkar AA, Croy BA. Interferon- $\gamma$  contributes to the normalcy of murine pregnancy. *Biol Reprod* 1999;**61**:493–502.
- Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med* 2000;**192**: 259–270.
- Avril T, Jarrow AC, Watier H, Boucraut J, Le Bouteiller P, Bardos P, Thibault G. Trophoblast cell line resistance to NK lysis mainly involves an HLA class I-independent mechanism. *J Immunol* 1999;**162**: 5902–5909.
- Chaouat G, Assal Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliot J, Mosmann T, Wegmann TG. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBAX DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau. *J Immunol* 1995;**154**:4261–4268.
- Choi BC, Polgar K, Xiao L, Hill JA. Progesterone inhibits in-vitro embryotoxic Th1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2000;**15**:46–59.
- García-Pacheco JM, Oliver, Kimatrai M, Blanco FJ, Olivares EG. Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related with bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod* 2001;**7**:151–157.

- Gu Y, Jow GM, Moulton BC, Lee C, Sensibar JA, Park-Sarge OK, Chen TJ, Gibori G. Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization. *Endocrinology* 1994;**135**:1272–1279.
- Hennessy A, Pilmore HL, Simmons LA, Painter DM. A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. *J Immunol* 1999;**163**:3491–3495.
- Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J* 2005;**19**:681–693.
- Iwase A, Ando H, Nagasaka T, Shibata D, Harata T, Shimomura Y, Goto M, Kikkawa F. Neutral endopeptidase expressed by decidualized stromal cells suppresses Akt phosphorylation and deoxyribonucleic acid synthesis induced by endothelin-1 in human endometrium. *Endocrinology* 2006;**147**:5153–5159.
- Jokhi PP, King A, Sharkey AM, Smith SK, Loke YW. Screening for cytokine messenger ribonucleic acids in purified human decidual lymphocyte populations by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Immunol* 1994;**153**:4427–4435.
- Kanda Y, Jikihara H, Markoff E, Handwerker S. Interleukin-2 inhibits the synthesis and release of prolactin from human decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;**84**:677–681.
- Khalil-Daheer I, Riteau B, Menier C, Sedlik C, Paul P, Dausset J, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Role of HLA-G versus HLA-E on NK function: HLA-G is able to inhibit NK cytotoxicity by itself. *J Reprod Immunol* 1999;**43**:175–182.
- Kimatrai M, Oliver C, Abadía-Molina AC, García-Pacheco JM, Olivares EG. Contractile activity of human decidual stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**:844–849.
- Kimatrai M, Blanco O, Muñoz-Fernández R, Tirado I, Martín F, Abadía-Molina AC, Olivares EG. Contractile activity of human decidual stromal cells. II. Effect of interleukin-10. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;**90**:6126–6130.
- King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update* 2000;**6**:28–36.
- Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 1990;**248**: 220–223.
- Le Bouteiller P, Tabiasco J. Killers become builders during pregnancy. *Nat Med* 2006;**12**:1065–1074.
- Le Discorde M, Moreau P, Sabatier P, Legeais JM, Carosella ED. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Hum Immunol* 2003;**64**:1039–1044.
- Lim KJ, Odukoya OA, Ajjan RA, Li TC, Weetman AP, Cooke ID. The role of T-helper cytokines in human reproduction. *Fertil Steril* 2000;**73**:136–142.
- Marzi M, Viganò A, Trabattini D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, Clerici M. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1996;**106**:127–133.
- Montes MJ, Alemán P, Tortosa CG, Borja C, Ruiz C, Olivares EG. Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with hematopoietic cells. *J Reprod Immunol* 1996;**30**:53–66.
- Montes MJ, Tortosa CG, Borja C, Abadía AC, González-Gómez F, Ruiz C, Olivares EG. Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am J Reprod Immunol* 1995;**34**:188–194.
- Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, Carosella ED, Paul P. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 1999;**11**:803–811.
- Muñoz-Fernández R, Blanco FJ, Frecha C, Martín F, Kimatrai M, Abadía-Molina AC, García-Pacheco JM, Olivares EG. Follicular dendritic cells are related to bone marrow stromal cell progenitors and to myofibroblasts. *J Immunol* 2006;**177**:280–289.
- Okada H, Nakajima T, Sanezumi M, Ikuta A, Yasuda K, Kanzaki H. Progesterone enhances interleukin-15 production in human endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**:4765–4770.
- Olivares EG, Muñoz R, Tejerizo G, Montes MJ, Gómez-Molina F, Abadía-Molina AC. Decidual lymphocytes of human spontaneous abortions induce apoptosis but not necrosis in JEG-3 extravillous trophoblast cells. *Biol Reprod* 2002;**67**:1211–1217.
- Oliver C, Montes MJ, Galindo JA, Ruiz C, Olivares EG. Human decidual stromal cells express  $\alpha$ -smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum Reprod* 1999;**14**:1599–1605.
- Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C *et al.* Progesterone favours the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol* 1995;**155**:128–133.

- Plevyak M, Hanna N, Mayer S, Murphy S, Pinar H, Fast L, Ekerfelt C, Ernerudh J, Berg G, Matthiesen L *et al.* Deficiency of decidual IL-10 in first trimester missed abortion: A lack of correlation with the decidual immune cell profile. *Am J Reprod Immunol* 2002;**47**:242–250.
- Roth I, Corry DB, Locksley RM, Abrams JS, Litton MJ, Fisher SJ. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med* 1996;**184**:539–548.
- Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;**94**:11520–11525.
- Ruiz C, Montes MJ, Abadía-Molina AC, Olivares EG. Phagocytosis by fresh and cultured human decidual stromal cells. Opposite effects of interleukin-1 $\alpha$  and progesterone. *J Reprod Immunol* 1997;**33**:15–26.
- Sumathi VP, McCluggage WG. CD10 is useful in demonstrating endometrial stroma at ectopic sites and in confirming diagnosis of endometriosis. *J Clin Pathol* 2002;**55**:391–392.
- Toki T, Shimizu M, Takagi Y, Ashida T, Konishi I. CD10 is a marker for normal and neoplastic endometrial stromal cells. *Int J Gynecol Pathol* 2002;**21**:41–47.
- van der Meer A, Lukassen HG, van Lierop MJ, Wijnands F, Mosselman S, Braat DD, Joosten I. Membrane-bound HLA-G activates proliferation and interferon- $\gamma$  production by uterine natural killer cells. *Mol Hum Reprod* 2004;**10**:189–195.
- Verma S, Hiby SE, Loke YW, King A. Human decidua natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. *Biol Reprod* 2000;**62**:959–968.
- Vigano P, Omigiana E, Angioni S, Vignali S, Vignali M, Di Blasio AM. Expression of interleukin-10 and its receptor is up-regulated in early pregnant versus cycling human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**:5730–5736.
- von Rango U, Classen-Linke I, Raven G, Bocken F, Beier HM. Cytokine microenvironments in human first trimester decidua are dependent on trophoblast cells. *Fertil Steril* 2003;**79**:1176–1186.
- Wiendl H, Mitsdoerffer M, Weller M. Hide-and-seek in the brain: a role for HLA-G mediating immune privilege for glioma cells. *Semin Cancer Biol* 2003;**13**:343–351.
- Wood KJ, Sawitzki B. Interferon  $\gamma$ : a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo. *Trends Immunol* 2006;**27**:183–187.
- Yie SM, Li LH, Li GM, Xiao R, Librach CL. Progesterone enhances HLA-G gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and human cytotrophoblasts in vitro. *Hum Reprod* 2006b;**21**:46–51.
- Yie SM, Xiao R, Librach CL. Progesterone enhances HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. *Hum Reprod* 2006a;**21**:2538–2544.
- Zdravkovic M, Aboagye-Mathiesen G, Guimond MJ, Hager H, Ebbesen P, Lala PK. Susceptibility of MHC class I expressing extravillous trophoblast cell lines to killing by natural killer cells. *Placenta* 1999;**20**:431–440.

Submitted on April 24, 2007; resubmitted on September 12, 2007; accepted on September 20, 2007



## Human Decidual Stromal Cells Protect Lymphocytes from Apoptosis

O. Blanco<sup>a,1</sup>, E. Leno-Durán<sup>a,1</sup>, J.C. Morales<sup>a</sup>, E.G. Olivares<sup>a,b</sup>, C. Ruiz-Ruiz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Inmunología, IBIMER, Universidad de Granada, Centro de Investigación Biomédica, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain

<sup>b</sup> Hospital Universitario "San Cecilio", 18012 Granada, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Accepted 27 May 2009

#### Keywords:

Human  
Stromal cells  
Lymphocytes  
Apoptosis  
Reproductive immunology

### ABSTRACT

Human decidual stromal cells (DSC) have been shown to be involved in different immune functions that may be relevant for the relationship between the mother and fetus and hence for successful pregnancy. The expression of death ligands by fetal trophoblast and maternal decidual cells has been proposed as a mechanism for the establishment of materno-fetal immunotolerance. This study intended to elucidate the interrelations between DSC and lymphocytes. We analyzed the expression and function of death receptors and ligands in DSC maintained in culture. These DSC lines expressed CD95 and TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor-2 (TRAIL-R2), although they were resistant to death receptor-mediated apoptosis. Regarding the expression of CD95L and TRAIL, it was variable among DSC lines although none of them induced apoptosis in death ligand-sensitive Jurkat T cells. Interestingly, most of the DSC lines, as well as fresh DSC, reduced apoptosis in Jurkat cells induced by anti-CD95 antibody and recombinant TRAIL. The protective effect of DSC was observed when they were co-cultured with Jurkat cells in Transwell plates, indicating that DSC may produce soluble factors of importance for lymphocyte survival. Moreover, the viability of peripheral blood lymphocytes and decidual lymphocytes was improved when co-cultured with DSC. Our results suggest that DSC, far from inducing apoptosis, may be relevant in the regulation of lymphocyte survival at the materno-fetal interface.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Successful pregnancy has been considered an example of semiallogeneic graft acceptance in which the fetus is protected from the mother's immune system. Immunological interrelations between the mother and fetus during pregnancy are believed to take place in the decidua, the maternal tissue in closest contact with the fetal trophoblast. The main cellular components of the decidua are decidual stromal cells (DSC), counterparts of endometrial stromal cells in the nongestating endometrium. These cells comprise a distinctive class whose origin and lineage remained unknown until recently. We have been able to isolate and maintain highly purified cultures of DSC, which has allowed us to demonstrate that human DSC are related to mesenchymal stem cells [1], and that their morphology, phenotype and functions are similar to those of myofibroblasts [2–4] and follicular dendritic cells [5].

Apoptosis is an active form of cell death that plays a fundamental role in normal development, tissue homeostasis and pathological situations. Apoptosis is also involved in the establishment

of immune tolerance [6]. The CD95/Fas receptor, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor (TNF/NGF) receptor superfamily, is a potent inducer of apoptosis in the immune system upon interaction with its natural ligand CD95L/FasL, a type II integral membrane protein homologous to TNF- $\alpha$  [7,8]. Several studies have demonstrated the importance of the CD95/CD95L system in the maintenance of immune-privileged sites such as the eye and testis [9]. Moreover, CD95L has been suggested to be involved in the survival mechanisms that allow the semiallogeneic embryo or fetus to reside safely within the mother [10,11]. These studies proposed that CD95L expressed on the surface of fetal trophoblast cells can induce apoptotic signalling in the CD95-expressing leukocyte population of the materno-fetal interface, which consists mainly of uterine NK cells, T lymphocytes and macrophages [12]. More recently, however, it has been shown that first trimester syncytiotrophoblast cells express a cytoplasmic form of CD95L, stored in microvesicles and secreted as exosomes, which is able to induce apoptosis in CD95-bearing immune cells [13,14]. Phosphorylation and mono-ubiquitination signals regulated by a prolin-rich domain in the cytoplasmic tail of CD95L are responsible for its sorting into vesicles of secretory lysosomes [15,16]. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/APO-2L) is another death ligand of the TNF superfamily that induces apoptosis upon binding to its death domain-containing receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2.

\* Corresponding author. Tel.: +34 958 241000x20025; fax: +34 958 249015.

E-mail address: [mcarmenr@ugr.es](mailto:mcarmenr@ugr.es) (C. Ruiz-Ruiz).

<sup>1</sup> O. Blanco and E. Leno-Durán contributed equally to this work.

Like CD95/CD95L, the TRAIL/TRAIL receptors system is also expressed in the human placenta and thus may contribute to the establishment of immune privilege during pregnancy [17,18].

Decidual stromal cells exert different immune activities that appear to be of relevance in the immunological cross-talk between the mother and the fetus, and that may contribute to the final outcome of pregnancy [19–21]. However, the role of DSC in maternal immunotolerance is not completely understood. Different authors have reported the expression of CD95L on maternal DSC as well as their ability to induce apoptosis on CD95-bearing leukocytes [22–24]. In contrast, a proliferative and anti-apoptotic effect has been described for DSC on uterine NK cells [25]. Moreover, it has been suggested that decidual leukocytes fail to undergo apoptosis in early pregnancy; this raises questions about the contribution of CD95L-expressing decidual and fetal trophoblast cells to the maintenance of immune privilege at the maternal-fetal interface [26]. The present study was designed to clarify the interrelations between DSC and lymphocytes. To this end we determined the expression of death receptors and death ligands in DSC. In addition, we analyzed the sensitivity of DSC to death receptor-mediated apoptosis as well as their ability to induce apoptosis in lymphocytes. Our results demonstrate that DSC are highly resistant to the induction of apoptosis. Moreover, they are not able to induce apoptosis in lymphocytes, but instead appear to protect them from apoptosis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Decidual stromal cell isolation and culture

Seventeen samples from elective vaginal terminations of first trimester pregnancy (6–11 weeks) from healthy patients aged 20–30 years were used. We excluded women receiving any medication or with infectious, autoimmune, or other systemic or local diseases. None of the abortions was pharmacologically induced. The specimens were obtained by vaginal curettage at the Clínica El Sur in Málaga or the Clínica Ginegranada in Granada. Informed consent was obtained from each patient. The research and ethics committee of the Hospital Universitario San Cecilio in Granada approved this study.

DSC lines were established as previously described [19,20]. Purity was confirmed using flow cytometry to detect the co-expression of CD10 and CD29, and the lack of CD45 (which identifies leukocytes) and cytokeratin (which detects epithelial cells and trophoblast) by 95%–100% of DSC [1–3]. With this procedure we obtained 17 finite DSC lines that were assigned individual names. In Opti-MEM medium (Invitrogen, Paisley, UK) with 3% FCS, cell lines proliferated for 8–12 weeks before extinction. In this and other low-containing FCS media, DSC showed stable antigen phenotype and functional activities [1–4].

Fresh DSC were isolated as reported previously [19]. In brief, decidual tissue was washed in  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free PBS and minced between two scalpels in a small volume of RPMI 1640 medium containing 10% FCS. The cell suspension was filtered through sterile gauze, washed and incubated with 5 mg/ml collagenase for 15 min. After adding RPMI-FCS and left to settle, the supernatant was collected, centrifuged, and resuspended in RPMI-FCS. This suspension was centrifuged at 650g for 30 min over a discontinuous Percoll gradient (20 and 30%, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and DSC were then collected, washed and incubated for 6 h to allow their adhesion to the plate. Cells in the supernatant were then discarded leaving the adherent cells, which were mainly DSC.

### 2.2. Lymphocytes isolation and culture

For the extraction of decidual lymphocytes, decidual fragments from samples obtained as described above were finely minced in a small volume of RPMI 1640 and then pushed through a 53-microm sieve (Gallenkamp, Loughborough, UK). The resultant cell suspension was washed with RPMI and centrifuged on Ficoll-Paque at room temperature for 20 min at 600g. The cells were collected from the interface, washed and suspended in complete culture medium (RPMI 1640, 10% FCS, 100 U/ml penicillin, and 50 g/ml gentamicin), and incubated for 2 h at 37 °C in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  to allow adherent cells to attach to the plastic. The supernatant containing decidual lymphocytes was then collected, purity was confirmed by flow cytometry (>90% CD45<sup>+</sup>) and the cells were washed and incubated as indicated.

To obtain peripheral blood lymphocytes (PBLs) blood samples were taken from healthy volunteers aged 20–35 years. Peripheral blood mononuclear cells were prepared by Ficoll-Paque density gradient centrifugation and adherent monocytes

were depleted by culture on plastic dishes for 1 h at 37 °C. Purity of lymphocytes was determined by flow cytometry (>95% CD45<sup>+</sup>). PBLs were then incubated in complete culture medium for 6 days before being used for experiments as indicated.

Decidual NK cells were isolated from decidual lymphocytes by successively using an anti-CD56 antibody (mouse IgG, Invitrogen), a goat anti-mouse IgG MicroBeads and magnetic separation columns (Miltenyi Biotec, GmbH). Similarly, peripheral NK cells were purified from PBL and, after magnetic separation, the negative fraction was further processed to isolate T lymphocytes by negative selection with an indirect magnetic labelling system consisting of a cocktail of biotin-conjugated antibodies against CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, and CD235a (Human Pan T Cells Isolation Kit II, Miltenyi Biotec, GmbH). Purity of NK cells and T cells was >90% CD56<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> as determined by flow cytometry. Purified lymphocyte subpopulations were resuspended in Opti-MEM medium with 3% FCS and incubated as indicated.

### 2.3. Tumor cell lines

The Jurkat human leukemic T cell line and the SKBR3 human breast carcinoma cell line were maintained in culture in RPMI 1640 medium with 10% FCS, L-glutamine, penicillin and streptomycin at 37 °C in a humidified 5%  $\text{CO}_2$ , 95% air incubator.

### 2.4. Reagents and antibodies

Mouse monoclonal antibodies to human CD95 (FITC-conjugated) and CD95L (clone Alf-2.1, R-phycoerythrin-conjugated) were obtained from Caltag Laboratories (Burlingame, CA). Mouse anti-human TRAIL and TRAIL receptor antibodies were purchased from Alexis Biochemicals (San Diego, CA). CH11 mAb (IgM) reacting with CD95 was from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Human recombinant TRAIL was prepared as described previously [27]. Doxorubicin and valproic acid were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

### 2.5. Flow cytometry analysis of surface and intracellular molecules

Cultured DSC were detached from the culture flask by treatment with 0.04% EDTA at 37 °C. The cells were centrifuged, the supernatant was discarded, and the pellet was suspended in PBS at  $10^6$  cells/ml. For direct staining, 100  $\mu\text{l}$  of the cell suspension was incubated with 10  $\mu\text{l}$  of the appropriate mAb for 30 min at 4 °C in the dark. For indirect staining, cells were incubated with primary antibodies (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) at 4 °C for 30 min, washed with PBS to remove unbound primary antibody, and then incubated with goat anti-mouse fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody (Caltag Laboratories) for 30 min at 4 °C. The cells were then washed again, resuspended in PBS and analyzed in a FACScan flow cytometer using Cell Quest software (BD Biosciences).

For intracellular detection of CD95L, detached DSC cells were washed with PBS and permeabilized with Cytotfix/cytoperm (Pharmingen, San Diego, CA). Cells were subsequently washed with 0.05% saponin in PBS and incubated shaking for 45 min at 4 °C with 10  $\mu\text{l}$  of PE-conjugated anti-CD95L in PBS-0.05% saponin. Cells were finally washed twice in PBS-0.02% saponin, once in PBS, and analyzed in a FACScan Flow Cytometer.

### 2.6. Detection of apoptotic cells

Hypodiploid apoptotic cells were detected by flow cytometry according to published procedures [28]. Briefly, cells were washed with PBS, fixed in cold 70% ethanol, and then stained with propidium iodide during treatment with RNase. Quantitative analysis of sub-G<sub>1</sub> cells was carried out in a FACScan cytometer.

To analyze nuclear morphology, cells were permeabilized with 0.5% Tween 20 in citric acid solution before staining the nuclei with 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in a solution containing  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  for 5 min at 37 °C, and were examined by fluorescence microscopy.

### 2.7. Co-culture experiments

Subconfluent (40%–50%) DSC were grown either in regular 6-well plates or on the bottom surface of Transwell plates for 1–2 days to obtain  $2 \times 10^5$  cells/well. The medium was then replaced and either  $1 \times 10^5$  Jurkat cells or  $2 \times 10^5$  primary lymphocytes, from decidua or blood samples, were added directly to the culture of DSC or plated on the upper compartment of Transwell plates. After the indicated times of co-incubation, Jurkat cells or primary lymphocytes were collected and apoptotic cells were detected as described above.

### 2.8. Statistical analysis

The data were analyzed with unpaired Student's *t*-tests (two-tailed) by using GraphPad Prism 4 for Windows. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.



### 3. Results

#### 3.1. Expression of death receptors and ligands on DSC lines

Several authors have reported the presence of death receptors and their ligands at the materno-fetal interface in human placentas. To characterize the phenotype of DSC, we determined the surface expression of CD95, CD95L, TRAIL and TRAIL receptors in our DSC cultures. As shown in Fig. 1A, all DSC lines expressed CD95 and TRAIL-R2 within ranges of 20–70% and 10–40%, respectively (means of 44.27% for CD95 and 23.5% for TRAIL-R2). In contrast, the expression of TRAIL-R1 receptor and TRAIL was negative or low (less than 15%). Regarding CD95L, the expression was negative in nine of fifteen DSC lines analyzed; in the other six the percentage of positive cells varied from line to line (6–80%) (Table 1). Fig. 1B shows data corresponding to a representative DSC line with a weak expression of CD95L. As other authors reported the existence of a cytoplasmic form of CD95L that is secreted via microvesicles [13,14], we analyzed the intracellular levels of CD95L in several DSC cell lines which expressed very low levels of ligand at the cell surface (means 6.6%). We found a higher, but still moderate, level of cytoplasmic CD95L in those DSC cells (means 22.5%, Fig. 1C).

#### 3.2. Function of death receptors and ligands in DSC lines

To establish the significance of death receptors expressed on DSC cells, we analyzed their sensitivity to CD95- and TRAIL-mediated apoptosis. No induction of apoptosis was observed in any DSC line after treatment with high doses of agonistic CD95 antibody CH11 or recombinant TRAIL, despite their expression of CD95 and TRAIL-R2 (Fig. 1D). In this set of experiments we used death ligand-sensitive Jurkat cells as a positive control [29,30].

We next studied the effect on lymphocytes of CD95L-expressing DSC. To this end we co-incubated Jurkat cells, as a model of CD95L-sensitive cells, with the different CD95L-positive DSC lines. The percentage of apoptotic Jurkat cells after co-incubation with DSC was similar to that found in Jurkat cells cultured alone, regardless of the percentage of surface CD95L expression on DSC (Table 1). Moreover, at higher effector:target cell ratios we did not observe significant changes in Jurkat cell viability, neither upon co-incubation with DSC cells expressing cytoplasmic CD95L (data not shown). To explain these surprising results we analyzed whether co-incubation of DSC with Jurkat cells modified their expression levels of CD95L and CD95, respectively. The results in Fig. 1E indicate that neither the surface expression of CD95L on effector DSC nor the CD95 levels on target Jurkat cells changed after 24 h of co-incubation of both cell types.

#### 3.3. DSC protect Jurkat cells from death receptor-mediated apoptosis

To further clarify the inability of DSC that highly expressed CD95L to induce apoptosis on Jurkat cells we tested whether co-culture with DSC modified the sensitivity of Jurkat cells to CD95-mediated cell death. To this end, we incubated Jurkat cells with anti-CD95 antibody in the presence or in the absence of the CD95L-positive DSC7 line. Interestingly, we observed a significant inhibition of anti-CD95-induced apoptosis in Jurkat cells co-incubated with DSC7, compared to Jurkat cells cultured alone (Fig. 2A, left panel). This effect was also observed with the DSC2 and DSC12 lines, which were 11% positive and negative respectively for the expression of CD95L (Fig. 2A, middle and right panels), indicating that the inhibition of apoptosis by DSC lines was independent of the expression of CD95L. Moreover, co-incubation with either of the DSC lines also attenuated TRAIL-mediated apoptosis in Jurkat cells

(Fig. 2A). All these data suggest a generalized protective effect of DSC from death ligand-induced apoptosis.

We also considered the possibility that the protective effect might be a spurious phenomenon due to competition between death receptors expressed on Jurkat cells and those expressed on the DSC for binding to anti-CD95 antibody or recombinant TRAIL. To rule out this possibility, we pretreated Jurkat cells with CH11 or TRAIL for 30 min and then washed the culture to eliminate excess reagent before co-incubation with DSC cells. Nuclear staining with DAPI and measurements of sub-G1 DNA content again showed protection from death receptor-mediated apoptosis in Jurkat cells co-cultured with DSC (Fig. 2B, C). To further substantiate the specificity of the protective effect of DSC, we tested whether apoptosis was induced in Jurkat cells co-incubated with SKBR3, a breast cancer cell line that is highly positive for CD95 and expresses moderate levels of TRAIL receptors (data not shown) [31]. Fig. 2D shows that no inhibitory effect of SKBR3 was observed when Jurkat cells were pretreated for 30 min with anti-CD95 antibody or TRAIL before co-culture. Testing in seven more DSC lines showed that to a greater or lesser extent, all but one line (DSC3) were able to protect pretreated Jurkat cells from death receptor-induced apoptosis (Fig. 2E).

Our previous reports have shown that DSC lines cultured in low-containing FCS media maintain a stable antigen phenotype and functional activities similar to those of fresh DSC [1–4]. Likewise, we confirmed that induction of apoptosis in Jurkat cells by anti-CD95 antibody and recombinant TRAIL was partially inhibited when co-incubated with fresh DSC (Fig. 3).

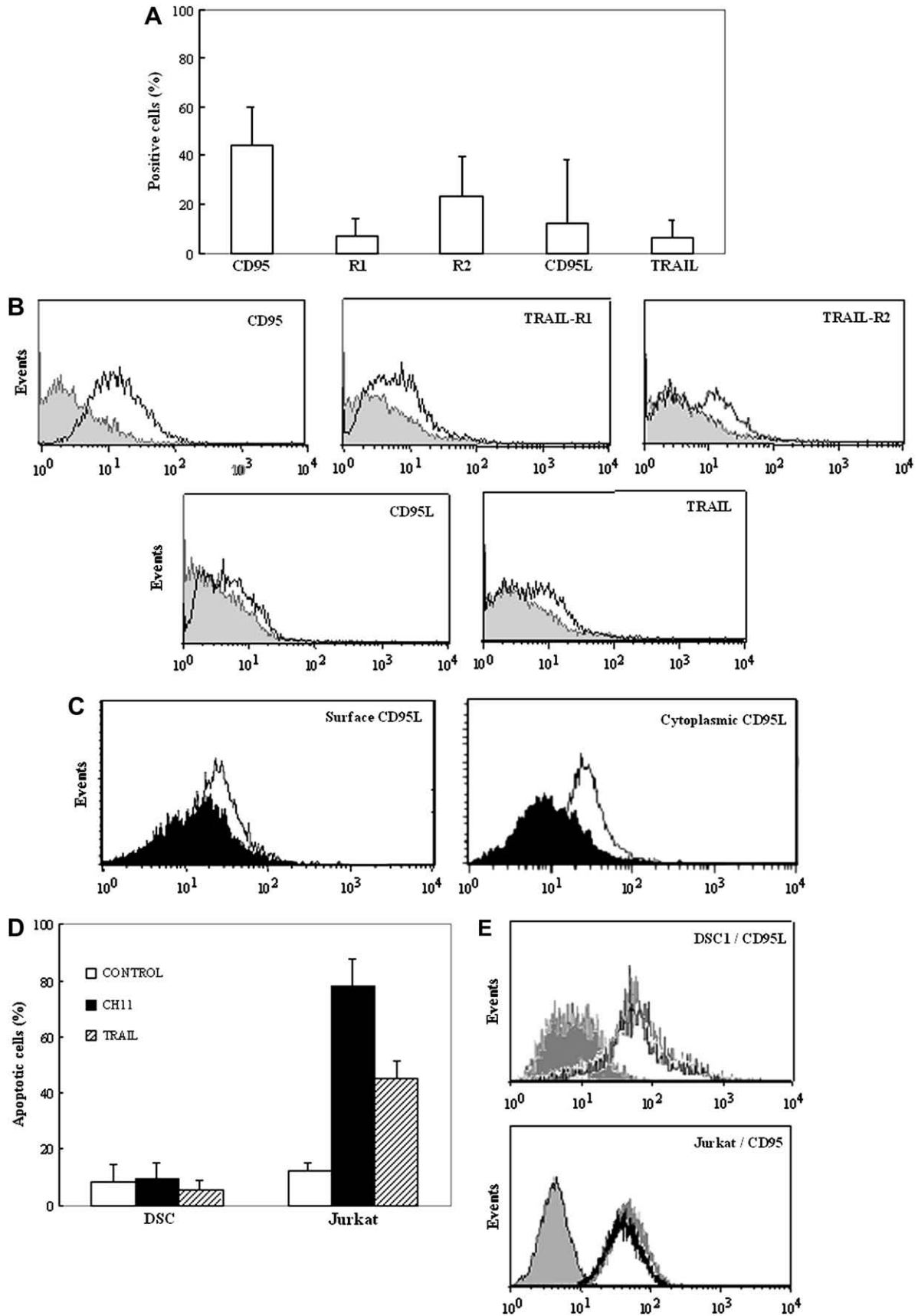
#### 3.4. The protective effect of DSC does not require cell-to-cell contact

To determine whether physical interaction is necessary for DSC to protect Jurkat cells from death receptor-induced apoptosis, we used a Transwell system that prevents cell-to-cell contact between cell types while allowing the free circulation of soluble molecules. As shown in Fig. 4, DSC still exerted their inhibitory action in the absence of physical contact with Jurkat cells. Similar protection from death receptor-induced apoptosis was observed in Jurkat cells incubated with the cell-free supernatant from DSC culture (data not shown). These results suggest that soluble factors were responsible for the observed protective effect.

#### 3.5. DSC improve survival of primary lymphocytes

As primary lymphocytes are resistant to death receptor-induced apoptosis [29], we analyzed the effect of DSC on the spontaneous apoptosis in culture of peripheral blood lymphocytes (PBL) to understand the relevance of the regulation of lymphocyte apoptosis by DSC in a more physiological context. We found that co-incubation with DSC for 24 h significantly reduced the percentage of apoptotic lymphocytes in culture (Fig. 5A). Moreover, a similar protection was observed when lymphocytes were co-cultured with DSC in Transwell plates. These results ruled out the possibility for any allogenic response and showed that, like protection from death receptor-induced apoptosis, protection from spontaneous apoptosis is mediated by soluble factors secreted by DSC (Fig. 5B). We also confirmed the protective effect of DSC on the viability of purified human decidual lymphocytes after 24 h co-incubation (Fig. 5C).

T cells represent the most abundant population of human peripheral lymphocytes while, in first trimester human decidua, NK cells constitute around 75% of leukocytes [12]. To further define whether this effect is more specific towards a particular lymphocyte subtype, we analyzed spontaneous apoptosis in purified populations of T lymphocytes and NK cells from PBL and in isolated



**Table 1**  
Effect of CD95L<sup>+</sup> DSC lines on Jurkat cells.

DSC line	% CD95L <sup>+</sup> cells	% Apoptotic Jurkat cells <sup>a</sup>	
		Control	+DSC
DSC1	70	12	13
DSC2	11	12	16
DSC3	12	10	6
DSC7	80	12	17
DSC8 <sup>b</sup>	6	10	11
DSC10	6	10	15

<sup>a</sup> Percentage of apoptotic Jurkat cells incubated alone or co-incubated for 24 h with DSC at a target:effector ratio of 1:2.

<sup>b</sup> 13.5% TRAIL-positive cells.

decidual NK cells, either incubated alone or upon co-culturing with DSC. In this set of experiments incubations were performed for several days to determine the persistence of the pro-survival effect of DSC. We observed a significant decrease in the percentage of apoptotic cells in all isolated cell populations when co-incubated with DSC, although this decrease was more important in NK cells than in T lymphocytes (Fig. 5D, E). It is interesting to mention that in the case of decidual NK cells, they were co-cultured with fresh DSC isolated from the same patient sample.

### 3.6. Co-culture with DSC does not protect from chemotherapeutic drugs-induced apoptosis

Decidual stromal cells are known to produce cytokines, hormones and other biologically active products [32]. Some of these secreted molecules might mediate the pro-survival effect of DSC. To better characterize this effect we compared the response of Jurkat cells to other known apoptotic inducers, i.e., the histone deacetylase inhibitor valproic acid (VPA) and the genotoxic drug doxorubicin, upon co-incubation with or without DSC. The results in Fig. 6A indicate that in contrast to the protective effect against CD95-mediated cell death, the induction of apoptosis by these chemotherapeutic agents was not inhibited in the presence of DSC. The doses of drugs used in these experiments were previously checked to rule out that they were able to induce apoptosis in DSC (Fig. 6B). These findings suggest that the protective action of DSC is not a generalized effect but, rather, it is specific for some pro-apoptotic stimuli.

## 4. Discussion

In this article, we used 17 independent DSC lines obtained from early pregnancy and demonstrated that DSC protect lymphocytes from apoptosis. Moreover, a similar protection was found when using fresh DSC. As we have shown in previous works [1–4], cultured DSC maintain stable antigen phenotype and functions similar to those of the fresh DSC. Because we found that high concentrations of FCS may inhibit the expression of some surface antigens [1], we maintained purified DSC in cultured medium with 3% FCS to favor stability of the antigen phenotype. The use of DSC lines avoids contamination with other cells of the decidua such as extravillous trophoblast or leukocytes [21]. To study death

receptor-induced apoptosis, we employed Jurkat cells, which is a widely used model in the research of cell death in lymphocytes [29,30]. Jurkat cells have also been used in earlier studies of apoptosis induced by DSC [22,33].

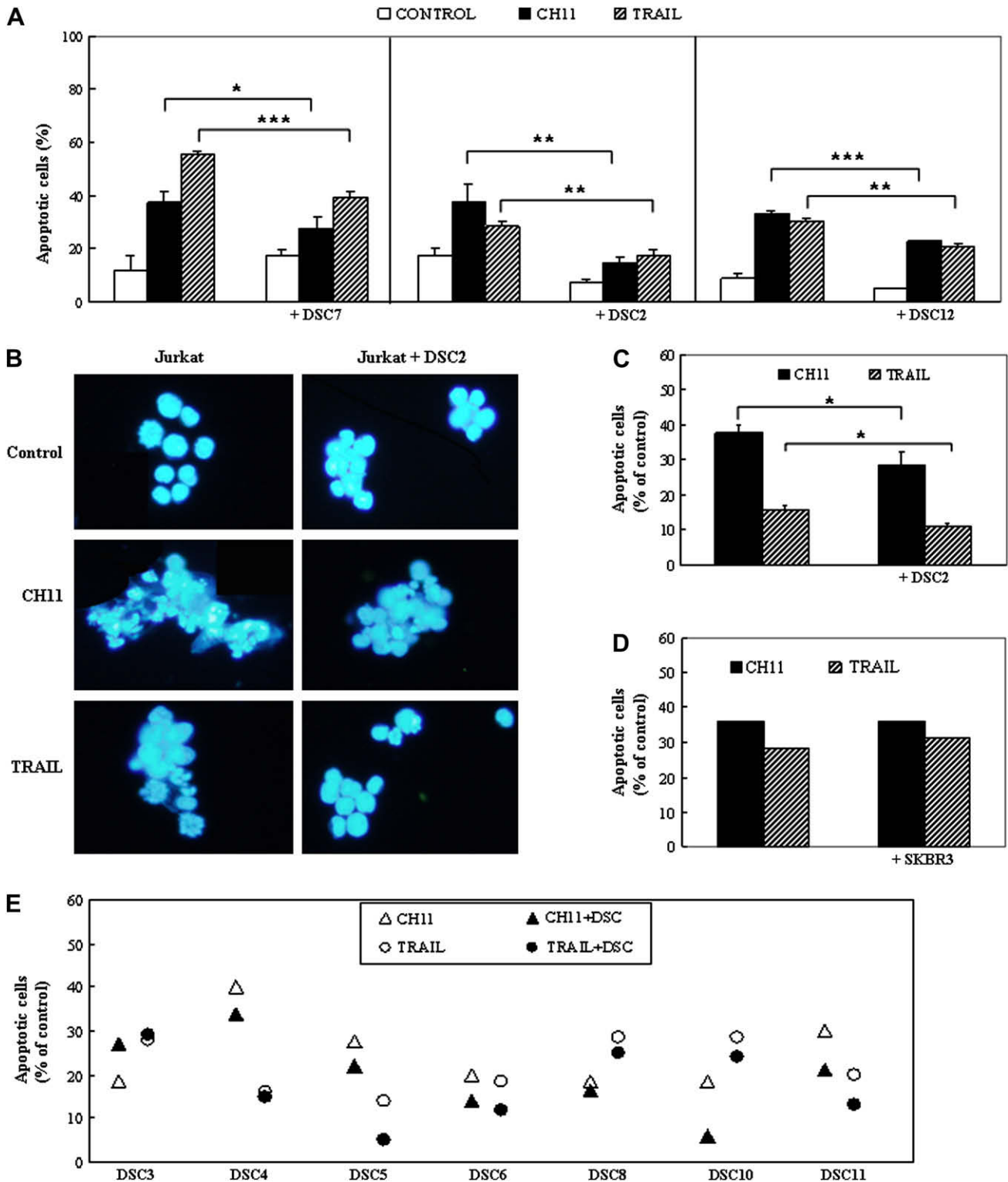
Evidence presented in several studies indicates that the human placenta is a rich source of TNF family ligands and receptors likely to play a major role in maintaining placental immune privilege [34]. By using highly purified cultures of DSC we have shown that the surface expression of CD95L and TRAIL was very low or absent in DSC lines, with the exception of two lines that showed high levels of CD95L (Table 1). Moreover, we only found a moderate expression of cytoplasmic CD95L. The differences between our findings and earlier studies describing the presence of death ligands on human DSC [18,22,24] may be due to the different type of samples and techniques used to detect these proteins, since most previous studies observed the expression of death ligands in human decidual cells by immunohistochemical analyses in sections of first-trimester decidua.

The major finding of our study is that, regardless of the level of expression of CD95L and TRAIL, DSC do not induce apoptosis either in death ligand-sensitive Jurkat cells or in primary peripheral and decidual lymphocytes, but rather exert an anti-apoptotic paracrine effect. Furthermore, our results indicate that the pro-survival effect of DSC is readily noticeable in both NK and T lymphocytes isolated from peripheral blood as well as in purified decidual NK cells. This latter result is in agreement with the previous observation that DSC can influence the proliferation and survival of decidual NK lymphocytes [25]. In general, studies suggesting a role for DSC in the induction of apoptosis in maternal lymphocytes did not provide experimental confirmation, but proposed this role on the basis of the expression of death ligands on DSC [18] or the finding of an inverse relationship between CD95L expression in decidual cells and the number of CD95-expressing leukocytes in the same region [24]. Other reports found that endometrial stromal cells treated with IL-8 or human chorionic gonadotropin (hCG) up-regulate their CD95L expression and acquire the ability to induce apoptosis in Jurkat cells [22,33]. However, they did not prove that CD95L is responsible for the induction of apoptosis.

The results presented here do not rule out the possibility that death ligands on DSC may interact with death receptors on lymphocytes, but suggest that in addition to the potential apoptotic signals, DSC may provide enough survival or regulatory signals to prevent apoptosis in lymphocytes. Consistent with our findings is the observation (in studies of the induction of apoptosis by IL-8- or hCG- treated endometrial cells) that untreated endometrial stromal cells have an anti-apoptotic effect on T lymphocytes [22,33]. Moreover, other authors have failed to detect apoptotic leukocytes in normal early pregnancy [26]. Interestingly, studies with *lpr* and *gld* mice, which are functionally defective in CD95 and CD95L respectively, have questioned the involvement of the CD95-CD95L pair in materno-fetal tolerance as no adverse effect on pregnancy outcome was found in either of these models [35,36]. It is also possible that CD95L and TRAIL expressed on DSC are not biologically active.

The protective effect of DSC does not depend on cell-to-cell contact with lymphocytes, as this effect was observed even when we used Transwell plates and DSC culture supernatants. Therefore,

**Fig. 1.** Expression and function of death receptors and ligands in DSC. (A) Cell surface expression of CD95, TRAIL receptors (R1 and R2), CD95L and TRAIL, was analyzed by flow cytometry in DSC lines. Figure shows percentage of positive cells. Data are displayed as mean  $\pm$  SEM from fifteen DSC lines. (B) Surface expression on DSC8 cells (solid lines). (C) Surface and cytoplasmic expression of CD95L in a representative DSC line. Similar results were obtained in four different DSC lines. (D) DSC were either untreated or incubated with anti-CD95 mAb CH11 (100 ng/ml) or recombinant TRAIL (250 ng/ml). After treatment for 24 h, DSC were removed and stained with propidium iodide to analyze the percentage of apoptotic cells. As a positive control, apoptosis was determined in Jurkat cells treated with 10 ng/ml CH11 or 100 ng/ml TRAIL. Error bars show SEM from six different DSC lines. (E) DSC and Jurkat cells were either incubated alone (grey lines) or co-incubated (black lines) for 24 h to determine the expression of CD95L on DSC (upper panel) and the expression of CD95 on Jurkat cells (lower panel) by flow cytometry. Jurkat cells and adherent DSC cells from co-cultures were collected separately for the analysis. In (B) (C) and (E) shaded peaks show background fluorescence with the isotype control antibody.

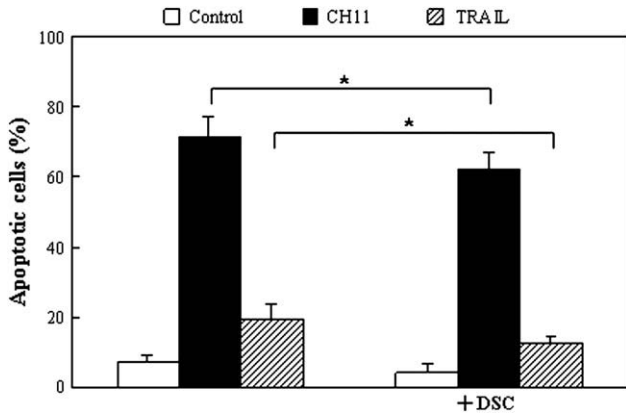


**Fig. 2.** Co-incubation with DSC reduces death receptor-mediated apoptosis in Jurkat cells. A) Jurkat cells incubated alone or co-incubated with different DSC lines, were treated without or with 2 ng/ml CH11 or 100 ng/ml TRAIL for 24 h. B–E) Jurkat cells were pretreated with 5 ng/ml CH11 or 200 ng/ml recombinant TRAIL for 30 min at 4 °C. Cells were then washed and incubated alone or co-cultured with different DSC lines (B, C, E) or the breast tumor cell line SKBR3 (D) for 24 h. The percentage of apoptotic cells with sub-G1 content was assessed by flow cytometry (A, C, D, E) and condensed nuclei were observed by fluorescence microscopy (B). Data for the different DSC lines correspond to independent experiments. Error bars show SEM of triplicate samples. \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001.

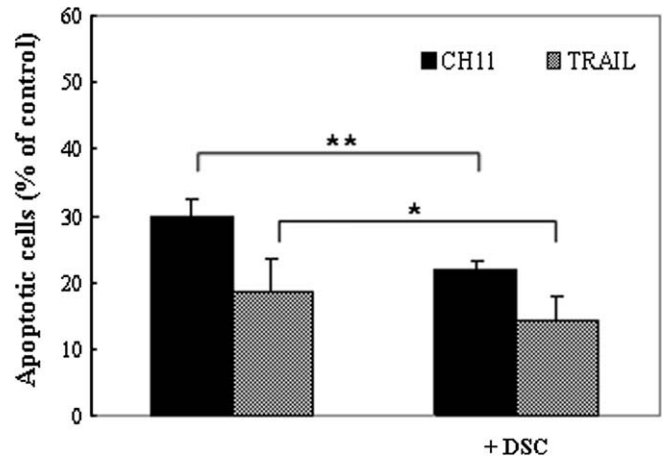
cytokines or other soluble factors secreted by DSC may act through a paracrine mechanism by supplying a suitable microenvironment for lymphocyte survival. The secretion of these survival factors must vary between different DSC lines, as the protective effects of

DSC differed between cell lines. It has been reported that DSC produce and secrete several cytokines, chemokines and growth factors such as IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-11, stem cell factor, vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor, among others

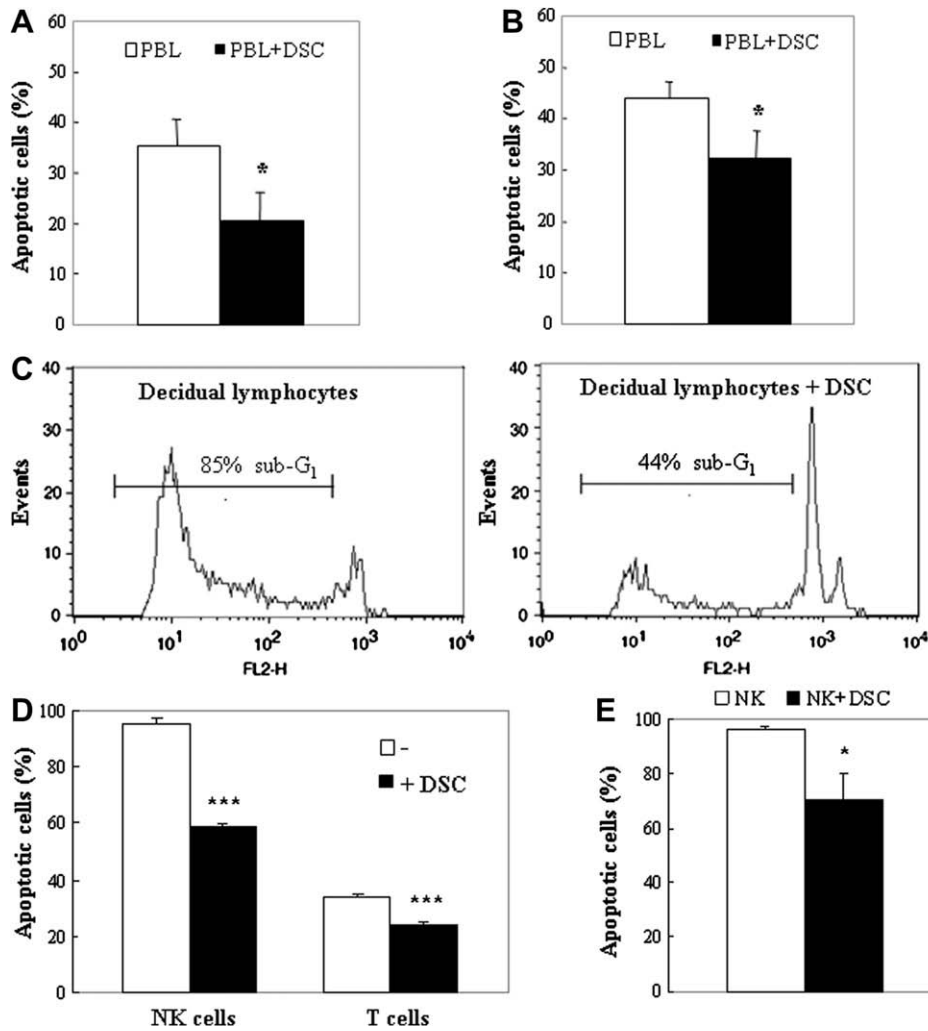




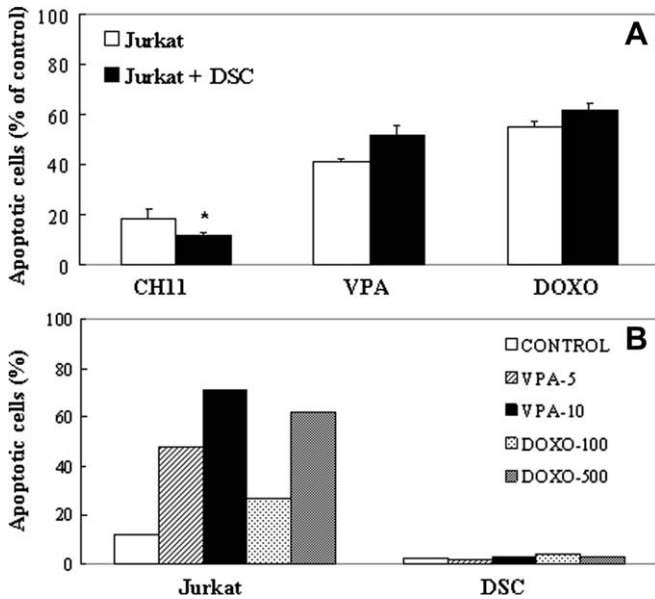
**Fig. 3.** Fresh DSC reduce death receptor-mediated apoptosis in Jurkat cells. Jurkat cells were pretreated for 30 min with 5 ng/ml CH11 or 200 ng/ml recombinant TRAIL. Cells were then washed and incubated in the presence or in the absence of fresh DSC for 24 h. Sub-G1 apoptotic cells were detected by flow cytometry. Error bars show SEM of four independent experiments. \* $p < 0.05$ .



**Fig. 4.** Protective effect of DSC in the absence of cell contact. Jurkat cells were pretreated for 30 min with 5 ng/ml CH11 or 200 ng/ml TRAIL. After pretreatment and washing they were incubated alone or with DSC cultured on Transwell plates for 24 h. The percentage of apoptotic Jurkat cells was then determined by flow cytometry. Error bars show SEM from six independent experiments with different DSC lines, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .



**Fig. 5.** Co-incubation with DSC protects primary lymphocytes from spontaneous apoptosis. Peripheral blood lymphocytes were cultured for 6 days in the absence of stimuli to allow spontaneous apoptosis, and then they were incubated alone or co-incubated with DSC in normal (A) or Transwell plates (B) for 24 h. (C) Purified decidual lymphocytes were cultured alone or co-incubated with DSC for 24 h. (D) NK and T lymphocytes isolated from peripheral blood were cultured in the presence or in the absence of DSC in Transwell plates for 7 days. (E) Isolated decidual NK cells were incubated alone or with fresh DSC from the same donor for 4 days. The percentage of apoptotic lymphocytes was determined by flow cytometry. Error bars show SEM of three independent experiments with different DSC lines and samples from different donors. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .



**Fig. 6.** Effect of DSC on the induction of apoptosis in Jurkat cells by chemotherapeutic drugs. A) Jurkat cells incubated alone or with DSC were treated with 5 mM valproic acid (VPA) or 250 ng/ml doxorubicin (DOXO) for 24 h. As a control for the protective effect of DSC, Jurkat cells were pretreated with 5 ng/ml CH11 before incubation with or without DSC. B) Jurkat and DSC were treated for 24 h without or with different concentrations of VPA (5 and 10 mM) or DOXO (100 and 500 ng/ml). Sub-G1 apoptotic Jurkat (A, B) and DSC (B) cells were detected by flow cytometry. Data shown is representative of three independent experiments. Error bars are SEM of triplicate wells. \* $p < 0.05$ .

[20,32,37–41]. The ability of these molecules to protect against apoptosis has been described in different contexts and is thought to take place through different mechanisms, e.g., by activating survival signalling pathways or upregulating the expression of anti-apoptotic factors [42–46]. Thus, factors secreted by DSC may neutralize or inhibit the apoptotic effects of death ligands and may serve as survival factors for decidual lymphocytes. Together, the data presented here show that DSC exert a small but substantiated protective effect on lymphocytes in certain situations. However, we cannot rule out that DSC might also simultaneously trigger pro-apoptotic mechanisms [22–24]. Although we were unable to demonstrate the induction of apoptosis by CD95L-positive DSC, these cells may induce other pro-apoptotic phenomena.

Despite the expression of CD95 and TRAIL-R2 receptors on DSC, our results demonstrate that these cells are highly resistant to death ligand-mediated apoptosis. Previous reports have shown that endometrial stromal cells are resistant to anti-CD95 antibody, and have suggested that binding of CD95 induces survival signals in these cells [33,47]. On the other hand, Fluhr and co-workers have recently described that TNF- $\alpha$  and INF- $\gamma$  up-regulate the expression of CD95 and sensitizes endometrial stromal cells to CD95-induced apoptosis [48]. However, to our knowledge this is the first time that the resistance of DSC to TRAIL-mediated apoptosis has been evaluated. In agreement with the findings of Lonergan et al., who detected the presence of TRAIL-R3 and TRAIL-R4 non-signalling TRAIL decoy receptors in gestational membranes [49], we observed the expression of TRAIL-R4 on the plasma membrane of DSC (data not shown), which may explain why these cells were resistant to the induction of apoptosis by TRAIL. We also show that DSC are resistant not only to death ligands but also to other apoptotic stimuli such as chemotherapeutic drugs, which suggests that different anti-apoptotic factors may be expressed on DSC to induce a general state of apoptosis resistance. The factors secreted by DSC and discussed above may also interact in an autocrine or paracrine

manner to induce survival signals and protect DSC from the induction of apoptosis. These results are highly paradoxical if we take into account that the physiological tendency of DSC during pregnancy in mammals is to die out by apoptosis [50]. Further studies to examine the expression of anti-apoptotic proteins and the activation of survival pathways in human DSC lines will shed light on the resistance of these cells to apoptosis.

## Acknowledgments

We are grateful to Dr S. Jordán from the Clínica el Sur (Málaga, Spain) and Dr F. García Gallego from the Clínica Ginegranada (Granada, Spain) for providing us with decidual specimens. We thank A.C. Abadía-Molina for invaluable advice and K. Shashok for improving use of English in the manuscript. This work was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo (grant PI060712 to C.R.-R.), the Ministerio de Ciencia y Tecnología (grant SAF2006-05689 to E.G.O.) and the Consejería de Salud, Junta de Andalucía (SAS PFI 3/02 and TCMR 0010/2006 to E.G.O.). O.B. was the recipient of a fellowship from the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía. J.C.M. and E.L.-D. were supported by a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia.

## References

- García-Pacheco JM, Oliver C, Kimatrai M, Blanco FJ, Olivares EG. Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related to bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod* 2001;7:1151–7.
- Kimatrai M, Blanco O, Munoz-Fernandez R, Tirado I, Martín F, Abadía-Molina AC, et al. Contractile activity of human decidual stromal cells. II. Effect of interleukin-10. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6126–30.
- Kimatrai M, Oliver C, Abadía-Molina AC, García-Pacheco JM, Olivares EG. Contractile activity of human decidual stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:844–9.
- Oliver C, Montes MJ, Galindo JA, Ruiz C, Olivares EG. Human decidual stromal cells express alpha-smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum Reprod* 1999;14:1599–605.
- Munoz-Fernandez R, Blanco FJ, Frecha C, Martín F, Kimatrai M, Abadía-Molina AC, et al. Follicular dendritic cells are related to bone marrow stromal cell progenitors and to myofibroblasts. *J Immunol* 2006;177:280–9.
- Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 1998;280:243–8.
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991;66:233–43.
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993;75:1169–78.
- Green DR, Ferguson TA. The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:917–24.
- Hammer A, Dohr G. Expression of Fas-ligand in first trimester and term human placental villi. *J Reprod Immunol* 2000;46:83–90.
- Uckan D, Steele A, Cherry, Wang BY, Chamizo W, Koutsonikolis A, et al. Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. *Mol Hum Reprod* 1997;3:655–62.
- Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod* 1991;6:791–8.
- Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 2004;10:55–63.
- Frangosmyr L, Baranov V, Nagaeva O, Stendahl U, Kjellberg L, Mincheva-Nilsson L. Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. *Mol Hum Reprod* 2005;11:35–41.
- Blott EJ, Bossi G, Clark R, Zvelebil M, Griffiths GM. Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail. *J Cell Sci* 2001;114:2405–16.
- Zuccato E, Blott EJ, Holt O, Sigismund S, Shaw M, Bossi G, et al. Sorting of Fas ligand to secretory lysosomes is regulated by mono-ubiquitylation and phosphorylation. *J Cell Sci* 2007;120:191–9.
- Chen L, Liu X, Zhu Y, Cao Y, Sun L, Jin B. Localization and variation of TRAIL and its receptors in human placenta during gestation. *Life Sci* 2004;74:1479–86.
- Phillips TA, Ni J, Pan G, Ruben SM, Wei YF, Pace JL, et al. TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege. *J Immunol* 1999;162:6053–9.

# Contractile Activity of Human Decidual Stromal Cells. II. Effect of Interleukin-10

Maria Kimatrai, Osmany Blanco, Raquel Muñoz-Fernández, Irene Tirado, Francisco Martin, Ana Clara Abadía-Molina, and Enrique G. Olivares

*Unidad de Inmunología (M.K., O.B., R.M.-F., I.T., A.C.A.-M., E.G.O.), Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, Hospital Universitario “San Cecilio” Universidad de Granada; and Instituto de Parasitología y Biomedicina (F.M.), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 18012 Granada, Spain*

**Context:** Human decidual stromal cells (DSC) are myofibroblast-like cells that express  $\alpha$ -smooth muscle ( $\alpha$ -SM) actin, a protein associated with cell contractility. Several lines of experimental evidence in humans and mice show that antiinflammatory cytokines favor normal pregnancy, whereas Th1 and inflammatory cytokines play a role in abortion. We previously demonstrated that IL-2, a Th1 cytokine, increased the contractility of human DSC.

**Objective:** We studied the effect of the antiinflammatory cytokines IL-10 and IL-4 on the contractility of DSC from first-trimester pregnancy.

**Setting and Patients:** We studied 10 healthy women who underwent elective vaginal termination of first-trimester pregnancy at Clínica El Sur, Málaga, and Clínica Ginegranada, Granada.

**Main Outcome Measure(s):** After isolation of DSC, cell contractility

was measured with the collagen gel contraction assay.  $\alpha$ -SM actin was detected with Western blotting and immunofluorescence.

**Results:** We found that IL-10, but not IL-4, increased the volume of the collagen gel matrixes in which the cytokine-treated DSC were cultured, showing that IL-10 decreased DSC contractility. By Western blotting we demonstrated that this effect was not related to an alteration in the synthesis of  $\alpha$ -SM actin. Nevertheless, we observed by immunofluorescence microscopy that DSC treated with IL-10 exhibited stress fibers with a lower content of  $\alpha$ -SM actin than untreated control DSC.

**Conclusions:** IL-10 relaxes DSC by reducing the incorporation of  $\alpha$ -SM actin into their stress fibers. This relaxing activity may be of relevance for the maintenance of pregnancy. (*J Clin Endocrinol Metab* 90: 6126–6130, 2005)

DECIDUAL STROMAL CELLS (DSC) are the main cellular component of the decidua, the maternal constituent of the maternal-fetal interface. These cells comprise a distinctive cell class whose origin and lineage remained unknown until recently. We have demonstrated that human DSC are related to bone marrow stromal precursors and that their morphology, phenotype, and functions are similar to those of myofibroblasts, fibroblastic cells with contractile activity that are involved in wound retraction (1–3). DSC express  $\alpha$ -smooth muscle ( $\alpha$ -SM) actin (1–3), a microfilament that is considered a marker of myofibroblasts (4), and are able to contract collagen gel matrixes under the effect of TGF $\beta$ 1 and platelet-derived growth factor (3). Furthermore, like myofibroblasts, DSC exhibit immune activities that appear to be relevant in maternal-fetal immune cross-talk (5–8).

There is increasing evidence that the immune system is involved in normal pregnancy and abortion (9). In mice and humans, normal pregnancy is related to the local and peripheral production of antiinflammatory cytokines (10), whereas abortion is associated with Th1 and inflammatory cytokine production (10, 11). DSC appear to be involved in this Th1-inflammatory/antiinflammatory balance, because

Th1 cytokines such as IL-2 block decidualization (12) and induce DSC contractility, and this may contribute to trophoblast expulsion during spontaneous abortion (3). Here we studied the effect of antiinflammatory cytokines, which favor normal pregnancy (10), on DSC contractility.

## Patients and Methods

### Tissues

Ten samples from elective vaginal terminations of first-trimester pregnancy (6–11 wk) from healthy patients, aged 20–30 yr, were used. We excluded women receiving any medication or with infectious, autoimmune, or other systemic or local diseases. None of the abortions was pharmacologically induced. The specimens were obtained by vaginal curettage at the Clínica El Sur, Málaga, and Clínica Ginegranada, Granada. Informed consent was obtained from each patient. This study was approved by the research and ethics committee of the Hospital Universitario de San Cecilio.

### Fibroblast medium

According to the information provided by the manufacturer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), fibroblast medium consists of fibroblast basal medium (a modified version of the culture medium MCDB 105) and a supplement containing fetal calf serum (FCS) (2%, final concentration) and unspecified amounts of basic fibroblast growth factor, heparin, epidermal growth factor, and hydrocortisone.

### Isolation and culture of DSC

Decidual tissues were examined histologically to exclude the presence of infection or inflammatory infiltration. Samples of decidua from different patients were not pooled so as to avoid the induction of cy-

First Published Online August 16, 2005

Abbreviations: DSC, Decidual stromal cells; FCS, fetal calf serum;  $\alpha$ -SM,  $\alpha$ -smooth muscle.

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

tokine secretion as a result of the allogeneic reaction of leukocytes that initially contaminate DSC cultures. Tissues were thoroughly washed in PBS solution, and the decidua was carefully freed from the trophoblast. Decidual fragments were finely minced between two scalpels in a small volume of RPMI 1640 medium with 100 U/ml penicillin and 50  $\mu$ g/ml gentamicin and put in a solution of 0.5% trypsin and 0.2% EDTA (Sigma-Aldrich) for 15 min at 37 C. The proteolytic reaction of trypsin was stopped by adding cold RPMI with 20% FCS (Life Technologies, Inc., Paisley, UK); the suspension was then filtered through gauze and centrifuged at 425  $\times$  g for 10 min. The supernatant was discarded and the cell pellet was suspended in RPMI and centrifuged on Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) for 20 min at 600  $\times$  g. Cells were collected from the interface, suspended in PBS, and washed. This suspension was incubated in culture flasks for 1 h in complete RPMI with 10% FCS to allow macrophages and granulocytes to adhere to the flask. The supernatant was washed and incubated in fibroblast medium with 100 U/ml penicillin and 50  $\mu$ g/ml gentamicin. After overnight incubation to allow DSC to adhere to the flask, nonadherent cells in the supernatant were discarded. The remaining adherent cells were mainly DSC. Fibroblast medium was then replaced and changed twice a week, and after 2–4 wk, adherent cells covered the whole surface of the 25-cm<sup>2</sup> culture flask. Proliferating DSC overgrew other possible contaminant cells, thus further guaranteeing the purity of the cultures. Purity was further confirmed using flow cytometry to detect the coexpression of CD10 and CD13 and the lack of CD45 antigens by 95–100% of DSC (1–3, 5). In fibroblast medium, cells proliferated for 8–12 wk; during this period their antigen phenotype was stable (2).

### Reagents

IL-10 and IL-4 were purchased from Sigma-Aldrich. The neutralizing antihuman IL-10 monoclonal antibody (JES3-19F1) and rat IgG2a (R35-95) were purchased from PharMingen (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium).

### Collagen gel contraction assay

Cellular collagen gel contraction assays were performed as previously described (13). A sterile solution of purified, pepsin-solubilized bovine dermal collagen (Vitrogen; Cohesion Technologies, Inc., Palo Alto, CA) was prepared according to the manufacturer's instructions and combined with 25  $\times$  10<sup>4</sup> DSC. The collagen/cell mixture (100  $\mu$ l/well) was dispensed into culture plates and allowed to polymerize at 37 C for 30 min. Immediately after polymerization, 2 ml fibroblast medium with or without the appropriate cytokine was added to each well. After incubation for 48 h, the height (*l*) and diameter (*d*) of each gel were measured with the scale of the fine adjustment knob (for *l*) and with the scale of the stage micrometer of the microscope (for *d*), and the volume (*V*) of each gel was calculated with the following formula:  $V = 1/24 \times \pi \times l \times (3 \times d^2 + l^2)$ .

The mean of the measurements (*n* = 6) taken at each concentration point was used to estimate gel volume. The data are presented as the volume of gel of cytokine-treated DSC compared with cells cultured in the absence of cytokine.

To demonstrate the specificity of the action of IL-10, the gel contraction assay was carried out as indicated, but a neutralizing anti-IL-10 monoclonal antibody (JES3-19F1) (1, 5, or 10  $\mu$ g/ml), or control rat IgG2a (10  $\mu$ g/ml), was added to the wells after polymerization of the gel and incubated for 1 h before the addition of 50 ng/ml IL-10. DSC with the antibody and the cytokine were then incubated for an additional period of 48 h before measuring the heights and diameters of the gels.

### Western immunoblotting

Cells were lysed with 1% Nonidet P-40 lysis buffer containing protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), resolved by SDS-PAGE (10% polyacrylamide gels, reducing conditions), and electrotransferred to Hybond-P polyvinylidene difluoride membranes (Amersham, Little Chalfont, UK). Membranes were blocked with 5% nonfat milk and probed for 1 h at room temperature with an anti- $\alpha$ -SM actin monoclonal antibody (Sigma-Aldrich) followed by incubation for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-labeled goat antimouse antibody (Caltag, Burlingame, CA). The blot was developed by chemilumines-

cence (ECL; Amersham) and exposed to autoradiographs (Amersham). Loading controls were carried out by rehybridization of stripped membranes with an anti-ERK polyclonal antibody (anti-MAP kinase 1/2; Upstate Biotechnology, Milton Keynes, UK).

### Immunofluorescence microscopy

DSC were plated onto slides in fibroblast medium. After 48 h, cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at 4 C, and permeabilized with cold acetone for 10 min before the addition of fluoresceinated anti- $\alpha$ -SM actin monoclonal antibody (Sigma-Aldrich) and tetramethylrhodamine-isothiocyanate-labeled phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR). Preparations were examined with a Leica confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

### IL-10 assay

Concentrations of IL-10 in the supernatants of the DSC cultures were determined by a commercially available enzyme immunoassay (R&D, Minneapolis, MN). The assay is sensitive to 3.9 pg/ml IL-10. Intra- and interassay coefficients of variation are less than 6.6 and less than 7.6%, respectively. The assay was performed according to the manufacturer's instructions, and all samples were determined in duplicate.

### Statistical analysis

Each experiment was made three to five times, and the figures illustrate representative results from a specific experiment (see Figs. 2–5). Gel volumes were compared with the Student's *t* test. A *P* value of 0.05 was considered statistically significant (see Figs. 2 and 3).

## Results

### Effect of IL-10 and IL-4 on DSC contractility

DSC were cultured in collagen gel matrixes (Fig. 1). In these matrixes, the state of contraction of DSC determines gel volume (3, 13). IL-10 increased the volume in a dose-response manner, but IL-4 did not have any significant effect on the gel matrixes (Fig. 2). These results demonstrated that IL-10, but not IL-4, relaxed cultured DSC. The specificity of the effect of IL-10 on DSC was confirmed by blocking this effect with a neutralizing anti-IL-10 antibody. This antibody significantly reduced or even abrogated the increase in volume of the gel matrixes induced by IL-10, whereas the control rat IgG2a showed no blocking effect. The anti-IL-10 antibody

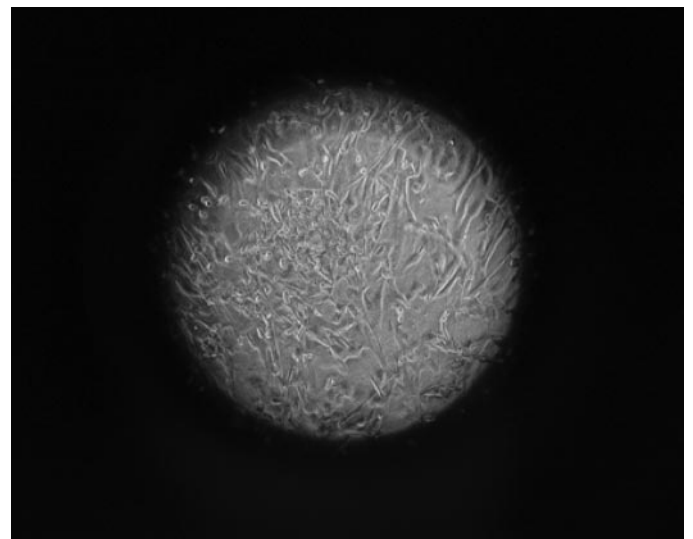


FIG. 1. Collagen gel matrix containing DSC ( $\times$ 40 magnification).



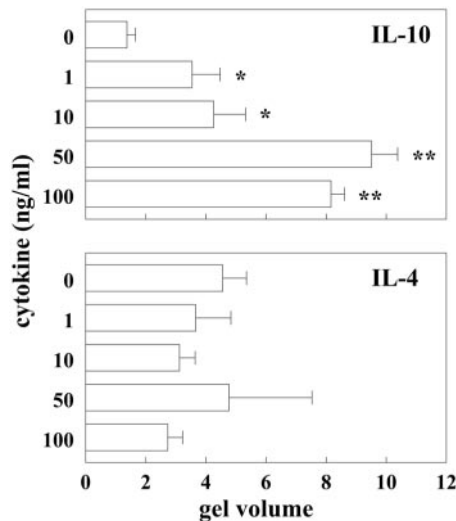


FIG. 2. Effect of IL-10 and IL-4 on the volume of collagen gel matrixes containing DSC. DSC were cultured in collagen gel matrixes for 48 h in the absence of cytokines or in the presence of increasing amounts of IL-10 or IL-4. The mean number of measurements ( $n = 6$ ) taken at each concentration *bar* was used to estimate gel volume. The data are presented as volume expressed in arbitrary units  $\pm$  SD. \*,  $P < 10^{-4}$ ; \*\*,  $P < 10^{-9}$  vs. untreated control DSC. IL-10, but not IL-4, significantly increased the volume of the collagen gel matrixes. Results are shown from one representative experiment of five.

also significantly reduced the volume of the gel matrix of DSC cultured in the absence of IL-10 (Fig. 3).

#### IL-10 decreases the presence of $\alpha$ -SM actin in DSC stress fibers

The relaxing effect of IL-10 on DSC did not depend on inhibition of  $\alpha$ -SM actin synthesis, because Western blot re-

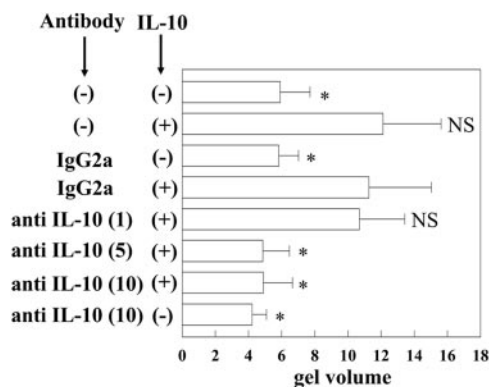


FIG. 3. Blocking activity of the neutralizing antihuman IL-10 monoclonal antibody (JES3-19F1) on the effect of IL-10. Decidual stromal cells were cultured in collagen gel matrixes for 48 h in the absence or in the presence of 50 ng/ml IL-10, without or with increasing amounts (in parentheses; 1, 5, or 10  $\mu$ g/ml) of the anti-IL-10 antibody. Rat IgG2a (R35-95) (10  $\mu$ g/ml) was used as control. The mean number of measurements ( $n = 6$ ) taken at each concentration *bar* was used to estimate gel volume. The data are presented as volume expressed in arbitrary units  $\pm$  SD. \*,  $P < 5 \times 10^{-3}$  vs. DSC incubated with IL-10 and control IgG2a. The anti-IL-10 antibody significantly reduced the increase in volume of the gel matrixes induced by IL-10. This antibody also significantly reduced the volume of the gel matrixes containing DSC cultured without IL-10 ( $P < 5 \times 10^{-2}$ ; significance not shown). Results are shown from one representative experiment of three.

sults showed that IL-10 did not affect the amount of  $\alpha$ -SM actin in these cells (Fig. 4). Nevertheless, we observed by immunofluorescence microscopy that IL-10 decreased the presence of  $\alpha$ -SM actin in the stress fibers (Fig. 5). This effect appears to be related to earlier findings in myofibroblasts, in which an increase in contractility was related to the incorporation of  $\alpha$ -SM actin in stress fibers (14, 15). Thus, the contraction or relaxation of myofibroblasts or myofibroblast-like cells appears to be associated with the increase or decrease, respectively, in the incorporation of  $\alpha$ -SM actin in the stress fibers.

#### Cultured DSC secrete IL-10

We detected IL-10 in supernatants collected from the culture medium of all the different DSC lines (Fig. 6). This showed that our cultured DSC secreted IL-10. This endogenous IL-10 may contribute to the relaxation of DSC. The fact that the anti-IL-10 antibody added to DSC cultured without exogenous IL-10 significantly reduced the volume of the gel matrixes suggests that the antibody blocked the effect of endogenous IL-10 (Fig. 3).

#### Discussion

Several lines of experimental evidence in humans and mice support the notion that normal and pathological pregnancies are associated with different immunological mechanisms. In general, in normal pregnancy the antiinflammatory cytokine response predominates, whereas in spontaneous abortion this response shifts to inflammatory (9–11). These immunological activities take place mainly in the decidua, the maternal tissue in close contact with fetal trophoblast. DSC, the characteristic cellular component of the decidua, exert different immunological activities that can play a role in maternal-fetal cross-talk (5, 16, 17). Recently, we demonstrated that IL-2, a Th1 cytokine, increased DSC contractility and speculated that this activity may facilitate trophoblast expulsion during abortion (3). In the present study, we show that the antiinflammatory cytokine IL-10, but not IL-4, relaxed DSC (Figs. 2 and 3). This relaxing effect has also been seen in the uterine muscle, because Sadowsky *et al.* (18) demonstrated that IL-10 reduced IL-1 $\beta$ -induced uterine contractility in rhesus monkeys. This effect may, therefore, favor the normal progression of pregnancy.

The expression of  $\alpha$ -SM actin by DSC and their ability to contract led us to conclude that these cells were a form of myofibroblast (1, 3). The contractility of myofibroblasts ap-

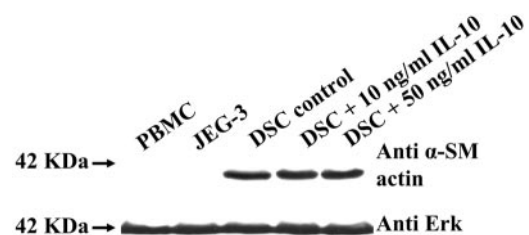
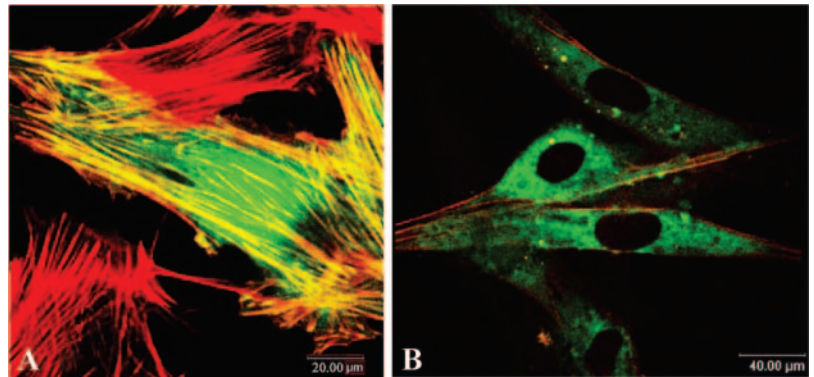


FIG. 4. Detection of  $\alpha$ -SM actin in DSC cultured without or with IL-10 for 48 h. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and the tumor cell line JEG-3 were used as negative controls for the expression of  $\alpha$ -SM actin. MAPK ERK was used as the loading control. Results are shown from one representative experiment of three.

FIG. 5. Immunofluorescence detection of  $\alpha$ -SM actin in the cytoplasm of DSC.  $\alpha$ -SM actin was detected with a fluoresceinated monoclonal antibody. Stress fibers were detected by staining with tetramethylrhodamine-isothiocyanate-labeled phalloidin (red). A, Untreated DSC revealed the presence of  $\alpha$ -SM actin in the stress fibers (yellow, colocalization with phalloidin). B, DSC cultured with 50 ng/ml IL-10 for 48 h (B) showed diffuse staining with anti- $\alpha$ -SM actin (green) and almost no colocalization with phalloidin in the stress fibers. Results are shown from one representative experiment of three.



pears to be related to the incorporation of  $\alpha$ -SM actin in stress fibers (15). In this connection, the relaxing effect of IL-10 (Fig. 2) seems to be related to a decrease in  $\alpha$ -SM actin in stress fibers of DSC (Fig. 5). Progesterone, a hormone that favors pregnancy, up-regulates the production of Th2 cytokines by lymphocytes (19) and inhibits the production of Th1 cytokines (20). It also differentiates DSC to a progestation status and blocks their immune activities (16, 17). In fact, we have observed that progesterone also relaxes DSC cultured in collagen cell matrixes (in preparation), although this may be an indirect effect through the induction of IL-10 secretion by DSC (21).

The trophoblast is the main source of IL-10 in the maternal-fetal interface (22), although decidual leukocytes (23, 24) or DSC (21) can also produce this cytokine, and in our system, DSC secreted IL-10 in the culture medium (Fig. 6). Therefore, this cytokine may have a paracrine/autocrine effect on the relaxation of DSC. IL-10 has been shown to restore pregnancy in mice programmed to acquire inflammatory immunity as a result of intrinsic immune polarization (25) and also to prevent lipopolysaccharide-induced preterm delivery (26). In humans, a deficiency of placental IL-10 occurs in pre-eclampsia (27), and a decrease of decidual IL-10 was observed in missed abortion (28). This cytokine increases the resistance of trophoblast cells to Fas-mediated apoptosis (29)

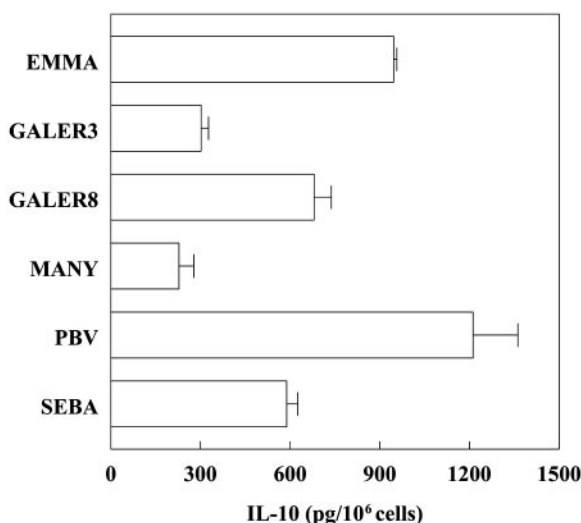


FIG. 6. Concentrations of IL-10 in the supernatants of six different DSC lines.

and induces the trophoblast expression of human leukocyte antigen G, a major histocompatibility complex Ib molecule involved in maternal tolerance to the fetus (30). Our results, together with these findings, show that IL-10 is a relevant molecule in the mechanism of maternal-fetal tolerance. Nevertheless, observations in pregnant IL-10 null mutant (IL-10<sup>-/-</sup>) mice showed that this molecule is a determinant of the growth trajectory of the progeny *in utero* and after birth, rather than of the success of pregnancy (31). Like IL-10, the null mutation of human leukocyte antigen G, a molecule that also appears to be essential for maternal-fetal tolerance in humans, was associated with successful pregnancies (32). These apparent contradictions may be explained if we take into account the high rate of redundancy in the actions of immune system molecules. On the other hand, reproduction is such an important function for the survival of the species that it may not depend on a single immunological molecule; many molecules may redundantly contribute to this function. One of these molecules is probably IL-10.

### Acknowledgments

We are grateful to Dr. S. Jordán from the Clínica el Sur (Málaga) and Dr. F. García Gallego from the Clínica Ginegranada (Granada) for providing us with decidual specimens. We thank K. Shashok for improving our use of English in the manuscript.

Received January 11, 2005. Accepted August 5, 2005.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Enrique G. Olivares, Unidad de Inmunología, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, 18012 Granada, Spain. E-mail: engarcia@ugr.es.

This work was funded by the following grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain: SAF2003-06799, SAS PFI 3/02, and SAS 195/2002.

### References

1. Oliver C, Montes MJ, Galindo JA, Ruiz C, Olivares EG 1999 Human decidual stromal cells express  $\alpha$ -smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum Reprod* 14:1599–1605
2. García-Pacheco JM, Oliver C, Kimatrai M, Blanco FJ, Olivares EG 2001 Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related with bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod* 7:151–157
3. Kimatrai M, Oliver C, Abadía-Molina AC, García-Pacheco JM, Olivares EG 2003 Contractile activity of human decidual stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88:844–849
4. Foo IT, Naylor IL, Timmons MJ, Trejdosiewicz LK 1992 Intracellular actin as a marker for myofibroblasts *in vitro*. *Lab Invest* 67:727–733
5. Olivares EG, Montes MJ, Oliver C, Galindo JA, Ruiz C 1997 Cultured human decidual stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. *Biol Reprod* 57:609–615
6. Huang HY, Wen Y, Krussel JS, Raga F, Soong YK, Polan ML 2001 Interleukin

- (IL)-1 $\beta$  regulation of IL-1  $\beta$  and IL-1 receptor antagonist expression in cultured human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1387–1393
7. Kai K, Nasu K, Nakamura S, Fukuda J, Nishida M, Miyakawa I 2002 Expression of interferon- $\gamma$ -inducible protein-10 in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 8:176–180
  8. Dunn CL, Critchley HOD, Kelly RW 2002 IL-15 regulation in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1898–1901
  9. Olivares EG, Muñoz R, Tejerizo G, Montes MJ, Gómez-Molina F, Abadía-Molina AC 2002 Decidual lymphocytes of human spontaneous abortions induce apoptosis but not necrosis in JEG-3 extravillous trophoblast cells. *Biol Reprod* 67:1211–1217
  10. Marzi M, Vigano A, Trabattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, Clerici M 1996 Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 106:127–133
  11. Raghupathy R 1997 Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 18:478–482
  12. Kanda Y, Jikihara H, Markoff E, Handwerker S 1999 Interleukin-2 inhibits the synthesis and release of prolactin from human decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab* 84:677–681
  13. Kleinman H, McGoodwin EB, Rennard SI, Martin GR 1979 Preparation of collagen substrates for cell attachment: effect of collagen concentration and phosphate buffer. *Anal Biochem* 94:308–313
  14. Arora PD, McCulloch CA 1994 Dependence of collagen remodelling on  $\alpha$ -smooth muscle actin expression by fibroblasts. *J Cell Physiol* 159:161–175
  15. Hinz B, Gabbiani G, Chaponnier C 2002 The NH<sub>2</sub>-terminal peptide of  $\alpha$ -smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo. *J Cell Biol* 157:657–663
  16. Montes MJ, Tortosa CG, Borja C, Abadía AC, González-Gomez F, Ruiz C, Olivares EG 1995 Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am J Reprod Immunol* 34:188–194
  17. Ruiz C, Montes MJ, Abadía-Molina AC, Olivares EG 1997 Phagocytosis by fresh and cultured human decidual stromal cells. Opposite effects of interleukin-1 $\alpha$  and progesterone. *J Reprod Immunol* 33:15–26
  18. Sadowsky DW, Novy MJ, Witkin SS, Gravett MG 2003 Dexamethasone or interleukin-10 blocks interleukin-1 $\beta$ -induced uterine contractions in pregnant rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 188:252–263
  19. Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C, Romagnani S, Maggi E 1995 Progesterone favours the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol* 155:128–133
  20. Choi BC, Polgar K, Xiao L, Hill JA 2000 Progesterone inhibits in-vitro embryotoxic Th1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 15:46–59
  21. Krasnow JS, Tollerud DJ, Naus G, DeLoia JA 1996 Endometrial Th2 cytokine expression throughout the menstrual cycle and early pregnancy. *Hum Reprod* 11:1747–1754
  22. Roth I, Corry DB, Locksley RM, Abrams JS, Litton MJ, Fisher SJ 1996 Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med* 184:539–548
  23. Heikkinen J, Möttönen M, Comi J, Alanen A, Lassila O 2003 Phenotypic characterization of human decidual macrophages. *Clin Exp Immunol* 131:498–505
  24. Vigano P, Gaffuri B, Somigliana E, Infantino M, Vignali M, Di Blasio AM 2001 Interleukin-10 is produced by human uterine natural killer cells but does not affect their production of interferon- $\gamma$ . *Mol Human Reprod* 7:971–977
  25. Chaouat G, Assal Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliot J, Mosmann T, Wegmann TG 1995 IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA  $\times$  DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN- $\gamma$ . *J Immunol* 154:4261–4268
  26. Dudley DJ, Dangerfield A, Edwin SS 1996 Interleukin-10 (IL-10) prevents preterm birth in a mouse model of infection-mediated preterm labor. *J Soc Gynecol Invest* 3:67A
  27. Hennessy A, Pilmore HL, Simmons LA, Painter DM 1999 A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. *J Immunol* 163:3491–3495
  28. Plevyak M, Hanna N, Mayer S, Murphy S, Pinar H, Fast L, Ekerfelt C, Ernerudh J, Berg G, Matthiesen L, Sharma S 2002 Deficiency of decidual IL-10 in first trimester missed abortion: a lack of correlation with the decidual immune cell profile. *Am J Reprod Immunol* 47:242–250
  29. Aschkenazi S, Straszewski S, Verwer KMA, Foellmer H, Rutherford T, Mor G 2002 Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells. *Biol Reprod* 66:1853–1861
  30. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, Carosella ED, Paul P 1999 IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 11:803–811
  31. White CA, Johansson M, Roberts CT, Ramsay AJ, Robertson SA 2004 Effect of interleukin-10 null mutation on maternal immune response and reproductive outcome in mice. *Biol Reprod* 70:123–131
  32. Ober C, Aldrich C, Rosinsky B, Robertson A, Walker MA, Willadsen S, Verp MS, Geraghty DE, Hunt JS 1998 HLA-G1 protein expression is not essential for fetal survival. *Placenta* 19:123–132

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

- [19] Blanco O, Tirado I, Munoz-Fernandez R, Abadia-Molina AC, Garcia-Pacheco JM, Pena J, et al. Human decidual stromal cells express HLA-G: effects of cytokines and decidualization. *Hum Reprod* 2008;23:144–52.
- [20] Montes MJ, Tortosa CG, Borja C, Abadia AC, Gonzalez-Gomez F, Ruiz C, et al. Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am J Reprod Immunol* 1995;34:188–94.
- [21] Olivares EG, Montes MJ, Oliver C, Galindo JA, Ruiz C. Cultured human decidual stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. *Biol Reprod* 1997;57:609–15.
- [22] Kayisli UA, Selam B, Guzeloglu-Kayisli O, Demir R, Arici A. Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas–Fas ligand system. *J Immunol* 2003;171:2305–13.
- [23] Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Mitsiades N, Margioris A, Chrousos GP, et al. Corticotropin-releasing hormone (CRH) and immunotolerance of the fetus. *Biochem Pharmacol* 2003;65:917–21.
- [24] Qiu Q, Yang M, Tsang BK, Gruslin A. Fas ligand expression by maternal decidual cells is negatively correlated with the abundance of leukocytes present at the maternal–fetal interface. *J Reprod Immunol* 2005;65:121–32.
- [25] King A, Gardner L, Loke YW. Co-stimulation of human decidual natural killer cells by interleukin-2 and stromal cells. *Hum Reprod* 1999;14:656–63.
- [26] Pongcharoen S, Bulmer JN, Searle RF. No evidence for apoptosis of decidual leucocytes in normal and molar pregnancy: implications for immune privilege. *Clin Exp Immunol* 2004;138:330–6.
- [27] MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, Alnemri ES. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1997;272:25417–20.
- [28] Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem* 1994;218:314–9.
- [29] Morales JC, Ruiz-Magana MJ, Ruiz-Ruiz C. Regulation of the resistance to TRAIL-induced apoptosis in human primary T lymphocytes: role of NF-kappaB inhibition. *Mol Immunol* 2007;44:2587–97.
- [30] Ruiz-Ruiz C, Robledo G, Font J, Izquierdo M, Lopez-Rivas A. Protein kinase C inhibits CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis by at least two different mechanisms in Jurkat T cells. *J Immunol* 1999;163:4737–46.
- [31] Palacios C, Yerbos R, Lopez-Rivas A. Flavopiridol induces cellular FLICE-inhibitory protein degradation by the proteasome and promotes TRAIL-induced early signaling and apoptosis in breast tumor cells. *Cancer Res* 2006;66:8858–69.
- [32] Engert S, Rieger L, Kapp M, Becker JC, Dietl J, Kammerer U. Profiling chemokines, cytokines and growth factors in human early pregnancy decidua by protein array. *Am J Reprod Immunol* 2007;58:129–37.
- [33] Selam B, Kayisli UA, Garcia-Velasco JA, Akbas GE, Arici A. Regulation of Fas ligand expression by IL-8 in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3921–7.
- [34] De Falco M, Penta R, Laforgia V, Cobellis L, De Luca A. Apoptosis and human placenta: expression of proteins belonging to different apoptotic pathways during pregnancy. *J Exp Clin Cancer Res* 2005;24:25–33.
- [35] Chaouat G, Clark DA. FAS/FAS ligand interaction at the placental interface is not required for the success of allogeneic pregnancy in anti-paternal MHC preimmunized mice. *Am J Reprod Immunol* 2001;45:108–15.
- [36] Rogers AM, Boime I, Connolly J, Cook JR, Russell JH. Maternal–fetal tolerance is maintained despite transgene-driven trophoblast expression of MHC class I, and defects in Fas and its ligand. *Eur J Immunol* 1998;28:3479–87.
- [37] Dimitriadis E, Robb L, Salamonsen LA. Interleukin 11 advances progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2002;8:636–43.
- [38] Sakakibara H, Taga M, Saji M, Kida H, Minaguchi H. Gene expression of epidermal growth factor in human endometrium during decidualization. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:223–6.
- [39] Simon C, Frances A, Piquette G, Hendrickson M, Milki A, Polan ML. Interleukin-1 system in the materno-trophoblast unit in human implantation: immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:847–54.
- [40] Sugino N, Kashida S, Karube-Harada A, Takiguchi S, Kato H. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Reproduction* 2002;123:379–87.
- [41] Umekage H, Saito S, Morikawa H. Enhancement by stem cell factor of interleukin-2 (IL-2)-induced DNA synthesis in human decidual CD16-CD56bright natural killer cells mediated by increased expression of the IL-2 receptor [alpha] chain. *J Reprod Immunol* 1998;40:1–24.
- [42] Drouet M, Mathieu J, Grenier N, Multon E, Sotto JJ, Herodin F. The reduction of in vitro radiation-induced Fas-related apoptosis in CD34+ progenitor cells by SCF, FLT-3 ligand, TPO, and IL-3 in combination resulted in CD34+ cell proliferation and differentiation. *Stem Cells* 1999;17:273–85.
- [43] Gibson S, Tu S, Oyer R, Anderson SM, Johnson GL. Epidermal growth factor protects epithelial cells against Fas-induced apoptosis. Requirement for Akt activation. *J Biol Chem* 1999;274:17612–8.
- [44] Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ. Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology* 2005;128:2054–65.
- [45] Kurita-Ochiai T, Ochiai K, Suzuki N, Otsuka K, Fukushima K. Human gingival fibroblasts rescue butyric acid-induced T-cell apoptosis. *Infect Immun* 2002;70:2361–7.
- [46] Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, et al. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:781–8.
- [47] Tanaka T, Umesaki N. Fas antigen (CD95) mediates cell survival signals to regulate functional cellular subpopulations in normal human endometrial stromal cells. *Int J Mol Med* 2003;11:757–62.
- [48] Fluhr H, Krenzer S, Stein GM, Stork B, Deperschmidt M, Wallwiener D, et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha sensitize primarily resistant human endometrial stromal cells to Fas-mediated apoptosis. *J Cell Sci* 2007;120:4126–33.
- [49] Lonergan M, Aponso D, Marvin KW, Helliwell RJ, Sato TA, Mitchell MD, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TRAIL receptors, and the soluble receptor osteoprotegerin in human gestational membranes and amniotic fluid during pregnancy and labor at term and preterm. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3835–44.
- [50] Gu Y, Jow GM, Moulton BC, Lee C, Sensibar JA, Park-Sarge OK, et al. Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization. *Endocrinology* 1994;135:1272–9.