

Programa de Doctorado en Biomedicina

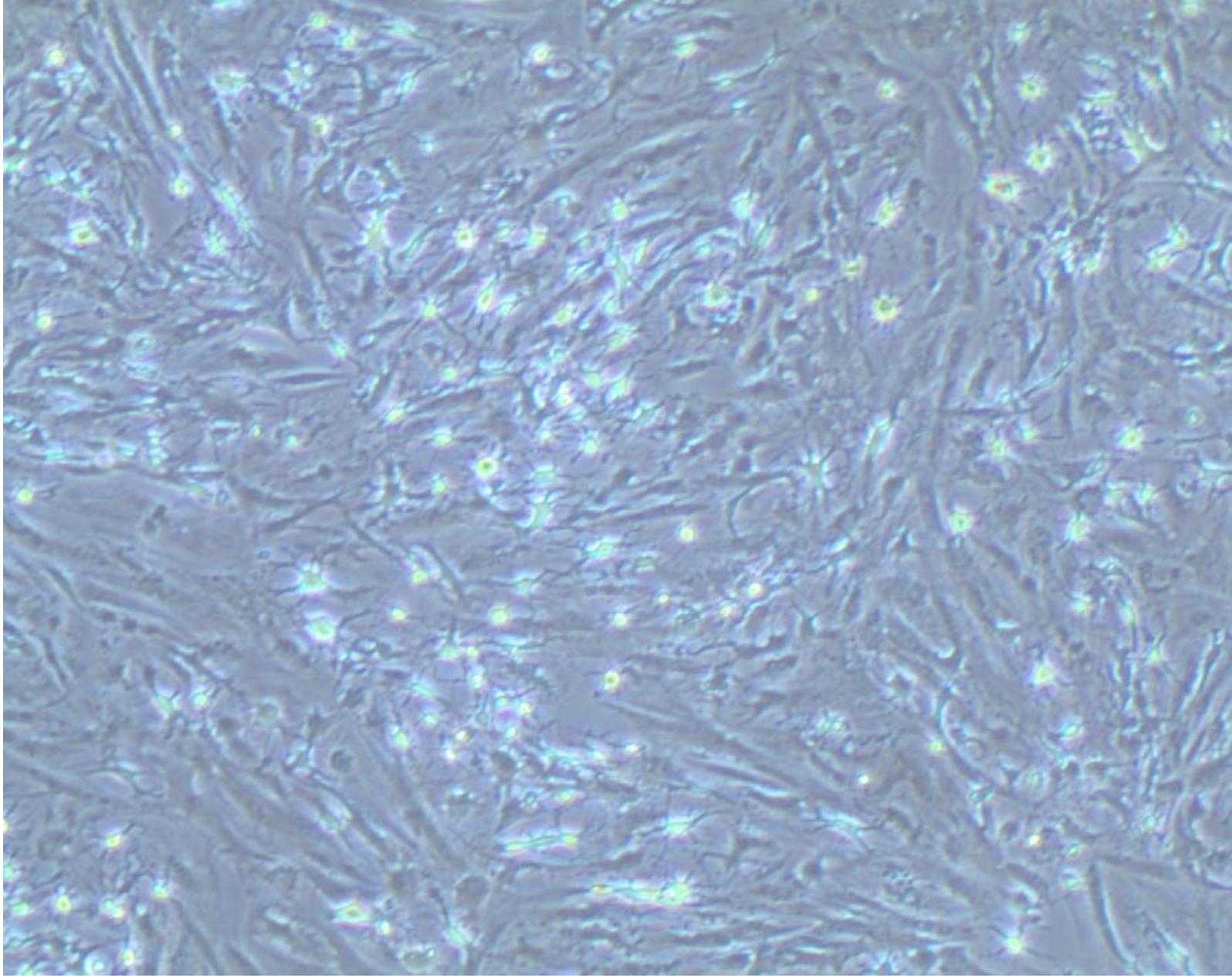


**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

*Estudio y caracterización de células
estromales uterinas procedentes de mujeres
sanas y con endometriosis*

Memoria presentada por **Tatiana Llorca Colomina** para
optar al título de Doctora por la Universidad de Granada

Granada, 2024



***Estudio y caracterización de células
estromales uterinas procedentes de mujeres
sanas y con endometriosis***

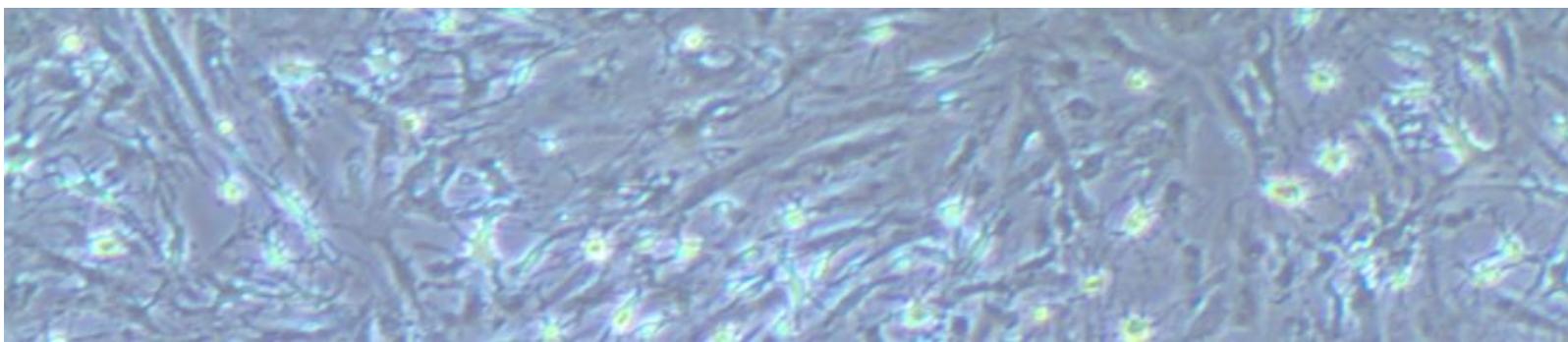
TESIS DOCTORAL

Bajo la dirección del Dr. Enrique García Olivares y la Dra. María José
Ruiz Magaña

Tatiana Llorca Colomina



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Tatiana Llorca Colomina
ISBN: 978-84-1195-251-4
URI: <https://hdl.handle.net/10481/90820>

A mis padres, Jorge y Conchi

Agradecimientos

“¿Has pensado en seguir el próximo año con la investigación y empezar la tesis doctoral?” Sí, LA TESIS DOCTORAL. Siendo sincera, en aquel momento no tenía ni idea de lo que implicaba embarcarse en esta aventura que ha sido el doctorado, pero lo hice y ya han pasado más de 6 años. No ha sido un camino fácil, de hecho ha sido bastante duro, pero puedo decir con total convencimiento que no me arrepiento de la decisión que tomé. Tras vivir una pandemia y un incendio en el centro de investigación, y a pesar de todos los problemas que surgen en el día a día de un investigador (por ejemplo, que el citómetro decida no funcionar cuando tienes el experimento preparado, que el pedido de cámaras Transwell tarde seis meses en llegar, que al -80°C se le ocurra pararse en fin de semana, que de 5 muestras de endometriosis solo llegue a crecer una, que los linfocitos y monocitos no quieran migrar...), puedo decir que todos estos obstáculos no han sido nada en comparación con todas las cosas maravillosas que me ha permitido vivir el doctorado. Y en particular, quiero aprovechar estas líneas para agradecer a todas las personas que han hecho posible que pueda conseguir mi objetivo. A todos vosotros... MUCHAS GRACIAS.

Mis primeras palabras de agradecimiento son para mis directores: Enrique y María José. Enrique, muchas gracias por considerar que yo podía formar parte de tu equipo de investigación; por brindarme esta oportunidad; por confiar en mí desde aquella primera entrevista del máster; por estar siempre muy pendiente de mi trabajo y valorarlo; por enseñarme a investigar; y, en estos últimos meses, por tu inestimable ayuda y guía en la redacción y corrección de esta tesis. Siempre me encantó escuchar cómo razonabas y llegabas a interpretar los resultados que te presentaba de una manera lógica y sencilla, gracias por hacerlo todo más fácil. Espero seguir aprendiendo muchas cosas de ti.

María José, tú fuiste quien me planteó aquella primera pregunta: *“¿has pensado en seguir el próximo año con la investigación y empezar la tesis doctoral?”*. Confiaste en mí desde el primer momento y no puedo sentirme más agradecida. Tu labor no fue solamente el de una codirectora, gracias por convertirte en una madre en el laboratorio. Durante todos los momentos difíciles (cuando he recibido malas noticias; cuando los experimentos no me han salido bien; cuando sentía tanta incertidumbre, que no sabía qué decisión era la más adecuada para mí y lo mejor para mi futuro), tú has estado ahí, dispuesta a escucharme y a aconsejarme de la mejor manera posible. Las dos sabemos que estos años tampoco han sido fáciles para ti, pero tengo que decirte que estoy muy contenta y orgullosa de ver que has alcanzado la meta que tanto deseabas. Sin duda, te lo mereces.

No puedo olvidarme de otras dos personas que también fueron mis maestras en muchos momentos: Mari Carmen y Ana. Gracias a las dos por todas las sugerencias y buenos consejos que me habéis dado en los seminarios de grupo. Siempre he intentado ponerlos en práctica y aprender mucho de vosotras y de vuestra experiencia investigadora. También me gustaría dar las gracias a Blanco. Tus intervenciones en los seminarios muchas veces aclaraban todas las dudas que tenía. Gracias también por estar siempre dispuesto a compartir una alícuota de anticuerpos cuando lo he necesitado.

Quiero agradecer a Pepe su colaboración en la obtención y el envío constante de muestras de endometriosis; sin ello, parte de esta tesis no se hubiera podido realizar.

Me gustaría dedicar unas líneas a José Antonio Galindo. En primer lugar, infinitas gracias por tu paciencia José, cuando te preguntaba constantemente si tenías noticias del pedido de las

Transwell. Tu labor hace que el trabajo diario en el laboratorio sea mucho más sencillo. Gracias por estar dispuesto a ayudarme cuando te he necesitado y por ser una persona tan generosa. Pero sin duda, lo que más valoro son los ratitos de charla que he tenido contigo. Me encanta escucharte porque siempre aprendo muchas cosas de ti. Intentaré recordar los sabios consejos que me has dado a lo largo de estos años.

Y llega el momento de hablar de MI FAMILIA EN EL LABORATORIO. Todo hubiese sido mucho más difícil sin tener a mi lado a estas cinco maravillosas personas: Salva, Rocío, Laura, Cris y Patri.

Tener la oportunidad de trabajar al lado de Salva, Rocío y Laura hizo que, durante los primeros años del doctorado, aprendiera muchas técnicas y desarrollara habilidades que me han sido muy útiles después. Siempre os admiraré y os querré mucho porque en el ámbito laboral sois mi ejemplo a seguir. Salva, recuerdo que cuando era alumna del máster me quedaba mirándote y pensaba: “¿cómo es posible que haga tantas cosas a la vez y le salga todo tan bien?”. La respuesta es sencilla: por tus ganas de trabajar y de aprender, por tu entusiasmo y por tu dedicación. Gracias porque, aunque no tenías ninguna obligación de hacerlo, siempre estuviste dispuesto a darme el mejor consejo y a compartir tu experiencia conmigo. Te admiro mucho y estoy muy feliz de ver todo lo que has conseguido en los últimos años.

Roci, fuiste un apoyo muy grande durante mis inicios. En infinidad de ocasiones antepusiste ayudarme con el diseño de mis experimentos a continuar con tu trabajo. Gracias por tu generosidad, por tu bondad, por compartir todo lo que sabías, por ponerte en mi lugar y ayudarme siempre que te necesité. Puedo decir que gran parte de mis conocimientos sobre biología molecular te los debo a ti.

Laura, empezamos este camino juntas y se puede decir que también lo terminamos juntas, y esto me hace muy feliz. Recuerdo que ir al laboratorio cada día era mucho más sencillo y divertido porque tú estabas allí, en la mesa de al lado. Tras muchas desensibilizaciones, citometrías y Western Blot; pero también tras muchos sustos y shawarmas (o falafel) en la salita de comida, se forjó una amistad que permaneció a pesar del tiempo y la distancia (que ha sido muy grande) y deseo de corazón que esto siga siendo así.

En los últimos años también he tenido a dos personas a mi lado que han sido compañeras, amigas e incluso hermanas. Cris (mi Cristi), tú fuiste quien sustituyó a Laura en la mesa de al lado. Recuerdo que le decía: “ha entrado una chica nueva de TFM que se sienta en tu sitio y es un encanto”. No solo eres un encanto de persona, eres mi mano derecha y un refugio tanto en los buenos como en los malos momentos. La complicidad que tenemos cuando trabajamos juntas hace que el trabajo diario sea mucho más sencillo, ameno y divertido. Y hablando del trabajo en común, ¿recuerdas la cantidad de horas metidas en la salita del microscopio haciendo fotos de la invasión? Ahí descubrí que vas a ser una grandísima investigadora, una investigadora muy disciplinada que realiza un trabajo constante y minucioso. Sé que vas a brillar en todo lo que te propongas.

Patri, eres la sonrisa del 244. Ahora estás un poquito más lejos, pero tanto Cris como yo contamos los meses para volver a verte entrar por la puerta del laboratorio. Admiro mucho tu valentía para afrontar nuevos retos, retos bastante difíciles. Estoy muy orgullosa de ver que aquella alumna del máster que hacía ICP e irradiaciones semana sí, semana también, se ha convertido en una excelente investigadora y mejor persona.

Estos años también he tenido la oportunidad de mentorizar a diferentes estudiantes de máster. Gracias a ellas he descubierto cuánto me gusta enseñar y que deseo dedicarme a ello en un futuro, espero, no muy lejano. Gracias Olga, Lucía y Blanca por ser unas alumnas muy aplicadas; gracias por vuestras ganas de aprender y por aportar vuestro granito de arena en la publicación del artículo que respalda esta tesis.

Deseo destacar el vínculo tan bonito que hemos creado con otros compañeros y compañeras del centro de investigación. Especial mención merece Maribel y las chicas del 247, Carmen e Inma. Pero no quiero olvidarme de Ali, Carlos, Dani y Paula. También quiero agradecer a María Pedrosa el ánimo que siempre me ha dado y que me recordara, muchas veces, que soy capaz de alcanzar esta meta.

La vida en Granada no sería lo mismo sin mis amigos, que tanto me han apoyado, animado y cuidado. Ellos son mi segunda familia y, vaya donde vaya, los llevaré en el corazón porque compartimos lo más importante. Gracias, mi querida Albaicín; merci, ma chère assemblée française.

Estas últimas palabras de agradecimiento son para las personas más importantes de mi vida y a quienes va dedicada esta tesis: MIS PADRES. Sin ninguna duda, esto no habría sido posible sin vuestro apoyo y confianza en mí. Gracias por intentar entender el mundo de la ciencia que es (o era) completamente desconocido para vosotros. Me habéis levantado en los momentos más difíciles, habéis sufrido conmigo; pero sé que ahora estáis muy orgullosos de ver que he conseguido llegar al final. Y vuestra alegría me hace inmensamente feliz.

I, finalment, moltes gràcies a mi mateixa, per no haver tingut por d'escollir aquest camí, per haver arribat a la fi sense rendir-me i per tenir sempre present que "tots els que gaudeixen d'aquestes obres grandioses les estudien".

Abreviaturas

- **ADN:** ácido desoxirribonucleico
- **ADNc:** ADN complementario
- **ALDH1A1:** isoforma A1 de la aldehído deshidrogenasa 1
- **AMPc:** adenosín monofosfato cíclico
- **AMV:** transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar
- **ANGPT1:** angiopoyetina 1
- **ANGPT2:** angiopoyetina 2
- **AP:** fosfatasa alcalina
- **APC:** alofococianina/célula presentadora de antígenos
- **ARN:** ácido ribonucleico
- **ARNm:** ARN mensajero
- **α -SMA:** alfa actina de músculo liso
- **ATCC:** “American Type Culture Collection”
- **BAFF:** factor activador de células B
- **BAFFR:** receptor del factor activador de células B
- **BSA:** albúmina sérica bovina
- **CCL2:** quimioquina 2 con motivo CC. También conocida como MCP-1
- **CCL3:** quimioquina 3 con motivo CC. También conocida como MIP-1 α
- **CCL4:** quimioquina 4 con motivo CC. También conocida como MIP-1 β
- **CCL5:** quimioquina 5 con motivo CC. También conocida como RANTES
- **CCL7:** quimioquina 7 con motivo CC. También conocida como MCP-3
- **CCL11:** quimioquina 11 con motivo CC
- **CCL16:** quimioquina 16 con motivo CC
- **CCL19:** quimioquina 19 con motivo CC
- **CCL21:** quimioquina 21 con motivo CC
- **CCL22:** quimioquina 22 con motivo CC
- **CCL25:** quimioquina 25 con motivo CC
- **CDKN1A:** inhibidor 1A de la quinasa dependiente de ciclina
- **CDKN1B:** inhibidor 1B de la quinasa dependiente de ciclina
- **CDKN2A:** inhibidor 2A de la quinasa dependiente de ciclina
- **C/EBP- α :** proteína de unión al enhancer CCAAT alfa
- **C/EBP- β :** proteína de unión al enhancer CCAAT beta
- **CHEK2:** proteína quinasa-serina/treonina CHK2
- **CIC-CIBM:** Centro de Instrumentación Científica. Sede en el Centro de Investigación Biomédica
- **CKBP:** “chemokine binding proteins” o proteínas de unión a quimioquinas
- **CRH:** hormona liberadora de corticotropina
- **CSF-1 (M-CSF):** factor estimulante de colonias 1. También conocido como factor estimulante de colonias de macrófagos
- **CT:** “cycle threshold” o ciclo umbral
- **CXCL1:** quimioquina 1 con motivo CXC. También conocida como GRO- α
- **CXCL2:** quimioquina 2 con motivo CXC. También conocida como MIP-2 α
- **CXCL8:** quimioquina 8 con motivo CXC
- **CXCL9:** quimioquina 9 con motivo CXC. También conocida como MIG (monoquina inducida por interferón gamma)

- **CXCL10**: quimioquina 10 con motivo CXC. También conocida como IP-10 (proteína 10 inducida por interferón gamma)
- **CXCL11**: quimioquina 11 con motivo CXC. También conocida como I-TAC (quimioquina alfa de células T inducible por interferón)
- **CXCL12**: quimioquina 12 con motivo CXC. También conocida como SDF-1
- **CXCL13**: quimioquina 13 con motivo CXC
- **CXCL14**: quimioquina 14 con motivo CXC
- **CX₃CL₁**: quimioquina 1 con motivo CX₃C
- **CXCR3**: receptor de quimioquinas CXC tipo 3. También conocido como CD183
- **CXCR4**: receptor de quimioquinas CXC tipo 4. También conocido como CD184
- **DAMP**: patrones moleculares asociados a daño
- **DAPI**: 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro
- **DC**: célula dendrítica
- **dDSC**: célula decidual estromal decidualizada
- **deEnSC**: célula endometriósica estromal decidualizada
- **dEnSC**: célula endometrial estromal decidualizada
- **DEPC**: dietilpirocarbonato
- **DNAsa I**: desoxirribonucleasa I
- **dNTP**: desoxinucleótidos trifosfato
- **DO**: densidad óptica
- **DR6**: receptor de muerte celular 6
- **EDC**: químico disruptor endocrino
- **EDTA**: ácido etilendiaminotetraacético
- **ELISA**: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
- **eMSC**: célula madre mesenquimal endometrial
- **ER- α** : receptor de estrógenos alfa
- **ER- β** : receptor de estrógenos beta
- **FasL**: ligando de Fas
- **FBS**: suero bovino fetal
- **FC**: "fold change" o porcentaje de cambio
- **FGF2**: factor de crecimiento de fibroblastos 2
- **FITC**: isotiocianato de fluoresceína
- **FOXO1**: factor de transcripción "Forkhead box protein O1"
- **FSH**: hormona foliculoestimulante
- **GAPDH**: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- **GM-CSF**: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
- **GnRH**: hormona liberadora de gonadotropina
- **GPCR**: receptor acoplado a proteína G
- **hESC**: célula madre embrionaria humana
- **HGF**: factor de crecimiento de hepatocitos
- **HLA-DR**: antígeno leucocitario humano (clase II, *locus* DR)
- **HOXA10**: factor de transcripción "Homeobox A10"
- **HRP**: enzima peroxidasa de rábano
- **ICAM-1 (CD54)**: molécula de adhesión intercelular 1
- **IDO**: indolamina-2,3-dioxigenasa
- **IDT**: "Integrated DNA technologies"
- **IFN- γ** : interferón gamma
- **IGF-1**: factor de crecimiento similar a la insulina 1

- **IGF-1R**: receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1
- **IGFBP-1**: proteína 1 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina
- **IL-1 β** : interleucina 1 β
- **IL-2**: interleucina 2
- **IL-4**: interleucina 4
- **IL-6**: interleucina 6
- **IL-8**: interleucina 8
- **IL-10**: interleucina 10
- **IL-11**: interleucina 11
- **IL-13**: interleucina 13
- **IL-15**: interleucina 15
- **IL-15R β** : subunidad β del receptor de la IL-15
- **IL-17**: interleucina 17
- **IL-18**: interleucina 18
- **IL-24**: interleucina 24
- **IL-33**: interleucina 33
- **ILC**: célula linfoide innata
- **ILC-3**: célula linfoide innata tipo 3
- **IMF**: intensidad media de fluorescencia
- **IP**: yoduro de propidio
- **IPBLN**: Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra
- **IRF-1**: factor de transcripción regulador de interferón 1
- **ISCT**: “International Society for Cellular Therapy” o Sociedad Internacional de Terapia Celular
- **KIR**: receptor similar a inmunoglobulina de células NK
- **LH**: hormona luteinizante
- **LIF**: factor inhibidor de la leucemia
- **LTi**: célula inductora de tejido linfoide
- **LTi-*like***: célula similar a la inductora de tejido linfoide
- **LTo**: célula organizadora de tejido linfoide
- **M1**: macrófago proinflamatorio
- **M2**: macrófago antiinflamatorio
- **MC**: medio condicionado
- **MCP-1**: proteína quimiotáctica de monocitos 1. También conocida como CCL2
- **MCP-3**: proteína quimiotáctica de monocitos 3. También conocida como CCL7
- **M-CSF (CSF-1)**: factor estimulante de colonias de macrófagos. También conocido como factor estimulante de colonias 1
- **MEC**: matriz extracelular
- **MIC-1**: citoquina 1 inhibidora de macrófagos
- **MIF**: factor inhibidor de la migración de macrófagos
- **MIP-1 β** : proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta. También conocida como CCL4
- **MMP-2**: metaloproteinasa de la matriz 2
- **MMP-9**: metaloproteinasa de la matriz 9
- **MMR (CD206)**: receptor de manosa de macrófagos/ “mismatch repair genes” o sistema de reparación de errores de emparejamiento del ADN
- **MSC**: célula madre mesenquimal
- **MWCO**: “molecular weight cut off” o corte de peso molecular
- **NCAM-1 (CD56)**: molécula de adhesión celular neural 1

- **NCR:** receptor de citotoxicidad natural
- **NFC:** “negative fold change” o porcentaje de cambio negativo
- **NFW:** “nuclease-free water” o agua libre de nucleasas
- **NK:** célula “natural killer” o asesina natural
- **NP-40:** nonilfenol etoxilado
- **pb:** pares de bases
- **PBL:** linfocitos de sangre periférica
- **PBMC:** células mononucleares de sangre periférica
- **PBS:** tampón fosfato salino
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- **PE:** ficoeritrina
- **PFA:** paraformaldehido
- **PGE₂:** prostaglandina E₂
- **PGF:** factor de crecimiento placentario
- **PHA:** fitohemaglutinina-M
- **PKA:** proteína quinasa A
- **PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- **PPAR γ 2:** “peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2”
- **PR-A:** receptor de la progesterona, isoforma A
- **PR-B:** receptor de la progesterona, isoforma B
- **preDSC:** célula pre-decidual estromal (no decidualizada)
- **preeEnSC:** célula pre-endometriósica estromal (no decidualizada)
- **preEnSC:** célula pre-endometrial estromal (no decidualizada)
- **PRL:** prolactina
- **PVDF:** difluoruro de polivinilideno
- **RANKL:** ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B
- **RNAse:** ribonucleasa
- **rpm:** revoluciones por minuto
- **SD:** desviación estándar
- **SDS:** dodecilsulfato sódico
- **SLO:** órgano linfoide secundario
- **SSEA-1:** antígeno embrionario 1 específico de estadio
- **ST2:** receptor supresor de tumorigenicidad 2
- **STAT3:** transductor de señal y activador de la transcripción 3
- **STAT5:** transductor de señal y activador de la transcripción 5
- **SUSD2:** “sushi domain containing 2”
- **Tc:** célula T citotóxica
- **TCIF:** factor inhibidor de la quimiotaxis de células T
- **TGF- β 1:** factor de crecimiento transformante β 1
- **Th1:** célula T cooperadora tipo 1
- **Th2:** célula T cooperadora tipo 2
- **Th17:** célula T cooperadora tipo 17
- **TLR:** receptor “Toll-like”
- **Tm:** temperatura de “melting” o fusión del ADN
- **TMB:** tetrametilbencidina
- **TNF- α :** factor de necrosis tumoral alfa
- **TNFR:** receptor del factor de necrosis tumoral

- **Treg**: célula T reguladora
- **uNK**: célula NK uterina
- **VCAM-1 (CD106)**: molécula de adhesión celular vascular 1
- **VEGF**: factor de crecimiento endotelial vascular
- **VEGF-C**: factor de crecimiento endotelial vascular C

La nomenclatura empleada en nuestro estudio es la siguiente:

1. **EnSC**: célula endometrial estromal (obtenida de sangre menstrual)
 - a) **preEnSC**: célula endometrial estromal no decidualizada
 - b) **dEnSC**: célula endometrial estromal decidualizada

2. **DSC**: célula decidual estromal
 - a) **preDSC**: célula decidual estromal no decidualizada
 - b) **dDSC**: célula decidual estromal decidualizada

3. **eEnSC**: célula endometriósica estromal
 - a) **preeEnSC**: célula endometriósica estromal no decidualizada
 - b) **deEnSC**: célula endometriósica estromal decidualizada

Índice de contenidos

RESUMEN	18
INTRODUCCIÓN	21
1. EL ENDOMETRIO	22
1.1. <i>El ciclo endometrial</i>	22
1.1.1. Fase menstrual	22
1.1.2. Fase proliferativa.....	24
1.1.3. Fase secretora	25
2. CELULAS ENDOMETRIALES ESTROMALES	26
2.1. <i>Regeneración epitelial</i>	26
2.2. <i>Regeneración estromal y vascular</i>	27
3. LA DECIDUALIZACION.....	29
3.1. <i>Señalización hormonal</i>	29
3.2. <i>Efecto de la decidualización sobre el fenotipo y las funciones celulares</i>	30
3.2.1. Cambios tisulares.....	30
3.2.2. Características celulares y ultraestructurales	31
3.2.3. Secretoma y marcadores de decidualización	31
4. LA DECIDUA	32
4.1. <i>La inmunología del embarazo</i>	33
4.1.1. La implantación y placentación constituyen una etapa proinflamatoria.....	33
4.1.2. El crecimiento fetal constituye una etapa antiinflamatoria.....	33
4.1.3. El parto se desencadena tras una etapa proinflamatoria	34
5. CÉLULAS DECIDUALES ESTROMALES	34
5.1. <i>Origen mesenquimal de las DSC</i>	35
5.2. <i>Efecto de las DSC sobre las células inmunitarias de la decidua</i>	35
5.3. <i>Efecto de las células inmunitarias deciduales sobre las DSC</i>	38
6. ENDOMETRIOSIS	39
6.1. <i>Etiopatogenia de la endometriosis</i>	39
6.1.1. Origen a partir de endometrio uterino	39
6.1.2. Origen a partir de endometrio extrauterino	40
6.2. <i>Células endometriósicas estromales</i>	41
6.3. <i>Factores que intervienen en el establecimiento de la enfermedad</i>	41
6.3.1. Predisposición genética	41
6.3.1.1. Apoptosis.....	42
6.3.2. Papel de la epigenética	43
6.3.3. Factores endocrinos.....	43
6.4. <i>El microambiente inmunitario de la lesión endometriósica</i>	44
6.4.1. El sistema inmunitario innato en la endometriosis	44
6.4.2. El sistema inmunitario adaptativo en la endometriosis	46
HIPÓTESIS	49
OBJETIVOS	51
MATERIAL Y MÉTODOS	53
1. CULTIVOS CELULARES.....	54
1.1. <i>Células endometriales estromales procedentes de sangre menstrual</i>	54
1.1.1. Obtención y cultivo de EnSC.....	54
1.2. <i>Células deciduales estromales</i>	55

1.2.1.	Obtención y cultivo de DSC.....	55
1.2.1.1.	Eficiencia clonogénica	56
1.2.1.2.	Diferenciación mesenquimal.....	56
1.2.1.3.	Ensayo de contracción del gel de colágeno	57
1.3.	<i>Células procedentes de quiste de endometriosis</i>	57
1.3.1.	Obtención y cultivo de eEnSC.....	57
1.4.	<i>Células madre mesenquimales de médula ósea</i>	58
1.4.1.	Obtención y cultivo de MSC	58
1.5.	<i>Decidualización</i>	59
1.6.	<i>Células mononucleares de sangre periférica</i>	59
1.6.1.	Aislamiento de monocitos.....	59
1.6.2.	Aislamiento y activación de linfocitos	60
1.6.2.1.	Bloqueo del receptor CXCR3 en linfocitos	61
1.7.	<i>Líneas celulares tumorales</i>	61
2.	OBTENCIÓN Y TRATAMIENTOS DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS.....	62
2.1.	<i>Diálisis</i>	62
2.2.	<i>Tratamiento térmico</i>	62
3.	ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR EN CÁMARA TRANSWELL.....	62
4.	CITOMETRÍA DE FLUJO.....	63
4.1.	<i>Análisis fenotípico de EnSC, DSC, eEnSC y MSC</i>	63
4.2.	<i>Análisis fenotípico de monocitos de sangre periférica y células THP-1</i>	66
4.3.	<i>Análisis fenotípico de PBL activados y células Jurkat</i>	67
4.4.	<i>Determinación de células apoptóticas</i>	69
5.	INMUNOCITOQUÍMICA Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	69
6.	INMUNOHISTOQUÍMICA Y MICROSCOPIA CONFOCAL.....	70
7.	EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	71
7.1.	<i>Extracción de ARN</i>	71
7.2.	<i>Retrotranscripción</i>	72
8.	PCR	74
8.1.	<i>PCR cualitativa</i>	74
8.1.1.	Análisis de ADN complementario	74
8.1.2.	Visualización del producto de PCR en gel de agarosa	78
8.2.	<i>PCR cuantitativa</i>	78
9.	INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	81
10.	INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR ELISA	83
11.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	84
	RESULTADOS	85
1.	CÉLULAS DECIDUALES ESTROMALES HUMANAS	86
1.1.	<i>Características generales de las DSC</i>	86
1.2.	<i>DSC como células madre mesenquimales</i>	88
1.2.1.	Fenotipo antigénico compatible con MSC de médula ósea	88
1.2.2.	Funciones asociadas a MSC. Formación de colonias y diferenciación mesenquimal	88
1.2.3.	Decidualización de preDSC y MSC	89
1.3.	<i>DSC como células perivasculares</i>	90
1.3.1.	Características de pericitos de las preDSC	90
1.3.2.	Localización perivascular de las preDSC	91
1.4.	<i>Clonos de DSC</i>	94
1.5.	<i>Decidualización de preDSC</i>	96

1.5.1.	Comparación del fenotipo de preDSC y dDSC	96
1.5.2.	Expresión y secreción de citoquinas por preDSC y dDSC	97
1.5.3.	Expresión de factores angiogénicos por preDSC y dDSC	100
1.5.4.	Efecto antitumoral de preDSC y dDSC	101
1.6.	<i>Actividad quimiotáctica de DSC</i>	102
1.6.1.	Actividad quimiotáctica de DSC sobre células T obtenidas de sangre periférica	102
1.6.1.1.	Fenotipo antigénico de PBL activados	102
1.6.1.2.	Quimiotaxis de PBL activados debida a los factores secretados por DSC	103
1.6.1.3.	Efecto de los MC de DSC sobre la quimiotaxis de las subpoblaciones de PBL activados	106
1.6.2.	Actividad quimiotáctica de DSC sobre las líneas tumorales Jurkat y THP-1	108
2.	CÉLULAS ENDOMETRIALES ESTROMALES HUMANAS	109
2.1.	<i>Características generales de las EnSC</i>	109
2.2.	<i>Fenotipo antigénico compatible con MSC de médula ósea</i>	111
3.	DIFERENCIAS ENTRE DSC Y ENSC	111
3.1.	<i>Marcadores y funciones asociadas a la decidualización</i>	111
3.2.	<i>Expresión de proteínas relacionadas con la decidualización</i>	112
3.3.	<i>Comparación del fenotipo antigénico de preDSC y preEnSC</i>	114
3.4.	<i>Expresión y secreción de quimioquinas por DSC y EnSC</i>	116
3.5.	<i>Actividad quimiotáctica de DSC y EnSC sobre células T obtenidas de sangre periférica</i>	117
4.	ENDOMETRIOSIS	118
4.1.	<i>CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS EENSC</i>	118
4.2.	<i>Fenotipo compatible con MSC de médula ósea</i>	120
5.	DIFERENCIAS ENTRE ENSC Y EENSC	121
5.1.	<i>Marcadores y funciones asociadas a la decidualización</i>	121
5.2.	<i>Comparación del fenotipo antigénico de preEnSC y preeEnSC</i>	122
5.3.	<i>Expresión y secreción de quimioquinas por EnSC y eEnSC</i>	124
5.4.	<i>Actividad quimiotáctica de EnSC y eEnSC</i>	125
5.4.1.	Actividad quimiotáctica de EnSC y eEnSC sobre PBL activados de sangre periférica	125
5.4.1.1.	Efecto de los MC de EnSC y eEnSC sobre la quimiotaxis de las subpoblaciones de PBL activados	127
5.4.2.	Actividad quimiotáctica de EnSC y eEnSC sobre monocitos de sangre periférica	128
5.4.2.1.	Cambios en el fenotipo antigénico de monocitos de sangre periférica en contacto con los MC de EnSC y eEnSC	130
5.4.2.2.	Fenotipo antigénico de los monocitos quimioatraídos por los MC de EnSC y eEnSC	130
5.4.3.	Actividad quimiotáctica de EnSC y eEnSC sobre células tumorales: Jurkat y THP-1	132
5.4.3.1.	Cambios en el fenotipo antigénico de células THP-1 en contacto con los MC de EnSC y eEnSC	133
5.4.3.2.	Fenotipo antigénico de células THP-1 quimioatraídas por los MC de EnSC y eEnSC	134
	DISCUSIÓN	136
	CONCLUSIONES	156
	BIBLIOGRAFÍA	158

Índice de ilustraciones, figuras y tablas

Ilustraciones

Ilustración 1. Esquema representativo del ciclo endometrial: niveles hormonales y células inmunitarias en cada fase del ciclo	23
Ilustración 2. Células progenitoras epiteliales presentes en las glándulas endometriales.....	27
Ilustración 3. Ubicación de las células progenitoras en el estroma endometrial.....	28
Ilustración 4. Mecanismo bioquímico de la decidualización en las EnSC y DSC.. ..	30
Ilustración 5. La decidualización de las células estromales: cambios morfológicos y bioquímicos.. ..	32
Ilustración 6. Efectos de las DSC sobre las células NK.....	36
Ilustración 7. Efectos de las DSC sobre las DC.....	37
Ilustración 8. Efectos de las DSC sobre monocitos y macrófagos.....	37
Ilustración 9. Efectos de las DSC sobre células T.. ..	38
Ilustración 10. Representación esquemática del microambiente inmunitario en la lesión de endometriosis.	45
Ilustración 11. Respuestas inmunitarias en la endometriosis.....	48
Ilustración 12. Esquema resumen de los ensayos de migración en cámara Transwell.....	63
Ilustración 13. Esquema representativo de los parámetros empleados en la retrotranscripción. .	73
Ilustración 14. Esquema representativo de los parámetros empleados en la PCR cualitativa.	74
Ilustración 15. Esquema representativo de los parámetros empleados en la PCR cuantitativa. ..	79
Ilustración 16. Esquema representativo del ELISA tipo sándwich.	84
Ilustración 17. Esquema representativo de la evolución de la expresión de diferentes marcadores en DSC durante el proceso de decidualización.....	142
Ilustración 18. Esquema representativo del posible mecanismo de acción de los factores secretados por DSC en la decidua humana, en un embarazo normal y en un contexto patológico.. ..	148
Ilustración 19. Esquema representativo de la decidualización de células endometriales estromales precursoras (preEnSC) a células endometriales estromales decidualizadas (dEnSC) y de la decidualización de células deciduales estromales precursoras (preDSC) a células deciduales estromales decidualizadas (dDSC)	151

Figuras

Figura 1. Características generales de líneas de preDSC.	87
Figura 2. Características de MSC presentadas por líneas de preDSC.	89
Figura 3. Análisis comparativo de la decidualización de preDSC y MSC.	90
Figura 4. Características de pericitos de líneas de preDSC.	91
Figura 5. Células perivasculares deciduales.	94
Figura 6. Características de clonos de preDSC.	95
Figura 7. Fenotipo antigénico de líneas de DSC no decidualizadas (preDSC) y decidualizadas (dDSC).	97
Figura 8. Efecto de la decidualización (14 días) en la expresión de citoquinas por preDSC y dDSC.	98
Figura 9. Efecto de la decidualización (8 días) en la expresión de citoquinas por preDSC y dDSC.	100
Figura 10. Efecto de la decidualización en la expresión de factores angiogénicos.	101
Figura 11. Actividad antitumoral de los factores secretados por preDSC y dDSC.	102
Figura 12. Perfil fenotípico de PBL activados.	103
Figura 13. Efecto de la decidualización en la actividad quimiotáctica de DSC humanas sobre PBL activados.	106
Figura 14. Estudio del fenotipo antigénico de los PBL quimioatraídos.	107
Figura 15. Efecto quimiotáctico de los MC de preDSC y dDSC en las líneas tumorales Jurkat y THP-1.	108
Figura 16. Características generales de líneas de preEnSC.	110
Figura 17. Análisis comparativo de la respuesta a la decidualización en EnSC y DSC.	112
Figura 18. Expresión de PR, PKA y FOXO1 en respuesta a la decidualización.	113
Figura 19. Comparación del perfil fenotípico entre preDSC y preEnSC.	115
Figura 20. Comparación del efecto de la decidualización en la expresión de citoquinas por DSC y EnSC.	117
Figura 21. Comparación de la actividad quimiotáctica de DSC y EnSC sobre PBL activados. ...	117
Figura 22. Características generales de líneas de preeEnSC.	119
Figura 23. Análisis comparativo de los efectos de la decidualización en las preEnSC y preeEnSC.	122
Figura 24. Comparación del perfil fenotípico entre preEnSC y preeEnSC.	123
Figura 25. Comparación del efecto de la decidualización en la expresión de citoquinas por EnSC y eEnSC.	125
Figura 26. Análisis comparativo de la migración de PBL con MC de EnSC y eEnSC.	126
Figura 27. Análisis comparativo del efecto de los MC de EnSC y eEnSC en la quimioatracción de diferentes subpoblaciones de PBL activados.	128
Figura 28. Análisis comparativo de la migración de monocitos de sangre periférica con MC de EnSC y eEnSC.	129
Figura 29. Estudio del fenotipo antigénico de monocitos de sangre periférica en contacto con MC de EnSC y eEnSC durante 48 horas.	130
Figura 30. Análisis comparativo del fenotipo antigénico de monocitos de sangre periférica que han experimentado quimiotaxis en los MC de EnSC y eEnSC.	131
Figura 31. Análisis comparativo de la migración de células Jurkat y THP-1 con MC de EnSC y eEnSC.	133
Figura 32. Estudio del fenotipo antigénico de células THP-1 en contacto con MC de EnSC y eEnSC durante 48 horas.	134

Figura 33. Análisis comparativo del fenotipo antigénico de células THP-1 que han experimentado quimiotaxis en los MC de EnSC y eEnSC.....	135
--	-----

Tablas

Tabla 1. Listado de anticuerpos empleados en la caracterización fenotípica de las EnSC, DSC, eEnSC y MSC.....	64
Tabla 2. Listado de anticuerpos empleados en la caracterización fenotípica de monocitos, células THP-1, PBL activados y células Jurkat.	68
Tabla 3. Listado de anticuerpos empleados en la caracterización fenotípica de las poblaciones celulares de la decidua por microscopía confocal.	71
Tabla 4. Reactivos empleados en la retrotranscripción.....	73
Tabla 5. Reactivos empleados en la PCR cualitativa.....	74
Tabla 6. Listado de oligonucleótidos utilizados en el análisis transcriptómico mediante PCR cualitativa para estudiar los marcadores de células madre pluripotentes.	75
Tabla 7. Listado de oligonucleótidos utilizados en el análisis transcriptómico mediante PCR cualitativa para estudiar los marcadores de diferenciación mesenquimal.....	75
Tabla 8. Listado de oligonucleótidos utilizados en el análisis transcriptómico mediante PCR cualitativa para estudiar los factores angiogénicos.	76
Tabla 9. Listado de oligonucleótidos utilizados en el análisis transcriptómico mediante PCR cualitativa para estudiar citoquinas y quimioquinas.	77
Tabla 10. Reactivos empleados en la PCR cuantitativa.....	78
Tabla 11. Listado de oligonucleótidos utilizados en el análisis transcriptómico mediante PCR cuantitativa para estudiar citoquinas y quimioquinas.....	80
Tabla 12. Listado de anticuerpos empleados en la inmunodetección de proteínas por Western Blot.	82
Tabla 13. Expresión de antígenos, determinada por citometría de flujo, en líneas de preDSC y MSC de médula ósea obtenidas en las mismas condiciones.	87
Tabla 14. Expresión de antígenos por tres clones de preDSC, determinada por citometría de flujo.	94
Tabla 15. Expresión de antígenos, determinada por citometría de flujo, en líneas de preEnSC y MSC de médula ósea obtenidas en las mismas condiciones.	110
Tabla 16. Expresión de antígenos, determinada por citometría de flujo, en líneas de preeEnSC y MSC de médula ósea obtenidas en las mismas condiciones.	120
Tabla 17. Comparativa entre las propiedades de las preDSC y las MSC.....	138
Tabla 18. Comparativa entre las propiedades de las preDSC y los pericitos.	141
Tabla 19. Características de preDSC y dDSC.	144



RESUMEN



Las propiedades inmunoregulatoras de las células mesenquimales estromales (MSC) hacen que la investigación sobre estas células sea un recurso prometedor para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. De ahí radica la necesidad de encontrar una fuente de células con las propiedades de las MSC que sea fácil de obtener y que no implique métodos invasivos.

En relación a ello, existen dos tipos celulares que se encuentran en tejidos adultos y cumplen estos requisitos, las células endometriales estromales (EnSC) y las células deciduales estromales (DSC). Las EnSC y las DSC presentan las características propias de las células progenitoras, tales como la clonogenicidad, la autorenovación y la capacidad de diferenciación a distintos linajes de origen mesenquimal. Además, se encuentran en una localización perivascular en el endometrio no gestante (EnSC) y en la decidua (DSC). Ambos tipos de células son capaces de decidualizarse en respuesta a la acción conjunta de las hormonas ováricas o placentarias (progesterona y estradiol) y otros factores endocrinos. Este proceso de diferenciación morfológica y bioquímica inducido durante la fase secretora del ciclo tiene la finalidad de preparar al endometrio para la implantación del embrión. Si hay embarazo, el proceso de decidualización se mantiene hasta completarse. En este contexto, el éxito del embarazo depende de la modulación inmunológica y la inducción de tolerancia materno-fetal por parte de las DSC. Estas propiedades inmunoregulatoras determinan que las DSC y sus antecesoras en el endometrio, las EnSC, puedan ser utilizadas en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

Por otra parte, el estudio y caracterización de las células estromales uterinas en condiciones patológicas es necesario para poder entender mejor la patogenia de enfermedades ginecológicas, como la endometriosis. Esta patología se caracteriza por la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina, en localizaciones ectópicas. Las células endometriósicas estromales (eEnSC) se caracterizan por la resistencia a la progesterona, la baja sensibilidad a la apoptosis y por establecer una comunicación intercelular con el sistema inmunitario que evita que este pueda eliminar el tejido endometrial ectópico.

En base a ello, el objetivo general de esta investigación es estudiar el origen, la diferenciación y las derivaciones patológicas de las células estromales uterinas. Por esta razón, hemos analizado las características fenotípicas y funcionales de las células estromales uterinas humanas procedentes del endometrio no gestante, de la decidua y del endometrioma ovárico, y su comparación con las MSC.

Nuestros resultados muestran que las células precursoras de las EnSC (preEnSC) y de las DSC (preDSC) tienen un fenotipo antigénico similar y compatible con el de MSC de médula ósea. También hemos comprobado, en el caso de las preDSC, la capacidad de diferenciación a células de tres linajes mesenquimales, la expresión de marcadores de células madre y la clonogenicidad. Estos datos apoyan la hipótesis de que las MSC de médula ósea son la fuente o el origen de las EnSC y las DSC. Además, hemos demostrado que las preDSC expresan antígenos propios de pericitos, factores angiogénicos, presentan actividad contráctil y una localización *in vivo* alrededor de los vasos sanguíneos; todas ellas son características propias de pericitos, que son células estrechamente relacionadas o idénticas a las MSC. Estos resultados nos indican que las preDSC constituyen el nicho perivascular de las MSC en la decidua humana.

Aunque las preEnSC y las preDSC son el mismo tipo celular, se encuentran en dos contextos fisiológicos diferentes; por lo que, según nuestros resultados, comparten el mismo fenotipo antigénico y funciones. Sin embargo, hemos demostrado que las preDSC tienen una mayor capacidad de decidualización que las preEnSC, evidenciada por las funciones asociadas a este proceso de diferenciación: secreción de prolactina (PRL) e IL-15, inducción de apoptosis y cambio a una morfología redondeada. Estas diferencias son atribuibles a los distintos ambientes fisiológicos en los que se encuentran, es decir, no gestación y gestación.

La decidualización de las preDSC cambia algunas de sus características, tales como la localización perivascular (que pasa a ser extravascular), el descenso de la expresión de antígenos asociados a pericitos, la menor contractilidad celular y el desarrollo de un perfil más inmunoregulador que contribuye a la tolerancia inmunológica materno-fetal. Concretamente, hemos estudiado la actividad quimiotáctica de las DSC sobre linfocitos T activados, los cuales podrían tener una actividad proabortígena al llegar a la decidua. Hemos demostrado que en las DSC decidualizadas (dDSC) se inhibe la secreción de CXCL9, CXCL10 y CXCL11, quimioquinas con capacidad de atraer a células Th1 y Tc. Además, las dDSC producen un factor termoestable y de bajo peso molecular que inhibe activamente la migración de células T activadas. También hemos observado que las dDSC inhiben la expresión de TNF- α e IFN- γ en las células T activadas quimioatraídas. Todos estos mecanismos evitan la llegada de linfocitos T con actividad proabortígena a la decidua.

En el contexto patológico de la endometriosis, hemos comprobado que las eEnSC son resistentes a la decidualización, ya que conservan en su mayoría la morfología fibroblástica, apenas producen PRL y no sufren apoptosis. Sin embargo, las preeEnSC secretan más CXCL9 que las preEnSC y, paralelamente, presentan una mayor actividad quimiotáctica sobre linfocitos T y células NK activadas. Nuestros datos sugieren que estas células inmunitarias, atraídas por las preeEnSC, pueden estar implicadas en la patogenia de la endometriosis.



INTRODUCCIÓN



1. El endometrio

El **endometrio** es un tejido mucoso que tapiza la cavidad uterina. Se encuentra dividido estructural y funcionalmente en dos capas: **funcional** y **basal**. La capa funcional se extiende desde el lumen uterino hasta la capa basal y comprende los dos tercios superiores de la mucosa endometrial. Histológicamente esta capa está formada por un epitelio simple prismático luminal y glándulas verticales que se introducen en un estroma compuesto por fibroblastos, tejido conectivo, arteriolas espirales y distintas poblaciones leucocitarias. Mientras que la capa funcional sufre una importante remodelación cíclica, la capa basal es permanente y está formada por un denso estroma con glándulas basales dispuestas horizontalmente y vasos sanguíneos. Algunos autores consideran que en esta capa se encuentran las células progenitoras responsables de la regeneración de la capa funcional después de la menstruación. Dichas células pueden diferenciarse en células estromales y epiteliales, permitiendo así el mantenimiento de la integridad endometrial tras la menstruación^{1,2}.

La regeneración natural y completa que experimenta el endometrio hace de él un tejido único en un contexto muy dinámico, ya que durante la etapa reproductiva el endometrio se desprende y se repara alrededor de 400 ciclos. Además, también se restaura por completo tras el parto¹.

Los procesos que ocurren en el endometrio, tanto durante el ciclo endometrial como en el embarazo, están sujetos a la influencia del sistema inmunitario. Por eso, los leucocitos son una población celular muy importante en el endometrio humano y representan del 10-20% del total de células endometriales³. Dicho sistema ejerce una doble función; por un lado, es capaz de generar una respuesta protectora frente a patógenos y, por otro lado, inicia el desarrollo de una respuesta tolerogénica hacia el feto semiallogénico cuando hay embarazo⁴.

1.1. El ciclo endometrial

El eje hipotalámico-hipofisario-gonadal regula la secreción cíclica de estradiol (17 β -estradiol o E2) y progesterona (P4) en el ovario a lo largo del ciclo. En respuesta a estas hormonas, se producen cambios en el aparato reproductor femenino para facilitar el desarrollo de procesos como la ovulación, la fecundación, la implantación y el embarazo. Los niveles de las hormonas mencionadas también definen las distintas etapas en que se divide el ciclo endometrial: **fase menstrual**, **fase proliferativa** o **folicular**, **fase intermedia** en la que tiene lugar la **ovulación** y **fase secretora** o **lútea**⁵.

1.1.1. Fase menstrual

El ciclo se inicia con la fase menstrual (días 1-5 aproximadamente) tras un significativo descenso de los niveles de E2 y P4. En esta etapa tiene lugar la descamación del endometrio y, como consecuencia, el sangrado. A medida que avanza la menstruación se produce, de manera simultánea, la reparación de la superficie endometrial mediante la reepitelización.

Las células endometriales estromales (EnSC), que expresan el receptor de P4 (PR), perciben el descenso en la concentración de esta hormona e inician una serie de procesos inflamatorios. Entre estos destaca la translocación nuclear del factor de transcripción NF- κ B, el cual regula la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. La activación de NF- κ B lleva a la producción progresiva de citoquinas, quimioquinas y prostaglandinas proinflamatorias. Esta respuesta favorece el

reclutamiento de leucocitos en el endometrio y ellos mismos secretan una serie de citoquinas proinflamatorias que reclutan más leucocitos en el endometrio, lo cual exacerba la inflamación presente en el tejido durante la menstruación¹. En la transición de fase secretora tardía a fase menstrual, se activa el inflamasoma NLRP3, tanto en las células endometriales decidualizadas como en los leucocitos residentes en el tejido endometrial, dando lugar a la secreción de IL-1 β e IL-18 activas, lo cual impulsa una serie de procesos inflamatorios y proteolíticos que resultan en la degradación del tejido⁶.

Las células inmunitarias desempeñan una función muy importante en la fase menstrual. De hecho, en los momentos previos a la menstruación, el 50% de las células presentes en el tejido endometrial son leucocitos; del 6-15% de las células del estroma de la capa funcional son neutrófilos CD11b^{bright}/CD66b+/CD16+ y hay una proporción equivalente de macrófagos CD16+/CD68+/CD163+ y de células NK uterinas (uNK) CD56+/CD16-⁷; la presencia de eosinófilos, mastocitos (ambos del 3-5%) y linfocitos T (1-2%) es menor¹ (**Ilustración 1**).

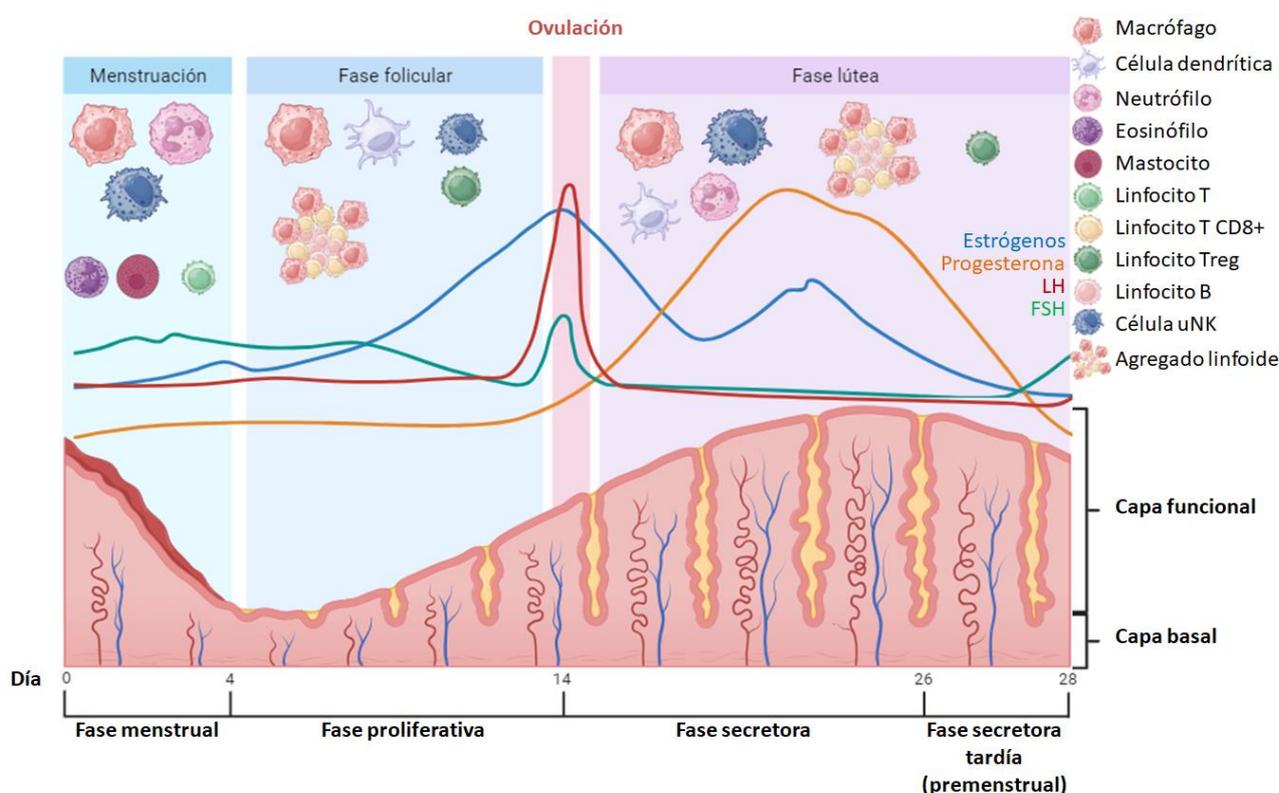


Ilustración 1. Esquema representativo del ciclo endometrial: niveles hormonales y células inmunitarias en cada fase del ciclo (el tamaño celular es indicativo de la proporción de cada célula inmunitaria en el endometrio). *Imagen creada con el software BioRender.*

La elevada proporción de **neutrófilos** en la fase menstrual es determinante para la descomposición del tejido endometrial mediante la liberación de enzimas degradativas, como la catepsina C, la elastasa, la metaloproteinasa de la matriz 9 (MMP-9) y la proteinasa 3. Los neutrófilos también aumentan la defensa inmunitaria innata, por ejemplo ejerciendo acciones quimiotácticas sobre los monocitos, tras la alteración de la barrera epitelial^{8,9}.

Al igual que ocurre con los neutrófilos, el número de **monocitos/macrófagos** también se incrementa en el estroma endometrial perimenstrual, como consecuencia de la regulación hormonal¹⁰. Esto, en parte, se debe al efecto del E2 en la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1 o CCL2) por parte de las células endometriales estromales. Se ha observado que la expresión de dicha quimioquina es mayor cuando los niveles de E2 son bajos, de manera que el reclutamiento de macrófagos endometriales aumenta¹¹. Además de CCL2, la expresión de otras quimioquinas que atraen a monocitos, como CCL7 (proteína quimiotáctica de monocitos 3, MCP-3), CCL16, CCL22 y CX₃CL₁ también se incrementa en esta fase del ciclo^{10,12}. Los monocitos reclutados se diferencian y adquieren un fenotipo proinflamatorio, lo cual es importante para la degradación tisular.

Por lo que respecta a las células **uNK**, estas expresan los antígenos CD9, CD69 y CD94, pero no expresan CD8 ni CD57, a diferencia de las células NK del torrente sanguíneo; además, son mayoritariamente CD56^{bright}/CD16⁻, mientras que en sangre periférica son CD56^{dim}/CD16⁺. El nivel de expresión de CD56 es aproximadamente 10 veces mayor en las uNK que en las células NK del torrente circulatorio¹⁰. Por otra parte, las células uNK producen citoquinas proinflamatorias, tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IL-8 e IFN- γ , de manera que promueven la respuesta inflamatoria, inducen la activación de macrófagos y la generación de células T citotóxicas⁸.

1.1.2. Fase proliferativa

Durante los días 7 a 13 del ciclo aproximadamente, el endometrio se encuentra en fase proliferativa, durante la cual aumenta la secreción en la adenohipófisis de la hormona gonadotropina foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH). En el folículo, las células foliculares ováricas de la granulosa y de la teca actúan de manera coordinada y regulada por las gonadotropinas. La LH estimula a las células de la teca para que sinteticen andrógenos a partir del colesterol; estos difunden hasta las células de la granulosa que, estimuladas por la FSH, convierten los andrógenos en estrógenos (E2). Es por esto que los niveles de E2 empiezan a aumentar progresivamente hasta que este alcanza su concentración máxima, alrededor de 24-36 horas antes de la ovulación. La FSH induce la aparición de receptores de la LH en las células foliculares ováricas de la granulosa, que secretan P4 junto con E2. Ambas hormonas actúan produciendo una retroalimentación positiva y estimulan la secreción de LH y FSH para que tenga lugar la ovulación¹.

El proceso regenerativo de los compartimentos epitelial (glandular) y estromal se debe a la presencia de células progenitoras endometriales, que son células madre adultas que se encuentran en la capa basal del endometrio^{1,2,13}. Estas células responden a E2 y P4 para generar tejido endometrial. Es por esto que el progresivo aumento de los niveles de E2 durante la fase proliferativa estimula el crecimiento de células epiteliales y estromales e induce un aumento de la expresión de los receptores de P4 y de estrógenos en el epitelio y el estroma¹.

Las diferentes poblaciones de células inmunitarias desarrollan su función a nivel endometrial durante la fase proliferativa (**Ilustración 1**). En su papel de células presentadoras de antígenos (APC), los macrófagos y las células dendríticas (DC) son importantes para la generación de respuestas inmunitarias adaptativas. La quimioatracción de **monocitos** desde sangre periférica es mediada por las quimioquinas secretadas por las células endometriales estromales, tales como CCL4 (proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, MIP-1 β), CCL7, CCL16, CCL22 y CX₃CL₁¹².

Los **macrófagos** representan entre el 1-2% del total de células del endometrio durante la fase proliferativa y expresan los marcadores de adhesión y activación CD54, CD69 y CD71, lo cual muestra su función en la regeneración y la proliferación de la capa funcional; además, son los leucocitos más abundantes durante el proceso de reparación del endometrio. El aumento del número de macrófagos y, en consecuencia, de los factores secretados por ellos, como CCL4, el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y CSF-1, son fundamentales para crear un microambiente proinflamatorio que desempeña un papel esencial en la preparación del endometrio antes de la ventana de implantación (fase secretora)¹⁴.

En cuanto a las células **uNK**, los niveles permanecen bajos inicialmente, pero aumentan a medida que avanza el ciclo.

Durante la fase proliferativa también desarrollan su función de presentación antigénica en el endometrio las **DC**, que residen tanto en el estroma sub-epitelial de la capa funcional como en la capa basal, y son mucho menos abundantes que otras células inmunitarias. La frecuencia de DC inmaduras CD1a+ aumenta durante la fase proliferativa, mientras que la población de DC maduras CD83+ permanece relativamente constante⁴.

El sistema inmunitario adaptativo, representado por los **linfocitos T y B**, también se encuentra presente a nivel endometrial durante la fase proliferativa. De la población total de leucocitos, aproximadamente el 50% son linfocitos T, entre los cuales hay al menos dos tercios de linfocitos T CD8+. Estas células se pueden encontrar dispersas en el estroma endometrial, en una localización intraepitelial o formando agregados linfoides. Dichos agregados empiezan a desarrollarse en la capa basal endometrial durante la fase proliferativa y están formados por un núcleo de linfocitos B rodeado de linfocitos T, que son mayoritariamente CD8+; la región de linfocitos T está, a su vez, rodeada de macrófagos. Estos agregados aumentan su tamaño durante la fase proliferativa y la acumulación progresiva de linfocitos T es el resultado de su migración desde sangre periférica hacia el endometrio y no a la proliferación de clones residentes, ya que hay un bajo nivel de división celular dentro de los agregados linfoides^{3,4}. La función de estos está relacionada con el mantenimiento de un equilibrio entre la creación de un ambiente protector contra los patógenos y, posteriormente, el establecimiento de un ambiente inmunosupresor que permita preparar el endometrio para proteger al embrión^{3,4}.

Por otra parte, también aumenta el número de **linfocitos T reguladores (Treg)** CD4+CD25+Foxp3+, que controlan la respuesta inmunitaria y alcanzan su número máximo durante la fase proliferativa tardía (días 9 a 13). Dicho aumento en un estadio preovulatorio se relaciona directamente con el incremento de los niveles de estrógenos y se debe a la necesidad de inducción de tolerancia inmunológica para facilitar la implantación del embrión¹⁵.

1.1.3. Fase secretora

Tras la ovulación, que tiene lugar entre 10-12 horas después del pico de LH, se inicia la fase secretora a nivel endometrial. Desde los días 15 a 28, descienden los niveles de LH y FSH, y el cuerpo lúteo secreta cantidades crecientes de P4 y E2, aunque los niveles de este último son menores que anteriormente. La capa funcional comienza a diferenciarse o a decidualizarse bajo la influencia de la P4, preparando al endometrio para la implantación del blastocisto. En ausencia de fecundación, los niveles de E2 y P4 descienden provocando el desprendimiento del tejido endometrial y el inicio de la menstruación¹.

En cuanto a la regulación del sistema inmunitario (**Ilustración 1**), el número de células **uNK** durante la fase secretora alcanzan niveles de, aproximadamente, el 70% de la población total de leucocitos y, a menudo, se encuentran cerca del epitelio luminal, en la porción superior de las glándulas endometriales. Producen factores de crecimiento angiogénicos y el factor inhibidor de la leucemia (LIF), los cuales son necesarios para la formación de los vasos sanguíneos⁸. La proliferación de las células uNK se debe al incremento de los niveles de IL-15 secretada por monocitos y a la llegada de células NK desde el torrente sanguíneo¹⁶.

Por otra parte, el número de **macrófagos** aumenta al 3-5% del total de células del endometrio. Estos desempeñan una función importante en la regulación de la homeostasis. Las quimioquinas responsables de la atracción de monocitos desde sangre periférica son diversas; por ejemplo, los niveles de expresión de CCL7, CCL22 y CX₃CL₁ son equivalentes a los de la fase proliferativa; además, al inicio de la fase secretora predominan las quimioquinas CCL4, CCL14, y CCL16, pero durante la fase secretora tardía solamente hay expresión de CCL14^{12,14}. El incremento de la población de macrófagos durante la fase secretora también se debe a la proliferación de dichas células *in situ*¹⁴.

Tanto en la capa funcional como en la capa basal, también se encuentran **DC**. Tal como ocurre durante la fase proliferativa, la frecuencia de DC inmaduras CD1a+ aumenta durante la fase secretora tardía y el número de DC maduras CD83+ permanece relativamente constante⁴.

En esta etapa los agregados linfoides están completamente formados, pero se ve disminuida la capacidad citotóxica de los linfocitos T CD8+, ya que en este momento puede producirse la concepción y se precisa el establecimiento de un estado temporal de inmunosupresión⁴. Además, tiene lugar una elevada reducción del número de linfocitos **Treg** CD4+CD25+Foxp3+¹⁵.

2. Células endometriales estromales

La capacidad regenerativa del endometrio es indicativa del importante papel que desempeñan las células progenitoras somáticas en el proceso de regeneración y crecimiento que experimentan los compartimentos epitelial y estromal¹. Desde que en 1989 se propusiera por primera vez la presencia de células progenitoras somáticas en la capa basal del endometrio, estas han sido ampliamente caracterizadas y estudiadas en el contexto de la regeneración endometrial¹³.

En el endometrio humano adulto se han identificado diferentes poblaciones celulares que presentan las características propias de las células progenitoras, tales como la clonogenicidad, la autorenovación y la capacidad de diferenciación a distintos linajes¹⁷. Estos tipos de células incluyen las **células progenitoras epiteliales**, las **células progenitoras mesenquimales endometriales (eMSC)** y las "**side population cell**" (**SP**)¹⁸.

2.1. Regeneración epitelial

El componente glandular de la capa basal del endometrio, que permanece durante la menstruación, contiene células progenitoras epiteliales, las cuales son responsables de la reepitelización de la superficie luminal. Estas células expresan el antígeno embrionario 1 específico de estadio (SSEA-1, CD15 o Lewis X). Las células progenitoras epiteliales SSEA-1+ expresan niveles más bajos del receptor de estrógenos- α (ER- α) y del PR que las células

epiteliales SSEA-1-, las cuales se encuentran mayoritariamente en la capa funcional; esto implica una menor diferenciación de las células SSEA-1+. Por otra parte, las células SSEA-1+ tienen telómeros más largos y una mayor actividad telomerasa, siendo esta una característica del endometrio regenerativo^{18,19}.

Se han identificado otros marcadores que caracterizan a las células progenitoras epiteliales, tales como el factor de transcripción SOX9 y la molécula de adhesión N-cadherina, que fue el primer marcador descrito de células epiteliales endometriales con función de células progenitoras y se expresa en la base de las glándulas. Además, existen distintas poblaciones de células epiteliales endometriales en función de la expresión de los marcadores mencionados (**Ilustración 2**). En concreto, las células epiteliales clonogénicas más primitivas en la base de las glándulas son N-cadherina+/SSEA-1-/SOX9-; estas generan una pequeña población de células N-cadherina+/SSEA-1+/SOX9+; a continuación, en el límite entre la capa basal y la capa funcional, se extienden las células N-cadherina-/SSEA-1+/SOX9+. En la capa funcional se encuentran las células epiteliales proliferativas con un fenotipo N-cadherina-/SSEA-1-/SOX9-, que se extienden hasta el epitelio luminal donde se encuentran las células N-cadherina-/SSEA-1+/SOX9+^{1,19,20,21}. Recientemente se ha demostrado que el marcador de células progenitoras epiteliales ALDH1A1 (isoforma A1 de la aldehído deshidrogenasa 1), que cataliza la producción de ácido retinoico, también colocaliza con el 78% de las células epiteliales N-cadherina+ de la capa basal más profunda del endometrio^{1,20,22}.

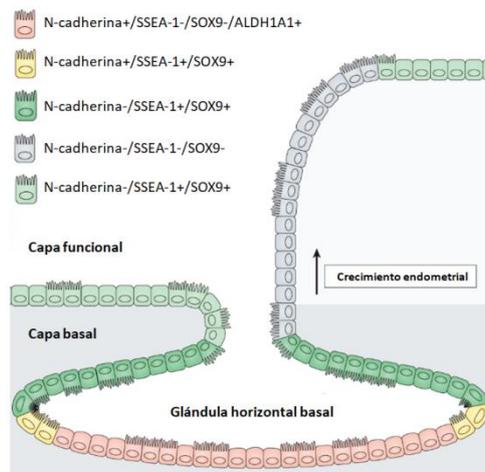


Ilustración 2. Células progenitoras epiteliales presentes en las glándulas endometriales. *Adaptado de Salamonsen et al.*¹

2.2. Regeneración estromal y vascular

La regeneración del estroma endometrial está mediada por células con las características propias de las células madre mesenquimales o MSC, las **células endometriales estromales (EnSC)**. La **Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT)** ha definido a las MSC humanas de médula ósea como células adherentes al plástico en condiciones de cultivo estándar; con capacidad clonogénica y de diferenciación *in vitro* a los linajes mesodérmicos adipogénico, osteogénico y condrogénico; con un fenotipo antigénico CD73+/CD90+/CD105+ y ausencia de expresión de los marcadores CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79α o CD19 y HLA-DR²³.

Las EnSC son eMSC que se clasifican en diferentes subpoblaciones en función de los marcadores expresados^{1,18}. Las eMSC CD140b+/CD146+/CD45- representan aproximadamente el 1,5% de todas las células endometriales estromales y presentan las características típicas de MSC de médula ósea²⁴. Estas eMSC se encuentran en una localización perivascular, tanto en la capa funcional como en la capa basal del endometrio, de ahí que puedan obtenerse a partir de muestras de biopsia endometrial y también a partir de sangre menstrual²⁵. Las células CD140b+/CD146+, por su ubicación alrededor de los vasos sanguíneos, se encuentran muy cerca de las células endoteliales (CD31+/CD140b-/CD146+) y se ha propuesto su identificación como pericitos, que son células murales que se encuentran en la parte abluminal de los vasos sanguíneos y están en íntimo contacto con las células endoteliales de la microvasculatura²⁴ (**Ilustración 3**).

El marcador de células perivasculares SUSD2 (“sushi domain containing 2”) se expresa también en eMSC (**Ilustración 3**) y se ha propuesto como marcador único para el aislamiento de eMSC clonogénicas con alta capacidad proliferativa, con las propiedades descritas por la ISCT y ubicadas alrededor de los vasos sanguíneos en la capa basal y la capa funcional del endometrio²⁶. La mayoría de las células SUSD2+ también expresan CD140b+, mientras que todas las células SUSD2+/CD146+ expresan CD140b+. La subpoblación de células SUSD2+/CD140b+/CD146+ desarrolla un papel importante en el crecimiento del estroma de la capa funcional del endometrio durante la fase proliferativa. Además, se ha comprobado que el 60% de las células SUSD2+ también expresan STRO-1, marcador de células mesenquimales de médula ósea^{18,26}.

Por otra parte, el endometrio humano contiene aproximadamente un 5% de células madre adultas SP. La población de células SP es heterogénea, ya que está formada por células endoteliales CD31+ (51%), células epiteliales CD326+ (EpCAM, molécula de adhesión de células epiteliales) (27%) y células estromales CD10+ o CD140b+/CD146+ (10-14%) (**Ilustración 3**); de manera que las células SP endometriales se encuentran tanto en el compartimento epitelial como en el estromal. Las células SP epiteliales y estromales presentan las características típicas de MSC *in vitro*; tienen un patrón intermedio de actividad telomerasa, en comparación con las células madre embrionarias (hESC) y las células diferenciadas; además, al igual que las células endoteliales vasculares endometriales, no expresan ER- α y PR, pero sí el ER- β ^{18,27,28}.

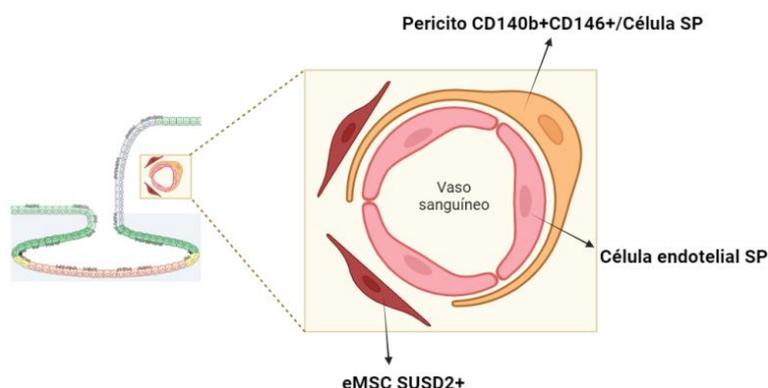


Ilustración 3. Ubicación de las células progenitoras en el estroma endometrial. Adaptado de Gargett et al.¹⁸

3. La decidualización

La **decidualización** es un proceso de diferenciación morfológica y bioquímica que experimentan las EnSC durante la fase secretora del ciclo endometrial, cuya finalidad es preparar al endometrio para la implantación del embrión. Si hay embarazo, el proceso de decidualización se mantiene hasta completarse^{29,30}. En este caso, las células que experimentan dicho proceso de diferenciación son las células deciduales estromales (DSC) presentes en la decidua, que es el componente materno de la placenta.

3.1. Señalización hormonal

Durante la fase secretora, el estroma endometrial está expuesto a la acción de la P4, cuya acción está mediada por la unión y activación de su receptor nuclear, el cual tiene dos isoformas: PR-A y PR-B. Generalmente, la isoforma PR-A es transcripcionalmente menos activa y actúa como inhibidor dominante de la transcripción de PR-B y de otros receptores de esteroides³¹. No obstante, la PR-A es la isoforma dominante durante el proceso de decidualización y participa en el reclutamiento de una serie de factores de transcripción activados, directa o indirectamente, por la vía de señalización del AMPc^{29,32}. Además, la expresión de los genes relacionados con la decidualización no parece encontrarse bajo el control transcripcional directo del PR activado, prueba de ello es la baja capacidad de la P4 de inducir diferenciación en EnSC *in vitro*, siendo necesarios varios días de exposición a esta hormona para el aumento de los niveles intracelulares de AMPc^{29,30,33} (**Ilustración 4**).

Las EnSC durante la fase secretora del ciclo no solamente están expuestas a la acción de la progesterona, sino también a otros factores capaces de unirse a receptores acoplados a proteínas G (GPCR), lo cual provoca la activación de la adenilato ciclasa, la formación de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) como segundo mensajero y la activación de la proteína quinasa A (PKA). Entre estos ligandos se encuentran la prostaglandina E₂ (PGE₂), la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la relaxina, la procineticina 2 y las gonadotropinas hipofisarias^{29,30,34}. La acción conjunta de estos factores junto a la de las hormonas ováricas (P4 y estradiol) induce la acumulación de AMPc intracelular^{33,34,35}. La señalización del AMPc puede transmitirse mediante la regulación directa de la región promotora de algunos genes (*PRL* e *IGFBP1*) o mediante la activación de la PKA. Además, la inducción de la expresión de *PRL* e *IGFBP1* en EnSC sometidas a decidualización *in vitro* con AMPc está estrechamente relacionada con una alta acetilación de histonas de las regiones promotoras de estos genes, que hace que estas regiones promotoras sean más accesibles a los factores de transcripción que regulan la expresión génica^{36,37,38} (**Ilustración 4**).

El aumento de la concentración de AMPc promueve la expresión y la acumulación nuclear de factores de transcripción como C/EBPβ (proteína de unión al enhancer CCAAT beta), FOXO1 ("Forkhead box protein O1") y los transductores de señal y activadores de la transcripción STAT3 y STAT5. Estos factores interactúan con PR-A y se inicia la transcripción de genes específicos para la síntesis de PRL, IGFBP-1, IL-1β, IL-6, IL-11, IL-15, LIF, activina A, entre otros^{29,30,39,40,41} (**Ilustración 4**). Estos actúan de forma autocrina y paracrina, y activan genes que controlan los cambios morfológicos y funcionales asociados a la decidualización, la implantación del blastocisto, la proliferación e invasión del trofoblasto y el reclutamiento de leucocitos.

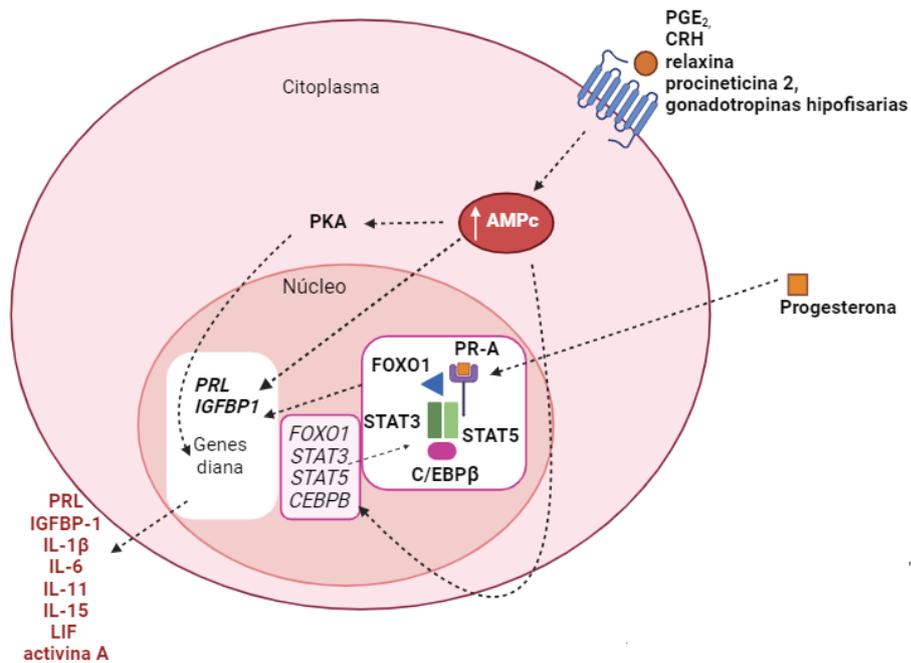


Ilustración 4. Mecanismo bioquímico de la decidualización en las EnSC y DSC. Imagen creada con el software BioRender.

3.2. Efecto de la decidualización sobre el fenotipo y las funciones celulares

Al decidualizarse, tanto EnSC como DSC adquieren una morfología poligonal, aumentan de tamaño, acumulan glucógeno y lípidos en el citoplasma, y secretan PRL e IGFBP-1. Además, al igual que a las células no decidualizadas, se les atribuye una función inmunológica ya que son capaces de secretar citoquinas y quimiocinas determinantes para el reclutamiento de leucocitos al sitio de implantación. El resultado de este proceso es una regulación positiva de genes que codifican para factores de crecimiento, receptores de neurotransmisores, neuromoduladores y moduladores de la apoptosis y sus receptores; todo ello es indicativo de la importancia de la señalización paracrina en el endometrio y en la decidua durante los primeros estadios de un embarazo^{42,43}.

3.2.1. Cambios tisulares

En su estudio sobre las características histológicas del endometrio durante el ciclo endometrial, Noyes *et al.* observaron un marcado aumento del citoplasma de las células estromales situadas cerca de las arterias espirales terminales, alrededor del día 23 del ciclo. Posteriormente, el día 25, la mayor parte de las células del estroma de la capa funcional más superficial presentaba esta característica y eran semejantes a las células del tejido decidua. En la fase secretora tardía, la capa funcional se vuelve cada vez más compacta y los cambios en la permeabilidad vascular promueven la infiltración leucocitaria. Esto deriva en una amplia interacción entre las EnSC y las células inmunitarias^{43,44}, entre las que destaca la presencia de las células uNK (**Ilustración 5**).

Durante la decidualización en el endometrio, las **uNK** CD56^{bright}/CD16⁻ constituyen aproximadamente del 30%-40% de las células del compartimento estromal, aunque son relativamente escasas en el estroma subyacente al epitelio luminal. Estas células presentan una baja citotoxicidad y participan en la remodelación de las arterias espirales antes y durante la invasión del trofoblasto. Las uNK experimentan quimioatracción en respuesta a quimioquinas como CXCL9, CXCL10, CXCL12 y CXCL14; además, las citoquinas producidas por las EnSC (DSC en el contexto del embarazo), como IL-11, IL-15 e IL-33, están implicadas en la proliferación y maduración de las células uNK^{43,45,46,47,48,49}. A su vez, estas células inmunitarias producen citoquinas, como el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IFN- γ , TNF- α , TGF- β y LIF; así como factores angiogénicos, como el factor de crecimiento placentario (PGF), el factor de crecimiento endotelial vascular C (VEGF-C) y angiopoyetina 2 (ANGPT2). Por ello, contribuyen al remodelamiento vascular, a la neovascularización uterina durante el ciclo endometrial y al aumento de la permeabilidad del epitelio endometrial (mediada por VEGF); posteriormente, durante el embarazo, favorecen el crecimiento fetal^{42,43,50}. Otras células inmunitarias que se acumulan en el estroma de la capa funcional durante la decidualización son los **macrófagos CD163+**, las **DC** uterinas y los **linfocitos T**^{14,51}.

3.2.2. Características celulares y ultraestructurales

La transformación de las EnSC, tanto *in vivo* como *in vitro*, en respuesta a la exposición a los factores decidualizantes resulta en un cambio morfológico, de manera que las células adquieren una forma más redondeada, así como también su núcleo; un mayor número de nucléolos; la dilatación del retículo endoplasmático rugoso y el complejo de Golgi; y la acumulación de glucógeno y gotas lipídicas en el citoplasma. Además, las células estromales decidualizadas presentan actividad fagocítica, por lo cual pueden contribuir a la extensa remodelación de la matriz extracelular (MEC)^{43,52}. Durante este proceso, las EnSC abandonan su localización perivascular y se localizan en la zona extravascular del estroma endometrial. La decidualización empieza alrededor de los vasos sanguíneos y se extiende hasta alcanzar los dos tercios superiores del endometrio⁵³.

Por otra parte, la comunicación intercelular en el estroma endometrial es importante para el establecimiento de una interfaz materno-fetal funcional. En este contexto, la molécula de adhesión cadherina 11 se expresa en las EnSC durante la decidualización, especialmente en las células estromales que rodean las arterias espirales y puede facilitar las uniones homofílicas entre células adyacentes, previamente a la formación de uniones tipo gap ("gap junctions"). Esta molécula de adhesión también se expresa en las células trofoblásticas, de manera que se establecen uniones homofílicas entre ellas y las DSC, evitando así una migración invasiva excesiva de las células del trofoblasto⁵⁴. La decidualización también se caracteriza por cambios en la composición de la MEC; por ejemplo, el colágeno tipo IV y la laminina aumentan significativamente alrededor de las EnSC que experimentan decidualización. De esta manera, la membrana basal participa en la permeabilidad selectiva de macromoléculas y en el soporte estructural tisular⁵⁵ (**Ilustración 5**).

3.2.3. Secretoma y marcadores de decidualización

Los marcadores indicativos de decidualización más estudiados son la **PRL** y la **IGFBP-1** (**Ilustración 5**). La producción de PRL en el endometrio empieza alrededor del día 22 del ciclo⁵⁶, lo cual coincide con la regulación positiva de la expresión de su receptor, que se localiza

principalmente en las células epiteliales glandulares del endometrio. Durante la fase secretora tardía, la PRL regula la expresión del factor de transcripción regulador de interferón (IRF-1), de forma paracrina en el compartimento glandular. Este factor, a su vez, participa en la regulación de diversos genes implicados en el crecimiento celular, la diferenciación, la adhesión y la apoptosis⁵⁷. En la decidua, las funciones de la PRL se relacionan con la diferenciación de las células epiteliales; el control de la invasión del trofoblasto, mediante la unión a su receptor expresado por las células del sincitiotrofoblasto; el estímulo de la angiogénesis en las primeras etapas del embarazo; y la prevención del rechazo, mediante la regulación de la proliferación y diferenciación de las células inmunitarias^{43,58,59,60}.

Otro factor producido durante la decidualización de las EnSC es la IGFBP-1. Esta proteína regula la biodisponibilidad del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF). Los IGF regulan positivamente el fenotipo invasivo de los trofoblastos del primer trimestre de embarazo, al estimular la proliferación y supervivencia celular. La función de la IGFBP-1 se modifica según su grado de fosforilación, el cual se incrementa a medida que avanza la gestación siendo más efectiva para unirse a la IGF-1 y, por lo tanto, restringir la invasión del trofoblasto^{43,61}.

Entre las citoquinas producidas por las células decidualizadas destacan la IL-11 y la IL-15 (**Ilustración 5**). La IL-11 desempeña funciones autocrinas y paracrinas sobre las células estromales y tiene un papel importante en la preparación del endometrio para la implantación⁶². Por su parte, la IL-15 estimula la proliferación de las células uNK en el endometrio secretor y la decidua, sin estimular la citotoxicidad de estas, ya que esto sería perjudicial para el trofoblasto⁶³.

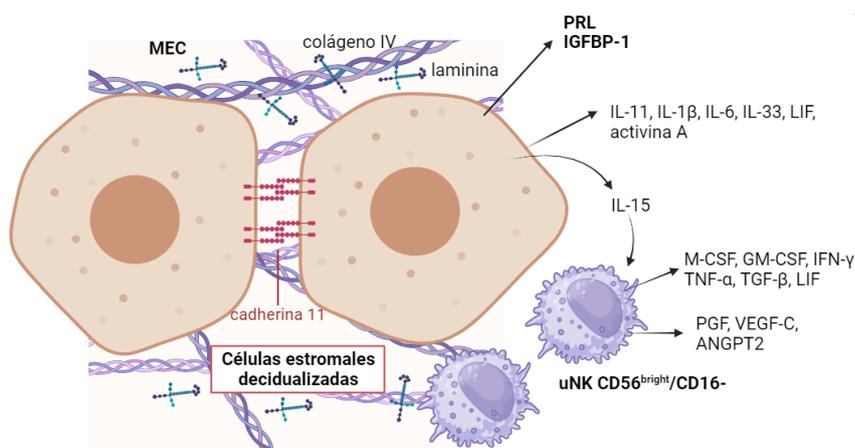


Ilustración 5. La decidualización de las células estromales: cambios morfológicos y bioquímicos.
 Imagen creada con el software BioRender.

4. La decidua

En el embarazo humano, la implantación del embrión se produce sobre la pared mucosa especializada del útero, llamada **decidua** (o endometrio gestante); por lo que puede considerarse como un tejido constituido a partir de células procedentes del endometrio. La decidua es el componente materno de la interfase materno-fetal; se encuentra en estrecho contacto con el trofoblasto; y está formada por glándulas, vasos sanguíneos y linfáticos, **células deciduales estromales (DSC)** y células del sistema inmunitario. Entre sus funciones, destaca el aporte de factores de crecimiento y citoquinas para el desarrollo embrionario, el control de la invasión del

trofoblasto y la inducción de tolerancia hacia el embrión semialogénico. Además, la relación fisiológica entre la madre y el feto en esta interfase es determinante para el desarrollo embrionario, la homeostasis vascular y la inmunoregulación³⁴.

4.1. La inmunología del embarazo

El éxito de un embarazo depende del establecimiento de un equilibrio entre la capacidad invasiva del trofoblasto y la receptividad de la decidua materna. Además de las DSC y las células endoteliales, las células inmunitarias representan un componente muy importante de la decidua materna. La respuesta inmunitaria en la interfaz materno-fetal facilita la recepción, el establecimiento y el crecimiento del blastocisto implantado⁶⁴.

Aproximadamente, el 70% del total de leucocitos presentes en la decidua son uNK; del 20-25% son macrófagos; del 3-10% son linfocitos T y el 1,7% son DC. Los linfocitos B están presentes en cantidad bajas^{64,65,66,67,68}.

La modulación inmunitaria y la inducción de tolerancia son necesarias al comienzo del embarazo para facilitar la implantación del blastocisto; pero para que el embarazo tenga éxito y llegue a término, también es imprescindible proteger a la madre y al feto de las agresiones ambientales y, para ello, se precisa un sistema inmunitario receptivo y activo. Por esta razón, el microambiente inmunitario de la decidua es único, sujeto a modulación y dinámico⁶⁴.

En cada una de las fases del embarazo, el sistema inmunitario desempeña unas funciones concretas y diferentes entre sí, dando lugar a una primera etapa proinflamatoria, una segunda etapa antiinflamatoria y una tercera etapa proinflamatoria. La primera etapa proinflamatoria se asocia con la implantación y la placentación; la segunda etapa antiinflamatoria se relaciona con el crecimiento y desarrollo fetal; y la tercera etapa proinflamatoria es responsable del inicio del parto⁶⁴.

4.1.1. La implantación y placentación constituyen una etapa proinflamatoria

La unión del blastocisto al epitelio luminal del útero y la placentación implican la degradación y reestructuración de la decidua materna. El gradiente inflamatorio que se crea en el sitio de implantación permite la aposición y adhesión del blastocisto al epitelio. La inflamación se caracteriza por la presencia de citoquinas, como IL-6, IL-8, IL-15, GM-CSF y TNF- α ; y quimioquinas, como CXCL1 y CCL4. Estos factores son producidos por las DSC y por las células inmunitarias que se infiltran en el tejido decidual. La presencia de **DC** uterinas CD11c+ aumenta la receptividad uterina regulando la remodelación tisular y la angiogénesis. Los factores secretados por las DC y los **macrófagos** eliminan la capa de mucina del epitelio luminal, exponiendo moléculas de adhesión que facilitan la implantación. Por otra parte, las células **uNK** en la decidua temprana también regulan la invasión del trofoblasto, mediante la secreción de IL-8 y quimioquinas, como CXCL10; además, son potentes secretoras de factores angiogénicos que inducen el crecimiento vascular^{64,69}.

4.1.2. El crecimiento fetal constituye una etapa antiinflamatoria

El desarrollo del feto necesita el establecimiento de un entorno antiinflamatorio de tipo **Th2** y cualquier señal proinflamatoria continua en esta etapa puede provocar un aborto espontáneo. Las

diferentes poblaciones inmunitarias, entre las que predominan los macrófagos, las uNK y los linfocitos Treg, contribuyen a crear el microambiente antiinflamatorio⁶⁴.

Los **macrófagos** de la decidua presentan un fenotipo predominantemente **M2**, el cual se asocia con la renovación tisular y con la secreción de citoquinas antiinflamatorias⁷⁰. Su capacidad fagocítica les permite eliminar de manera eficaz células apoptóticas procedentes del trofoblasto, impidiendo así la liberación de aloantígenos paternos, lo cual podría desencadenar una respuesta inmunitaria contra el feto^{64,71}. Las **uNK** CD56^{bright}/CD16⁻ presentan una baja citotoxicidad e interactúan con los macrófagos deciduales (CD14+/CD86+/CD206+/CD209+/PDL1+) que inducen la generación de linfocitos **Treg**, mediante la producción de TGF- β e indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO)⁷². Los linfocitos Treg Foxp3⁺ son muy importantes en esta etapa, ya que evitan respuestas inmunitarias de tipo efector contra los aloantígenos paternos. Además, el embarazo estimula selectivamente la acumulación de linfocitos Treg maternos con especificidad fetal y, después del parto, estas células persisten en niveles elevados, manteniendo la tolerancia al antígeno fetal preexistente⁷³. Dichas células Treg también regulan la actividad de los linfocitos **Th17**, una población celular menos numerosa, que contribuye a proteger la interfaz materno-fetal de infecciones microbianas⁷⁴.

4.1.3. El parto se desencadena tras una etapa proinflamatoria

Después del completo desarrollo del feto, el establecimiento de un microambiente proinflamatorio es indispensable para el inicio del parto. Concretamente, la vía de señalización de NF- κ B en el tejido decidual inicia el parto y es determinante para el progreso del mismo. En este estadio hay un importante incremento de citoquinas proinflamatorias (como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8), originado como consecuencia de la infiltración leucocitaria, pero también de la secreción por parte de las DSC, las células del miometrio y las células placentarias. La expresión de NF- κ B es inducible por los estímulos proinflamatorios y puede desencadenar una retroalimentación positiva que da lugar a una amplificación de la producción de citoquinas. Por otra parte, la entrada de células inmunitarias en el miometrio es necesaria para promover la contracción del útero y la separación de la placenta^{64,75}.

5. Células deciduales estromales

Las **DSC** son las células más abundantes de la decidua humana y están implicadas en la implantación del embrión, en el desarrollo del embarazo y en el establecimiento de los mecanismos de tolerancia inmunológica materno-fetal^{76,77,78,79,80,81,82}. Estas células se originan a partir de precursores fibroblásticos perivasculares que son capaces de decidualizarse, como respuesta al aumento de los niveles de hormonas ováricas, placentarias y otros factores, tal como se ha explicado anteriormente⁸³. Como resultado de este proceso, las DSC abandonan su localización perivascular y se localizan en la zona extravascular del estroma decidual⁵³. Las DSC pueden aislarse del tejido decidual, cultivarse y decidualizarse *in vitro* al ser incubadas con P4 y AMPc, experimentando un cambio a una morfología redondeada y secretando PRL (el marcador de decidualización más estudiado *in vitro*)^{84,85}.

5.1. Origen mesenquimal de las DSC

Las MSC pueden ser aisladas de diferentes tejidos y están estrechamente relacionadas con las células del nicho perivascular. Esta asociación permite a las MSC ser una fuente de células para la regeneración fisiológica tisular y para la reparación de lesiones locales^{86,87,88,89}. Se ha demostrado que los pericitos presentan un panel de expresión de marcadores similar al de las MSC; concretamente, expresan CD44, CD73, CD90 y CD105, que son moléculas de superficie comúnmente utilizadas como marcadores de células progenitoras mesenquimales⁹⁰. Además, los pericitos son capaces de diferenciarse en diferentes linajes de origen mesenquimal *in vitro*, dando lugar a adipocitos, condrocitos y osteoblastos^{91,92,93}. Entre sus funciones destaca el mantenimiento de la homeostasis vascular y, por ello, producen factores angiogénicos y desempeñan actividad contráctil, fagocítica, quimiotáctica e inmunoreguladora^{94,95,96,97,98}.

Los estudios recientes demuestran una estrecha relación fenotípica de las DSC con los pericitos y las MSC. Entre estas propiedades destaca la expresión de los antígenos clásicamente asociados a MSC CD44, CD73, CD90 y CD105. Otros dos marcadores característicos de las DSC son STRO-1 y CD34⁹⁹. Mientras que STRO-1 es un antígeno que identifica a los precursores estromales de médula ósea, la expresión de CD34 caracteriza a células precursoras hematopoyéticas y precursoras estromales. Este hecho sugiere que CD34 está implicado en la adhesión e interacción entre ambos tipos de células precursoras para la regulación de la hematopoyesis¹⁰⁰. En el microambiente decidual esta propiedad es determinante, ya que la decidua contiene una alta proporción de leucocitos implicados en el establecimiento de la tolerancia inmunológica. Además, las DSC expresan los marcadores de las células del estroma endometrial CD10 y CD29⁸⁰. Por otra parte, la proteína del citoesqueleto vimentina y el microfilamento contráctil α -actina de músculo liso (α -SMA) caracterizan a las DSC y las relacionan con las células perivasculares, determinando su actividad contráctil^{101,102}.

Algunas funciones comunes entre DSC y MSC son la contractilidad celular, la resistencia a la apoptosis y la inhibición de la apoptosis de linfocitos. En primer lugar, la contractilidad celular presentada por las DSC indica que estas desempeñan una función de regulación del flujo sanguíneo en la decidua y, por lo tanto, de la llegada de células inmunitarias a la interfaz materno-fetal¹⁰². La formación de la decidua durante el embarazo implica procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis de DSC. Por ello, la regulación de la apoptosis celular es necesaria para la fisiología normal de un embarazo. Se ha demostrado que las DSC experimentan apoptosis *in vitro* durante la decidualización, aunque son resistentes a diversos estímulos apoptóticos. Esto implica que la muerte celular es un proceso estrictamente regulado que ocurre en condiciones similares a las que se encuentran durante el embarazo¹⁰³. Las DSC también desempeñan una función protectora, ya que secretan citoquinas (como IL-1 β , IL-6 e IL-11), quimioquinas y factores de crecimiento (como VEGF) que actúan de manera paracrina y proporcionan un microambiente adecuado que favorece la supervivencia de linfocitos T y uNK^{62,104,105,106,107}. Estas moléculas activan vías de señalización para la supervivencia celular o regulan positivamente la expresión de factores antiapoptóticos^{108,109}.

5.2. Efecto de las DSC sobre las células inmunitarias de la decidua

El microambiente decidual influye en las características fenotípicas y funcionales de los leucocitos presentes en la decidua y en los que son reclutados desde sangre periférica durante el

embarazo. En dicho contexto, las DSC desempeñan un papel muy importante en esta función reguladora.

El porcentaje más elevado de leucocitos en la decidua corresponde a las células **uNK**. Mediante la secreción de quimioquinas, como CXCL10, CXCL12 y CX₃CL₁, las DSC participan en el reclutamiento de células NK desde sangre periférica hasta el tejido decidual¹¹⁰. Las DSC también son capaces de inducir cambios en la expresión antigénica de las NK atraídas desde sangre periférica y diferenciarlas a uNK; los factores secretados responsables de inducir dichos cambios son TGF-β, IL-15, IL-18 e IL-24; y las NK quimioatraídas adquieren la expresión de marcadores de uNK, tales como CD9, CD49a, CD103 y CXCR4, e incrementan la expresión de CXCR3^{111,112,113}. Además, la decidua contiene precursores hematopoyéticos CD34+/CD45+ que pueden diferenciarse a uNK CD56^{bright}/CD16-, debido al efecto de la IL-15 secretada por las DSC, que se une a su receptor (IL-15Rβ; también llamado CD122) en las células CD34+^{111,114}. Por otra parte, las DSC son capaces de inhibir la regulación positiva de la expresión de los principales receptores activadores de células NK atraídas desde sangre periférica y, por lo tanto, disminuir su citotoxicidad; la PGE₂, la IDO, el TGF-β y la IL-24 median el efecto inhibitor de las DSC^{113,115}. Dicho efecto también lo ejercen sobre las uNK al secretar IL-33, de manera que en estas células inmunitarias se incrementa la expresión de citoquinas propias de Th2 (IL-4, IL-10 e IL-13)¹¹⁶; la secreción de IGF-1 por las DSC decidualizadas también regula negativamente la citotoxicidad de las células uNK mediante la interacción con su receptor IGF-1R¹¹⁷ (**Ilustración 6**).

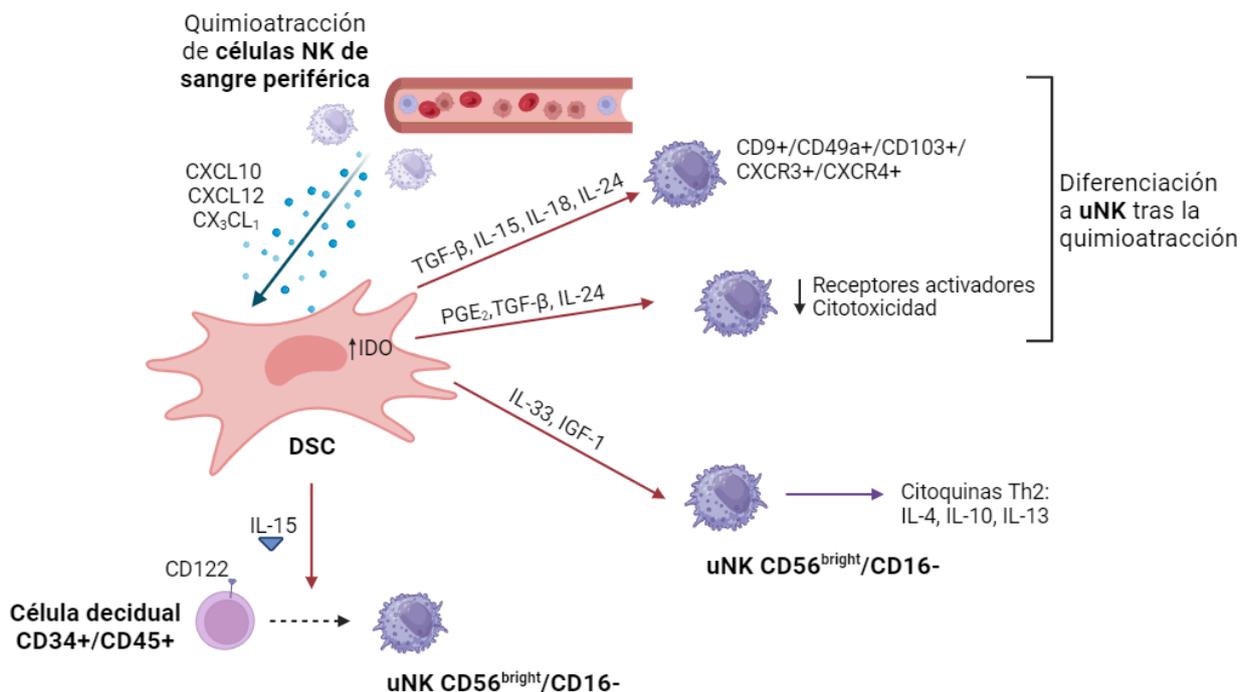


Ilustración 6. Efectos de las DSC sobre las células NK. Imagen creada con el software BioRender.

Otras células inmunitarias también adquieren una función específica al interactuar con las DSC, que al expresar PGE₂, IDO y la citoquina 1 inhibitor de macrófagos (MIC-1) ejercen un efecto inhibitor sobre la diferenciación de DC atraídas desde sangre periférica, de manera que también se inhibe su capacidad de inducir respuestas de linfocitos T potencialmente dañinas^{115,118} (**Ilustración 7**).

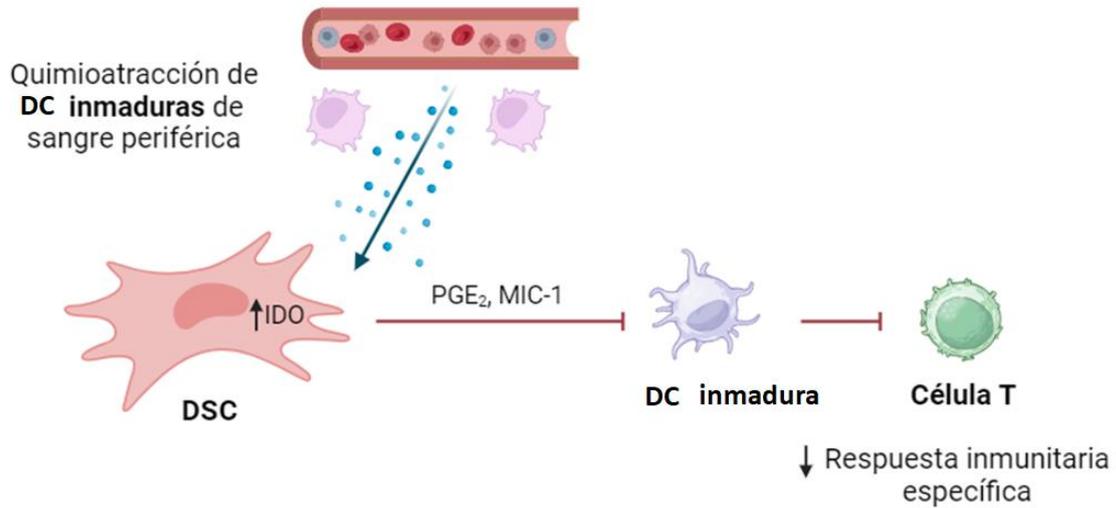


Ilustración 7. Efectos de las DSC sobre las DC. *Imagen creada con el software BioRender.*

Por otra parte, durante la decidualización, las DSC son capaces de expresar el receptor del factor activador de células B (BAFFR) y secretar la forma soluble de esta proteína, la cual inhibe las funciones de **monocitos** y **macrófagos** atraídos desde sangre periférica; por ejemplo, inhibe la expresión de HLA-DR y la secreción de TNF- α e IL-6 por parte de estas células. Ya que la función principal del HLA-DR es la presentación de antígenos peptídicos a los linfocitos T CD4+, la inhibición de su expresión en monocitos y macrófagos atenúa la activación de linfocitos T¹¹⁹. Además, los monocitos quimioatraídos desde sangre periférica se diferencian adquiriendo un fenotipo M2 antiinflamatorio (CD14^{bright}/CD163+/CD209+/CD86^{dim}), el cual es inducido por el M-CSF secretado por DSC¹²⁰. Otra función de las DSC sobre los macrófagos deciduales implica la secreción de IL-24, la cual promueve la renovación y la homeostasis de estos¹²¹ (**Ilustración 8**).

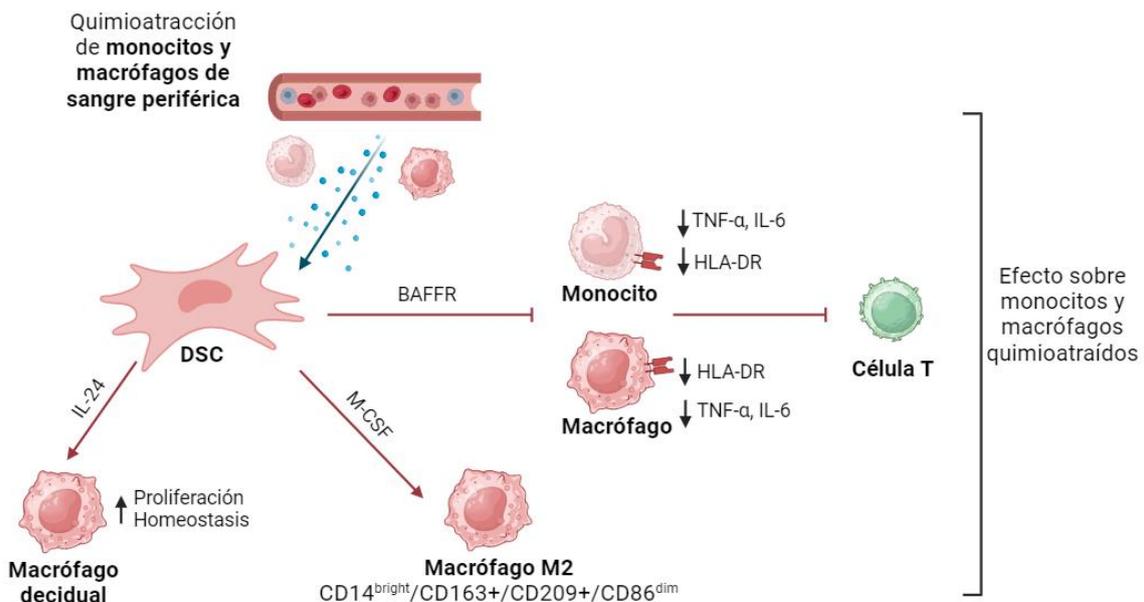


Ilustración 8. Efectos de las DSC sobre monocitos y macrófagos. *Imagen creada con el software BioRender.*

En cuanto a la influencia de las DSC sobre el sistema inmunitario adaptativo, destaca el efecto en los linfocitos **Treg**, una población fundamental para promover la tolerancia materno-fetal. Se ha demostrado que la señalización mediante TGF- β es el principal inductor de linfocitos Treg CD4+/CD25^{bright}/Foxp3+ en la decidua a partir de linfocitos T CD4+ de sangre periférica¹²⁰. Otro factor que induce dicha diferenciación es IDO¹²². Estudios realizados en modelo murino señalan que la IL-33, secretada por DSC, regula las respuestas inmunitarias de tipo **Th2** durante la etapa antiinflamatoria del embarazo¹²³. Otra investigación llevada a cabo en ratones muestra que, durante la decidualización, en las DSC se inhibe la expresión de las quimioquinas CXCL9, CXCL10, CXCL11 y CCL5 que atraerían a células Th1 y Tc proinflamatorias a la interfaz materno-fetal⁸¹. Por otra parte, la secreción de citoquinas antiinflamatorias Th2, como IL-4 e IL-10, y la inhibición de la secreción de quimioquinas proinflamatorias Th1, como TNF- α e IFN- γ , se ve favorecida por el efecto de CCL2 sobre estas células¹²⁴. Esta quimioquina también induce la migración de linfocitos **Th17** periféricos, con funciones reguladoras y protectoras; las células Th17 secretan IL-17 que promueve la proliferación y la invasión del trofoblasto¹²⁵ (**Ilustración 9**).

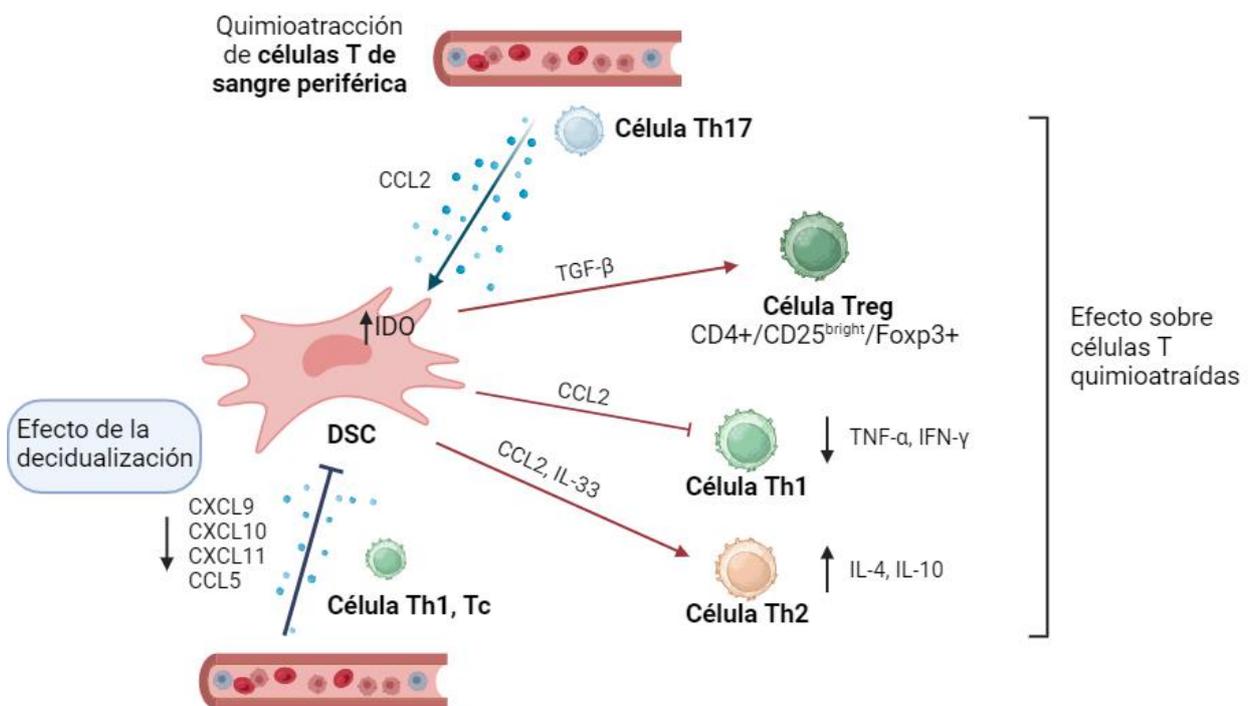


Ilustración 9. Efectos de las DSC sobre células T. Imagen creada con el software BioRender.

5.3. Efecto de las células inmunitarias deciduales sobre las DSC

Teniendo en cuenta que la señalización entre dos tipos celulares diferentes frecuentemente resulta en una comunicación bidireccional, los factores secretados por las células inmunitarias también influyen en las características que presentan las DSC⁸². En relación a ello, hay estudios que demuestran que las **células linfoides innatas (ILC)** desempeñan funciones relacionadas con la remodelación, la homeostasis y la defensa inmunitaria innata en el tejido decidua. Las células linfoides innatas tipo 3 (ILC-3) están presentes en la decidua humana durante el primer trimestre de embarazo¹²⁶.

Vacca et al. identificaron dos subconjuntos de ILC-3: las células similares a las inductoras de tejido linfoide (LTi-*like*) y las ILC-3 NCR+ (receptor de citotoxicidad natural). Las células inductoras de tejido linfoide (LTi) están involucradas en el desarrollo embrionario de órganos linfoides secundarios (SLO). Durante el desarrollo embrionario humano y murino, las células estromales de los SLO derivan de células organizadoras de tejido linfoide (LTo) que son células con una ubicación perivascular y están relacionadas con las MSC. Las células LTo interactúan con las células LTi, que son ILC-3. De forma equivalente a la interacción embrionaria entre LTo y LTi en los SLO para la formación de ganglios linfáticos, tanto las células ILC-3 NCR+ como las células LTi-*like* interactúan con las DSC. Esto aumenta la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 por parte de las DSC^{126,127,128}. Esta regulación positiva puede estar implicada en la remodelación tisular, la placentación y el reclutamiento leucocitario.

Otro factor que contribuye a la interacción entre las DSC y las células inmunitarias es el tejido trofoblástico. Se ha demostrado, en modelo murino, que las células del trofoblasto modulan la proliferación de las células estromales, pero dicha proliferación solo se produce si hay una comunicación intercelular eficaz de las DSC con las uNK y las DC de la decidua¹²⁹.

6. Endometriosis

La **endometriosis** es una enfermedad ginecológica que se caracteriza por la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina, en localizaciones ectópicas. Las propiedades histopatológicas de las lesiones endometrióticas muestran la presencia de tejido endometrial, estromal y glandular. Se asocia a síntomas como el dolor pélvico crónico y la infertilidad. No obstante, existe una gran heterogeneidad entre los pacientes respecto a las manifestaciones fenotípicas de la enfermedad y la gravedad de los síntomas. Afecta, aproximadamente, a una de cada diez mujeres en edad reproductiva en todo el mundo, las cuales ven disminuida considerablemente su calidad de vida. Aunque se ha investigado mucho la endometriosis en estos últimos años, a día de hoy no existe un marcador diagnóstico no invasivo y tampoco un tratamiento curativo^{130,131}.

6.1. Etiopatogenia de la endometriosis

Se han propuesto diversas teorías para explicar el origen de la endometriosis, las cuales se incluyen en dos grupos en función de si el origen de los implantes es el endometrio uterino o extrauterino. Estas teorías podrían no ser excluyentes y estar implicadas en las diferentes manifestaciones de la enfermedad.

6.1.1. Origen a partir de endometrio uterino

Teoría de la menstruación retrógrada. Una de las teorías más aceptadas es la menstruación retrógrada o retroperitoneal, propuesta por *Sampson et al.* en la década de 1920; la cual explica que, durante la menstruación, las células del tejido endometrial se desplazan a través de las trompas de Falopio y se implantan en el tejido y/o en los órganos pélvicos¹³². Esta teoría se consolidó al observar tejido endometrial de procedencia menstrual en la cavidad peritoneal durante la menstruación y también al encontrar un mayor volumen de sangre y tejido endometrial en la pelvis de mujeres con endometriosis^{131,133}. Aunque el aumento del reflujo menstrual puede predisponer a la enfermedad, la prevalencia de menstruación retrógrada en mujeres sanas es del

76-90%, por lo tanto se trata de un evento fisiológico común¹³³. Además, esta teoría no es capaz de explicar la presencia de endometriosis fuera de la cavidad peritoneal (piel, mucosa nasal, pulmones, estómago, intestinos, riñones...), que ocurre en el 10% de los casos; su aparición en la pubertad temprana; en mujeres afectadas por el síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (se caracteriza por un defecto en el desarrollo de los conductos de Müller que forman el útero, las trompas de Falopio y la vagina durante la embriogénesis); y en varones^{134,135,136,137}.

Diseminación hematológica o linfática del tejido endometrial (Teoría de Halban). Esta teoría indica que las células endometriales pueden aparecer en órganos extrapélvicos a través de la diseminación linfática o hematológica. Además, la tendencia del adenocarcinoma endometrial a diseminarse a través de la circulación linfática prueba que las células endometriales pueden ser transportadas por esta vía¹³⁸.

6.1.2. Origen a partir de endometrio extrauterino

Teoría de la metaplasia celómica (Teoría de Meyer). La metaplasia celómica implica la transformación del tejido peritoneal normal en tejido endometrial ectópico, por lo que esta teoría explicaría la presencia de lesiones en el peritoneo. El mesotelio, que se origina en el epitelio celómico que recubre el ovario, posee un importante potencial metaplásico. Puede sufrir invaginación hacia la corteza ovárica y dichas inclusiones mesoteliales tienen la capacidad de transformarse en endometriosis a través de metaplasia^{139,140,141}. Esta teoría podría explicar por qué solo un pequeño porcentaje de las mujeres que presentan menstruación retrógrada tiene endometriosis, así como la presencia de la enfermedad en ausencia de menstruación. No obstante, la ausencia de enfermedad en otros tejidos que derivan del epitelio celómico contradice esta teoría.

Teoría de los restos Müllerianos. Sugiere como origen de la endometriosis la migración de células embrionarias residuales procedentes de los conductos de Müller embrionarios, las cuales pueden diferenciarse dando lugar a las lesiones ectópicas. Según esta teoría, dichas células embrionarias permanecen inactivas hasta la pubertad y, tras la estimulación con estrógenos, empieza el desarrollo de la lesión. Mediante esta teoría se explicaría la aparición de focos de endometriosis en el peritoneo profundo y la bolsa de Douglas; y la endometriosis en varones, ya que los conductos de Wolff también albergan células embrionarias¹⁴⁰.

Teoría del “Homing erróneo” de células madre de médula ósea. Investigaciones recientes proponen a las células progenitoras extrauterinas procedentes de médula ósea como posible origen de la endometriosis. Tendría lugar un “homing erróneo” de los precursores de EnSC relacionados con MSC que desde médula ósea, a través de la sangre, llegan a tejidos peritoneales y extraperitoneales. Esta teoría explicaría los casos de endometriosis fuera de la cavidad peritoneal y los casos de endometriosis en varones. En este contexto patológico, el eje CXCL12/CXCR4 sería determinante al participar en el reclutamiento de MSC en tejidos endometriales, tanto eutópicos como ectópicos. Las células endometriales en tejidos inflamados o lesionados expresan la quimioquina CXCL12, que es ligando del receptor CXCR4 expresado por las células progenitoras. La activación de este eje promovería el reclutamiento de MSC al lugar de la lesión y la angiogénesis^{140,142}.

6.2. Células endometriósicas estromales

Los focos de endometriosis (peritoneales, ováricos y extraperitoneales) contienen tanto **células endometriósicas estromales (eEnSC)** como células epiteliales. La detección de células epiteliales y estromales, procedentes del donante, en el endometrio de mujeres trasplantadas de médula ósea sugiere la existencia de un precursor común que da origen a ambos linajes celulares, tanto epitelial como estromal; o la existencia de dos precursores independientes que se desarrollan en la médula ósea y luego colonizan el endometrio^{142,143}. Estos resultados coinciden con experimentos llevados a cabo en modelo murino, en los que se demuestra que células de médula ósea humana colonizan el endometrio y los focos de endometriosis diferenciándose en células epiteliales y estromales¹⁴⁴. Dadas estas dos posibilidades y en base a las investigaciones realizadas hasta la fecha, parece poco probable que dos precursores independientes de la médula ósea puedan colonizar cada uno de manera errónea un tejido extraperitoneal, para producir focos de endometriosis extraperitoneales. Es más probable que haya un solo precursor que dé origen tanto a células epiteliales como estromales. El hecho de que tanto las MSC como las eEnSC puedan diferenciarse en células epiteliales respalda la existencia de un solo precursor, relacionado con las MSC y las eEnSC¹⁴⁵. Este precursor puede colonizar el endometrio en condiciones normales, donde se diferencia en células epiteliales y estromales. En el caso de la endometriosis, el precursor puede formar los focos (tanto peritoneales como extraperitoneales), diferenciándose también en células epiteliales y estromales.

6.3. Factores que intervienen en el establecimiento de la enfermedad

Aunque las teorías mencionadas anteriormente pueden explicar la aparición de células endometriales en la cavidad peritoneal o en otras localizaciones, el desarrollo de los implantes de endometriosis es consecuencia de su adhesión al epitelio e invasión; de la evasión de la eliminación por parte del sistema inmunitario; y del desarrollo de neovascularización, que permite el crecimiento de los implantes. Para que se den estas condiciones deben intervenir factores genéticos, epigenéticos, inmunitarios, endocrinos y ambientales, que hacen que la endometriosis sea una enfermedad multifactorial.

6.3.1. Predisposición genética

La endometriosis es una enfermedad con un importante componente hereditario. Se ha demostrado que es significativamente más frecuente en mujeres que tienen una familiar de primer grado afectada¹⁴⁶. Además, en un estudio llevado a cabo con 16 parejas de gemelas monocigóticas, se observó una concurrencia del 87%¹⁴⁷.

Aunque la base genética de la enfermedad no se conoce completamente, se han identificado diversos genes implicados en el inicio y progresión de la endometriosis; por ejemplo, genes relacionados con la regulación del ciclo celular, moléculas de adhesión, respuesta inflamatoria, factores de crecimiento y receptores hormonales. Los factores genéticos contribuyen a la enfermedad a través de la inestabilidad de microsatélites, inestabilidad cromosómica, polimorfismo de un solo nucleótido, mutaciones génicas, pérdida de heterocigosidad y/o mutaciones del ADN mitocondrial¹³⁴. Además, teniendo en cuenta que en el endometrio hay un elevado grado de recambio celular, aumentan las probabilidades de la aparición de errores en la recombinación genética.

La inestabilidad de microsatélites y la alteración de los genes de reparación del ADN (MMR) son características de las células cancerosas. La expresión de MMR se incrementa en el cáncer de ovario, aunque en la endometriosis disminuye. Hay estudios que sugieren que las anomalías en MMR pueden llevar a la transformación maligna de las lesiones de endometriosis¹³⁴.

La inestabilidad cromosómica es otro factor importante que implica la alteración maligna de una célula con un número de copias cromosómicas anormal. La reducción del número de copias del cromosoma 1p, 22q y X, así como el aumento del número de copias del cromosoma 6p, 20q y 17q se relacionan con el desarrollo de la endometriosis^{134,148}. Diferentes estudios de asociación de genoma completo han demostrado que la expresión de las regiones cromosómicas 10q26 y 7p15.2 se relaciona con una mayor susceptibilidad a desarrollar la enfermedad^{149,150}.

Un estudio reciente aporta nuevos datos sobre la implicación de químicos disruptores endocrinos (EDC), como parabenos y benzofenonas, en la patogénesis y fisiopatología de la endometriosis. La exposición de las mujeres a estos compuestos se asocia con un perfil alterado de la expresión de genes relacionados con vías de señalización celular determinantes para el desarrollo de la enfermedad; tales como la adhesión celular, la invasión, la migración, la inflamación, la angiogénesis, la proliferación celular y la estimulación hormonal. Teniendo en cuenta que el microambiente inflamatorio complejo que caracteriza a la endometriosis favorece los procesos de adhesión, invasión y proliferación de las células endometrióticas, así como la vascularización, se ha descrito que la exposición a EDC puede contribuir a la generación de inflamación en el tejido ectópico, mediante la regulación positiva de genes como *IL1RL1*, *IL6ST*, *TNFRSF1B* y *NR3C1*¹⁵¹.

6.3.1.1. Apoptosis

Un proceso implicado en el mantenimiento de la homeostasis y el recambio celular en el endometrio es la muerte celular programada o apoptosis. La apoptosis se caracteriza por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos, tales como la reducción del volumen celular y nuclear debido a la condensación del citoplasma y la cromatina. Una de las características más importantes de la apoptosis es la fragmentación oligonucleosomal del ADN en fragmentos de 180-200 pb, o múltiplos de estos, por la acción de las endonucleasas. Además, muchas proteínas celulares sufren proteólisis catalizada por caspasas. Simultáneamente, tiene lugar la dilatación del retículo endoplasmático dando lugar a la formación de vesículas. Finalmente, la célula se fragmenta en cuerpos apoptóticos que son fagocitados por macrófagos y otras células para ser eliminados; de esta manera se evita la liberación del material intracelular y su exposición al sistema inmunitario, lo cual provocaría que se desencadenara una respuesta inflamatoria¹⁵².

Los niveles de las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas varían permitiendo el control del proceso de muerte celular programada, pero los defectos en la regulación de la apoptosis dan lugar a numerosos procesos patológicos. Las investigaciones recientes han demostrado que cuando el tejido endometrial se sitúa en localizaciones ectópicas, se diferencia del tejido endometrial eutéptico en la expresión de algunos marcadores de apoptosis. La menor sensibilidad de las células endometrióticas a la apoptosis puede promover la diseminación e implantación de estas células en sitios ectópicos¹⁵³. Esta resistencia a la apoptosis se debe, en parte, a la sobreexpresión del gen antiapoptótico Bcl-2¹⁵⁴. También se ha encontrado una expresión alterada del ligando de muerte FasL, secretado por células endometriales o inmunitarias; de manera que el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis moderada o grave contiene altas concentraciones

de FasL soluble, en comparación con las mujeres con endometriosis leve o sin endometriosis. Esto contribuye a la mayor eliminación de las células inmunitarias que expresen Fas en su membrana, permitiendo así la supervivencia de las células endometrióticas en la localización ectópica¹⁵⁵.

6.3.2. Papel de la epigenética

Los cambios epigenéticos son alteraciones hereditarias de la expresión genética, sin ninguna variación en las secuencias de ADN, que controlan el desarrollo y la diferenciación celular. Las alteraciones epigenéticas también se observan en la endometriosis y tienen un papel clave en la regulación de la expresión génica a través de modificaciones postraduccionales de las histonas (histonas metiltransferasas, histonas acetiltransferasas e histonas deacetilasas), metilación del ADN, silenciamiento de microARN, ARN no codificante, ARN no codificante largo intergénico y reparación del ADN.

Investigaciones recientes identificaron varios genes que están hipoacetilados en la endometriosis; por ejemplo, el gen que codifica para ER- α ; el factor de transcripción homeobox A10 (HOXA10); la proteína de unión al enhancer CCAAT alfa (C/EBP- α); las proteínas reguladoras del ciclo celular p16 (CDKN2A), p21 (CDKN1A) y p27 (CDKN1B); la proteína reguladora de puntos de control del ciclo celular y la apoptosis CHEK2; el receptor de muerte celular 6 (DR6) y la E-cadherina¹⁵⁶.

También se ha comprobado que la hipermetilación del ADN en la endometriosis afecta a la expresión de genes implicados en la capacidad de respuesta a la progesterona y el proceso de decidualización. Entre los genes afectados se encuentran el gen que codifica para el PR-B, HOXA10, IGFBP-1, factor esteroideogénico 1 (NR5A1) y aromatasa (CYP19A1)¹⁵⁷.

La hipermetilación del promotor específico de PR-B se considera una causa para el desarrollo de la resistencia a la P4 que caracteriza a la endometriosis. Por otra parte, se ha demostrado que los niveles de expresión del ER- α en las células del endometrio ectópico son más bajos que los del endometrio eutópico; mientras que el ER- β se sobreexpresa en las células endometrióticas en comparación con las células endometriales eutópicas. La metilación deficiente del promotor de ER- β da como resultado su sobreexpresión patológica en las células endometrióticas. El aumento de la proporción ER- β /ER- α en la endometriosis, al comparar con el tejido endometrial sano, se asocia a la supresión del PR, lo que contribuye a la resistencia a la P4^{158,159}.

6.3.3. Factores endocrinos

La endometriosis es una enfermedad dependiente de estrógenos. El estradiol es el estrógeno biológicamente activo y se produce en los ovarios y en otros tejidos periféricos, gracias a la aromatización de los andrógenos ováricos y suprarrenales. En todos estos sitios, la expresión de la enzima aromatasa es esencial para la producción de estradiol. El propio tejido endometriótico también es capaz de sintetizar estradiol al expresar aromatasa, que convierte la androstenediona en estrona; y la 17- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1, que convierte la estrona en estradiol. De esta manera, los estrógenos locales producidos por el tejido endometriótico ejercen un efecto autocrino sobre el mismo tejido¹⁵⁹. Además, el ambiente estrogénico también se favorece por un déficit de la enzima 17- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2, que desactiva los estrógenos al convertir el estradiol en estrona¹⁶⁰.

El tejido endometrial eutópico no expresa aromatasa, pero sí produce 17- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 en respuesta a la P4. Por este motivo, la P4 durante la fase secretora estimula la inactivación del estradiol mediante su conversión a estrona. No obstante, a diferencia del tejido eutópico, el tejido endometriósico es resistente a la acción de la P4, por lo que se impide la atenuación del estímulo estrogénico¹⁶⁰.

Una mayor comprensión de los mecanismos genéticos, epigenéticos, moleculares y celulares implicados en la etiología y fisiopatología de la endometriosis conducirá a mejores métodos de diagnóstico y tratamientos más específicos.

6.4. El microambiente inmunitario de la lesión endometriósica

La incapacidad del sistema inmunitario de eliminar tejido endometrial ectópico puede provocar a lo largo del tiempo una disregulación inmunitaria. No obstante, no está claro si esa disregulación es causa o consecuencia de la endometriosis. De ahí la necesidad de poder dilucidar cuáles son los mecanismos que explican el fracaso de la eliminación de las células endometriales en los focos ectópicos o endometriomas¹³⁰.

La lesión endometriósica se establece en un microambiente complejo y dinámico en el que intervienen factores inflamatorios, angiogénicos y endocrinos. Además, el perfil transcriptómico de las células endometriales ectópicas (eEnSC), en comparación con el de las células endometriales eutópicas de pacientes y de donantes sanas, muestra una expresión elevada de genes asociados con el reclutamiento de células inmunitarias, la interacción entre citoquinas y sus receptores, la adhesión celular y la apoptosis. Estos datos corroboran la existencia de la disregulación inmunitaria que a menudo se observa en el líquido peritoneal de las pacientes¹⁶¹. En relación a ello, *Suryawanshi et al.* mostraron que el perfil inflamatorio de la lesión endometriósica se asemeja al de un tumor y esto es particularmente importante, ya que la lesión ectópica puede ser precursora de algunos tumores endometrioides y ováricos¹⁶².

Entre las poblaciones de células inmunitarias innatas implicadas en la fisiopatología de la endometriosis destacan los neutrófilos, los macrófagos, las células NK y las DC. En cuanto a los componentes del sistema inmunitario adaptativo, destaca la inmunidad celular mediada por linfocitos T y la inmunidad humoral mediada por linfocitos B productores de anticuerpos¹³⁰.

6.4.1. El sistema inmunitario innato en la endometriosis

La elevada concentración de IL-8, un quimioatrayente de **neutrófilos**, en el líquido peritoneal de las pacientes de endometriosis conlleva un aumento de la infiltración de estas células en el peritoneo, en comparación con mujeres sanas^{163,164,165}. Además, probablemente los neutrófilos tengan una función importante en los primeros estadios del desarrollo de la lesión, ya que se ha demostrado, en un modelo murino de endometriosis, que tiene lugar una infiltración máxima de neutrófilos en el tejido endometrial ectópico durante una etapa temprana de formación de la lesión (días 1 a 5), mientras que posteriormente (días 6 y 7) disminuye el número total de estas células. Además, este estudio demostró que los neutrófilos promueven la angiogénesis en la etapa temprana mediante la secreción de VEGF¹⁶⁶. En el foco inflamatorio, el reclutamiento de neutrófilos también se ve favorecido por la presencia de quimioquinas secretadas por macrófagos y mastocitos, dos poblaciones celulares que están aumentadas en la lesión endometriósica^{167,168} (**Ilustración 10**).

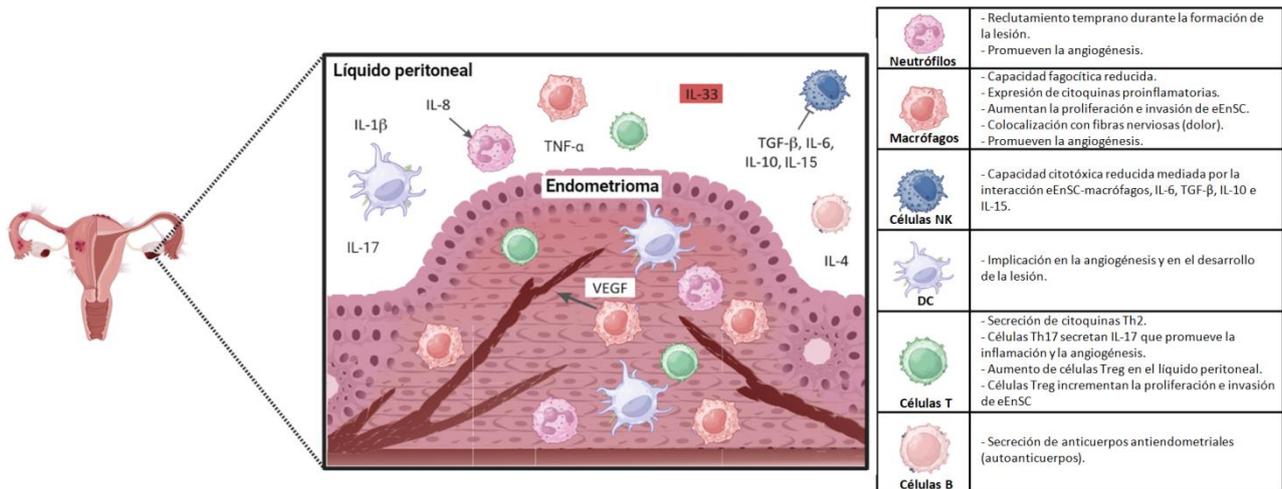


Ilustración 10. Representación esquemática del microambiente inmunitario en la lesión de endometriosis. Adaptado de Symons et al.¹³⁰

En cuanto a los **macrófagos**, el número total de estas células se encuentra elevado en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis, aunque son más abundantes en el tejido ectópico^{167,169}. El reclutamiento de estas células no es solamente un evento temprano en el desarrollo del foco ectópico, sino un hecho necesario para el establecimiento de la lesión, por lo que la comunicación entre las eEnSC y los macrófagos es determinante. Tras el aislamiento de macrófagos de pacientes, se ha demostrado que presentan una capacidad fagocítica reducida, asociada a una menor expresión del receptor “scavenger” CD36; esta es una molécula capaz de reconocer y captar lipoproteínas modificadas, patógenos, neutrófilos apoptóticos y actuar como correceptor de los receptores “Toll-like” (TLR) para que tenga lugar una respuesta inflamatoria eficiente¹⁷⁰. Al comparar con mujeres sanas, los macrófagos peritoneales también presentan una mayor activación de NF- κ B y una mayor secreción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, CCL3 y CXCL2^{166,171,172}. El crecimiento del endometrioma se puede ver favorecido por la presencia de macrófagos, ya que se ha demostrado que el cocultivo de macrófagos con eEnSC aumenta la proliferación y la capacidad invasiva de estas células¹⁷³. Otra función de los macrófagos está relacionada con la generación del dolor que experimentan las mujeres con endometriosis, ya que se ha comprobado que en las lesiones ectópicas hay un elevado número de macrófagos que colocalizan e interaccionan con fibras nerviosas¹⁷⁴. Además, al igual que los neutrófilos, los macrófagos promueven la angiogénesis en la etapa temprana de formación de la lesión, mediante la secreción de VEGF¹⁶⁶.

La plasticidad celular para adquirir un fenotipo proinflamatorio (M1) o un fenotipo antiinflamatorio (M2) es una propiedad que caracteriza a los macrófagos. *Bacci et al.* demostraron que los macrófagos M2 son más abundantes en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis. Además, la transferencia intraperitoneal de estos, en modelo murino, facilitó el crecimiento de las lesiones y la neovascularización¹⁶⁷. No obstante, dada la complejidad del microambiente inflamatorio en las lesiones de endometriosis, probablemente la polarización de los macrófagos cambie según el estadio de la enfermedad o la localización de estos¹³⁰. Una posibilidad es que los macrófagos M1 contribuyan al entorno inflamatorio, mientras que los macrófagos M2 favorezcan la angiogénesis que caracteriza a la enfermedad¹⁷⁵ (**Ilustración 10**).

Otras células inmunitarias innatas implicadas en la patología son las **células NK**. El entorno peritoneal suprime la actividad citotóxica de dichas células, las cuales muestran una expresión aberrante de algunos receptores activadores e inhibidores, al comparar con mujeres sanas. Por ejemplo, en mujeres con endometriosis se observó, tanto en líquido peritoneal como en sangre periférica, un incremento de la expresión de los receptores inhibidores de NK (KIR), que reconocen el HLA-C en las células diana e inhiben la activación de las células NK, estableciendo así un mecanismo de tolerancia¹⁷⁶. Además, se ha descubierto que en el fluido del peritoneo de las pacientes se incrementa la concentración de las moléculas de histocompatibilidad no clásicas MICA y MICB, que son ligandos solubles del receptor tipo lectina NKGD2 en células NK. El aumento de las formas solubles de MICA y MICB en el líquido peritoneal implica una menor expresión de estos ligandos en la superficie de las células endometriales ectópicas, lo que conduce a una mayor evasión del reconocimiento de las células NK y a la inhibición de su citotoxicidad¹⁷⁷. La actividad citotóxica de las células NK también se ve disminuida por la presencia de algunas citoquinas y quimioquinas, como IL-6 y TGF- β 1 en el líquido peritoneal; IL-15 secretada por las eEnSC; e IL-10 y TGF- β como producto de la interacción entre eEnSC y macrófagos^{178,179,180,181} (**Ilustración 10**).

Por lo que respecta a las **DC**, estas están implicadas en la angiogénesis y en el desarrollo de la lesión. Hay estudios que demuestran que las DC CD1a+ (inmaduras) están presentes en el interior de la lesión ectópica y en el fluido peritoneal, aunque la presencia de DC CD83+ (maduras) es muy baja. Ambas poblaciones celulares no se detectan en el peritoneo de mujeres sanas. Estos datos sugieren que las eEnSC o los factores presentes en el fluido peritoneal de las mujeres enfermas reclutan DC CD1a+ para iniciar la captación y posterior eliminación de antígenos ectópicos extraños¹⁸². Las DC BDCA-1+/CD206+ son capaces de fagocitar restos celulares procedentes de las eEnSC y contribuyen al incremento de la inflamación, mediante la secreción de IL-1 β e IL-6¹⁸³ (**Ilustración 10**).

Otros mediadores de la inmunidad innata son los patrones moleculares asociados a daño (DAMP), moléculas endógenas estimuladoras del sistema inmunitario que se liberan como respuesta a una lesión o inflamación tisular¹³⁰. Una de estas moléculas, que tienen un papel activo en la progresión de la endometriosis, es la IL-33. Se observan concentraciones elevadas de IL-33 en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis infiltrante profunda, en comparación con mujeres sanas. Además, las lesiones ectópicas en un estadio avanzado de la enfermedad también expresan altos niveles de IL-33, así como de su receptor ST2 (supresor de tumorigenicidad 2). Esto es indicativo de que las eEnSC contribuyen a la producción de IL-33 pero también responden a este factor presente en el microambiente¹⁸⁴ (**Ilustración 10**).

6.4.2. El sistema inmunitario adaptativo en la endometriosis

En cuanto a los mecanismos de inmunidad adaptativa, la endometriosis se caracteriza por la baja actividad de los linfocitos T citotóxicos, la regulación de la expresión de citoquinas por los linfocitos Treg y la producción de autoanticuerpos por los linfocitos B¹⁸⁵.

Los estudios que evaluaron los linfocitos T en pacientes con endometriosis mostraron una mayor proporción de células CD4+ que de células CD8+ en el líquido peritoneal; aunque la concentración de ambas poblaciones celulares se incrementa, en comparación con mujeres sanas. Las lesiones ectópicas también contienen linfocitos T, pero la proporción de células CD4+/CD8+ es equivalente^{185,186}.

En el contexto de la endometriosis predomina una respuesta inmunitaria **Th2** y, por lo tanto, las citoquinas secretadas por estas células, como la IL-4 y la IL-10, en el líquido peritoneal de las pacientes^{187,188} (**Ilustración 10**).

La proporción de linfocitos **Th17** en el líquido peritoneal de las mujeres enfermas aumenta con respecto a las mujeres sanas, de manera que también se incrementan los niveles de la principal citoquina secretada por estas células, la IL-17. Esta molécula contribuye a la fisiopatología de la endometriosis al estimular la producción de citoquinas que inducen angiogénesis e inflamación crónica, para el establecimiento y mantenimiento de las lesiones^{130,189}. Se ha descubierto que a medida que progresa la enfermedad, el porcentaje de linfocitos Th17 en el peritoneo aumenta¹⁹⁰ (**Ilustración 10**).

Los linfocitos **Treg** tienen una función supresora en el sitio de desarrollo de la lesión. El número de células Treg CD4+/CD25+/Foxp3+ es elevado en el líquido peritoneal de las mujeres enfermas, en comparación con mujeres sanas; además, también están presentes en el endometrioma^{191,192}. Se ha demostrado que los macrófagos y las eEnSC secretan la quimioquina CCL25, la cual estimula la diferenciación de linfocitos Treg y la producción de IL-10 y TGF- β ¹⁹³. A su vez, estas citoquinas estimulan la proliferación e invasión de las eEnSC, al regular positivamente la expresión de las metaloproteinasas de la matriz extracelular 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9), lo que lleva al crecimiento de la lesión y la progresión de la endometriosis¹⁹⁴ (**Ilustración 10**).

Finalmente, los **linfocitos B** contribuyen a la patogénesis de la endometriosis mediante la generación de anticuerpos antiendometriales (**autoanticuerpos IgG e IgA**) que están presentes en el suero y el líquido peritoneal de las pacientes^{195,196}. Además, las células B contribuyen a la producción local y sistémica de citoquinas, como IL-6, GM-CSF e IL-17, de manera que participan en la generación del microambiente inflamatorio^{165,189,197} (**Ilustración 10**).

Los estudios realizados hasta el momento proporcionan información sobre la implicación del sistema inmunitario en la patogénesis de la enfermedad (**Ilustración 11**). No obstante, sigue siendo necesario dilucidar la composición exacta del microambiente inmunitario en la lesión endometriósica y su relación con las diferentes etapas y síntomas asociados a la endometriosis; así como comprender las alteraciones de las propiedades funcionales de las células inmunitarias innatas y adaptativas dentro de las lesiones y cómo esto contribuye a que el sistema inmunitario no elimine el tejido endometrial en localizaciones ectópicas¹³⁰.

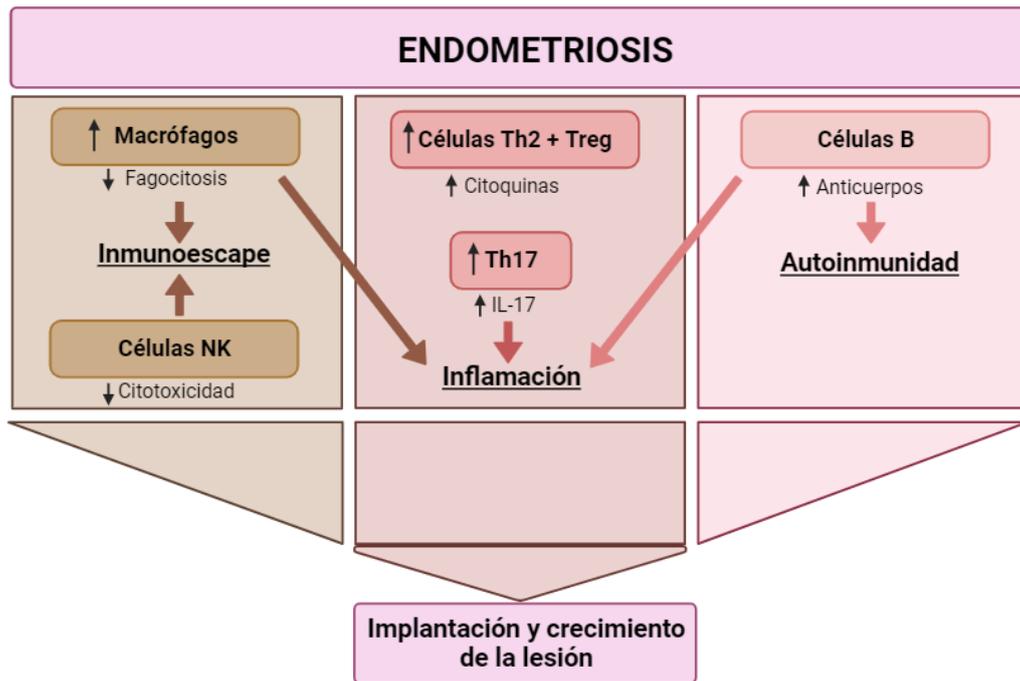


Ilustración 11. Respuestas inmunitarias en la endometriosis. *Adaptado de Riccio et al.*¹⁸⁵

 **HIPÓTESIS** 

Las propiedades inmunoregulatoras de las MSC hacen que la investigación sobre estas células sea un recurso prometedor para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes¹⁹⁸. De ahí radica la necesidad de encontrar una fuente de células con las características de las MSC que sea fácil de obtener y que no implique procedimientos invasivos. En relación a ello, en esta tesis se han investigado dos tipos celulares que se encuentran en tejidos adultos, concretamente, las EnSC y las DSC. Tomamos como base que investigaciones previas sugerían que tanto las EnSC en el endometrio no gestante, como las DSC en el endometrio gestante se encuentran relacionadas con las MSC y con células perivasculares^{79,101,102,199,200,201,202,203}. Además, el estudio y caracterización de las células estromales uterinas en condiciones sanas es necesario para poder entender mejor la inmunopatología de enfermedades ginecológicas, como la endometriosis²⁰⁴.

Por todo lo expuesto anteriormente, proponemos las siguientes hipótesis:

1. Las células precursoras de las DSC (preDSC) constituyen el nicho perivascular de las MSC en la decidua humana.
2. La decidualización de las DSC (dDSC) produce cambios en sus características fenotípicas y funcionales que favorecen el perfil inmunomodulador de estas células.
3. Aunque las DSC y las EnSC son el mismo tipo de célula, el hecho de que cada una de ellas se encuentre en un contexto fisiológico diferente (decidua y endometrio no gestante, respectivamente) determina diferencias fenotípicas y funcionales entre ambos tipos celulares.
4. Las eEnSC presentan cambios en su fenotipo y funciones respecto a las EnSC, que están relacionados con la inmunopatología de la enfermedad.



OBJETIVOS



Objetivo general

Esta tesis doctoral tiene como objetivo general estudiar el origen, la diferenciación y las derivaciones patológicas de las células estromales uterinas. Para ello, analizaremos las características fenotípicas y funcionales de las células estromales uterinas humanas procedentes del endometrio no gestante, del endometrio gestante o decidua y del endometrioma ovárico, y su comparación con las MSC.

Objetivos específicos

1. Estudio de las propiedades de MSC y pericitos en precursores de las DSC (preDSC).
2. Análisis del efecto del proceso de decidualización en el fenotipo antigénico y en las propiedades inmunoregulatoras de las DSC.
3. Estudio comparativo del fenotipo antigénico y de las funciones de DSC y EnSC.
4. Comparación del fenotipo antigénico y de las funciones de EnSC y eEnSC, para esclarecer la inmunopatología de la endometriosis.



MATERIAL Y MÉTODOS



1. Cultivos celulares

1.1. Células endometriales estromales procedentes de sangre menstrual

1.1.1. Obtención y cultivo de EnSC

Las muestras de sangre menstrual se obtuvieron de 10 donantes voluntarias sanas, de un rango de edad comprendido entre 20 y 35 años. Las donantes no padecían ningún trastorno ginecológico ni autoinmune y no estaban recibiendo tratamiento hormonal anticonceptivo. Las muestras se obtuvieron previo consentimiento informado de todas las donantes que participaron en el estudio. Se ha elegido la sangre menstrual como fuente de células endometriales sanas porque se sigue un procedimiento sencillo, no invasivo y se puede disponer fácilmente de un número elevado de donantes.

En todos los casos, la muestra se recogió el primer o segundo día de la fase menstrual, empleando tampones o copa menstrual. Este es un momento óptimo para obtener un mayor volumen de sangre.

Se recogieron, aproximadamente, de 2 a 5 mL de sangre menstrual que se vertieron en frascos de polipropileno estériles para la recogida de muestras clínicas (150 mL). La sangre se diluyó en proporción 1:2 con tampón fosfato salino (PBS) estéril (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, EEUU) hasta obtener una mezcla más fluida y homogénea. Dicha mezcla se sometió a un gradiente de densidad con Ficoll-Paque (*Merck KGaA*, Darmstadt, Alemania) a razón de 4 mL de reactivo por cada 10 mL de sangre diluida. Tras una centrifugación a 2200 rpm (20 min a 20 °C), se recogió la interfase, donde se encuentran las EnSC, y se centrifugó en PBS (*Thermo Fisher Scientific*) a 1500 rpm (5 min a 20 °C). El *pellet* de células obtenido se resuspendió en medio de cultivo Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) suplementado con un 3% de suero bovino fetal (FBS) descomplementado, 100 U/mL de penicilina/estreptomicina y 0,25 µg/mL de anfotericina B (todo de *Thermo Fisher Scientific*). Las células se sembraron en un frasco de cultivo de 25 cm² de superficie y se mantuvieron durante 24 horas a 37 °C, permitiendo así su adherencia al frasco. Transcurrido este tiempo, se realizó un lavado con PBS (*Thermo Fisher Scientific*) para retirar las células que quedan en suspensión.

Las EnSC en cultivo se mantuvieron realizando cambios de medio cada 2 o 4 días, en función de la confluencia, hasta llegar a una confluencia del 80% aproximadamente. En ese momento, se realizó un pase o subcultivo utilizando Tripsina-EDTA 1x (*Merck KGaA*) y las células se transfirieron a un frasco de cultivo de 75 cm² de superficie, donde se mantuvieron de forma rutinaria.

Los cultivos celulares permanecieron a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5% de dióxido de carbono (CO₂) con cambios de medio cada 2-3 días y tripsinizaciones al alcanzar una confluencia del 80%. Todos los experimentos se realizaron usando EnSC con un bajo número de pases (P2-P6) para asegurar la conservación de su fenotipo original.

Para confirmar la pureza de cada línea obtenida, se realizaron estudios, mediante citometría de flujo, de la coexpresión de los marcadores CD10/CD29, CD44/CD29 y CD73/CD29 (90-100% de células positivas) y la ausencia de los marcadores CD45 (identifica leucocitos), CD31 (identifica

células endoteliales) y citoqueratina (identifica células epiteliales). El cultivo en un medio con un bajo contenido en suero (3% de FBS) permite que las células presenten un fenotipo antigénico estable y actividades funcionales durante 8-12 semanas (hasta 5-6 pases)⁹⁹.

1.2. Células deciduales estromales

1.2.1. Obtención y cultivo de DSC

Durante toda la investigación se trabajó con DSC que habían sido previamente congeladas. Estas células fueron obtenidas anteriormente por otros miembros del grupo de investigación, a partir de muestras de decidua, procedentes de interrupciones voluntarias de embarazos del primer trimestre (6-11 semanas de gestación) de mujeres sanas, con un rango de edad comprendido entre 20 y 30 años. Fueron excluidas las mujeres que estuvieran recibiendo tratamiento farmacológico o que presentaran alguna infección o enfermedad autoinmune. Las muestras fueron obtenidas vía vaginal, por legrado, en la Clínica El Sur (Málaga, España) y en la Clínica Ginegranada (Granada, España). Se obtuvo el consentimiento informado de cada donante y el estudio fue autorizado por el comité ético del Hospital Universitario San Cecilio en Granada.

Con anterioridad a la presente investigación, los tejidos deciduales fueron examinados y procesados según el protocolo descrito por *Kimatrai et al., 2003*¹⁰². La pureza de las células deciduales había sido confirmada, mediante citometría de flujo, por la detección de la coexpresión de los marcadores CD10/CD29, CD44/CD29 y CD73/CD29 (90-100% de células positivas) y la ausencia de CD45, CD31 y citoqueratina. Posteriormente, las diferentes líneas de DSC fueron congeladas y mantenidas a -196 °C en nitrógeno líquido, hasta su uso.

Para nuestra investigación se descongelaron 10 líneas de DSC. Tras una centrifugación a 1500 rpm (5 min a 20 °C), el *pellet* de células se resuspendió en medio de cultivo Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) completo, con un 3% de FBS (*Thermo Fisher Scientific*), y las células se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm² de superficie. Se mantuvieron durante 24 horas a 37 °C, permitiendo su adherencia al plástico. A continuación, se realizó un lavado con PBS (*Thermo Fisher Scientific*) para retirar las células que no se habían adherido. El medio Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) se cambió cada 2 días hasta llegar a una confluencia del 80%, aproximadamente. Posteriormente, se realizó un pase o subcultivo mediante tripsinización y las DSC se transfirieron a un frasco de cultivo de 75 cm² de superficie, donde se mantuvieron de forma rutinaria. Las DSC en cultivo permanecieron a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂, con cambios de medio cada 2 días y tripsinizaciones al alcanzar una confluencia del 80%. Todos los experimentos se realizaron usando DSC con pocos pases (P2-P6).

Los clones de preDSC se obtuvieron por el método de dilución limitante en placas de 96 pocillos, empleando medio Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) completo suplementado con un 10% de FBS (*Thermo Fisher Scientific*). Tres días después de la siembra, se revisaron las placas mediante observación por microscopía óptica y se seleccionaron los pocillos que contenían una única célula. Después de dos semanas, estas células formaron colonias que fueron tripsinizadas y sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos con medio Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) completo suplementado con un 3% de FBS (*Thermo Fisher Scientific*). Los clones se expandieron y se realizaron los correspondientes estudios morfológicos, fenotípicos y funcionales.

1.2.1.1. Eficiencia clonogénica

Para estudiar la eficiencia en la formación de colonias de las líneas de preDSC, se sembraron 100 preDSC/cm² en placas de 6 pocillos con 2 mL de medio de cultivo Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) completo, con un 3% de FBS (*Thermo Fisher Scientific*). Las placas permanecieron a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ durante 15 días. Las colonias fueron observadas diariamente mediante microscopía óptica. Posteriormente, las colonias fueron teñidas con cristal violeta (*Merck KGaA*) al 0,1% durante 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se realizaron 2-3 lavados con agua destilada. Finalmente, se llevó a cabo un recuento de colonias, contando únicamente aquellas con más de 50 células, y se calculó la eficiencia clonogénica con la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia clonogénica (\%)} = \frac{\text{Número de colonias contadas}}{\text{Número de células sembradas}}$$

1.2.1.2. Diferenciación mesenquimal

En primer lugar, para la diferenciación osteogénica, se sembró un número de preDSC suficiente para llegar a una confluencia del 80-90% en 24 horas. El medio empleado en el cultivo fue Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) completo, con un 3% de FBS (*Thermo Fisher Scientific*). Las células se mantuvieron durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂, permitiendo así su adherencia, y después se lavaron con PBS (*Thermo Fisher Scientific*). Seguidamente, se añadió el medio de cultivo necesario para la diferenciación a osteoblastos. Para ello, el medio Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) completo se suplementó con ácido ascórbico 10 nM, β-glicerolfosfato 10 nM y dexametasona 100 nM (todo de *Merck KGaA*). Las células fueron incubadas con este medio a 37 °C y un 5% de CO₂. El medio consumido se cambió cada 3 días por medio fresco, necesario para la diferenciación. El proceso de diferenciación osteogénica se completó en 21-28 días y fue verificado por la formación de osteoblastos con morfología alargada y con una disposición muy compacta. Además, la matriz mineralizada se detectó mediante tinción con alizarina (*Merck KGaA*).

En segundo lugar, para la diferenciación adipogénica, las preDSC se sembraron en placas de cultivo con medio Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) completo, suplementado con un 5% de FBS (*Thermo Fisher Scientific*), y se incubaron a 37 °C y un 5% de CO₂. Tras llegar a una confluencia del 80-90%, se indujo la diferenciación cultivando las células en medio Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) completo al que se añadió 3-isobutil-1-metilxantina 100 μM, dexametasona 1 μM, indometacina 100 μM (todo de *Merck KGaA*) y 10 μg/mL de insulina (*Novo Nordisk*, Bagsvaerd, Dinamarca). La diferenciación se completó en 15 días y se verificó por la visualización de gotas lipídicas teñidas con solución Oil Red O (*Merck KGaA*).

En tercer lugar, para la diferenciación condrogénica, las células deben ser cultivadas en tubos Eppendorf de polipropileno, ya que se diferencian produciendo agregados. El medio empleado en este caso fue Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) sin FBS y suplementado con 10 ng/mL de TGF-β1 (*Merck KGaA*). En primer lugar, colonias de preDSC fueron tripsinizadas y se realizó un recuento. Se centrifugaron alícuotas de 2 x 10⁵ células en 1 mL de medio en tubos de polipropileno cónicos. El *pellet* de células se incubó a 37 °C y un 5% de CO₂ durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se observó que las células formaron un agregado que no se adhirió a las paredes del tubo de polipropileno. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días y los

agregados se obtuvieron durante intervalos de tiempo de hasta 21 días. Para poder detectar proteoglicanos, se tiñeron, con una solución de safranina O (*Merck KGaA*), secciones congeladas de 4 µm de grosor de los agregados obtenidos.

1.2.1.3. Ensayo de contracción del gel de colágeno

Estos ensayos se llevaron a cabo tal y como se ha descrito en investigaciones previas^{102,205}. En primer lugar, se preparó una solución estéril de colágeno dérmico bovino purificado y solubilizado con pepsina, siguiendo las instrucciones del fabricante (*Vitrogen, Cohesion Technologies Inc.*, Palo Alto, California, EEUU). A la solución de colágeno se añadieron 25×10^4 preDSC. A continuación, la mezcla de colágeno y células se colocó en placas de cultivo (100 µL/pocillo) para la polimerización durante 30 min a 37 °C. Seguidamente, a cada pocillo se añadieron 2 mL de medio Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) completo, con un 3% de FBS (*Thermo Fisher Scientific*). Al medio se añadieron diferentes concentraciones de la citoquina TNF (10, 25 y 50 ng/mL), de la citoquina IL-10 (0,1, 1, 10 y 50 ng/mL) o de P4 (30, 75, 150 y 300 ng/mL) (todo de *Merck KGaA*). Se reservaron otros pocillos como control (sin tratamiento). Tras una incubación de 24 horas, se midió la altura (h) y el diámetro (d) de cada gel con el micrómetro de un microscopio y se calculó el volumen del gel con la siguiente fórmula: $V = 1/6 \times \pi \times h \times (3d^2 + h^2)$. Se realizaron 3 medidas por muestra para calcular una media que permitiera estimar el volumen del gel. Los datos se representan como una variación porcentual en volumen del gel de colágeno en las preDSC cultivadas con citoquinas o con P4, en comparación con las preDSC cultivadas en ausencia de estas, empleando para el cálculo la siguiente fórmula:

$$\text{Variación del volumen del gel} = \frac{(\text{volumen con preDSC tratadas} - \text{volumen con preDSC no tratadas})}{\text{volumen con preDSC no tratadas}} \times 100$$

1.3. Células procedentes de quiste de endometriosis

1.3.1. Obtención y cultivo de eEnSC

Las muestras de endometriosis proceden de endometriomas ováricos (“quiste de chocolate”) y fueron obtenidas mediante laparoscopia realizada en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Materno Infantil Virgen de las Nieves (Granada, España) y en el Hospital Universitario Ruber Juan Bravo (Madrid, España). Durante este estudio se recibieron 10 muestras que procedían de mujeres en edad reproductiva que no habían recibido terapia hormonal en los tres meses anteriores. Además, no se incluyeron en el estudio mujeres que presentaran otras patologías endometriales u hormonales. Las muestras se obtuvieron previo consentimiento informado de todas las donantes.

En todos los casos, el diagnóstico de endometriosis fue intraoperatorio y se confirmó, posteriormente, mediante el estudio histológico de la muestra. Según la clasificación establecida por la *Sociedad Americana de Medicina Reproductiva*, todas las donantes presentaban endometriosis de moderada a grave (estadios III-IV de la enfermedad).

Se ha escogido el quiste de chocolate como fuente de células endometriósicas porque es la forma más frecuente de presentación de la enfermedad y supone una forma de menstruación intraquística.

Para el procesamiento de cada muestra, se trabajó con el contenido interno del endometrioma ovárico o “chocolate” que se diluyó en PBS (*Thermo Fisher Scientific*). A continuación, la preparación se centrifugó a 2200 rpm (20 min a 20 °C) sobre Ficoll-Paque (*Merck KGaA*). Transcurrido este tiempo, se recogió la interfase, donde se encuentran las eEnSC, y se centrifugó en PBS (*Thermo Fisher Scientific*) a 1500 rpm (5 min a 20 °C). El *pellet* de células obtenido se resuspendió en medio de cultivo Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) completo, con un 3% de FBS (*Thermo Fisher Scientific*), y las células se sembraron en un frasco de cultivo de 25 cm² de superficie. A continuación, se incubaron durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂. Tras el periodo de incubación, se realizó un lavado con PBS (*Thermo Fisher Scientific*) para eliminar las células en suspensión y las eEnSC quedaron adheridas al frasco de cultivo.

Debido al crecimiento más lento de estas células, al principio el cultivo se mantuvo realizando cambios de medio cada 4 días. Posteriormente, se realizaron cambios de cultivo cada 2-3 días hasta llegar a una confluencia del 80%, aproximadamente. En ese momento, se realizó un pase o subcultivo, las eEnSC se tripsinizaron y transfirieron a un frasco de cultivo de 75 cm² de superficie, donde se mantuvieron de forma rutinaria. Todas las eEnSC empleadas en los experimentos tenían un bajo número de pases (P2-P6).

La pureza de los cultivos de eEnSC se evaluó, por citometría de flujo, estudiando la doble expresión de los marcadores CD10/CD29, CD44/CD29 y CD73/CD29 (90-100% de células positivas) y la ausencia de CD45, CD31 y citoqueratina.

1.4. Células madre mesenquimales de médula ósea

1.4.1. Obtención y cultivo de MSC

Para establecer líneas de MSC, se partió de aspirados de médula ósea de 7 donantes sin patologías hematológicas, que se obtuvieron en el Hospital de Baza (Baza, Granada, España). Todos los participantes en el estudio dieron su consentimiento informado y el Comité de Investigación y Ética de la Universidad de Granada aprobó esta investigación.

El procesamiento de las muestras empezó con la dilución en PBS (*Thermo Fisher Scientific*) del aspirado de médula ósea y la posterior centrifugación en un gradiente de densidad con Ficoll-Paque (*Merck KGaA*). Las células obtenidas fueron mantenidas en medio de cultivo Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) completo, con un 3% de FBS (*Thermo Fisher Scientific*), y cambios de medio cada 2-3 días. Las MSC en cultivo fueron expandidas al llegar a una confluencia del 80%, aproximadamente. Todos los experimentos se realizaron usando MSC con un bajo número de pases (P2-P6).

La pureza del cultivo se confirmó mediante el estudio, por citometría de flujo, de la doble expresión de CD10/CD29, CD44/CD29 y CD73/CD29 (90-100% de células positivas) y la ausencia de CD45, CD31 y citoqueratina.

1.5. Decidualización

Para reproducir *in vitro* el proceso de decidualización que tiene lugar durante la fase secretora del ciclo endometrial y continúa si se produce embarazo, se decidualizaron 10 líneas de EnSC, DSC y eEnSC, y 7 líneas de MSC. Dicha decidualización se indujo añadiendo al medio de cultivo Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) completo, con un 3% de FBS (*Thermo Fisher Scientific*), los siguientes factores: P4 a una concentración de 300 nM y AMPc a una concentración de 500 μ M (ambos de *Merck KGaA*).

Para cada línea celular, se mantuvo un frasco de cultivo de 75 cm² con células que sirven de control (sin tratamiento) y un frasco de cultivo de 75 cm² con células decidualizadas. La decidualización se inició cuando el cultivo alcanzó, aproximadamente, el 70% de confluencia y se mantuvo durante 20 días, realizando cambios de medio cada 4 días. Los días 4, 8, 12, 16 y 20 se recogió el sobrenadante del cultivo de las células no tratadas y tratadas, y se reemplazó por medio fresco con P4 y AMPc. Los medios condicionados (MC) recogidos se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

La decidualización se confirmó por la observación del cambio de morfología fibroblástica a poligonal (redondeada) y la toma de imágenes que verifican dicho cambio. A partir de estas imágenes, se realizó un recuento y comparación del número de células redondeadas en cada uno de los medios (sin tratamiento y con tratamiento). El software empleado para la toma de imágenes es AnalySIS getIT. Por otra parte, la presencia de PRL e IL-15 se detectó en el MC mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (*Roche*, Indianapolis, EEUU y *R&D Systems*, Minneapolis, Minnesota, EEUU). Los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante y todas las muestras se analizaron por duplicado.

1.6. Células mononucleares de sangre periférica

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de 10 donantes voluntarias sanas, con un rango de edad entre 20 y 45 años. Se tuvo en cuenta que en el momento de la extracción y en las semanas previas las donantes no hubiesen presentado síntomas de infección, ni hubiesen recibido tratamiento inmunosupresor. Las muestras se obtuvieron previo consentimiento informado de todas las donantes.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron mediante una centrifugación de gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque (*Merck KGaA*). En la interfase se encuentran dichas células, que fueron recogidas y centrifugadas en PBS (*Thermo Fisher Scientific*) a 1500 rpm (5 min a 20 °C). Seguidamente, se procedió a realizar la separación de linfocitos y monocitos.

1.6.1. Aislamiento de monocitos

Los monocitos se obtuvieron mediante separación inmunomagnética, por selección negativa, con el kit Dynabeads Untouched Human Monocytes (*Thermo Fisher Scientific*) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Se describe brevemente a continuación.

En primer lugar, partiendo de un *pellet* de PBMC, se añadió el reactivo de bloqueo de receptores Fc de monocitos y una mezcla de anticuerpos (IgG biotinilados) que reconocen los

siguientes antígenos: CD3, CD7, CD16 (específico para CD16a y CD16b), CD19, CD56, CDw123 y CD235a. Se realizó una incubación de 20 minutos a 4 °C. A continuación, se llevó a cabo una centrifugación con PBS (*Thermo Fisher Scientific*) a 1500 rpm (5 min a 4 °C). Seguidamente, las bolas magnéticas (de poliestireno y revestidas con estreptavidina) se incubaron con las células durante 15 minutos a 4 °C y en agitación, permitiendo así su unión a los anticuerpos anteriormente indicados. Tras la incubación, se aplicó un imán magnético a la preparación y se mantuvo durante 2 minutos (este paso se realizó dos veces). Como resultado, se obtuvo una fracción con los monocitos de interés no seleccionados por los anticuerpos y una fracción de células no monocíticas pegada a la columna magnética.

La pureza de la preparación se confirmó midiendo, por citometría de flujo, el porcentaje de células CD14 positivas, que siempre fue superior a un 95%.

Los monocitos de sangre periférica purificados fueron incubados durante 48 horas con 600 µL de los medios de cultivo correspondientes: Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) completo (Control), con un 3% de FBS (*Thermo Fisher Scientific*); medios condicionados de EnSC, DSC y eEnSC no decidualizadas (MC de preEnSC, MC de preDSC y MC de preeEnSC); y medios condicionados de EnSC, DSC y eEnSC decidualizadas (MC de dEnSC, MC de dDSC y MC de deEnSC). Este cultivo se realizó en placas de 24 pocillos a razón de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo, con el objetivo de estudiar por citometría de flujo el fenotipo antigénico de los monocitos tras la incubación con los MC.

1.6.2. Aislamiento y activación de linfocitos

Los linfocitos de sangre periférica (PBL) se obtuvieron a partir de las PBMC que se aislaron previamente. A continuación, se dejó que los monocitos se adhirieran al plástico del frasco de cultivo de 75 cm² durante 2 horas a 37 °C, en medio de cultivo RPMI 1640 (*Thermo Fisher Scientific*). Dicho medio se suplementa con un 10% de FBS descomplementado, 100 U/mL de penicilina/estreptomina y L-glutamina 2 mM (todo de *Thermo Fisher Scientific*). Tras el tiempo de incubación, se recogió el sobrenadante con los PBL y se realizó una centrifugación a 1500 rpm (5 min a 20 °C). Así se obtuvo un *pellet* con los linfocitos de interés para los estudios fenotípicos y funcionales.

La activación de los PBL se realizó mediante cultivo en medio RPMI 1640 (*Thermo Fisher Scientific*) completo a una concentración de 2×10^6 células/mL en presencia de 5 µg/mL PHA (fitohemaglutinina-M) (*Merck KGaA*) y 1 µg/mL del anticuerpo monoclonal anti-CD28 (*BioLegend*, San Diego, California, EEUU) durante 20 horas, aproximadamente. Tras este periodo de incubación, se realizó una centrifugación a 1500 rpm (5 min a 20 °C) y, después, los linfocitos se cultivaron durante 6 días en medio RPMI 1640 (*Thermo Fisher Scientific*) completo a una concentración de 1×10^6 células/mL con 25 U/mL de IL-2 (*National Institutes of Health AIDS Reagent Program*, Rockville, Maryland, EEUU). Cada 2 días se realizó una centrifugación y posterior recuento celular. Después las células se incubaron en medio fresco con IL-2. Transcurrido los 6 días de tratamiento, se determinó la pureza del cultivo de PBL activados por citometría de flujo (>95% CD45+, >90% CD3+).

Los PBL purificados fueron incubados durante 48 horas con 600 µL de los medios de cultivo correspondientes: Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) completo (Control), con un 3% de FBS (*Thermo Fisher Scientific*); medios condicionados de EnSC, DSC y eEnSC no decidualizadas (MC

de preEnSC, MC de preDSC y MC de preeEnSC); y medios condicionados de EnSC, DSC y eEnSC decidualizadas (MC de dEnSC, MC de dDSC y MC de deEnSC). Este cultivo se realizó en placas de 24 pocillos a razón de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo, con el objetivo de estudiar por citometría de flujo el fenotipo antigénico de los PBL tras la incubación con los MC.

1.6.2.1. Bloqueo del receptor CXCR3 en linfocitos

Con la intención de bloquear el receptor de quimioquinas CXCR3 en los PBL activados, obtenidos de 3 donantes diferentes, se incubaron $2,5 \times 10^5$ células con dosis crecientes del anticuerpo monoclonal anti-CXCR3 (Ultra-LEAF Purified anti-human CD183) (*BioLegend*) durante 45 min a temperatura ambiente. Las dosis empleadas fueron las siguientes: 1,25 µg/mL, 5 µg/mL y 10 µg/mL. Como control negativo se usó el anticuerpo monoclonal que sirve de isotipo (Mouse IgG1, κ Isotype Control) (*BioLegend*). Una vez bloqueado el receptor CXCR3, los PBL activados se emplearon para llevar a cabo los ensayos de migración celular.

1.7. Líneas celulares tumorales

Las líneas celulares tumorales humanas utilizadas en este estudio se cultivaron tal y como recomienda la *American Type Culture Collection* (ATCC) y fueron las siguientes: Jurkat (leucemia linfoblástica; ATCC), Raji (linfoma de Burkitt; ATCC), THP-1 (leucemia monocítica; ATCC), A375 (melanoma; ATCC), Cal33 (carcinoma de células escamosas de la lengua; Instituto Leibniz, Braunschweig, Alemania), HeLa (adenocarcinoma cervical; ATCC) y SKBR3 (cáncer de mama; ATCC).

Las células Jurkat, A375, HeLa y SKBR3 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (*Thermo Fisher Scientific*) completo, mientras que las células Raji y Cal33 se cultivaron en medio DMEM (*Thermo Fisher Scientific*) suplementado con un 10% de FBS descomplementado y 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (todo de *Thermo Fisher Scientific*). Las células THP-1 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (*Thermo Fisher Scientific*) al que se añadió piruvato sódico 1 mM, tampón HEPES 25 mM, 100 U/mL de penicilina/estreptomicina, L-glutamina 2 mM y un 10% de FBS descomplementado (todo de *Thermo Fisher Scientific*). Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂, con cambios de medio cada 2-3 días.

En el caso de las células en suspensión (líneas Jurkat, Raji y THP-1), la confluencia del cultivo nunca excedió 1×10^6 células/mL, tal y como recomienda la ATCC. Todos los experimentos fueron realizados usando células con un máximo de 12-14 pases, ya que en ese momento empiezan a perder su turgencia y forma redondeada.

Las células THP-1 fueron incubadas durante 48 horas con 600 µL de los medios de cultivo correspondientes: Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) completo (Control), con un 3% de FBS (*Thermo Fisher Scientific*); medios condicionados de EnSC, DSC y eEnSC no decidualizadas (MC de preEnSC, MC de preDSC y MC de preeEnSC); y medios condicionados de EnSC, DSC y eEnSC decidualizadas (MC de dEnSC, MC de dDSC y MC de deEnSC). Este cultivo se realizó en placas de 24 pocillos a razón de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo, con el objetivo de estudiar por citometría de flujo el fenotipo antigénico de las THP-1 tras la incubación con los MC.

2. Obtención y tratamientos de los medios condicionados

Los MC necesarios para los estudios funcionales se obtuvieron a partir del sobrenadante del cultivo de EnSC, DSC, eEnSC y MSC no decidualizadas y decidualizadas en frascos de cultivo de 75 cm², tal como se explicó anteriormente. El volumen recolectado por cada una de las líneas estudiadas fue aproximadamente de 10 mL. Para eliminar restos celulares, dicho volumen se centrifugó a 1500 rpm (5 min a 20 °C), se filtró por un diámetro de poro de 0,2 µm y se almacenó a -20 °C en tubos de polipropileno cónicos y estériles de 15 mL, hasta su uso.

2.1. Diálisis

Los MC de preDSC y dDSC, obtenidos a partir del cultivo de 3 líneas diferentes, fueron dializados empleando una membrana de diálisis Spectra/Por 1 (*Repligen*, Waltham, Massachusetts, EEUU) que permite el paso de moléculas con un peso molecular inferior a 6000-8000 Da ("Molecular Weight Cut Off" MWCO 6000-8000 Da).

En primer lugar, se hidrató la membrana de diálisis con medio de cultivo Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*). A continuación, se añadieron 5 mL de medio Control (Opti-MEM completo, con un 3% de FBS) y del MC correspondiente en el interior de diferentes fragmentos de membrana, los cuales se introdujeron en 500 mL de medio de cultivo Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) completo, con un 3% de FBS (*Thermo Fisher Scientific*). Para permitir el intercambio de moléculas, se llevó a cabo una incubación durante 24 horas a 4 °C y en agitación. Una vez transcurrido este tiempo, se recogieron los medios del interior de la membrana y se filtraron por un diámetro de poro de 0,2 µm, antes de usarse en los ensayos de migración celular.

2.2. Tratamiento térmico

Los MC de preDSC y dDSC, así como el medio Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) completo, con un 3% de FBS (*Thermo Fisher Scientific*), se sometieron a un tratamiento térmico a 60 °C durante 45 min. Posteriormente, dichos medios se emplearon en los estudios de migración celular.

3. Ensayo de migración celular en cámara Transwell

Los ensayos de migración celular se llevaron a cabo empleando cámaras Transwell de 24 pocillos (*Corning Incorporated*, Nueva York, EEUU) (**Ilustración 12**). El diámetro de poro de los insertos dependió del tamaño de las células estudiadas en cada experimento. Se emplearon insertos con un diámetro de poro de 3 µm para PBL y monocitos de sangre periférica, y para las células tumorales se usaron insertos con un diámetro de poro de 5 µm. El fondo de los pocillos de la cámara Transwell se cubrió con 600 µL del medio correspondiente: Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) completo (Control) con un 3% de FBS (*Thermo Fisher Scientific*); medios condicionados de EnSC, DSC y eEnSC no decidualizadas (MC de preEnSC, MC de preDSC y MC de preeEnSC); y medios condicionados de EnSC, DSC y eEnSC decidualizadas (MC de dEnSC, MC de dDSC y MC de deEnSC). En la parte superior del inserto se añadieron $2,5 \times 10^5$ células en 100 µL de medio Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) completo, con un 3% de FBS (*Thermo Fisher Scientific*). Las células sembradas en los ensayos de migración fueron PBL no activados y activados, monocitos de sangre periférica, células Jurkat y THP-1. Después de periodos de

incubación de 24 y 48 horas (en función del experimento) a 37 °C, se retiraron los insertos y se recogieron y contaron las células que habían experimentado quimiotaxis y que, por lo tanto, se encontraban en el fondo de los pocillos. El número total de células migradas se determinó con un hemocitómetro (*Zuzi*, Auxilab, España) y los resultados se expresaron como porcentaje de migración celular calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Migración celular (\%)} = \frac{\text{Número de células migradas}}{\text{Número total de células sembradas}} \times 100$$

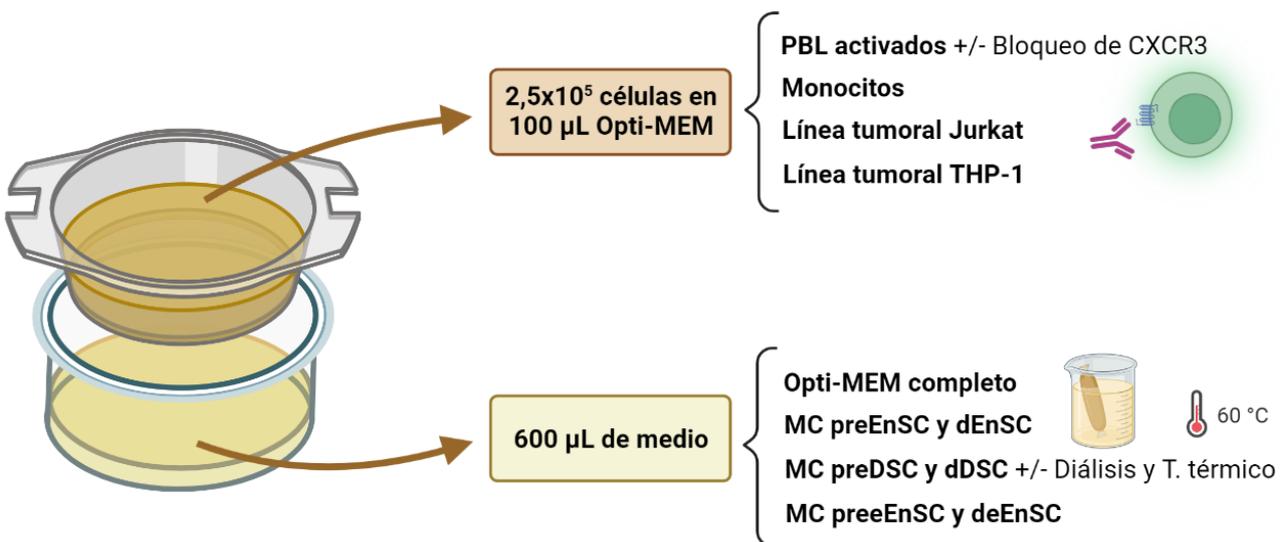


Ilustración 12. Esquema resumen de los ensayos de migración en cámara Transwell. Imagen creada con el software BioRender.

4. Citometría de flujo

4.1. Análisis fenotípico de EnSC, DSC, eEnSC y MSC

Las líneas de EnSC, DSC, eEnSC y MSC fueron analizadas para confirmar su fenotipo y pureza. Para ello, se tripsinizaron las células (Tripsina-EDTA 1x; *Merck KGaA*) del frasco de cultivo de 75 cm² y después fueron centrifugadas a 1500 rpm (5 min a 20 °C). A continuación, el *pellet* de células fue resuspendido en PBS (*Thermo Fisher Scientific*) suplementado con 0,5 % de albúmina sérica bovina (BSA) y EDTA 2Mm (*Merck KGaA*) y se añadieron 5x10⁴ de células/tubo en 100 µL. Seguidamente, se añadió el anticuerpo correspondiente (dilución 1/50) (anticuerpos directos y controles de isotipo) (**Tabla 1**) por tubo y se incubaron las muestras durante 30 min a 4 °C, en oscuridad. Tras la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm (5 min a 4 °C). Finalmente, el *pellet* obtenido se resuspendió en 200 µL de PBS/tubo y las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo FACSCalibur (*Becton Dickinson*, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EEUU). En el caso del marcaje indirecto, se realizó una segunda incubación durante 30 min a 4 °C y en oscuridad con el anticuerpo secundario (**Tabla 1**), conjugado con otro fluorocromo (dilución 1/500).

Para el marcaje de antígenos intracitoplásmicos, se requirió un paso previo de fijación de las

células con paraformaldehído al 4% (PFA) (*Merck KGaA*) durante 20 min a 4 °C, y un posterior lavado y permeabilización con PBS saponina al 0,05% (*Merck KGaA*). Después se realizó el marcaje descrito anteriormente.

Durante la adquisición de las muestras, los parámetros *forward scatter* y *side scatter* fueron empleados para excluir regiones de restos celulares. Se midió la fluorescencia emitida por las células con los detectores FL1, FL2 y FL4, y el porcentaje de células positivas para cada marcaje fue calculado comparando con el correspondiente isotipo. El análisis de los resultados obtenidos se llevó a cabo usando el software *FlowJo* (v.10, *FlowJo LLC*, *BD Biosciences*).

Tabla 1. Listado de anticuerpos empleados en la caracterización fenotípica de las EnSC, DSC, eEnSC y MSC. Se muestra el fluorocromo conjugado al anticuerpo, el clon y la casa comercial.

<u>Anticuerpo</u>	<u>Fluorocromo</u>	<u>Clon</u>	<u>Casa comercial</u>
<u>Anti-human CD9</u>	FITC	HI9a	BioLegend
<u>Anti-human CD10</u>	PE	HI10a	BioLegend
<u>Anti-human CD13</u>	FITC	WM15	Thermo Fisher Scientific
<u>Anti-human CD15</u>	APC	HI98	BioLegend
<u>Anti-human CD19</u>	PE	HIB19	BioLegend
<u>Anti-human CD29</u>	APC	TS2/16	BioLegend
<u>Anti-human CD31</u>	FITC	WM59	BioLegend
<u>Anti-human CD34</u>	FITC	581	BioLegend
<u>Anti-human CD44</u>	FITC	BJ18	BioLegend
<u>Anti-human CD45</u>	FITC/PE	HI30	BioLegend
<u>Anti-human CD54 (ICAM-1)</u>	FITC	HA58	BioLegend
<u>Anti-human CD62P</u>	PE	AK4	BioLegend
<u>Anti-human CD73</u>	FITC/PE	AD2	BioLegend

MATERIAL Y MÉTODOS

<u>Anti-human CD80</u>	FITC	2D10	BioLegend
<u>Anti-human CD86</u>	PE	IT2.2	BioLegend
<u>Anti-human CD90</u>	FITC	5E10	Thermo Fisher Scientific
<u>Anti-human CD105</u>	-	43A3	BioLegend
<u>Anti-human CD106 (VCAM-1)</u>	PE	STA	BioLegend
<u>Anti-human CD140b</u>	PE	18A2	BioLegend
<u>Anti-human CD146</u>	APC	P1H12	BioLegend
<u>Anti-human CD271</u>	FITC	ME20.4	BioLegend
<u>Anti-human AP (B4-78)</u>	-	-	DHSB
<u>Anti-human α-SMA</u>	FITC	1A4	Merck KGaA
<u>Anti-human BAFF</u>	FITC	137314	R&D Systems
<u>Anti-human CXCL12 (SDF-1)</u>	APC	79018	R&D Systems
<u>Anti-human CXCL13</u>	APC	53602	R&D Systems
<u>Anti-human cytokeratin</u>	-	C-11	BioLegend
<u>Anti-human HLA-DR</u>	PE	L243	BioLegend
<u>Anti-human HLA-G</u>	FITC/APC	MEM-G/9	Abcam
<u>Anti-human MFG-E8</u>	PE	278918	R&D Systems
<u>Anti-human nestin</u>	-	196908	R&D Systems
<u>Anti-human OCT3/4</u>	Alexa Fluor 488	EM92	Thermo Fisher Scientific

<u>Anti-human podoplanin</u>	Alexa Fluor 488	NC-08	BioLegend
<u>Anti-human STRO-1</u>	FITC	STRO-1	BioLegend
<u>Anti-human vimentin</u>	PE	W16220A	BioLegend
<u>Anti-human SUSD2</u>	APC	W5C5	BioLegend
<u>Mouse IgG1, κ Isotype</u>	FITC	MOPC-21	BioLegend
<u>Mouse IgG1, κ Isotype</u>	PE	MOPC-21	BioLegend
<u>Mouse IgG1, κ Isotype</u>	APC	MOPC-21	BioLegend
<u>Mouse IgG2a, κ Isotype</u>	FITC	MOPC-173	BioLegend
<u>Mouse IgG2a, κ Isotype</u>	PE	MOPC-173	BioLegend
<u>Rat IgG2a, κ Isotype</u>	Alexa Fluor 488	RTK2758	BioLegend
<u>Goat anti-mouse IgG</u>	FITC	Poly4053	BioLegend
<u>Goat anti-mouse IgG</u>	PE	Poly4053	BioLegend
<u>Goat anti-mouse IgG</u>	APC	Poly4053	BioLegend

FITC: isotiocianato de fluoresceína; APC: alofocianina; PE: ficoeritrina. Casa comercial: BioLegend (San Diego, California, EEUU); Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EEUU); DHSB (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, EEUU); Merck KGaA (Darmstadt, Alemania); R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, EEUU); Abcam (Cambridge, UK).

4.2. Análisis fenotípico de monocitos de sangre periférica y células THP-1

El fenotipo antigénico de los monocitos purificados y de las células THP-1 se determinó por citometría de flujo. Este estudio se realizó tanto en las células antes de ser sembradas en placa, como después de haber estado en contacto con los MC; por un lado, en placa de 24 pocillos durante 48 horas y, por otro lado, tras haber experimentado quimiotaxis en cámara Transwell durante 48 horas.

Partimos de, aproximadamente, 1×10^5 de células/tubo resuspendidas en 100 μ L de PBS

(*Thermo Fisher Scientific*) suplementado con 0,5 % de BSA y EDTA 2mM (*Merck KGaA*) que incubamos con el anticuerpo bloqueante Fc-block (anti-CD16/CD32) (*Thermo Fisher Scientific*), a una dilución 1/100 durante 15 min a 4 °C, para evitar uniones inespecíficas. Posteriormente, las células se centrifugaron a 1500 rpm (5 min a 4 °C) y el *pellet* resultante se resuspendió en 100 µL de PBS (*Thermo Fisher Scientific*) (+BSA+EDTA) y se añadieron los anticuerpos directos (dilución 1/50) y los respectivos isotipos (dilución 1/50) (**Tabla 2**). Las muestras fueron incubadas durante 30 min a 4 °C, en oscuridad. Tras la incubación, las células se centrifugaron a 1500 rpm (5 min a 4 °C) y después se resuspendieron en 200 µL de PBS/tubo para ser analizadas en el citómetro de flujo FACSCalibur (*Becton Dickinson*). El análisis de los resultados obtenidos se llevó a cabo usando el *software FlowJo* (v.10, *FlowJo LLC, BD Biosciences*).

4.3. Análisis fenotípico de PBL activados y células Jurkat

El estudio del fenotipo antigénico de los PBL activados se realizó antes de la siembra en placa y tras haber estado en contacto con los MC, tanto en placa de 24 pocillos durante 48 horas, como después de experimentar quimiotaxis en cámara Transwell durante 24 y 48 horas. También se analizó el fenotipo basal de las células Jurkat.

Como en el caso de los monocitos, partimos de, aproximadamente, 1×10^5 de células/tubo resuspendidas en 100 µL de PBS (*Thermo Fisher Scientific*), suplementado con 0,5 % de BSA y EDTA 2mM (*Merck KGaA*), que incubamos con el anticuerpo directo no conjugado con ningún fluorocromo (anti-CXCR3) (dilución 1/50) (**Tabla 2**), durante 30 min a 4 °C, en oscuridad. Tras la incubación, las células se centrifugaron a 1500 rpm (5 min a 4 °C). Después se realizó el marcaje indirecto, con una segunda incubación, durante 30 min a 4 °C y en oscuridad, con el anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo (dilución 1/500) y su respectivo isotipo (dilución 1/500) (**Tabla 2**). Tras un lavado y centrifugación a 1500 rpm (5 min a 4 °C), se realizó un último marcaje, durante 30 min a 4 °C y en oscuridad, con los anticuerpos directos conjugados con otro fluorocromo (dilución 1/50) y sus respectivos isotipos (dilución 1/50) (**Tabla 2**). Tras la incubación, las células se centrifugaron a 1500 rpm (5 min a 4 °C) y se resuspendieron en 200 µL de PBS/tubo para ser analizadas en el citómetro de flujo FACSCalibur (*Becton Dickinson*). Se empleó el *software FlowJo* (v.10, *FlowJo LLC, BD Biosciences*) para el análisis de los datos.

El número de células positivas de cada población celular se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células positivas} = \frac{\% \text{ de células positivas} \times \text{recuento celular total}}{100}$$

Tabla 2. Listado de anticuerpos empleados en la caracterización fenotípica de monocitos, células THP-1, PBL activados y células Jurkat. Se muestra el fluorocromo conjugado al anticuerpo, el clon y la casa comercial.

<u>Anticuerpo</u>	<u>Fluorocromo</u>	<u>Clon</u>	<u>Casa comercial</u>
<u>Anti-human CD3</u>	FITC	HIT3a	BioLegend
<u>Anti-human CD4</u>	FITC/PE	SK3	BioLegend
<u>Anti-human CD8</u>	PE	SK1	BioLegend
<u>Anti-human CD14</u>	FITC/APC	HCD14	BioLegend
<u>Anti-human CD19</u>	PE	HIB19	BioLegend
<u>Anti-human CD45</u>	FITC/PE	HI30	BioLegend
<u>Anti-human CD56 (NCAM-1)</u>	APC	5.1H11	BioLegend
<u>Anti-human CD86</u>	Alexa Fluor 488	IT2.2	BioLegend
<u>Anti-human CD163</u>	FITC	GHI/61	BioLegend
<u>Anti-human CD206 (MMR)</u>	APC	15-2	BioLegend
<u>Anti-human CD183 (CXCR3)</u>	-	G025H7	BioLegend
<u>Mouse IgG1, κ Isotype</u>	FITC	MOPC-21	BioLegend
<u>Mouse IgG1, κ Isotype</u>	PE	MOPC-21	BioLegend
<u>Mouse IgG1, κ Isotype</u>	APC	MOPC-21	BioLegend
<u>Mouse IgG2a, κ Isotype</u>	FITC	MOPC-173	BioLegend

<u>Mouse IgG2b, κ Isotype</u>	Alexa Fluor 488	MPC-11	BioLegend
<u>Goat anti-mouse IgG</u>	FITC	Poly4053	BioLegend
<u>Goat anti-mouse IgG</u>	APC	Poly4053	BioLegend

FITC: isotiocianato de fluoresceína; APC: alofocianina; PE: ficoeritrina. Casa comercial: BioLegend (San Diego, California, EEUU).

4.4. Determinación de células apoptóticas

Las células apoptóticas hipodiploides fueron detectadas por citometría de flujo, según un protocolo previamente descrito²⁰⁶. Este procedimiento consistió en el lavado de las células con el buffer salino PBS (*Thermo Fisher Scientific*) y, tras una centrifugación a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C, las células se resuspendieron en 100 μ L de PBS (*Thermo Fisher Scientific*). A este volumen se añadieron 900 μ L de etanol al 70% (mantenido a -20 °C) para fijar las células y se realizó una incubación durante 5 min en frío (4 °C). Una vez transcurrido este tiempo, se lavó el exceso de etanol con PBS (*Thermo Fisher Scientific*) y se realizó una centrifugación a 3500 rpm durante 2 min a 4 °C. A continuación, las células se resuspendieron en 250 μ L de PBS (*Thermo Fisher Scientific*) y se añadieron 250 μ L de una solución de extracción del DNA (0,2 M NaHPO₄, 0,1 M ácido cítrico; pH 7,8); se incubaron durante 10 min a 37 °C. Tras esta incubación, las células fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 2 min a 4 °C y el *pellet* fue resuspendido en 200 μ L de una solución preparada con PBS (*Thermo Fisher Scientific*) al que se añadió ioduro de propidio (IP) (40 μ g/mL) y RNasa (100 μ g/mL) (todo de *Thermo Fisher Scientific*), durante 30 min a 37 °C y en oscuridad, con la finalidad de teñir el ADN.

A continuación, mediante citometría de flujo se llevó a cabo un análisis cuantitativo de la fase sub-G1 del ciclo celular, para detectar células apoptóticas. Se midió la intensidad de fluorescencia del ADN con un detector FL2 del citómetro de flujo FACSCalibur (*Becton Dickinson*). El análisis de los resultados se realizó con el *software FlowJo (v.10, FlowJo LLC, BD Biosciences)*.

5. Inmunocitoquímica y microscopía de fluorescencia

La detección de la proteína contráctil α -SMA en preDSC se realizó por inmunocitoquímica y microscopía de fluorescencia. Las células se sembraron en cámaras con medio de cultivo Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) (+/- citoquinas y P4). Tras 48 horas de incubación, las preDSC se lavaron con PBS (*Thermo Fisher Scientific*) y se fijaron con PFA al 4% durante 20 min a 4 °C. Después se permeabilizaron con acetona fría durante 10 min. Seguidamente, se realizó el marcaje mediante la adición del anticuerpo monoclonal anti- α SMA-Cy3 (*Merck KGaA*) y la contratinción nuclear con 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI) (*BioLegend*). Finalmente, las preparaciones se examinaron con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse (*Nikon Instruments Europe BV, Ámsterdam, Países Bajos*) con ayuda técnica del servicio de microscopía del CIC-CIBM (Centro de Instrumentación Científica, Centro de Investigación Biomédica, Granada, España).

6. Inmunohistoquímica y microscopía confocal

Para el análisis histológico de la decidua, partimos de muestras que se habían procesado anteriormente en el laboratorio. Dicho procesamiento consistió en el acomodamiento de la muestra en un molde con compuesto O.C.T (*Tissue-Tek O.C.T Compound, Sakura Finetek, Torrance, California, EEUU*) y congelación instantánea tras su inmersión en isopentano (*Merck KGaA*) enfriado con nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su crioseccionamiento.

Para el análisis de las poblaciones celulares de la decidua mediante microscopía confocal, se realizaron cortes de $10\text{ }\mu\text{m}$ de grosor con un criotomo (*Leica CM1510, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemania*) que se fijaron con PFA al 3,7% durante 7 min a temperatura ambiente o en acetona fría (*Merck KGaA*) durante 3 min, en el caso de las muestras en las que se estudiaron epítomos sensibles a PFA (CD140b). A continuación, los cortes fueron rehidratados con PBS frío durante 15 min y después se bloquearon con PBS-Tween 20 (0,1%) (*Thermo Fisher Scientific*) suplementado con BSA (5%), suero de cabra (5%) y Tritón X-100 (0,2%) (todo de *Merck KGaA*), durante 45 min a temperatura ambiente. La posterior incubación con los anticuerpos primarios correspondientes (dilución 1/100) (**Tabla 3**) se mantuvo durante toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente, los cortes se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 (0,1%) (*Thermo Fisher Scientific*) y después fueron incubados con los anticuerpos secundarios (dilución 1/1000) (**Tabla 3**) durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se realizaron de nuevo 3 lavados con PBS-Tween 20 (0,1%) (*Thermo Fisher Scientific*) y los cortes fueron contrateñidos con Hoechst 33258 (*Merck KGaA*) (dilución 1/200) y sellados con medio de montaje Fluoroshield (*Merck KGaA*). Para la adquisición de imágenes se utilizó un microscopio confocal Nikon A1 (*Nikon Instruments Europe BV*) con ayuda técnica del servicio de microscopía del CIC-CIBM. Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el software NIS-Elements AR 3.2 (*Nikon Instruments Europe BV*).

Tabla 3. Listado de anticuerpos empleados en la caracterización fenotípica de las poblaciones celulares de la decidua por microscopía confocal. Se muestra el fluorocromo conjugado al anticuerpo, el clon y la casa comercial.

<u>Anticuerpo</u>	<u>Fluorocromo</u>	<u>Clon</u>	<u>Casa comercial</u>
<u>Anti-human CD10</u>	FITC	HI10a	BioLegend
<u>Anti-human CD34</u>	Brilliant Violet 421	561	BioLegend
<u>Anti-human CD140b</u>	-	18A2	BioLegend
<u>Anti-human CD146</u>	FITC	P1H12	BioLegend
<u>Anti-human SUSD2</u>	-	W5C5	BioLegend
<u>Anti-human α-SMA</u>	Cy3	1A4	Merck KGaA
<u>Anti-human MFG-E8</u>	-	278918	R&D Systems
<u>Anti-human nestin</u>	-	196908	R&D Systems
<u>Anti-human podoplanin</u>	Alexa Fluor 647	NC-08	BioLegend
<u>Anti-human STRO-1</u>	-	STRO-1	R&D Systems
<u>Goat anti-mouse IgG</u>	Alexa Fluor 488	Policlonal	Thermo Fisher Scientific

FITC: isotiocianato de fluoresceína; Cy3: cianina 3. Casa comercial: BioLegend (San Diego, California, EEUU); Merck KGaA (Darmstadt, Alemania); R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, EEUU); Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EEUU).

7. Extracción de ácidos nucleicos

7.1. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN total, las muestras preservadas en TRIzol® (*Thermo Fisher Scientific*) a -80 °C en tubos Eppendorf de polipropileno de 1,5 mL (sin DNAsas y RNAsas), se descongelaron en frío (4 °C) y después se mantuvieron durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron sobre las muestras 200 μ L de cloroformo (*Scharlab*, Barcelona,

España) por cada mL de TRIzol® (*Thermo Fisher Scientific*), se mezclaron las fases agitando suavemente los tubos y se mantuvieron durante 2-3 min a temperatura ambiente. Tras una centrifugación a 12500 rpm (15 min a 4 °C), se obtuvo una fase superior acuosa donde se encuentran los ácidos nucleicos. Dicha fase fue recogida y transferida a un nuevo tubo. Seguidamente, se añadieron 500 µL de isopropanol sobre las muestras y se agitaron suavemente los tubos. La solución se mantuvo toda la noche a -20 °C para favorecer la precipitación de los ácidos nucleicos. Transcurrido este tiempo, se realizó una centrifugación a 12500 rpm (10 min a 4 °C), se descartó el sobrenadante y el *pellet* obtenido se lavó con 500 µL de etanol al 75% en agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC) (*Merck KGaA*). Las muestras se centrifugaron de nuevo a 12500 rpm (5 min a 4 °C). A continuación, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el *pellet* manteniendo los tubos abiertos a temperatura ambiente durante 5 min, para la evaporación de los restos de alcohol. Finalmente, las muestras fueron reconstituidas en 20 µL de agua tratada con DEPC (*Merck KGaA*) y se incubaron durante 10 min a 55-60 °C.

Las pureza y concentración de las muestras se midió mediante espectrofotometría (*NanoDrop™ 2000; Thermo Fisher Scientific*). Se mantuvieron a -80 °C hasta realizar la síntesis del ADN complementario (ADNc).

7.2. Retrotranscripción

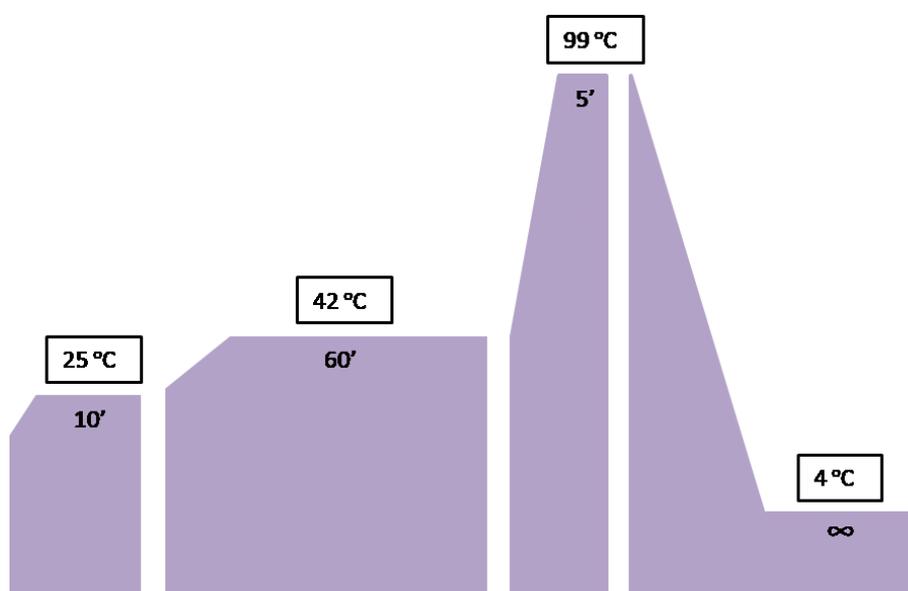
Para la síntesis de ADNc, las muestras de ARN fueron tratadas previamente con DNasa I (*DNase I RNase-free; Thermo Fisher Scientific*) para eliminar el ADN genómico. Para ello, se partió de diluciones de 1 µg de ARN en 16 µL de agua libre de nucleasas (NFW) (*Promega, Madison, Wisconsin, EEUU*) y se añadió 1 µL de DNasa I y 1 µL de tampón de reacción. Las muestras se incubaron durante 30 min a 37 °C. A continuación, se añadió 1 µL de EDTA a cada tubo y se realizó una nueva incubación a 65 °C durante 10 min.

La retrotranscripción se llevó a cabo empleando el kit *Access RT-PCR System (Promega)* y se usaron los siguientes volúmenes de reacción (**Tabla 4**):

Tabla 4. Reactivos empleados en la retrotranscripción.

Mezcla de retrotranscripción	
Tampón de retrotranscripción 10x	2 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	4 μ L
dNTPs mix (10 mM)	2 μ L
Oligo(dT) ₁₅ (0,5 μ g/ μ L)	0,5 μ L
Random Primers (0,5 μ g/ μ L)	0,5 μ L
Inhibidor de RNAsas (rRNasin®)	0,5 μ L
Retrotranscriptasa AMV	0,6 μ L
NFW	1,9 μ L
Muestra de ARN (0,5 μ g) o NFW	8 μ L
Volumen final de reacción	20 μL

Tras preparar la mezcla de la retrotranscripción, la reacción se llevó a cabo en un termociclador (*2720 Thermal Cycler; Thermo Fisher Scientific*) empleando los parámetros que se muestran a continuación (**Ilustración 13**):

**Ilustración 13. Esquema representativo de los parámetros empleados en la retrotranscripción.**

Los tubos que contenían el ADNc se guardaron a -20 °C hasta realizar la PCR cualitativa o cuantitativa.

8. PCR

8.1. PCR cualitativa

8.1.1. Análisis de ADN complementario

Tras realizar la extracción de ARN y la retrotranscripción, las muestras de ADNc fueron amplificadas con el kit *PCR Master Mix (Promega)*. Se usaron los siguientes volúmenes de reacción (**Tabla 5**):

Tabla 5. Reactivos empleados en la PCR cualitativa.

Mezcla de amplificación del ADNc	
PCR Master Mix 2x	12,5 µL
Oligonucleótido 5' (10 µM)	0,5 µL
Oligonucleótido 3' (10 µM)	0,5 µL
NFW	10,5 µL
Muestra de ADNc o NFW	1 µL
Volumen final de reacción	25 µL

Tras preparar la mezcla de amplificación, la PCR se llevó a cabo en un termociclador (2720 *Thermal Cycler; Thermo Fisher Scientific*) usando los parámetros detallados en el siguiente esquema (**Ilustración 14**):

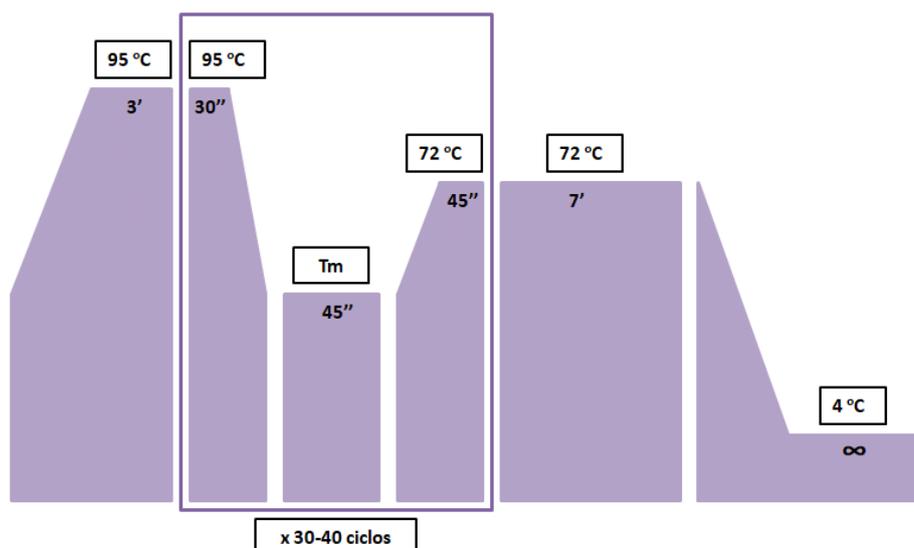


Ilustración 14. Esquema representativo de los parámetros empleados en la PCR cualitativa.

Las secuencias de los oligonucleótidos empleados aparecen detalladas en las siguientes tablas (**Tablas 6-9**):

Tabla 6. Listado de oligonucleótidos utilizados en el análisis transcriptómico mediante PCR cualitativa para estudiar los marcadores de células madre pluripotentes. Se muestra el nombre del gen, la secuencia, la Tm (temperatura de “melting” o fusión del ADN), el número de ciclos empleado, el número de pares de bases (pb) del amplicón o producto de PCR y la casa comercial.

Gen de interés	Secuencia	Tm	Ciclos	Amplicón (pb)	Casa comercial
<i>ABCG2</i>	5'-CCCATCCTGACCTCCAGCCG-3' (F) 5'-TTGAGTGGGCACAGCACGCA-3' (R)	55 °C	35	127	IPBLN
β 2-microglobulina (<i>B2M</i>)	5'-CTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGG-3' (F) 5'-TCTACATGTCTCGATCCCACTAA-3' (R)	55 °C	35	335	IPBLN
<i>NANOG</i>	5'-TGCTGGACTGAGCTGGTTGCC-3' (F) 5'-AGCAAGGCAAGCTTTGGGGACA-3' (R)	55 °C	35	221	IPBLN
<i>OCT-4 (POU5F1)</i>	Oct4F: 5'-AGCCCTCATTTACCAGGCC-3' (F) Oct4FP: 5'-GATGGCGTACTGTGGGCC-3' (F) Oct4R: 5'-TGGGACTCTCCGGGTTTGG-3' (R)	55 °C	35	456 195	IDT

F: oligonucleótido o “primer forward”; R: oligonucleótido o “primer reverse”. Casa comercial: IPBLN: Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra; IDT: “Integrated DNA Technologies”.

Tabla 7. Listado de oligonucleótidos utilizados en el análisis transcriptómico mediante PCR cualitativa para estudiar los marcadores de diferenciación mesenquimal. Se muestra el nombre del gen, la secuencia, la Tm, el número de ciclos empleado, el número de pb del amplicón o producto de PCR y la casa comercial.

Gen de interés	Secuencia	Tm	Ciclos	Amplicón (pb)	Casa comercial
<i>AP (ALPL)</i>	5'-TGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCA-3' (F) 5'-ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC-3' (R)	55 °C	35	338	IPBLN
β 2-microglobulina (<i>B2M</i>)	5'-CTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGG-3' (F) 5'-TCTACATGTCTCGATCCCACTAA-3' (R)	55 °C	35	335	IPBLN
Colágeno tipo II (<i>COL2A1</i>)	5'-TTTCCCAGGTCAAGATGGTC-3' (F) 5'-CTTCAGCACCTGTCTACCA-3' (R)	55 °C	35	159	IPBLN
Osteopontina (<i>SPP1</i>)	5'-CTAGGCATCACCTGTGCCATACC-3' (F) 5'-CAGTGACCAGTTCATCAGATTCATC-3' (R)	55 °C	35	373	IPBLN
PPAR γ 2 (<i>PPARG</i>)	5'-GCTGTTATGGGTGAAACTCTG-3' (F) 5'-ATAAGGTGGAGATGCAGGCTC-3' (R)	55 °C	35	351	IPBLN

AP: fosfatasa alcalina; PPAR γ 2: “peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2”. F: oligonucleótido o “primer forward”; R: oligonucleótido o “primer reverse”. Casa comercial: IPBLN: Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra; IDT: “Integrated DNA Technologies”.

Tabla 8. Listado de oligonucleótidos utilizados en el análisis transcriptómico mediante PCR cualitativa para estudiar los factores angiogénicos. Se muestra el nombre del gen, la secuencia, la Tm, el número de ciclos empleado, el número de pb del amplicón o producto de PCR y la casa comercial.

Gen de interés	Secuencia	Tm	Ciclos	Amplicón (pb)	Casa comercial
<i>ANGPT1</i>	5'-ACTAAAGGGAGGAAAAAGAGAGG-3' (F) 5'-TACAGTCCAACCTCCCCAT-3' (R)	59 °C	35	166	IPBLN
β 2-microglobulina (<i>B2M</i>)	5'-CTCGCGTACTCTCTCTTTCTGG-3' (F) 5'-TCTACATGTCTCGATCCCACTTAA-3' (R)	59 °C	35	335	IPBLN
<i>FGF2</i>	5'-GGGTGCCAGATTAGCGGAC-3' (F) 5'-GGTTCACGGATGGGTGTCTC-3' (R)	58 °C	35	112	IPBLN
<i>GAPDH</i>	5'-GCACCACCAACTGCTTAGC-3' (F) 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3' (R)	59 °C	35	87	IDT
<i>HGF</i>	5'-CAATGCCTCTGGTCCCCTT-3' (F) 5'-GGGCTGACATTTGATGCCAC-3' (R)	59 °C	35	171	IPBLN
<i>PGF</i>	5'-TGTTCCAGCCCATCCTGTG-3' (F) 5'-ACGTGCTGAGAGAACGTCAG-3' (R)	59 °C	35	163	IPBLN
<i>VEGFA</i>	5'-TCTTACCCAGGTCAGACG-3' (F) 5'-AGCAATGTCCTGAAGCTCCC-3' (R)	58 °C	35	98	IPBLN

ANGPT1: angiopoyetina 1; *FGF2*: factor de crecimiento de fibroblastos 2; *GAPDH*: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; *HGF*: factor de crecimiento de hepatocitos; *PGF*: factor de crecimiento placentario; *VEGFA*: factor de crecimiento endotelial vascular. F: oligonucleótido o “primer forward”; R: oligonucleótido o “primer reverse”. Casa comercial: IPBLN: Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra; IDT: “Integrated DNA Technologies”.

Tabla 9. Listado de oligonucleótidos utilizados en el análisis transcriptómico mediante PCR cualitativa para estudiar citoquinas y quimioquinas. Se muestra el nombre del gen, la secuencia, la T_m, el número de ciclos empleado, el número de pb del amplicón o producto de PCR y la casa comercial.

Gen de interés	Secuencia	T_m	Ciclos	Amplicón (pb)	Casa comercial
CCL2	5'-AGCAGCAAGTGTCCTCCAAA-3' (F) 5'-GAGTTTGGGTTTGCTTGTC-3' (R)	55 °C	35	124/506	IDT
CCL7	5'-TTCTGTGTCTGCTGCTCA-3' (F) 5'-GCTTCCATAGGGACATCATAT-3' (R)	53 °C	35	526/644	IDT
CXCL9 (1)	5'-CCTTGAAAGACCTTAAAC-3' (F) 5'-AGAACGTTGAGATTTTC-3' (R)	46 °C	35	224	IDT
CXCL9 (2)	5'-CCAGTAGTGAGAAAGGGTCGC-3' (F) 5'-AGGGCTTGGGGCAAATTGTT-3' (R)	63 °C	35	99	IDT
CXCL10	5'-CCAAAATGTATCAAAGAACTGA-3' (F) 5'-GCATCTTCACTGATTCTTGG-3' (R)	48 °C	35	120	IDT
CXCL11	5'-TACAGTTGTTCAAGGCTTCCC-3' (F) 5'-GGGTACATTATGGAGGCTTCTC-3' (R)	59 °C	35	111	IDT
GAPDH	5'-GCACCACCAACTGCTTAGC-3' (F) 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3' (R)	59 °C	35	87	IDT
IFN-γ (IFNG)	5'-AGCTCTGCATCGTTTTGGGT-3' (F) 5'-CGCTTCCCTGTTTTAGCTGC-3' (R)	58 °C	40	424	IDT
IL10	5'-AACCAAGACCCAGACATCAAG-3' (F) 5'-CTAAATCGTTCACAGAGAAGC-3' (R)	55,5 °C	35	432	IDT
LIF	5'-CATGAACCTCTGAAAACCTGCC-3' (F) 5'-CATCTGGACCCAACCTCTGA-3' (R)	59 °C	35	730	IDT
Prolactina (PRL)	5'-TTCAGGATGAACCTGGCTGAC-3' (F) 5'-GGGTTTATTACCAAGGCCATC-3' (R)	58,5 °C	35	276	IPBLN
RANKL (TNFSF11)	5'-GCAGATTTTCAAGACACAAC-3' (F) 5'-GGTCTCCTGAAGTTTCATG-3' (R)	53 °C	35	403	IDT
TNF-α (TNF)	5'-GTCAGATCATCTTCTCGAACC-3' (F) 5'-CAGATAGATGGGCTCATACC-3' (R)	54 °C	40	360	IDT

CCL2: quimioquina 2 con motivo CC; CCL7: quimioquina 7 con motivo CC; CXCL9 (1): quimioquina 9 con motivo CXC (oligonucleótidos empleados en las preDSC y dDSC de 14 días de decidualización; CXCL9 (2): quimioquina 9 con motivo CXC (oligonucleótidos empleados en las preDSC y dDSC de 8 días de decidualización; en EnSC y eEnSC); CXCL10: quimioquina 10 con motivo CXC; CXCL11: quimioquina 11 con motivo CXC; GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; IFN-γ: interferón gamma; IL10: interleucina 10; LIF: factor inhibidor de la leucemia; RANKL: ligando de receptor activador para el factor nuclear κB; TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa. F: oligonucleótido o “primer forward”; R: oligonucleótido o “primer reverse”. Casa comercial: IPBLN: Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra; IDT: “Integrated DNA Technologies”.

8.1.2. Visualización del producto de PCR en gel de agarosa

Los productos obtenidos de la PCR fueron separados por tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (*Seakem LE Agarose for gel electrophoresis; Lonza Group, Basilea, Suiza*) a un voltaje de 100 V y amperaje de 400 mA. Dichos productos se visualizaron mediante tinción con GelRed (*GelRed Nucleic Acid Gel Stain; Biotium, Fremont, California, EEUU*) en un revelador de geles (*ChemiDoc MP Imaging System; Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EEUU*). En cada gel se incluyó un marcador de peso molecular (*BenchTop 100bp DNA Ladder; Promega*), los controles positivo y negativo del gen de interés y las muestras a estudiar.

Las bandas se cuantificaron con el *software* Adobe Photoshop CS3 (*Adobe Systems Incorporated; San José, California, EEUU*). Los valores de intensidad de banda para cada muestra se normalizaron frente a los obtenidos para el gen de expresión constitutiva (“housekeeping gene”) GAPDH. Se representaron los datos normalizados como Fold Change (FC); calculado como el valor obtenido para dDSC, relativizado frente al valor obtenido para preDSC o como el valor obtenido para PBL activados en contacto con MC de DSC, relativizado frente al valor obtenido en el medio Control.

Los valores de FC inferiores a 1 se representaron con la fórmula NFC (“Negative Fold Change”) = -1/FC.

8.2. PCR cuantitativa

Para el análisis cuantitativo de la expresión génica, las muestras de ADNc fueron amplificadas mediante PCR a tiempo real en placas de 96 pocillos (*MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate; Thermo Fisher Scientific*) usando FastStart Universal SYBR Green Master (*Merck KGaA*) con los siguientes volúmenes y parámetros de reacción de qPCR (**Tabla 10**):

Tabla 10. Reactivos empleados en la PCR cuantitativa.

Mezcla de amplificación del ADNc	
SYBR Green 2x	12,5 µL
Oligonucleótido 5' (10 µM)	0,75 µL
Oligonucleótido 3' (10 µM)	0,75 µL
NFW	8,5 µL
Muestra de ADNc (dilución 1/10) o NFW	2,5 µL
Volumen final de reacción	25 µL

Tras preparar la mezcla de amplificación, la PCR cuantitativa se llevó a cabo en un sistema *QuantStudio 3 Real-time PCR (Thermo Fisher Scientific)* usando los parámetros detallados en el siguiente esquema (**Ilustración 15**):

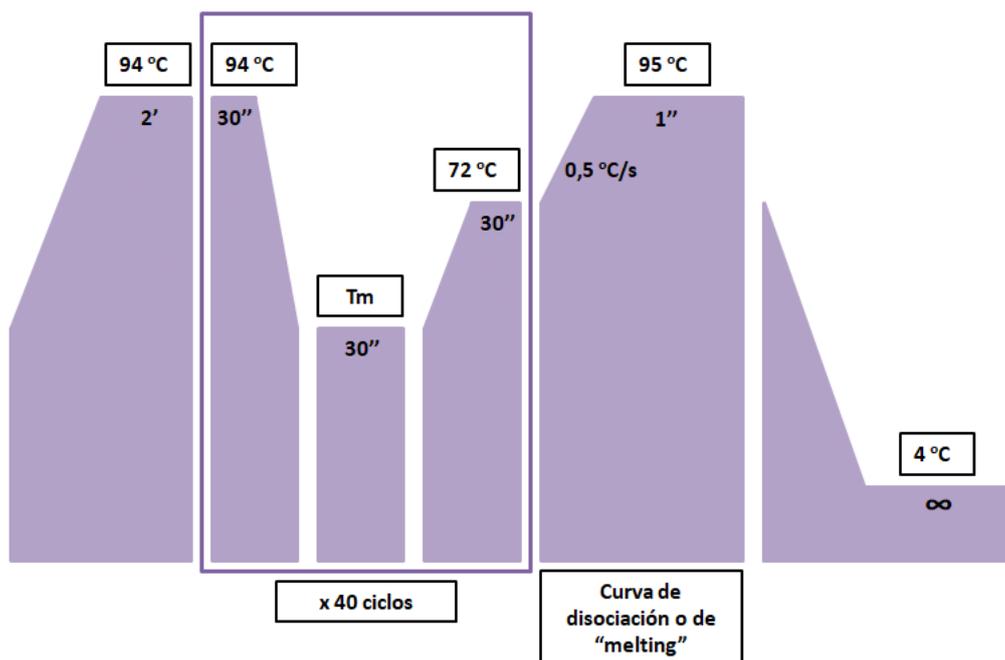


Ilustración 15. Esquema representativo de los parámetros empleados en la PCR cuantitativa.

Las secuencias de los oligonucleótidos empleados aparecen detalladas en la **Tabla 11**.

Una vez finalizada la reacción, se obtuvieron valores de CT (*"cycle threshold"*) o ciclo umbral para cada muestra. Dichos valores se normalizaron frente a los obtenidos para el gen control de expresión constitutiva (*"housekeeping gene"*) y se aplicó la fórmula $2^{-\Delta CT}$, donde $\Delta CT = CT_{gen\ de\ interés} - CT_{gen\ control}$. Los valores resultantes fueron representados como FC; calculado como el valor obtenido para dDSC, relativizado frente al valor obtenido para preDSC o como el valor obtenido para PBL activados en contacto con los MC de DSC relativizado frente al valor obtenido en el medio Control. Los valores de FC inferiores a 1 se representaron con la fórmula $NFC = -1/FC$.

Tabla 11. Listado de oligonucleótidos utilizados en el análisis transcriptómico mediante PCR cuantitativa para estudiar citoquinas y quimioquinas. Se muestra el nombre del gen, la secuencia, la Tm, el número de pb del amplicón o producto de PCR y la casa comercial.

<u>Gen de interés</u>	<u>Secuencia</u>	<u>Tm</u>	<u>Amplicón (pb)</u>	<u>Casa comercial</u>
<i>CCL5</i>	5'-AAGGAGTATTTCTACACC-3' (F) 5'-CCAAAGAGTTGATGTA-3' (R)	45 °C	124	IDT
<i>CCL19</i>	5'-GCCTCTGTTACCCCTCAT-3' (F) 5'-AGCATCATTGGTGCCACTC-3' (R)	59 °C	95	IDT
<i>CCL21</i>	5'-TCCATCCCAGCTATCCTGTT-3' (F) 5'-AGCTCCTTGGGTCTGCAC-3' (R)	59 °C	71	IDT
<i>CXCL8</i>	5'-CCCAAATTTATCAAAGA-3' (F) 5'-GCATCTTCACTGATTCTGG-3' (R)	53 °C	207	IDT
<i>CXCL10</i>	5'-CCAAAATGTATCAAAGA-3' (F) 5'-GCATCTTCACTGATTCTGG-3' (R)	48 °C	120	IDT
<i>CXCL11</i>	5'-TACAGTTGTTCAAGGCTTCCC-3' (F) 5'-GGGTACATTATGGAGGCTTCTC-3' (R)	59 °C	111	IDT
<i>CXCL12</i>	5'-CAACTCCAACTGTGCC-3' (F) 5'-TAGCTTCGGGTCAATGCACA-3' (R)	59 °C	79	IDT
<i>CXCL14</i>	5'-ACGGGTCCAATGCAAGT-3' (F) 5'-CGCTCTGGTGGTGATGATAA-3' (R)	59 °C	126	IDT
<i>CX3CL1</i>	5'-ACCACGGTGTGACGAAATG-3' (F) 5'-CTCCAAGATGATTGCGGTTT-3' (R)	59 °C	122	IDT
<i>GAPDH</i>	5'-GCACCACCAACTGCTTAGC-3' (F) 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3' (R)	59 °C	87	IDT
<i>IFN-γ (IFNG)</i>	5'-GAGTGTGGAGACCATCAAGGAAG-3' (F) 5'-TATGCTTTGCGTTGGACATTCAAGTC-3' (R)	65 °C	126	IDT
<i>IL6</i>	5'-GTAGCCGCCCCACACAGA-3' (F) 5'-CATGTCTCCTTCTC AGG GCT G-3' (R)	59 °C	101	IDT
<i>IL15</i>	5'-CAAACAACAGTTTGTCTTCTAATG-3' (F) 5'-GGACAATATGTACAAAACCTGCAA-3' (R)	53,5 °C	114	IDT
<i>PR (PGR)</i>	5'-GATGAGCTTAATGGTGTGGTTC-3' (F) 5'-TGATTCTTTCATCCGCTGTC-3' (R)	53,5 °C	112	IDT
<i>TNF-α (TNF)</i>	5'-CCCAGGGACCTCTCTAATCA-3' (F) 5'-GCTACAGGCTTGTCACTCGG-3' (R)	60 °C	80	IPBLN

CCL5: quimioquina 5 con motivo CC; *CCL19*: quimioquina 19 con motivo CC; *CCL21*: quimioquina 21 con motivo CC; *CXCL8*: quimioquina 8 con motivo CXC; *CXCL10*: quimioquina 10 con motivo CXC; *CXCL11*: quimioquina 11 con motivo CXC; *CXCL12*: quimioquina 12 con motivo CXC; *CXCL14*: quimioquina 14 con motivo CXC; *CX3CL1*: quimioquina 1 con motivo CX₃C; *GAPDH*: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; IFN-γ: interferón gamma; *IL6*: interleucina 6; *IL15*: interleucina 15; PR: receptor de progesterona; TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa. F: oligonucleótido o “primer forward”; R: oligonucleótido o “primer reverse”. Casa comercial: IPBLN: Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra; IDT: “Integrated DNA Technologies”.

9. Inmunodetección de proteínas por Western Blot

Diferentes líneas de DSC y EnSC no decidualizadas y decidualizadas (7, 10 y 14 días) fueron lavadas con PBS (*Thermo Fisher Scientific*) y lisadas para la detección de las proteínas PR, PKA y el factor de transcripción FOXO1.

La detección se llevó a cabo a partir de extractos celulares totales. Para ello, las células (5×10^5) se incubaron durante 30 min a 4 °C (en hielo) con 100 μ L de buffer de lisis (*Thermo Fisher Scientific*) compuesto por NaCl 140 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 2M, NP-40 (nonilfenol etoxilado) al 1%, NaF 50 mM, PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1 mM, iodoacetamida 10 mM, pirofosfato sódico 5 mM, óxido de fenilarsina 50 mM e inhibidores de proteasas y fosfatasas (20x).

El sobrenadante se separó por centrifugación a 14000 g (12100 rpm) durante 15 min a 4 °C. Las proteínas del sobrenadante se cuantificaron por el método Bradford (*Merck KGaA*) y después se añadió el tampón de carga, buffer Laemmli 6x (*Thermo Fisher Scientific*) compuesto por Tris 2 M pH 6,8, urea 6 M, β -mercaptoetanol al 6%, azul de bromofenol al 0,003% y SDS (dodecilsulfato sódico) al 3%.

Posteriormente, las proteínas se separaron en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) (*Bio-Rad*) al 10%, en el sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (*Bio-Rad*) durante 80 min a un voltaje de 140 V. A continuación, se transfirieron las proteínas desde el gel a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (*Merck KGaA*) por transferencia semiseca, empleando el sistema Trans-Blot SD (*Bio-Rad*) durante 50 min a un amperaje de 50 mA.

Las membranas se bloquearon con una solución de PBS-Tween 20 (0,1%) (*Thermo Fisher Scientific*) con un 5% de leche en polvo durante 60 min a temperatura ambiente. Después se lavaron con PBS-Tween 20 (0,1%) (*Thermo Fisher Scientific*) y se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo correspondiente frente a la proteína a detectar (**Tabla 12**), el cual se diluyó con PBS-Tween 20 (0,1%) (*Thermo Fisher Scientific*) con 1% de leche en polvo. Después de esta incubación, las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 (0,1%) (*Thermo Fisher Scientific*) durante 5 min. Finalmente, estas se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario que está marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (**Tabla 12**) y preparado en solución de bloqueo. Después se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 (0,1%) (*Thermo Fisher Scientific*) durante 5 min. Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia empleando el reactivo ECL Select (*Cytiva RPN2235SK; Thermo Fisher Scientific*) recogiendo la señal con el sistema ImageQuant LAS-4000 mini (*Fujifilm*, Tokio, Japón). El análisis de resultados se realizó con el *software* Multicaule V.30 (*Fujifilm*). La intensidad de las bandas obtenidas fue cuantificada con el *software* Adobe Photoshop CS3 (*Adobe Systems Incorporated*); los valores de intensidad se normalizaron frente a los respectivos controles de carga (α -tubulina y β -actina).

Tabla 12. Listado de anticuerpos empleados en la inmunodetección de proteínas por Western Blot. Se muestra la proteína a detectar, la dilución/concentración a la que se emplea el anticuerpo y la casa comercial.

<u>Anticuerpo</u>	<u>Frente a:</u>	<u>Dilución/Concentración</u>	<u>Casa comercial</u>
<u>anti-protein Kinase A (PKA) R1α/β</u>	R1α y R1β	1:100	Santa Cruz Biotechnology
<u>anti-PKA Cα/β/γ</u>	Cα, Cβ y Cγ	1:100	Santa Cruz Biotechnology
<u>antiprogesterone receptor (PR)</u>	PR-A y PR-B	1:100	Santa Cruz Biotechnology
<u>anti-human FOXO1</u>	FOXO1	1 μg/mL	R&D Systems
<u>antimouse IgG-horseradish peroxidase (HRP)</u>		1:5000	Santa Cruz Biotechnology
<u>anti-sheep IgG HRP-conjugated</u>		1:1000	R&D Systems
<u>anti-β actin</u>		1:5000	Merck KGaA
<u>anti-α-tubulin</u>		1:1000	Merck KGaA

PKA R1 α / β : subunidades reguladoras R1 α / β de la proteína quinasa A; PKA C α / β / γ : subunidades catalíticas C α / β / γ de la proteína quinasa A; PR-A y PR-B: isoformas A y B del receptor de la progesterona; HRP: enzima peroxidasa de rábano. Casa comercial: Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, EEUU); R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, EEUU); Merck KGaA (Darmstadt, Alemania).

10. Inmunodetección de proteínas por ELISA

La detección de las proteínas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en el MC obtenido del cultivo de EnSC, DSC y eEnSC se llevó a cabo con un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). Mediante este procedimiento se pudieron detectar cuantitativamente dichos antígenos en muestras obtenidas de 3 donantes diferentes para cada tipo celular (se realizaron triplicados para cada muestra). La metodología empleada fue un ELISA tipo sándwich (**Ilustración 16**), mediante el cual se emplean dos anticuerpos específicos de dos epítomos diferentes presentes en el antígeno y el anticuerpo de detección está conjugado a una enzima que cataliza una reacción colorimétrica. Los kits utilizados en los experimentos se detallan a continuación: Human CXCL9 (MIG) ELISA Kit (EHCXCL9; *Thermo Fisher Scientific*), Human IP-10 (CXCL10) ELISA Kit (KAC2361; *Thermo Fisher Scientific*) y Human I-TAC (CXCL11) ELISA Kit (EHCXCL11; *Thermo Fisher Scientific*). Se siguió el protocolo especificado por el fabricante en cada caso, el cual se explica a continuación de forma resumida.

En primer lugar, se descongelaron alícuotas del MC que previamente había sido centrifugado a 1500 rpm (5 min a 20 °C) y filtrado por un diámetro de poro de 0,2 µm, para eliminar posibles restos celulares. En los experimentos se usaron las muestras correspondientes sin diluirlas previamente, ya que en este caso realizar diluciones impide la correcta detección de las proteínas objeto de estudio.

En cuanto a los reactivos presentes en cada kit, todos alcanzaron la temperatura ambiente y fueron mezclados debidamente antes de su uso.

Un paso inicial y necesario es la preparación del estándar, de concentración conocida, que se realizó siguiendo los pasos que se especifican a continuación. Primero fue reconstituido, para después preparar diluciones seriadas de dicho estándar. Las muestras de proteína purificada se añaden a los pocillos en concentraciones decrecientes y con ello, posteriormente, se obtiene una curva patrón con unos valores de absorbancia que servirán de referencia y permitirán determinar la concentración de antígeno presente en las muestras problema.

El procedimiento se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos, los cuales ya presentaban el anticuerpo de captura unido a la superficie de la placa. Seguidamente, se añadió el volumen correspondiente de cada muestra, tanto de las diluciones del estándar como de las muestras control (Opti-MEM) y problema (MC de preEnSC, MC de dEnSC, MC de preDSC, MC de dDSC, MC de preeEnSC y MC de deEnSC). De esta manera el antígeno contenido en la muestra se une al anticuerpo de captura. Tras una incubación a temperatura ambiente, se eliminó el contenido de los pocillos por decantación y se realizaron 4 lavados con la solución de lavado correspondiente. Así permanece solamente el antígeno de interés unido al anticuerpo de captura y se elimina el material no unido. Seguidamente, se añadió el anticuerpo de detección que está marcado con biotina y se incubó a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se eliminó el exceso de anticuerpo mediante decantación y se realizaron 4 lavados. Después se añadió a los pocillos la solución que contiene estreptavidina conjugada con HRP y que permite la detección del anticuerpo biotinilado. Se realizó una nueva incubación a temperatura ambiente. El contenido de los pocillos se volvió a eliminar por decantación y se realizaron 4 nuevos lavados. A continuación, se añadió el sustrato enzimático (TMB: tetrametilbencidina), de manera que la enzima transforma el sustrato sobre el anticuerpo de detección produciéndose un cambio de color

(azul). Tras una incubación a temperatura ambiente protegiendo los pocillos de la luz, se añadió una solución “stop” que para la reacción, produciéndose un cambio de color de azul a amarillo. Con un espectrofotómetro de microplacas Multiskan SkyHigh (*Thermo Scientific*) se detectó el producto de la reacción enzimática, es decir, se determinó la densidad óptica (DO) de cada pocillo, leyendo la absorbancia a 450 nm en los siguientes 30 minutos. El software Skanlt 6.1.1. RE for Microplate Readers genera una curva estándar; siendo la función logística de cuatro parámetros (4 PL) la que proporciona el mejor ajuste de la curva estándar. Con la ecuación obtenida se calculó la concentración de proteína en las muestras control y en las muestras problema.

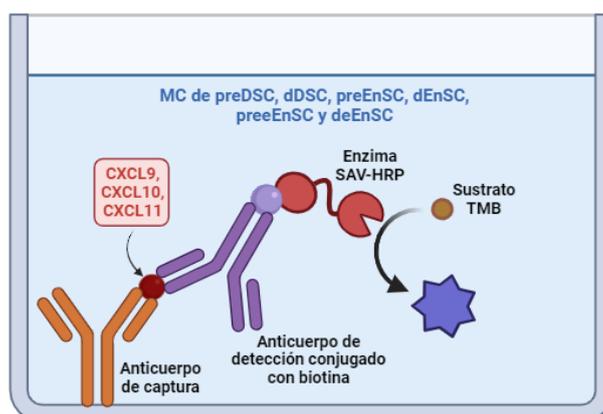


Ilustración 16. Esquema representativo del ELISA tipo sándwich. Imagen creada con el software BioRender.

11. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado o por cuadruplicado y los resultados aparecen representados como la media \pm SD (desviación estándar). En todos los casos, se emplearon al menos tres líneas de EnSC, DSC, eEnSC y MSC diferentes, tanto no decidualizadas como decidualizadas. Los medios condicionados también fueron obtenidos a partir del cultivo de, al menos, tres líneas celulares distintas. Los estudios de quimiotaxis y fenotipo de linfocitos y monocitos se realizaron a partir de la sangre de 10 donantes sanas (3 donantes diferentes en cada experimento).

Se empleó la prueba no paramétrica para dos muestras independientes U de Mann-Whitney, con el objetivo de comparar los efectos de la decidualización en el cambio en la morfología celular, la secreción de PRL y la actividad antitumoral. También se empleó para analizar la actividad contráctil de las preDSC.

Se empleó la prueba paramétrica para dos muestras independientes t de Student con el objetivo de comparar las diferencias en la quimiotaxis y en la expresión génica. Las comparaciones se realizaron mediante la prueba con la corrección de Welch para varianzas desiguales.

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 6 (*GraphPad Software*; San Diego, California, EEUU). Un p-valor inferior a 0,05 fue interpretado como estadísticamente significativo (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001).



RESULTADOS



1. Células deciduales estromales humanas

1.1. Características generales de las DSC

Las células deciduales estromales (preDSC) presentan una morfología alargada, similar a la de los fibroblastos, y tienen la capacidad de decidualizarse *in vivo* bajo los efectos de la P4 y otras hormonas ováricas o del embarazo. Durante este proceso de diferenciación, las DSC decidualizadas (dDSC) adquieren una morfología más redondeada y secretan PRL^{84,207,208}.

Con el objetivo de comprobar las características de las líneas de DSC establecidas, se analizó la morfología de la población celular y se estudió su capacidad para decidualizarse *in vitro*, como respuesta al tratamiento con P4 y AMPc. Los resultados mostraron que las DSC aisladas estaban compuestas por una población uniforme de células proliferantes que exhibían una morfología adherente de tipo fibroblástico. No se detectó PRL en los cultivos sin P4 y AMPc, por lo que se concluyó que estas líneas estaban constituidas por preDSC. No obstante, añadir estos factores decidualizantes al medio de cultivo resultó en un cambio a una morfología más redondeada y la secreción de PRL, por lo tanto, en la diferenciación a dDSC (**Figura 1A**).

Por otra parte, se analizó, por citometría de flujo, el fenotipo antigénico de las preDSC aisladas. El resultado del estudio de un panel de 36 antígenos mostró que más del 95% de células expresaban los marcadores CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, α -SMA, nestina, podoplanina y vimentina. Las células no expresaron CD15, CD19, CD31, CD34, CD45, CD62P, citoqueratina y HLA-DR. Los datos obtenidos confirman la pureza del cultivo de preDSC y la ausencia de células de origen hematopoyético (**Figura 1B**) (**Tabla 13**).

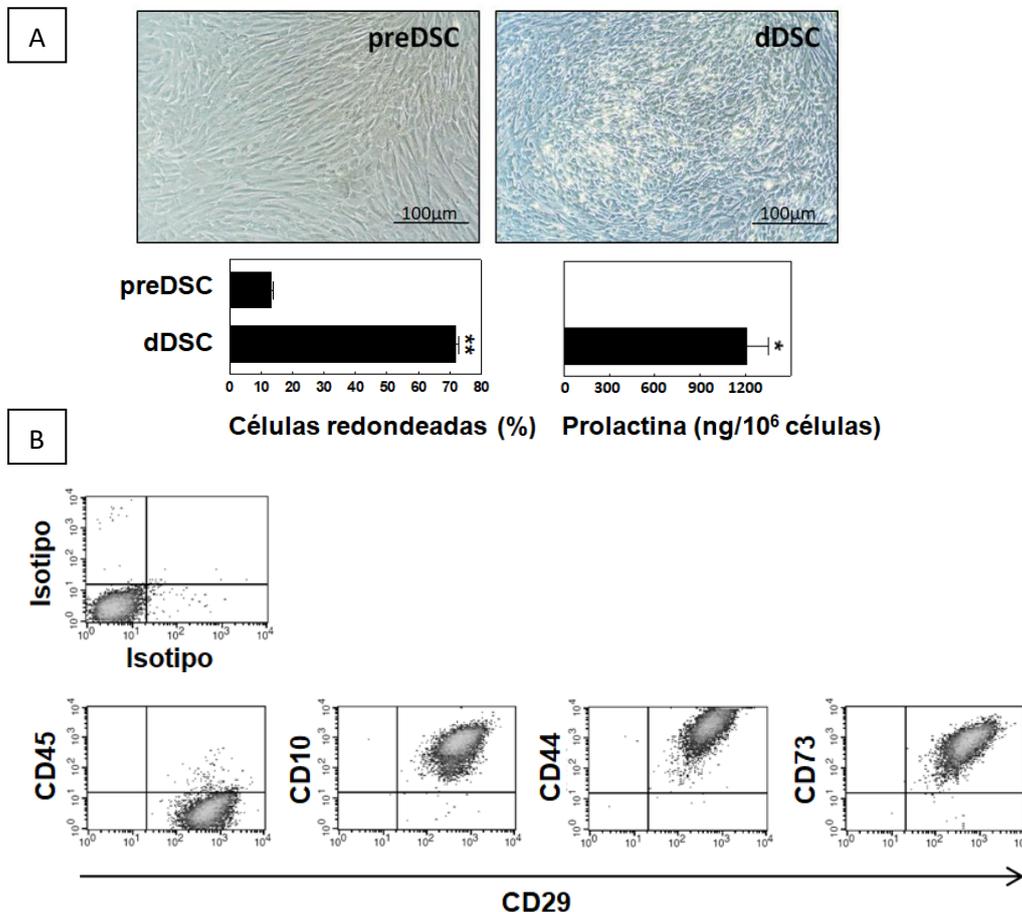


Figura 1. Características generales de líneas de preDSC. A) Decidualización de preDSC. Tras 14 días en cultivo con P4 y AMPc, las preDSC cambian su morfología fibroblástica a una más redondeada y secretan PRL. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo de aumento de 4x. Las barras representan el porcentaje de células redondeadas tras la cuantificación de áreas representativas (n = 3 por muestra) con ImageJ y la secreción de PRL, por tres líneas de preDSC (media ± SD). B) Análisis del fenotipo antigénico de una línea de preDSC por citometría de flujo (citogramas de un experimento representativo). El estudio se realizó con tres muestras independientes. (*P < 0,05; **P < 0,01).

Tabla 13. Expresión de antígenos, determinada por citometría de flujo, en líneas de preDSC y MSC de médula ósea obtenidas en las mismas condiciones. ND: no determinado; ^a**Negrita:** antígenos asociados a pericitos.

Antígeno	% Células positivas	
	MSC (n=7)	preDSC (n=10)
CD9	ND	>95
CD10	>95	>95
CD13^a	>95	>95
CD15	<1	<1
CD19	<1	<1
CD29	>95	>95
CD31	<1	<1
CD34	<1	<1
CD44^a	>95	>95
CD45	<1	<1
CD54	45-69	51-91
CD62P	<1	<1
CD73	>95	>95
CD80	ND	0-73
CD86	ND	0-79
CD90^a	>95	>95
CD105^a	>95	>95
CD106^a	0-10	0-21
CD140b^a	ND	67-84
CD146^a	68-75	67-92
CD271^a	0-8	10-26
AP^a	ND	72-85
α-SMA^a	>95	>95
BAFF	<1	52-66
CXCL12	ND	12-20
CXCL13	<1	20-32
Citoqueratina	ND	<1
HLA-DR	<1	<1
HLA-G	<1	7-30
MFG-E8^a	ND	37-57
Nestina^a	>95	70-95
OCT3/4	42-52	42-65
Podoplanina	>95	>95
STRO-1^a	7-48	36-63
Vimentina^a	ND	>95
SUSD2	21-35	32-60

1.2. DSC como células madre mesenquimales

1.2.1. Fenotipo antigénico compatible con MSC de médula ósea

Una vez analizado el fenotipo de las líneas de preDSC y teniendo en cuenta que la decidua humana (del primer trimestre de embarazo) contiene células madre mesenquimales multipotentes²⁰⁹, se buscó determinar si nuestras preDSC estaban relacionadas o derivaban de células madre mesenquimales. Para ello, se comparó el perfil fenotípico de las líneas de preDSC con el de células mesenquimales obtenidas de médula ósea (MSC)²¹⁰, realizando un extenso análisis por citometría de flujo.

Dicho estudio confirmó que ambos tipos de células presentan un fenotipo equivalente. Más del 95% de las células de las líneas de preDSC y MSC expresaban CD10, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, α -SMA, nestina y podoplanina; por otra parte, se vio ausencia de expresión de los marcadores CD15, CD19, CD31, CD34, CD45, CD62P y HLA-DR. Las preDSC expresaron el antígeno STRO-1 que es un marcador característico de precursores estromales de médula ósea y que relaciona ambos tipos de células, como anteriormente había comprobado nuestro grupo de investigación⁹⁹. Es por esto que el perfil de expresión de antígenos era equivalente al observado en las líneas de MSC de médula ósea. No obstante, se observó que las MSC no expresaban BAFF y CXCL13, los cuales sí fueron expresados por preDSC²¹¹. Las líneas de preDSC también fueron positivas para los marcadores de eMSC¹⁸ CD140b, CD146 y SUSD2 (**Tabla 13**).

1.2.2. Funciones asociadas a MSC. Formación de colonias y diferenciación mesenquimal

Tal como se mostró en el anterior apartado, las preDSC presentan un fenotipo compatible con el de MSC de médula ósea (**Tabla 13**). Dicho fenotipo antigénico, junto a la adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar y la capacidad de diferenciación *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos, son propiedades que, en conjunto, se encuentran dentro de los criterios mínimos propuestos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) para definir las MSC humanas²³.

Es por esto que se estudió, a continuación, mediante RT-PCR, la expresión en preDSC de los siguientes marcadores de células madre pluripotentes: OCT-4, NANOG y ABCG2²¹⁰. Estos también son marcadores expresados por MSC fetales²¹². La detección de los transcritos de OCT-4 mediante RT-PCR es un reto, ya que fácilmente se inducen artefactos como resultado de la amplificación de muchos transcritos similares a OCT-4, procedentes de la expresión de pseudogenes procesados y no procesados. Se emplearon dos “primers forward” específicos de OCT-4 (OCT-4FP y OCT-4F), que también amplifican pseudogenes. OCT-4FP y OCT-4F fueron positivos en las 4 líneas de preDSC estudiadas. Estas también expresaron NANOG y ABCG2 (**Figura 2A**). Por otra parte, la eficacia de formación de colonias de las líneas de preDSC osciló entre un 4 y un 15% (**Figura 2B**). Además, en adecuadas condiciones de cultivo, las preDSC se diferenciaron en células procedentes de tres linajes mesenquimales distintos: adipocitos, osteoblastos y condrocitos. Tal como se esperaba, los adipocitos expresaron “peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2” (PPAR γ 2) y la fosfatasa alcalina (AP); los condrocitos expresaron colágeno tipo II y AP; y los osteocitos fueron positivos para osteopontina, colágeno tipo II y AP. Osteopontina y AP también fueron positivas en líneas de preDSC no diferenciadas (**Figura 2C**).

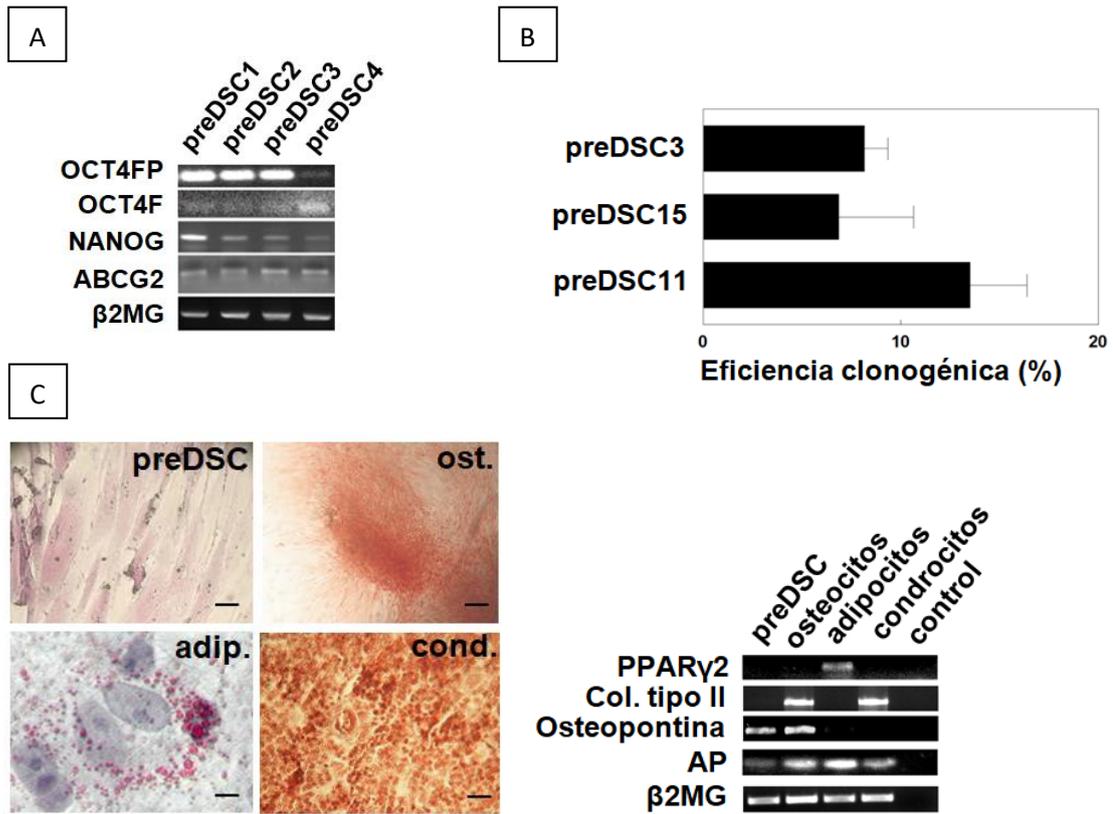
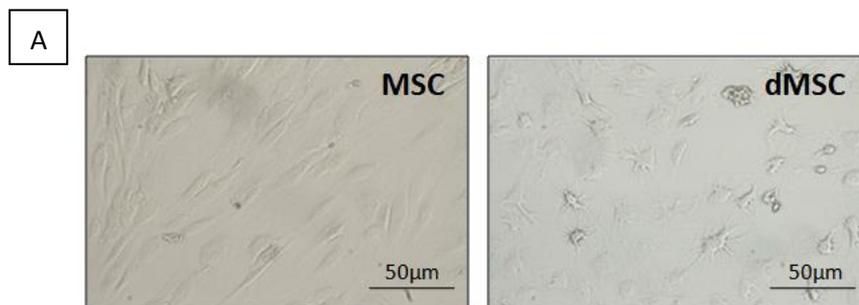


Figura 2. Características de MSC presentadas por líneas de preDSC. A) Detección por RT-PCR de marcadores de células madre pluripotentes (OCT-4, NANOG, ABCG2) en cuatro líneas de preDSC. B) Eficiencia de formación de colonias en tres líneas de preDSC. Las barras representan la media \pm SD de tres determinaciones independientes. C) Diferenciación mesenquimal de una línea de preDSC. PreDSC no diferenciadas, preDSC diferenciadas a osteocitos (ost.), adipocitos (adip.) y condrocitos (cond.). La diferenciación se comprobó con tinción de alizarina (ost.), Oil Red O (adip.) y safranina O (cond.). Barra de escala: 50 μ m. Los marcadores moleculares de diferenciación se detectaron mediante RT-PCR: PPAR γ 2 (adip.), colágeno tipo II (cond.), osteopontina y AP (ost.). La β -2 microglobulina (β 2MG) se usó como control de carga. Para estos experimentos se realizaron 4 réplicas.

1.2.3. Decidualización de preDSC y MSC

Debido a la estrecha relación existente entre las preDSC y las MSC de médula ósea y tras estudiar el perfil fenotípico, se comparó su capacidad para diferenciarse en respuesta a P4 y AMPc. Para ello, también se analizaron líneas de MSC cultivadas en condiciones de decidualización²¹³. Los resultados obtenidos mostraron que, aunque las MSC cambian su morfología fibroblástica hacia una más redondeada (**Figura 3A**) y expresan PRL a nivel de ARNm, no se detectó secreción de este factor a nivel proteico (**Figura 3B**).



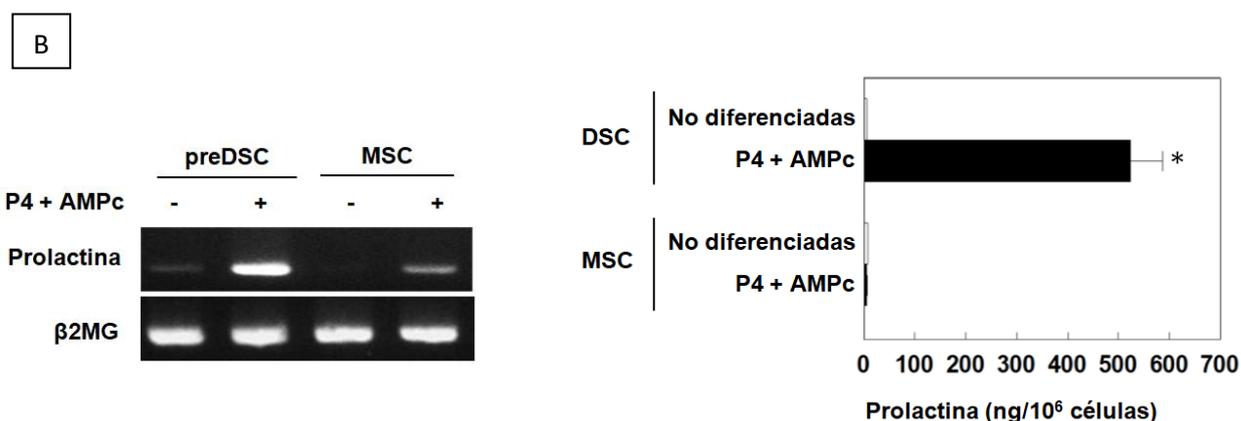


Figura 3. Análisis comparativo de la decidualización de preDSC y MSC. A) Decidualización de MSC. Tras 14 días en cultivo con P4 y AMPc, las MSC cambian su morfología fibroblástica a una más redondeada. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo de aumento de 10x. B) Determinación por RT-PCR y ELISA de la producción de prolactina por preDSC y MSC tras 14 días de tratamiento con P4 y AMPc. Se empleó la β 2MG como gen de expresión constitutiva (“housekeeping gen”). Se muestra un experimento representativo. En cuanto a la determinación por ELISA de la producción de PRL, las barras de error muestran la media \pm SD de tres experimentos independientes con 3 diferentes líneas celulares. (*P < 0,05).

1.3. DSC como células perivasculares

1.3.1. Características de pericitos de las preDSC

Una vez demostrada la relación existente entre preDSC y MSC de médula ósea, nos planteamos el estudio de las características de células perivasculares en preDSC²⁰⁸. Investigaciones previas han demostrado la localización perivascular de las MSC, relacionando directamente estas células con los pericitos¹⁹⁹. Los pericitos son células contráctiles que rodean las células endoteliales microvasculares y que tienen un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis vascular. Para llevar a cabo sus funciones, los pericitos producen factores angiogénicos y tienen propiedades contráctiles, fagocíticas, quimiotácticas e inmunoreguladoras^{94,96,97}.

Inicialmente se estudiaron una serie de marcadores de pericitos en preDSC. Concretamente, de los 35 antígenos estudiados por citometría de flujo, 14 de ellos eran marcadores de pericitos (CD13, CD44, CD90, CD105, CD106, CD140b, CD146, CD271, AP, α -SMA, MFG-E8, Nestina, STRO-1 y Vimentina)¹⁹⁹. El elevado porcentaje de células positivas para marcadores como α -SMA, CD140b y CD146 nos ayudaron a identificar nuestras preDSC como pericitos (**Tabla 13**).

Las líneas de preDSC estudiadas también mostraron otras características típicas de células perivasculares, tales como la expresión de factores angiogénicos y la actividad contráctil. Por un lado, las células expresaron los siguientes factores angiogénicos: angiopoyetina-1 (ANGPT1), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento placentario (PGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (**Figura 4A**). Además, por microscopía de fluorescencia se pudo comprobar que las preDSC expresaban la proteína α -SMA, la cual es uno de los marcadores más característicos de pericitos y confiere a las células actividad contráctil (**Figura 4B**). Por otra parte, los ensayos de contracción del colágeno mostraron que en presencia de la citoquina proinflamatoria TNF, que se asocia al aborto, las preDSC experimentaron contracción; mientras que en presencia de IL-10 y P4, que favorecen el

embarazo, las células no experimentaban contracción y se mantenían en estado relajado (**Figura 4B**).

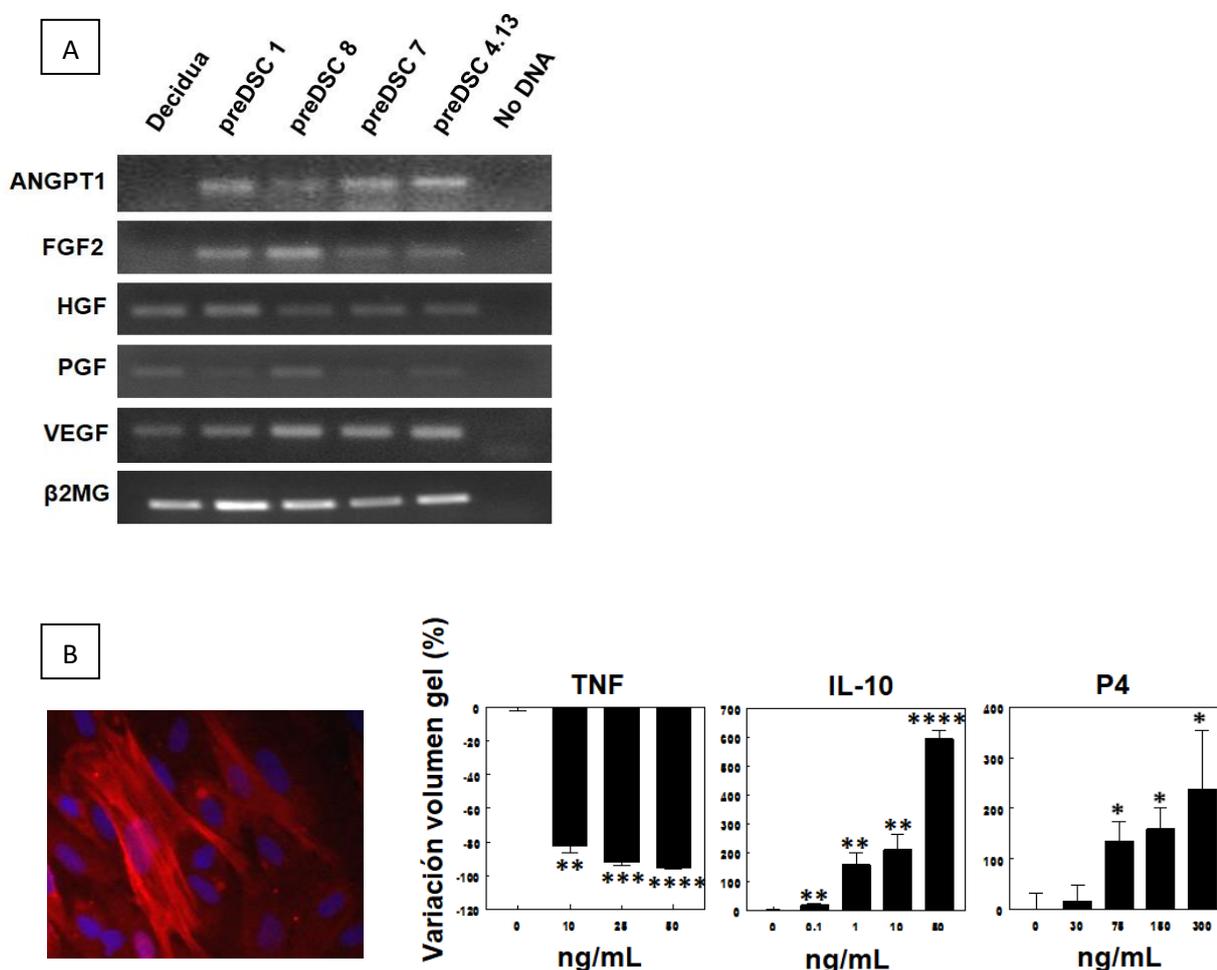


Figura 4. Características de pericitos de líneas de preDSC. A) Detección de factores angiogénicos por RT-PCR en líneas de preDSC. La expresión de ANGPT1, FGF2, HGF, PGF y VEGF fue analizada en decidua y en 4 líneas independientes de preDSC. B) La proteína α -SMA se detectó por microscopía de fluorescencia con un anticuerpo anti- α -SMA-Cy3 en fibras de estrés de preDSC (color rojo). El núcleo fue teñido con DAPI (color azul). El TNF indujo contracción, mientras que IL-10 y P4 indujeron relajación en las células, en ensayos de contracción del colágeno. Los datos se muestran como la variación porcentual en volumen de la matriz de gel de colágeno \pm SD en las preDSC tratadas con citoquinas o con P4, en comparación con las preDSC no tratadas. La fórmula empleada es la siguiente: variación del volumen de gel (%) = [(volumen con preDSC tratadas - volumen con preDSC no tratadas)/volumen con preDSC no tratadas] x 100. Los valores negativos indican contracción celular, mientras que los positivos indican relajación. (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001).

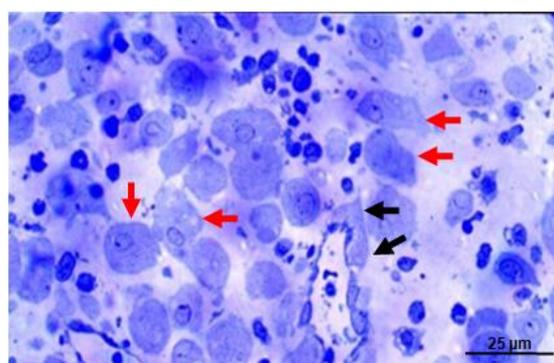
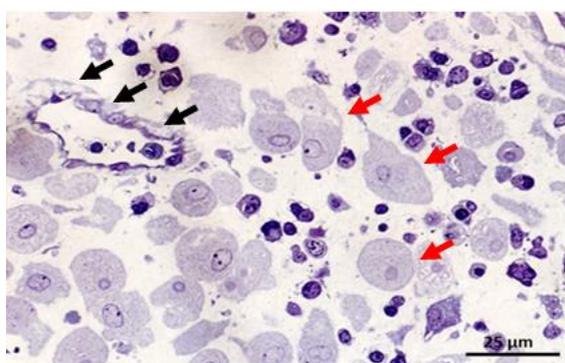
1.3.2. Localización perivascular de las preDSC

Se ha observado que las preDSC humanas se localizan *in vivo* alrededor de los vasos sanguíneos y, bajo el efecto hormonal, dichas células se diferencian y migran hacia el estroma, durante la fase secretora tardía y en el endometrio gestante⁵³. Para determinar la correspondencia de nuestras líneas de preDSC con las preDSC perivasculares *in vivo*, se realizaron los siguientes experimentos en cortes de decidua^{208,214}.

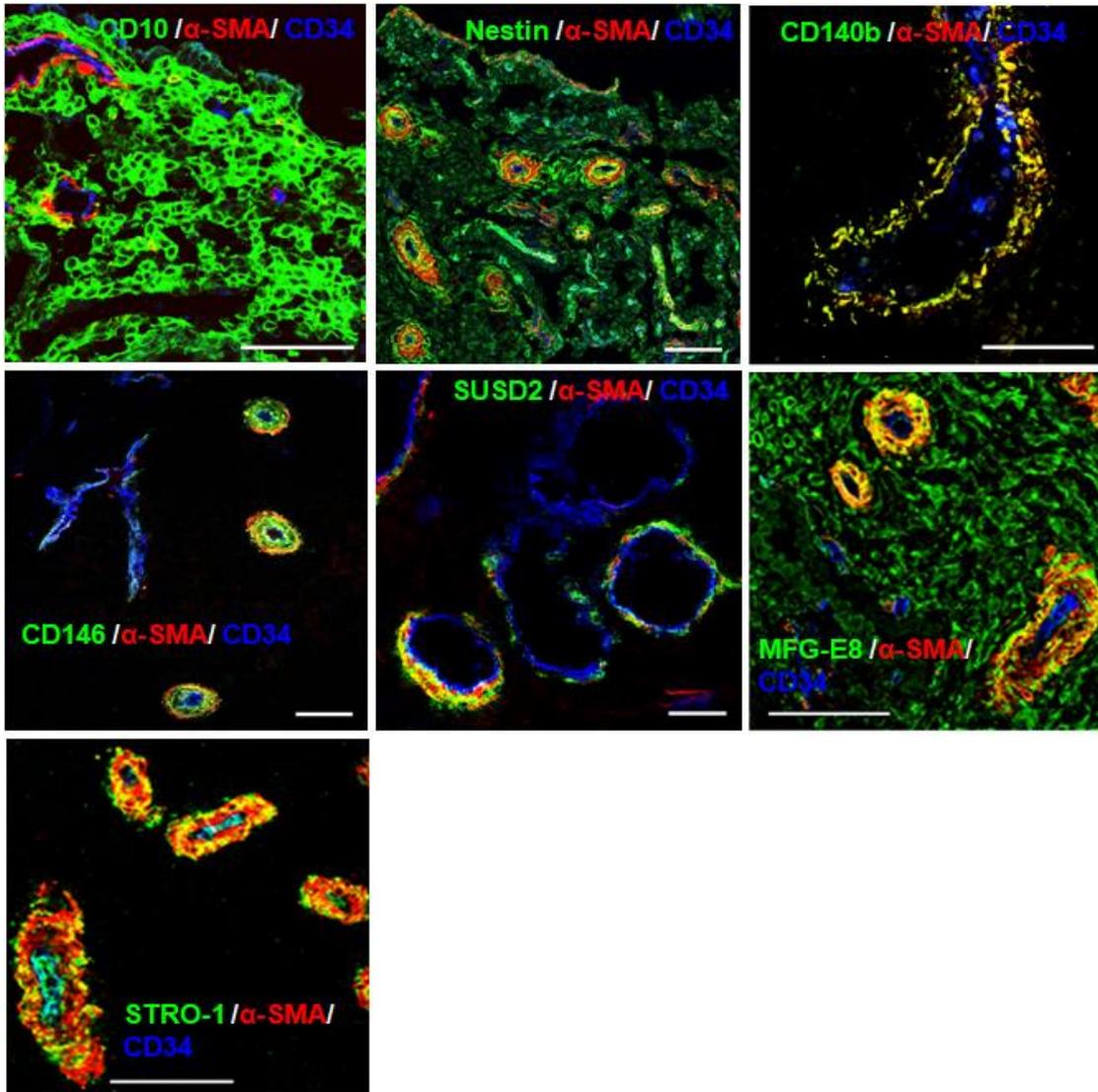
En estas secciones, las preDSC mostraban una morfología fibroblástica perivascular, mientras que se pudo identificar a las dDSC por su morfología redondeada, gran tamaño y también por su localización en el espacio extravascular (**Figura 5A**).

En cuanto al fenotipo, se observó, por microscopía confocal, que en su localización perivascular, las preDSC expresaban CD10, marcador de las líneas de preDSC, junto con los antígenos de MSC/pericitos, tales como α -SMA, nestina, CD140b, CD146, SUSD2, MFG-E8 y STRO-1. La expresión de CD10 fue similar tanto en las preDSC perivasculares como en las dDSC extravasculares. Sin embargo, se observó menor expresión de los marcadores de MSC/pericitos en las dDSC localizadas en la zona extravascular (**Figura 5B**). Se detectó α -SMA, un antígeno altamente expresado por las líneas de preDSC, principalmente alrededor de los vasos sanguíneos y mucho menos intensamente en células extravasculares de las secciones de decidua humana. La α -SMA se colocalizó con nestina, CD140b, CD146, SUSD2, MFG-E8 y STRO-1 (todos ellos marcadores de pericitos expresados por las líneas preDSC) en células perivasculares, pero no en zonas extravasculares (**Figura 5B**). Las células perivasculares también expresaron podoplanina (**Figura 5C**), una proteína detectada en las líneas de preDSC. La podoplanina se colocalizó con CD146 y MFG-E8 en las células perivasculares deciduales (**Figura 5C**). Estos resultados confirman que las líneas de preDSC *in vitro* representan a las preDSC perivasculares y se encuentran estrechamente relacionadas con los pericitos.

A



B



C

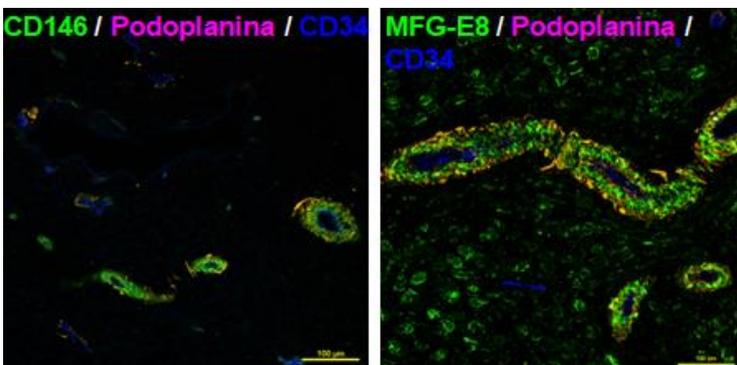


Figura 5. Células perivasculares deciduales. A) Decidua humana crioseccionada y teñida con azul de toluidina; se muestran las preDSC (flechas negras) y las dDSC decidualizadas (flechas rojas). Barras de escala: 25 μ m. B) Las células perivasculares α -SMA+ coexpresan (amarillo) CD10, nestina, CD140b, CD146, SUSD2, MFG-E8 y STRO-1. Las células α -SMA+ de los vasos, que no coexpresan estos antígenos, corresponden a células musculares lisas. Las células endoteliales son CD34+. Barras de escala: 100 μ m. C) Las células perivasculares coexpresan (rosa) podoplanina, CD146 y MFG-E8. Barras de escala: 100 μ m. Este experimento se realizó en cuatro muestras independientes.

1.4. Clonos de DSC

Con el objetivo de descartar que las características de pericitos y MSC presentadas por las preDSC se debieran a una mezcla de poblaciones celulares, se obtuvieron tres clones de diferentes líneas de preDSC^{208,210}. Se observó que en ausencia de P4 y AMPc, estos clones presentaban una morfología fibroblástica y no secretaban PRL. No obstante, en cultivo con dichos factores, los clones adquirirían una morfología redondeada y secretaban PRL, demostrando su capacidad de decidualizarse (**Figura 6**). Bajo adecuadas condiciones de cultivo, los clones se diferenciaron a adipocitos, condrocitos y osteoblastos (**Figura 6**). De esta manera, se pudo observar que el mismo tipo de célula podía experimentar diferenciación decidual y mesenquimal. Además, los clones de preDSC presentaron un fenotipo equivalente al de las líneas de preDSC, compatible con el de MSC de médula ósea y expresaron antígenos de pericitos (**Tabla 14**). Estos resultados demostraron que tanto las características de las preDSC como las de los pericitos y MSC se asocian con el mismo tipo de célula.

Tabla 14. Expresión de antígenos por tres clones de preDSC, determinada por citometría de flujo.

^a**Negrita:** antígenos asociados a pericitos.

Antígeno	% Células positivas		
	Clon 1	Clon 2	Clon 3
CD10	>95	>95	>95
CD29	>95	>95	>95
CD34	<1	<1	<1
CD44^a	>95	>95	>95
CD45	<1	<1	<1
CD73	>95	>95	>95
CD140b^a	20-33	51-65	33-62
CD146^a	73-90	68-87	>95
α-SM actina^a	>95	>95	>95
HLA-G	7-21	12-30	9-32
SUSD2	22-53	37-68	50-63

RESULTADOS

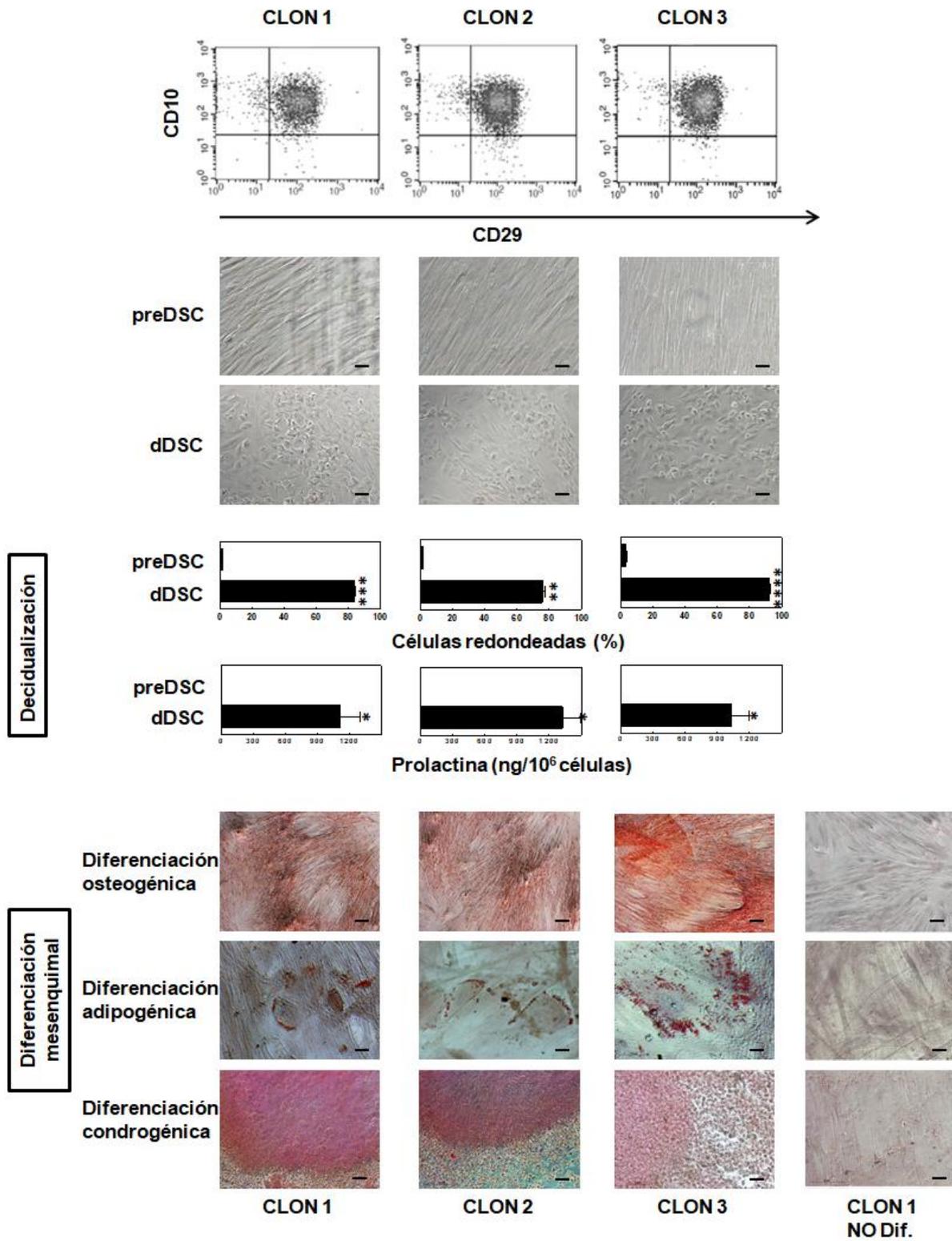


Figura 6. Características de clones de preDSC. Los clones estudiados presentaron el mismo fenotipo antigénico que las líneas de preDSC (se muestran citogramas de la doble expresión de CD10 y CD29). Se decidualizaron en presencia de P4 y AMPc, cambiando su morfología fibroblástica a una más redondeada y secretando PRL. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo de aumento de 10x. Barra de escala: 50 μ m. Los gráficos de barras muestran el porcentaje de células redondas y la secreción de PRL para cada uno de los tres clones (media \pm SD de tres determinaciones independientes por clon). Los clones se diferenciaron en osteoblastos, condrocitos y adipocitos. La diferenciación mesenquimal se determinó con tinción de alizarina (osteogénica), tinción Oil Red O (adipogénica) y safranina O (condrogénica). Barra de

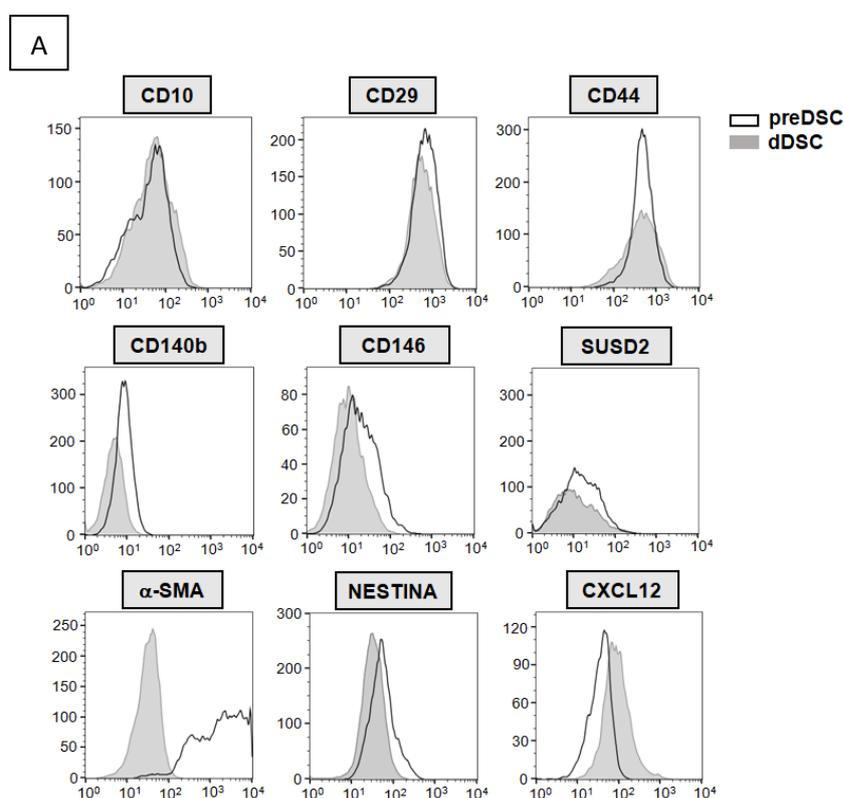
escala: 50 μ m. Estos experimentos se realizaron a partir de 4 réplicas independientes. (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001).

1.5. Decidualización de preDSC

Durante la fase secretora del ciclo endometrial y el embarazo, las células del estroma endometrial/decidual abandonan su localización perivascular hacia una zona extravascular, cambian su morfología y tamaño, secretan PRL y otros factores como IL-15^{53,207}. Por lo tanto, este proceso conocido como decidualización induce cambios morfológicos, funcionales y de localización en las preDSC. En base a ello, el siguiente objetivo se centró en el estudio de variaciones inducidas por la decidualización en las características de nuestras líneas de preDSC²¹⁴.

1.5.1. Comparación del fenotipo de preDSC y dDSC

Anteriormente habíamos comprobado en los estudios de microscopía confocal que las dDSC, que han abandonado su localización alrededor de los vasos sanguíneos, presentan una menor expresión de los marcadores de MSC/pericitos (α -SMA, nestina, CD140b, CD146, SUSD2, MFG-E8 y STRO-1) que las preDSC (**Figura 5B**). Los resultados de los experimentos *in vitro* fueron equivalentes, es decir, nuestras líneas de preDSC experimentaron los mismos cambios en la expresión de antígenos detectados *in vivo*. No se obtuvieron diferencias en la expresión de CD10, CD29 y CD44 en las dDSC en comparación con las preDSC. No obstante, la expresión de CD140b, CD146, SUSD2, α -SMA y nestina sí disminuyó de manera significativa en las dDSC. También se observó que la expresión de la quimioquina con actividad angiogénica CXCL12²¹⁵ aumentó significativamente (**Figuras 7A y 7B**). Además, se vio que tiempos más largos de decidualización se relacionaban con un mayor descenso de la intensidad media de fluorescencia de la α -SMA (**Figura 7C**).



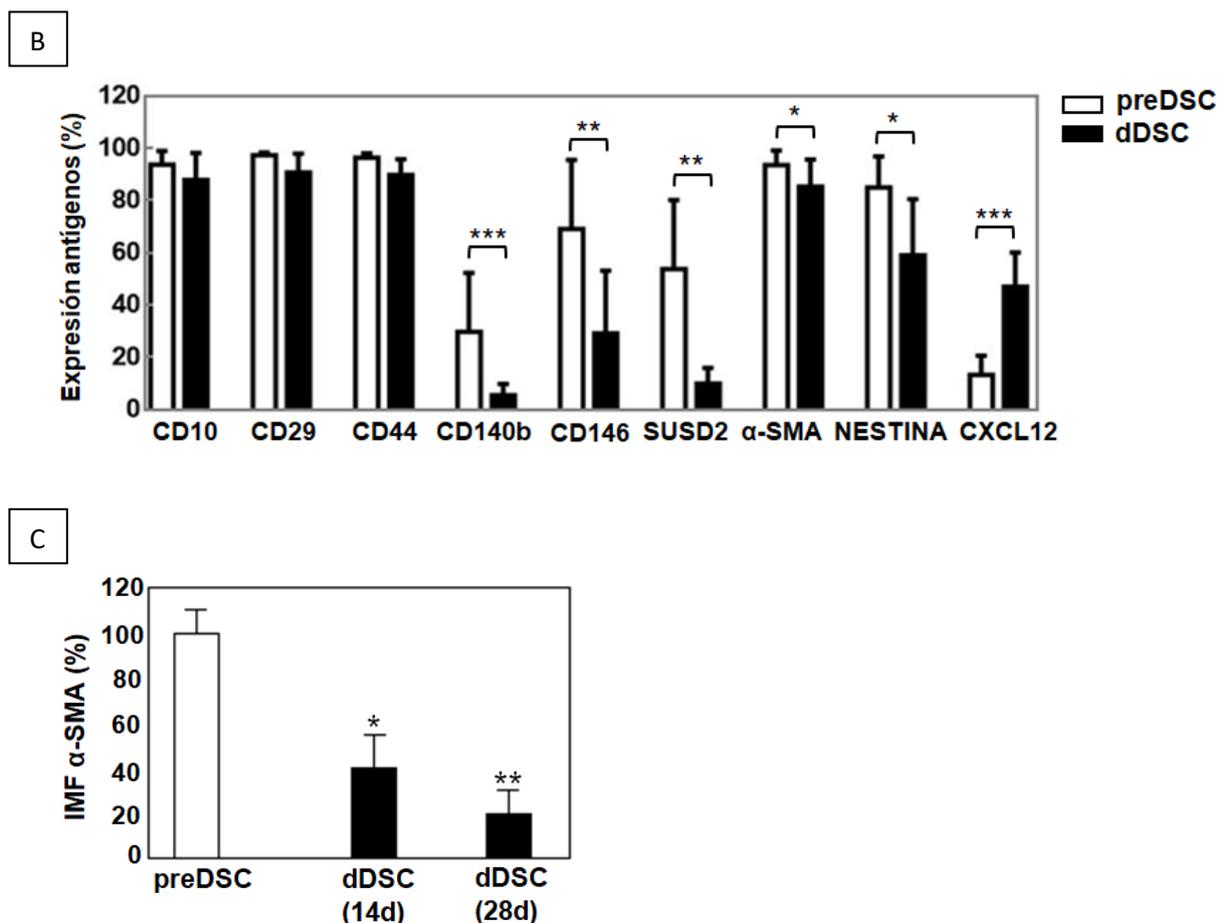


Figura 7. Fenotipo antigénico de líneas de DSC no decidualizadas (preDSC) y decidualizadas (dDSC). A) Histogramas que muestran la expresión de los antígenos CD10, CD29, CD44, CD140b, CD146, SUSD2, α-SMA, nestina y la quimioquina CXCL12 en una línea representativa de DSC. B) Las barras representan la media del porcentaje de células que expresan cada antígeno ± SD. C) Las barras representan la media para la intensidad de fluorescencia (IMF) correspondiente al marcador α-SMA. Los experimentos se realizaron con 4 muestras diferentes de DSC. Las células decidualizadas fueron tratadas con P4 y AMPc durante 14 días. (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001).

1.5.2. Expresión y secreción de citoquinas por preDSC y dDSC

Las DSC tienen una función muy importante en la regulación del desarrollo normal de un embarazo debido a su capacidad inmunoreguladora. Estas células secretan citoquinas inmunoreguladoras y quimioquinas que permiten la llegada de leucocitos desde sangre periférica hacia la decidua. La localización perivascular de las preDSC favorece el control de la quimiotaxis de células T, uNK y monocitos. Los leucocitos activados también secretan citoquinas que ayudan a regular el microambiente de la decidua²¹⁶.

Hasta la fecha, se han realizado estudios en modelo murino que señalan que, durante el embarazo, en las DSC se inhibe la expresión de quimioquinas que atraen hacia la decidua células T activadas con actividad proabortígena, fenómeno que parece estar relacionado con la decidualización. Este silenciamiento de quimioquinas en la decidua constituye un mecanismo de tolerancia inmunológica materno-fetal⁸¹.

Partiendo de estos resultados previos, analizamos este fenómeno en líneas de preDSC y dDSC humanas y comprobamos si existen diferencias en la expresión del ARNm de una serie de

citoquinas y quimioquinas entre ambos tipos de células. Para ello estudiamos, mediante PCR, la expresión de los siguientes factores: PRL; IL-6; IL-10; IL-15; PR; LIF; el ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL); las quimioquinas con motivo CC: CCL2, CCL5, CCL7, CCL19 y CCL21; las quimioquinas con motivo CXC: CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL14; y la quimioquina con motivo CX₃C: CX₃CL₁.

Pudimos comprobar que en dDSC hay una expresión significativamente mayor que en preDSC de los genes relacionados directamente con el proceso de decidualización^{208,214,217}, como PRL, IL-15, PR, CXCL12 y CXCL14; también hay una mayor expresión de IL-10, LIF, RANKL, CCL7, CCL19, CXCL8 y CX₃CL₁ (**Figura 8A**). No obstante, en relación a la expresión de quimioquinas que atraen células T activadas, los resultados obtenidos indican que preDSC y dDSC no expresan CXCL9 y que hay una disminución significativa de la expresión de CXCL10 y CXCL11 en las dDSC respecto a las preDSC (**Figuras 8A y 8B**). Estas quimioquinas regulan la quimiotaxis de linfocitos al actuar como ligando del receptor CXCR3 expresado por células Th1, Tc y células NK⁸¹. De esta manera, la decidualización de nuestras líneas de DSC inhibe la expresión de quimioquinas que atraen hacia la decidua a células T con actividad proabortígena.

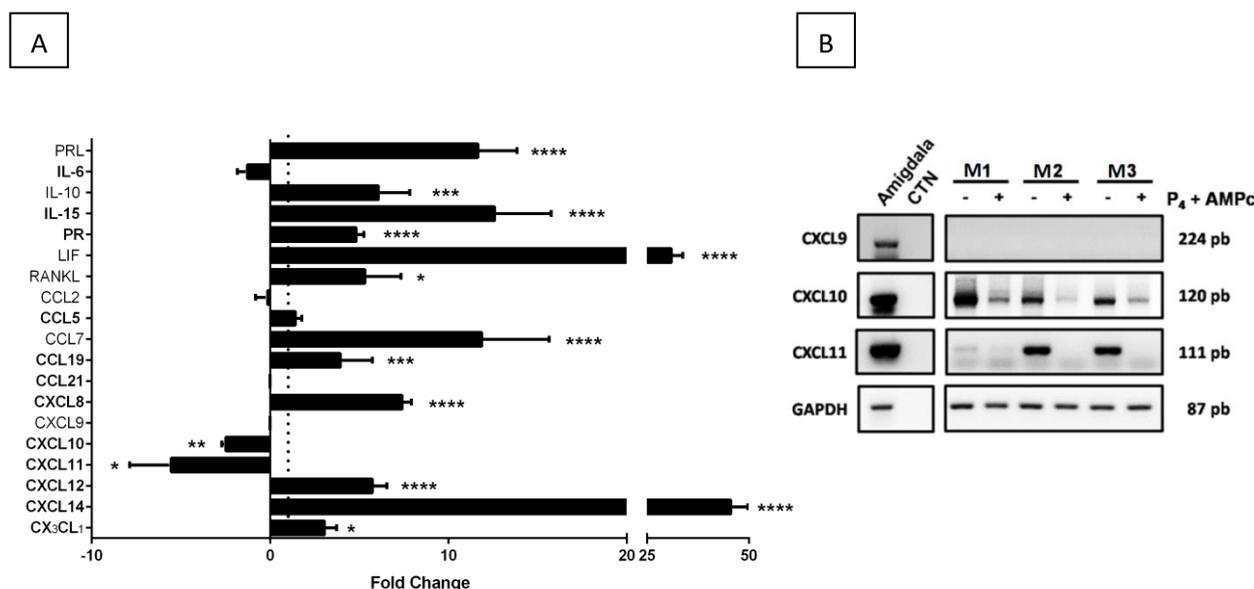
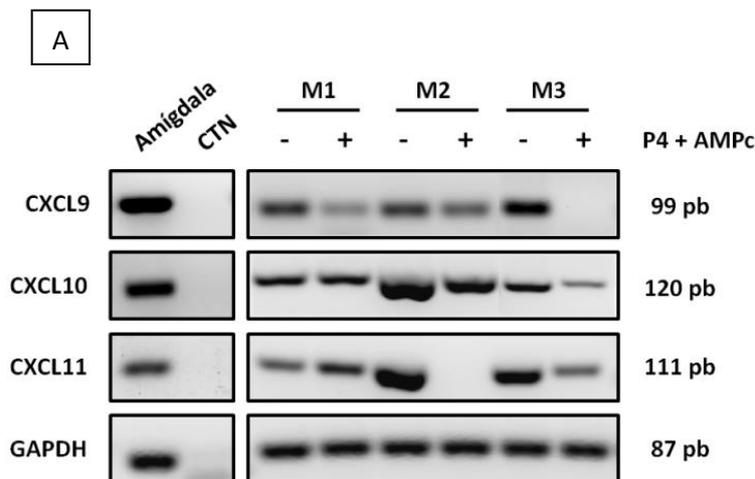


Figura 8: Efecto de la decidualización (14 días) en la expresión de citoquinas por preDSC y dDSC. A) Fold Change de los niveles de expresión de ARNm para los distintos factores estudiados. Los genes estudiados por RT-PCR (convencional) fueron los siguientes: PRL, IL-10, LIF, RANKL, CCL2, CCL7 y CXCL9. Los genes estudiados por qPCR fueron los siguientes: IL-6, IL-15, PR, CCL5, CCL19, CCL21, CXCL8, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL14 y CX₃CL₁. En la RT-PCR, los valores de intensidad de banda se normalizaron respecto a los obtenidos para el gen de expresión constitutiva GAPDH (“housekeeping gene”). Para obtener el Fold Change, los valores de intensidad de banda normalizados para dDSC se relativizaron frente a los de preDSC. En la qPCR, los valores de CT (“cycle threshold”) para cada muestra se normalizaron respecto a los obtenidos para el gen control de expresión constitutiva GAPDH y los resultados se expresaron como Fold Change. Los valores de Fold Change inferiores a 1 se representaron con la fórmula NFC (“Negative Fold Change”) = -1/FC. Las barras representan la media \pm SD. Los experimentos se realizaron a partir de 5 muestras independientes. (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001). B) Se muestra la expresión de CXCL9, CXCL10, CXCL11 y GAPDH por RT-PCR en tres líneas celulares (M1: muestra 1; M2: muestra 2; M3: muestra 3), tanto en preDSC como en dDSC. Las células decidualizadas fueron tratadas con P4 y AMPc durante 14 días.

Los resultados anteriores se obtuvieron en DSC decidualizadas durante un periodo de tiempo de 14 días; no obstante, pensamos en la necesidad de repetir este estudio en células decidualizadas durante menos tiempo, concretamente, 8 días de tratamiento con P4 y AMPc. Esto fue conveniente ya que los MC empleados posteriormente en los estudios de migración de células sanguíneas fueron de 8 días. Además, nuestro grupo de investigación ha comprobado que es en estos MC en los que se obtienen los porcentajes de migración celular más elevados (*datos no mostrados*) y, en ese caso, no hay un elevado número de células que hayan entrado en apoptosis; ya que la decidualización prolongada promueve la producción de factores solubles capaces de inducir apoptosis en las propias células deciduales o endometriales estromales¹⁰³.

También es importante destacar que, llegados a este punto, y ya que anteriormente no se detectó expresión del ARNm de la quimioquina CXCL9, pensamos en la necesidad de realizar el siguiente estudio con dos nuevos oligonucleótidos. Los resultados obtenidos (**Figura 9A**) muestran claramente una equivalencia en las tres quimioquinas estudiadas, es decir, CXCL9, CXCL10 y CXCL11. Tiene lugar una disminución de la expresión de dichas quimioquinas en las dDSC respecto a las preDSC.

Una vez estudiadas a nivel transcripcional, realizamos un análisis de los niveles de proteína en los MC de preDSC y dDSC (**Figura 9B, 9C y 9D**). Se encontró que hay una secreción más elevada de CXCL9 por ambos tipos de células que de CXCL10 y CXCL11; de hecho, en el caso de esta última quimioquina, los niveles de proteína son inferiores a 17 pg/mL en todas las muestras estudiadas. Por otra parte, tal y como habíamos comprobado con el análisis de la expresión del ARNm, en los tres casos tiene lugar un descenso significativo de la secreción proteica en las dDSC respecto a las preDSC. De esta manera, se pudo comprobar que la decidualización de nuestras líneas de DSC inhibe la secreción de quimioquinas que atraen hacia la decidua a células T con actividad proabortígena.



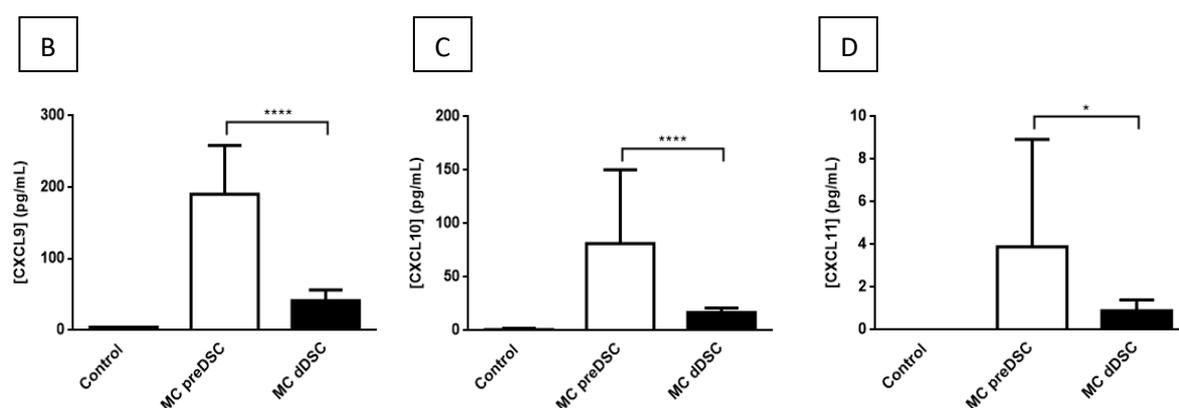


Figura 9: Efecto de la decidualización (8 días) en la expresión de citoquinas por preDSC y dDSC. A) Se muestra la expresión de CXCL9, CXCL10, CXCL11 y GAPDH por RT-PCR en tres líneas celulares (M1: muestra 1; M2: muestra 2; M3: muestra 3), tanto en preDSC (-) como en dDSC (+). Las células decidualizadas fueron tratadas con P4 y AMPc durante 8 días. Como gen de expresión constitutiva se usó la GAPDH (“housekeeping gene”). Se muestran los niveles (pg/mL) de las quimioquinas CXCL9 (B), CXCL10 (C) y CXCL11 (D) secretadas por preDSC y dDSC al MC. Como Control (ausencia de proteína) se empleó el medio de cultivo Opti-MEM. Las barras representan la media \pm SD. Los experimentos se llevaron a cabo a partir de 4 muestras independientes y se realizaron triplicados de cada una de ellas. (*P < 0,05; ****P < 0,0001).

1.5.3. Expresión de factores angiogénicos por preDSC y dDSC

Anteriormente, habíamos estudiado la expresión positiva en las líneas de preDSC de una serie de factores angiogénicos: ANGPT1, FGF2, HGF, PGF y VEGF (**Figura 4A**). A continuación, pudimos comprobar que la decidualización no modificó la expresión de los factores angiogénicos HGF, FGF2, ANGPT1 o VEGF en las dDSC, aunque la expresión de PGF sí se incrementó significativamente (**Figura 10A y 10B**).

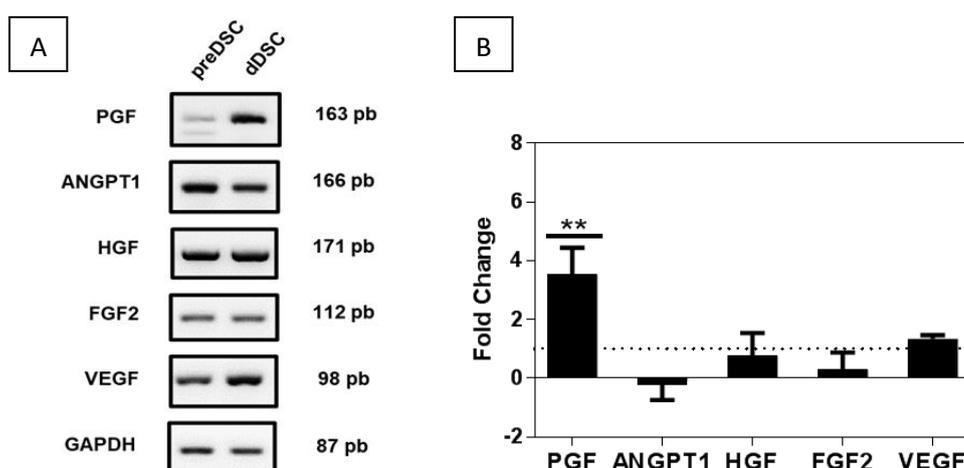


Figura 10. Efecto de la decidualización en la expresión de factores angiogénicos. A) Se muestra la expresión de los factores angiogénicos PGF, ANGPT1, HGF, FGF2 y VEGF por RT-PCR en una línea de DSC, tanto en preDSC como en dDSC. Las células decidualizadas fueron tratadas con P4 y AMPc durante 14 días. B) Fold Change de los niveles de expresión de ARNm para cada factor. Los valores de intensidad de banda se normalizaron respecto a los obtenidos para el gen de expresión constitutiva (“housekeeping gene”). Para obtener el Fold Change, los valores de intensidad de banda normalizados para dDSC se relativizaron frente a los de preDSC. Los experimentos se realizaron a partir de 4 muestras independientes. (**P < 0,01).

1.5.4. Efecto antitumoral de preDSC y dDSC

Actualmente hay numerosas investigaciones que aportan datos dispares sobre el efecto antitumoral que tienen las MSC. Se ha observado que, dependiendo del tipo de tumor, estas células pueden estimular o inhibir el crecimiento de las células tumorales y la invasión a otros tejidos²¹⁸. Por otra parte, hay estudios que señalan que MSC derivadas de la gelatina de Wharton (Wharton’s jelly) del cordón umbilical secretan factores que inducen apoptosis en líneas tumorales y tienen propiedades inmunoregulatoras^{219,220,221}.

Es por esto que buscamos estudiar, mediante citometría de flujo, el efecto del MC de preDSC y del MC de dDSC sobre la apoptosis en diferentes líneas celulares tumorales²¹⁴. Las células se incubaron con los MC durante 4 días. Se observó que el MC de dDSC inducía la apoptosis de manera significativa (en comparación con el medio Control) en 4 líneas celulares tumorales, tales como A375 (melanoma), Raji (linfoma de células B), HeLa (adenocarcinoma cervical humano) y SKBR3 (adenocarcinoma de mama humano). La línea linfocítica tumoral Jurkat y la línea monocítica tumoral THP-1 no se vieron afectadas. En la línea de carcinoma Cal33 también se observó un aumento de la apoptosis con el MC de dDSC, pero este no fue estadísticamente significativo en comparación con el valor de apoptosis en el medio Control. Por otra parte, tal como nuestro grupo había demostrado anteriormente¹⁰³, el MC de dDSC indujo apoptosis sobre preDSC, pero el MC de preDSC no tuvo efecto. En relación al efecto sobre linfocitos, se observó que tanto el MC de preDSC como el MC de dDSC protegieron a los PBL en reposo de la apoptosis espontánea²¹¹. Los PBL activados no experimentaron apoptosis ni previamente a la incubación con los MC ni tras la incubación con estos (**Figura 11**). En conjunto, estos resultados muestran que los factores secretados por las dDSC inducen apoptosis en las líneas de preDSC y en algunas líneas celulares tumorales; pero no tienen el mismo efecto en PBL, llegando incluso a proteger a los PBL en reposo de la apoptosis espontánea.

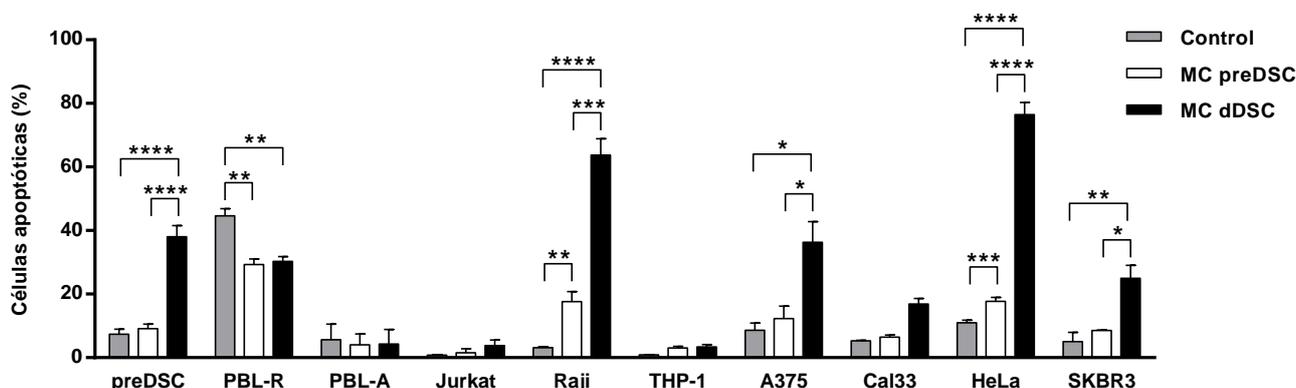


Figura 11. Actividad antitumoral de los factores secretados por preDSC y dDSC. Se muestra el efecto del medio Control (Opti-MEM) y de los medios condicionados de preDSC (MC preDSC) y dDSC (MC dDSC) en la apoptosis de PBL en reposo y activados, preDSC y 7 diferentes líneas tumorales (Jurkat, Raji, THP-1, A375, Cal33, HeLa y SKBR3). Las barras representan el porcentaje de células apoptóticas (media \pm SD de cuatro determinaciones). Los experimentos se realizaron a partir de MC de 4 líneas diferentes de DSC. (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001).

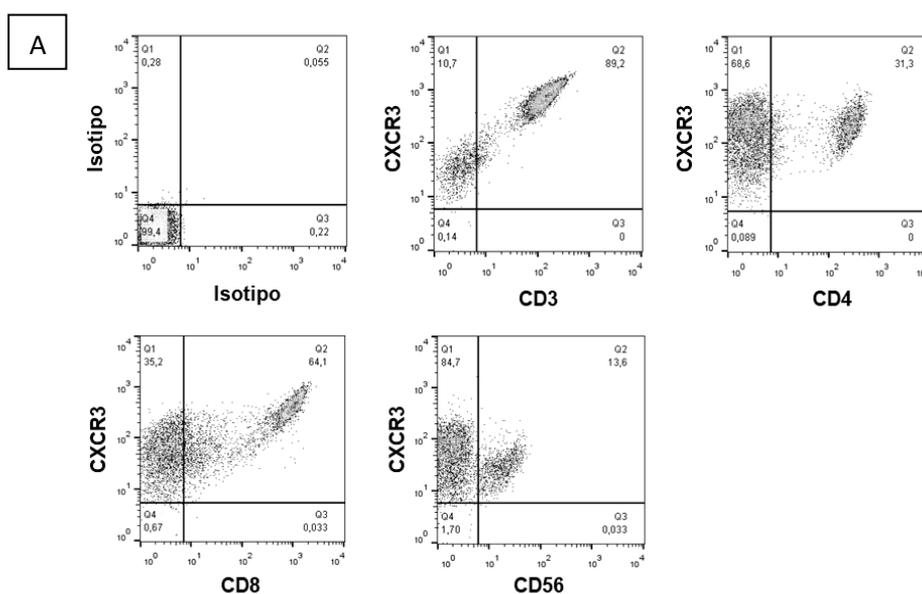
1.6. Actividad quimiotáctica de DSC

La decidua humana presenta un microambiente inmunitario único que favorece la implantación y el desarrollo del embrión semialogénico. En la decidua, las DSC desempeñan una función muy importante en la tolerancia inmunológica materno-fetal, a través de la secreción de quimioquinas que orquestan la actividad proliferativa y migratoria de las células inmunitarias hacia el tejido decidual. La mayoría de estas quimioquinas son quimioatrayentes de macrófagos y células NK. Estas células, a su vez, regulan la invasión del trofoblasto y el progreso de la decidualización^{12,222}. Sin embargo, en modelo murino se ha observado que las DSC inhiben la expresión de las quimioquinas que atraen células Th1 y Tc hacia la decidua⁸¹ y nuestros resultados en células de origen humano también lo confirman (**Figura 8** y **Figura 9**). Es por esto que en la siguiente serie de experimentos investigamos el efecto de las DSC en la migración de células T activadas.

1.6.1. Actividad quimiotáctica de DSC sobre células T obtenidas de sangre periférica

1.6.1.1. Fenotipo antigénico de PBL activados

En primer lugar, se determinó por citometría de flujo el fenotipo de los PBL obtenidos de la sangre periférica de diferentes donantes y activados *in vitro* con PHA y anti-CD28, a los que se añadió IL-2 como factor de crecimiento/proliferación. Los resultados muestran que los PBL presentan un perfil de linfocitos activados CXCR3+ (>95%), que incluye células T (>95% CD45+, >90% CD3+, CD14-, CD19-), con subpoblaciones de células Th1 CD4+ (20-41%), células Tc CD8+ (46-65%) y células NK CD56+ (6-14%) (**Figura 12**).



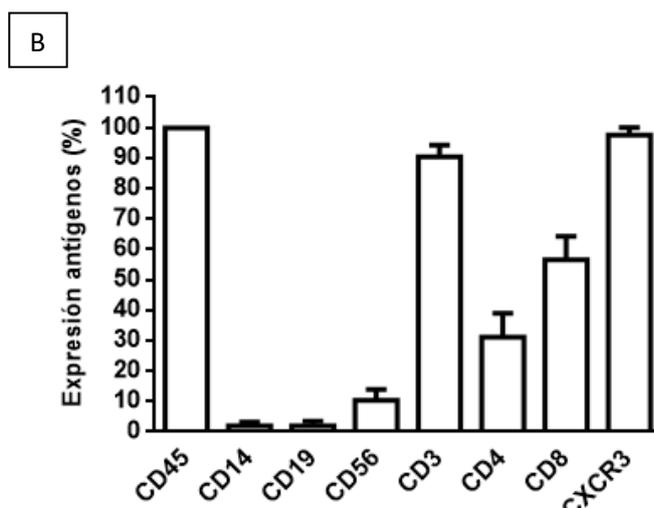


Figura 12. Perfil fenotípico de PBL activados. A) Análisis por citometría de flujo del fenotipo antigénico de PBL activados *in vitro* con PHA+anti-CD28 y mantenidos durante 6 días con IL-2 (citogramas de un experimento representativo). Se muestra la doble expresión de CD3/CXCR3, CD4/CXCR3, CD8/CXCR3 y CD56/CXCR3. B) Expresión de los antígenos CD45, CD14, CD19, CD56, CD3, CD4, CD8 y CXCR3 en PBL activados. Las barras representan la media del porcentaje de células que expresan cada antígeno \pm SD. Los experimentos se llevaron a cabo con linfocitos de 6 donantes sanas diferentes.

1.6.1.2. Quimiotaxis de PBL activados debida a los factores secretados por DSC

A continuación, estudiamos la migración, en cámara Transwell y durante 24 horas, de los PBL activados en respuesta a la exposición a los MC de preDSC y dDSC que contienen los factores secretados por estas células.

Los resultados obtenidos mostraron que el MC de preDSC incrementa significativamente la migración de PBL activados en comparación con el medio Control (Opti-MEM), pero el MC de dDSC inhibe de forma significativa la migración. Además, se observó una migración muy baja de los PBL no activados, siendo inferior a un 10% en todos los medios, y sin diferencias significativas entre los MC y el Control (**Figura 13A**).

Sabiendo que el MC de preDSC incrementa la migración de PBL activados y que las preDSC expresan CXCL9, CXCL10 y CXCL11 (**Figura 9**); investigamos el efecto del bloqueo de la actividad quimiotáctica de las preDSC, con el objetivo de demostrar que efectivamente estas quimioquinas son las responsables del efecto quimioatrayente de las preDSC.

El bloqueo de la actividad quimiotáctica del MC de preDSC se llevó a cabo usando un anticuerpo monoclonal que reconoce el receptor CXCR3 (receptor de quimioquinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11). La exposición mantenida de los PBL con el anticuerpo bloqueante a dosis crecientes resultó en una disminución de la migración de los linfocitos T activados y expuestos al MC de preDSC, demostrando así que CXCL9, CXCL10 y CXCL11 son responsables de esta actividad quimioatrayente (**Figura 13B**).

No obstante, la menor expresión de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en dDSC no explica la inhibición significativa de la migración de PBL activados inducida por el MC de dDSC; ya que el efecto de esta disminución de la expresión de quimioquinas por sí sola implicaría una migración

similar a la que se obtiene en el medio Control y no significativamente menor, como observamos en nuestros resultados (**Figuras 13A y 13B**). Esta inhibición de la migración, es decir, menor a la obtenida en el medio Control, sugiere, por tanto, que además de inhibir la expresión de las quimioquinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11, las dDSC secretan uno o más factores que son capaces de inhibir activamente la migración de linfocitos T activados, es decir, factores inhibidores de la quimiotaxis de células T (T cell chemotaxis-inhibiting factors, TCIF).

A continuación, buscamos describir la naturaleza y propiedades de dicho factor o factores inhibidores de la migración. Para ello, en primer lugar, se sometió el MC de preDSC y de dDSC a un tratamiento térmico. Se observó que el calentamiento del MC de dDSC a 60°C durante 45 minutos no afectó a su capacidad de inhibir la actividad migratoria de PBL activados; mientras que el calentamiento sí redujo el efecto activador de la migración del MC de preDSC, probablemente debido a la desnaturalización de las proteínas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 (**Figura 13C**). Este resultado indica que el TCIF es termoestable, mientras que los factores que activan la migración de células T son termolábiles.

Seguidamente, para poder definir el tamaño del factor que buscamos, se llevaron a cabo experimentos de diálisis del MC de preDSC y el MC de dDSC. Esta se realizó en membranas que permitían el paso de moléculas con un peso molecular menor de 6000-8000 Da (MWCO 6000-8000 Da). En estos experimentos se observó que la actividad migratoria con el MC de preDSC dializado se mantenía, no había diferencias significativas en comparación con el medio no dializado. Esto es debido a que el peso molecular de las quimioquinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11^{223,224} es superior a 8000 Da. No obstante, la actividad inhibitoria del MC de dDSC dializado se perdió, indicando que el peso molecular de TCIF es inferior al MWCO de la membrana de diálisis (**Figura 13D**).

Por todo esto, nuestros resultados indican que las preDSC secretan las quimioquinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 que atraen a los linfocitos T activados. Dichos factores son termolábiles y tienen un peso molecular superior a los 8000 Da^{223,224}. Por su parte las dDSC secretan factores que inhiben activamente la migración de linfocitos T activados. Estos factores son termoestables y presentan un peso molecular inferior a 6000 Da²²⁵.

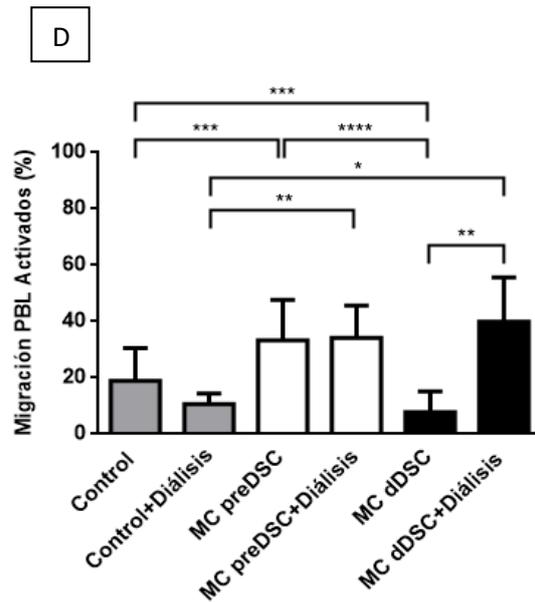
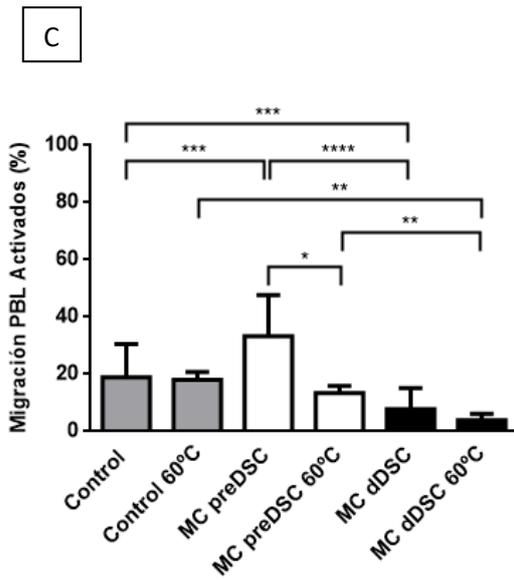
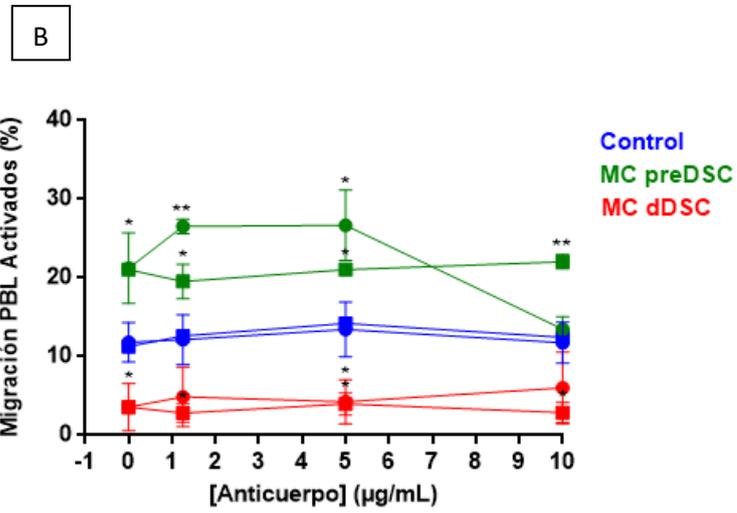
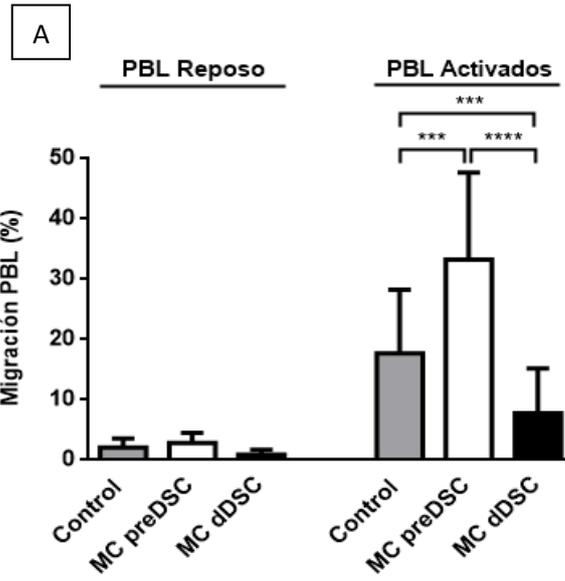


Figura 13. Efecto de la decidualización en la actividad quimiotáctica de DSC humanas sobre PBL activados. A) Efecto del medio Control (Opti-MEM) y el MC de preDSC y dDSC en la migración de PBL no activados y activados durante 24 horas en Cámara Transwell. Las barras representan la media del porcentaje de migración de PBL \pm SD de 10 determinaciones independientes. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de 5 donantes sanas y se emplearon 10 líneas de DSC para obtener los MC. B) Bloqueo de la actividad quimiotáctica del medio Control y el MC de preDSC y dDSC, y efecto en la migración de PBL activados durante 24 horas en Cámara Transwell. Los PBL se incubaron con distintas dosis de un anticuerpo monoclonal anti-CXCR3 (1,25 μ g/mL, 5 μ g/mL, 10 μ g/mL). C) Efecto del calentamiento, a 60°C durante 45 minutos, del medio Control y el MC de preDSC y dDSC en la migración de PBL activados durante 24 horas en Cámara Transwell. D) Efecto de la diálisis del medio Control y el MC de preDSC y dDSC en la migración de PBL activados durante 24 horas en Cámara Transwell. La diálisis se llevó a cabo en membranas con un MWCO de 6000-8000 Da. Los medios se dializaron frente a medio Opti-MEM (sin FBS) durante 24 horas a 4°C y en agitación. En los apartados B, C y D las barras representan la media del porcentaje de migración de PBL \pm SD de 3 determinaciones independientes. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de 3 donantes sanas y se emplearon 3 líneas de DSC para obtener los MC de preDSC y dDSC. El MC de dDSC se obtiene de células decidualizadas durante 8 días en todos los experimentos. (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001).

1.6.1.3. Efecto de los MC de DSC sobre la quimiotaxis de las subpoblaciones de PBL activados

Tras estudiar el efecto de la decidualización de las DSC en la quimiotaxis de PBL activados, analizamos por PCR y citometría de flujo el perfil fenotípico de las células quimioatraídas. Los resultados mostraron que el MC de dDSC disminuye significativamente la expresión de las citoquinas proinflamatorias IFN- γ y TNF- α en PBL activados (**Figuras 14A y 14B**). Por otra parte, el análisis de las subpoblaciones de linfocitos activados, que han experimentado quimiotaxis tras la exposición a los MC, mostró que el efecto activador de la migración del MC de preDSC y el efecto inhibitor de la migración del MC de dDSC afectaron a las células Th1 (CD3+/CD4+/CXCR3+) y Tc (CD3+/CD8+/CXCR3+), pero no tuvieron un efecto significativo sobre células NK activadas (CD56+/CXCR3+) (**Figura 14C**).

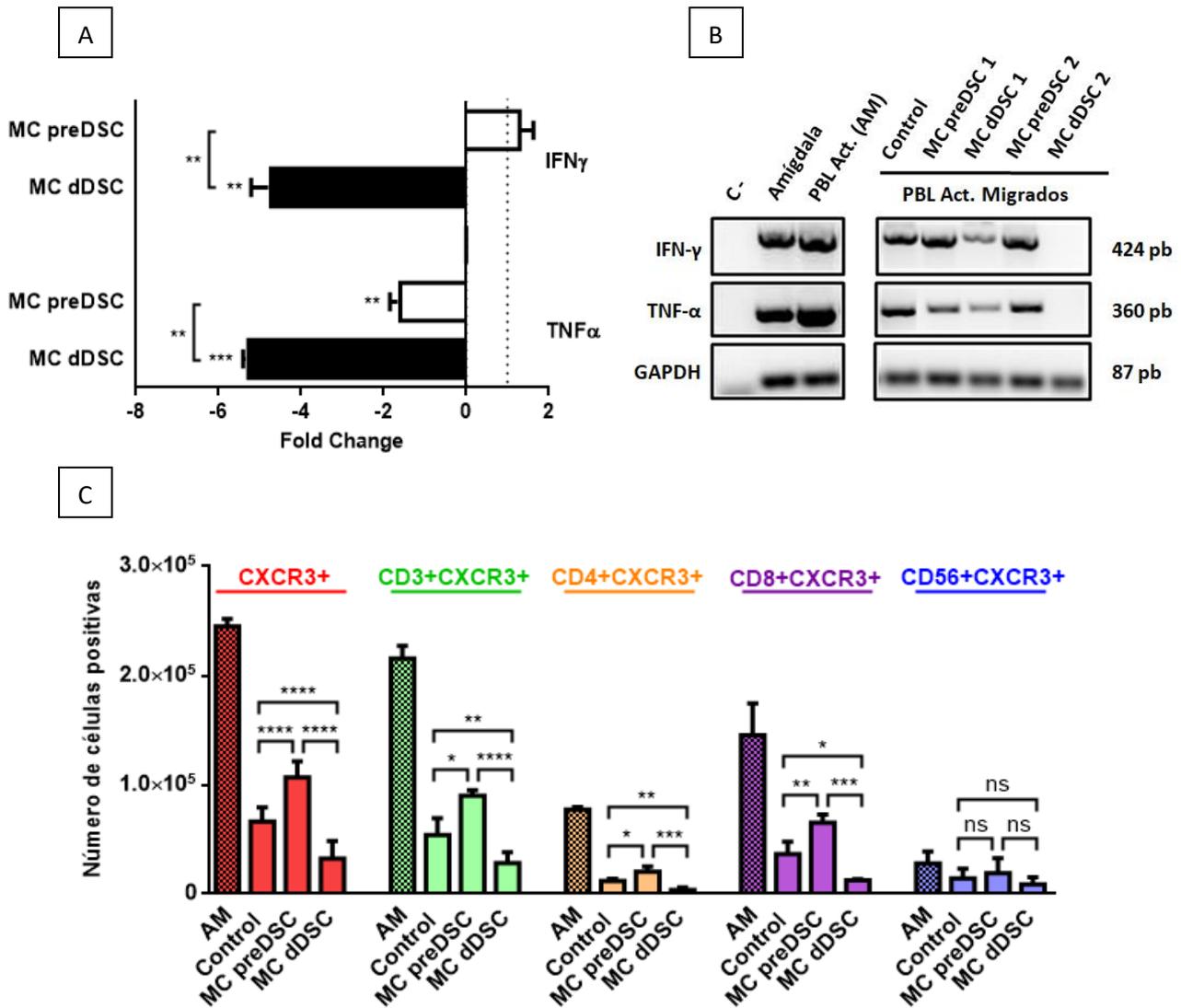


Figura 14. Estudio del fenotipo antigénico de los PBL quimioatraídos. A) Efecto de los MC en la expresión de IFN- γ y TNF- α por PBL activados que han experimentado quimiotaxis. Se representa el resultado obtenido del estudio por qPCR. Los valores de CT ("cycle treshold") para cada muestra se normalizaron respecto a los obtenidos para el gen control de expresión constitutiva GAPDH ("housekeeping gene"). Los valores normalizados correspondientes a los PBL activados que han migrado en los MC, se relativizaron frente a los valores obtenidos para los PBL activados que han migrado en el medio Control. El resultado se expresó como Fold Change. B) Se muestra la expresión de IFN- γ , TNF- α y GAPDH por RT-PCR en PBL activados antes de la exposición a los medios (AM: antes de migrar); y en PBL activados que han sido quimioatraídos por el medio Control y el MC de preDSC y dDSC (2 líneas de DSC). C) Efecto quimiotáctico de los MC sobre las diferentes subpoblaciones de linfocitos activados. Las barras sombreadas representan el número de células positivas para cada marcador antes de la exposición a los medios (AM: antes de migrar). Las barras no sombreadas representan el número de células positivas para cada marcador tras la migración. Las subpoblaciones linfocitarias estudiadas son positivas para los siguientes antígenos respectivamente: CD3+/CXCR3+, CD4+/CXCR3+, CD8+/CXCR3+, CD56+/CXCR3+. En los apartados A y C, las barras representan la media \pm SD de 3 determinaciones independientes. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de 3 donantes sanas y se emplearon 3 líneas de DSC para obtener los MC de preDSC y dDSC. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Para la obtención del MC de dDSC, las células fueron tratadas con P4 y AMPc durante 8 días. (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001).

1.6.2. Actividad quimiotáctica de DSC sobre las líneas tumorales Jurkat y THP-1

Paralelamente, se estudió el efecto de los MC de preDSC y dDSC sobre dos líneas tumorales: la línea linfocítica Jurkat (células Th) y la línea monocítica THP-1. El objetivo de dichos experimentos fue comprobar si el efecto activador de la migración del MC de preDSC y el efecto inhibitor del MC de dDSC se mantenían, es decir, si eran o no específicos para células T activadas.

Se observó que el MC de preDSC incrementaba significativamente la migración de células THP-1 (**Figura 15B**), pero no de células Jurkat (**Figura 15A**). La menor eficacia migratoria de esta línea linfocítica tumoral en comparación con los PBL activados (**Figura 13A**) se explica por la menor expresión del receptor de quimioquinas CXCR3 (**Figura 15C**). No obstante, el MC de dDSC también inhibió la migración de células Jurkat (**Figura 15A**), mientras que la migración se incrementó en la línea THP-1 (**Figura 15B**). Esto confirma que la decidualización aumenta la secreción en las DSC de factores quimiotácticos para monocitos. Además, los resultados señalan que los factores inhibidores pueden ser específicos de células T activadas.

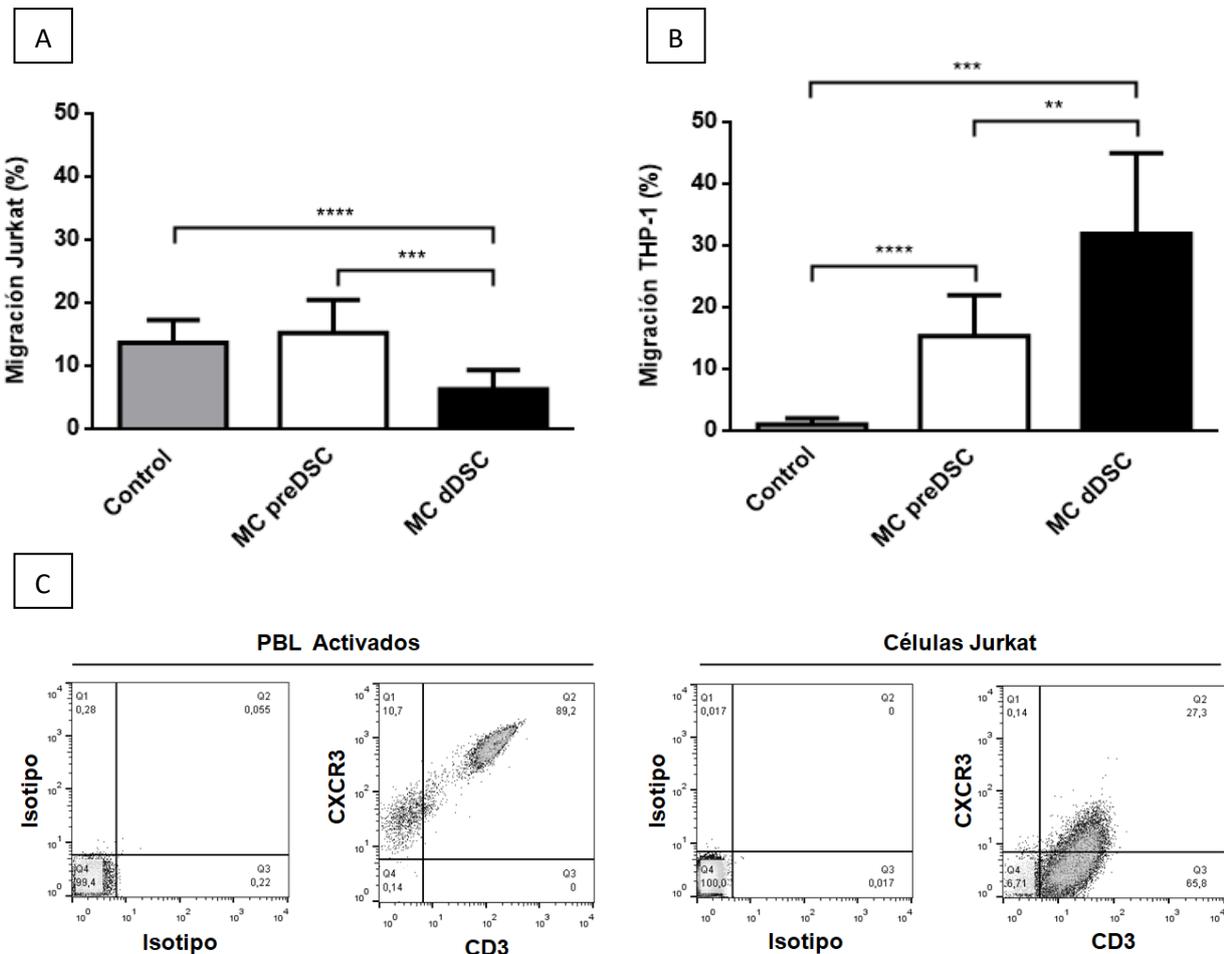


Figura 15. Efecto quimiotáctico de los MC de preDSC y dDSC en las líneas tumorales Jurkat y THP-1. Efecto del medio Control (Opti-MEM) y el MC de preDSC y dDSC en la migración de células Jurkat (A) y de células THP-1 (B) durante 24 horas en Cámara Transwell. Las barras representan la media del porcentaje de migración celular \pm SD de 5 determinaciones independientes. Se emplearon 5 líneas de DSC para

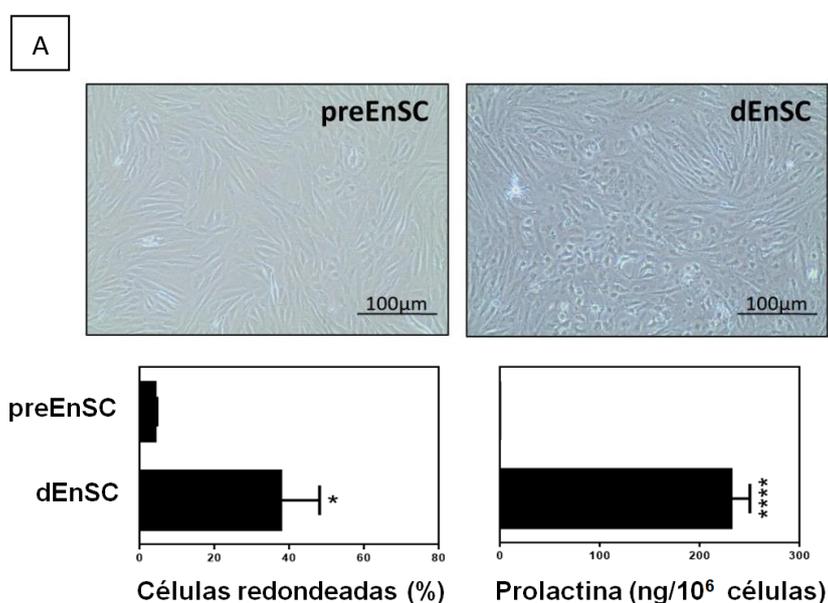
obtener los MC de preDSC y dDSC. Los experimentos se realizaron por triplicado. El MC de dDSC se obtiene de células decidualizadas durante 8 días. C) Análisis por citometría de flujo del fenotipo antigénico de PBL activados y células Jurkat (citogramas de un experimento representativo). Se muestra el correspondiente isotipo y la doble expresión de CD3/CXCR3. (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001).

2. Células endometriales estromales humanas

2.1. Características generales de las EnSC

El segundo tipo de células objeto de estudio en nuestro trabajo son las células endometriales estromales o EnSC, obtenidas a partir de sangre menstrual. Se establecieron líneas de EnSC con las que, al igual que con DSC, se realizó una caracterización morfológica de la población y se estudió su capacidad de decidualización²¹³. Como las preDSC, las preEnSC presentaron una morfología de tipo fibroblástico y crecieron de forma adherente. Tras la decidualización, se apreció un cambio hacia una morfología más redondeada en las EnSC decidualizadas (dEnSC), las cuales secretaron PRL. No se detectó PRL en los cultivos sin P4 y AMPc (**Figura 16A**).

El análisis del fenotipo antigénico, por citometría de flujo, de preEnSC mostró que más del 95% de células expresaban los marcadores CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, α -SMA, nestina y podoplanina; por otra parte, se vio ausencia de expresión de los marcadores CD15, CD19, CD31, CD34, CD45, CD62P, citoqueratina y HLA-DR (**Figura 16B**) (**Tabla 15**). Los datos obtenidos confirman la pureza del cultivo de preEnSC y la ausencia de células de origen hematopoyético.



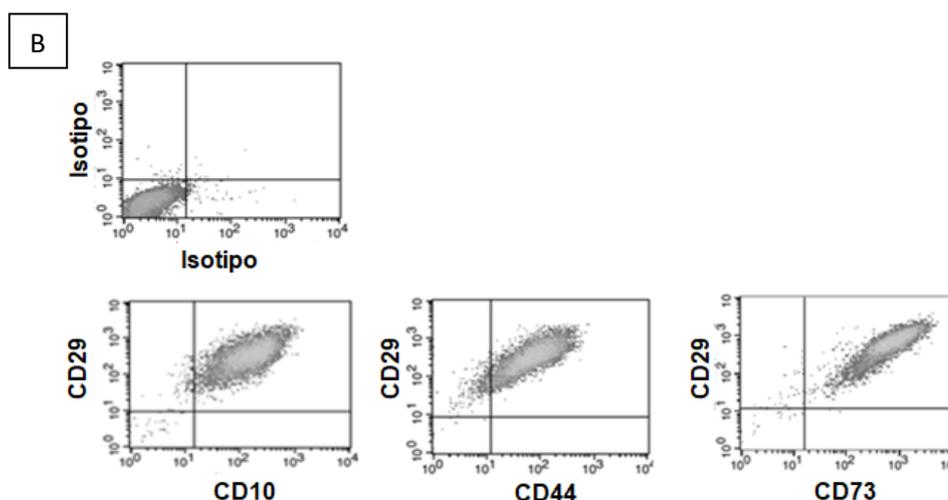


Figura 16. Características generales de líneas de preEnSC. A) Decidualización de preEnSC. Tras 14 días en cultivo con P4 y AMPc, las preEnSC no diferenciadas cambian su morfología fibroblástica a una redondeada y secretan PRL. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo de aumento de 4x. Las barras representan el porcentaje de células redondeadas tras la cuantificación de áreas representativas (n = 3 por muestra) con ImageJ y la secreción de PRL, por tres líneas de preEnSC (media ± SD). B) Análisis del fenotipo antigénico de una línea de preEnSC por citometría de flujo (citogramas de un experimento representativo). El estudio se realizó en tres muestras independientes. (*P < 0,05; ****P < 0,0001).

Tabla 15. Expresión de antígenos, determinada por citometría de flujo, en líneas de preEnSC y MSC de médula ósea obtenidas en las mismas condiciones. ND: no determinado; ^a**Negrita:** antígenos asociados a pericitos.

Antígeno	% Células positivas	
	MSC (n=7)	preEnSC (n=10)
CD9	ND	>95
CD10	>95	>95
CD13^a	>95	>95
CD15	<1	<1
CD19	<1	<1
CD29	>95	>95
CD31	<1	<1
CD34	<1	<1
CD44^a	>95	>95
CD45	<1	<1
CD54	45-69	75-87
CD62P	<1	<1
CD73	>95	>95
CD80	ND	5-33
CD86	ND	10-22
CD90^a	>95	>95
CD105^a	>95	58-98
CD106^a	0-10	0-22
CD140b^a	ND	30-92
CD146^a	68-75	48-95
CD271^a	0-8	ND
AP^a	ND	ND
α-SMA^a	>95	74-99
BAFF	<1	72-84
CXCL12	ND	30-46
CXCL13	<1	18-33
Citoqueratina	ND	<1
HLA-DR	<1	<1
HLA-G	<1	0-18

MFG-E8 ^a	ND	26-33
Nestina ^a	>95	20-95
OCT3/4	42-52	ND
Podoplanina	>95	>95
STRO-1 ^a	7-48	14-21
Vimentina ^a	ND	ND
SUSD2	21-35	34-79

2.2. Fenotipo antigénico compatible con MSC de médula ósea

Tras analizar el fenotipo de las líneas de preEnSC obtenidas de sangre menstrual y con el objetivo de determinar si estas células derivan también de células madre mesenquimales, nos centramos en comparar el perfil de expresión de marcadores de las líneas de preEnSC con el de MSC (**Tabla 15**).

Dicho análisis confirmó que ambos tipos de células presentan un fenotipo equivalente. Más del 95% de las células de las líneas de preEnSC y MSC expresaban CD10, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 y podoplanina; al igual que las MSC, un elevado porcentaje de preEnSC expresaban α -SMA y nestina. Además, se vio ausencia de expresión de los marcadores CD15, CD19, CD31, CD34, CD45, CD62P y HLA-DR. Las preEnSC expresaron también el antígeno STRO-1 que es característico de precursores estromales de médula ósea. No obstante, aunque en las MSC había ausencia de expresión de BAFF y CXCL13, las preEnSC sí expresaron estos antígenos. Las líneas de preEnSC fueron positivas para los marcadores de eMSC CD140b, CD146 y SUSD2 (**Tabla 15**).

3. Diferencias entre DSC y EnSC

3.1. Marcadores y funciones asociadas a la decidualización

Las EnSC son equivalentes a las DSC en endometrio no gestante; es decir, son el mismo tipo de célula, pero en un contexto fisiológico diferente (EnSC en endometrio no gestante y DSC en endometrio gestante). Es previsible que las diferencias presentes en dicho contexto fisiológico afecten a su fenotipo y funciones^{213,216}.

Partiendo de la base de que tanto las líneas de preDSC como de preEnSC pueden diferenciarse *in vitro* tal como lo hacen *in vivo*, se comparó su capacidad para decidualizarse en respuesta al cultivo con P4 y AMPc²¹³. Los resultados mostraron que ambos tipos de células cambian su aspecto fibroblástico por una morfología más redondeada; no obstante, el porcentaje de células redondeadas es significativamente mayor en DSC decidualizadas (dDSC) (**Figura 17A**). Además, las dDSC secretaron significativamente más PRL que las EnSC decidualizadas (dEnSC) (**Figura 17B**). Otras propiedades asociadas al proceso de decidualización, tales como la producción de IL-15 y la muerte celular por apoptosis, también fueron significativamente mayores en las dDSC que en las dEnSC (**Figuras 17C y 17D**). Incluso, tras la incubación prolongada en el tiempo con P4 y AMPc, las dEnSC no alcanzaron el nivel de producción de PRL y de apoptosis observados en las dDSC (**Figuras 17B y 17D**).

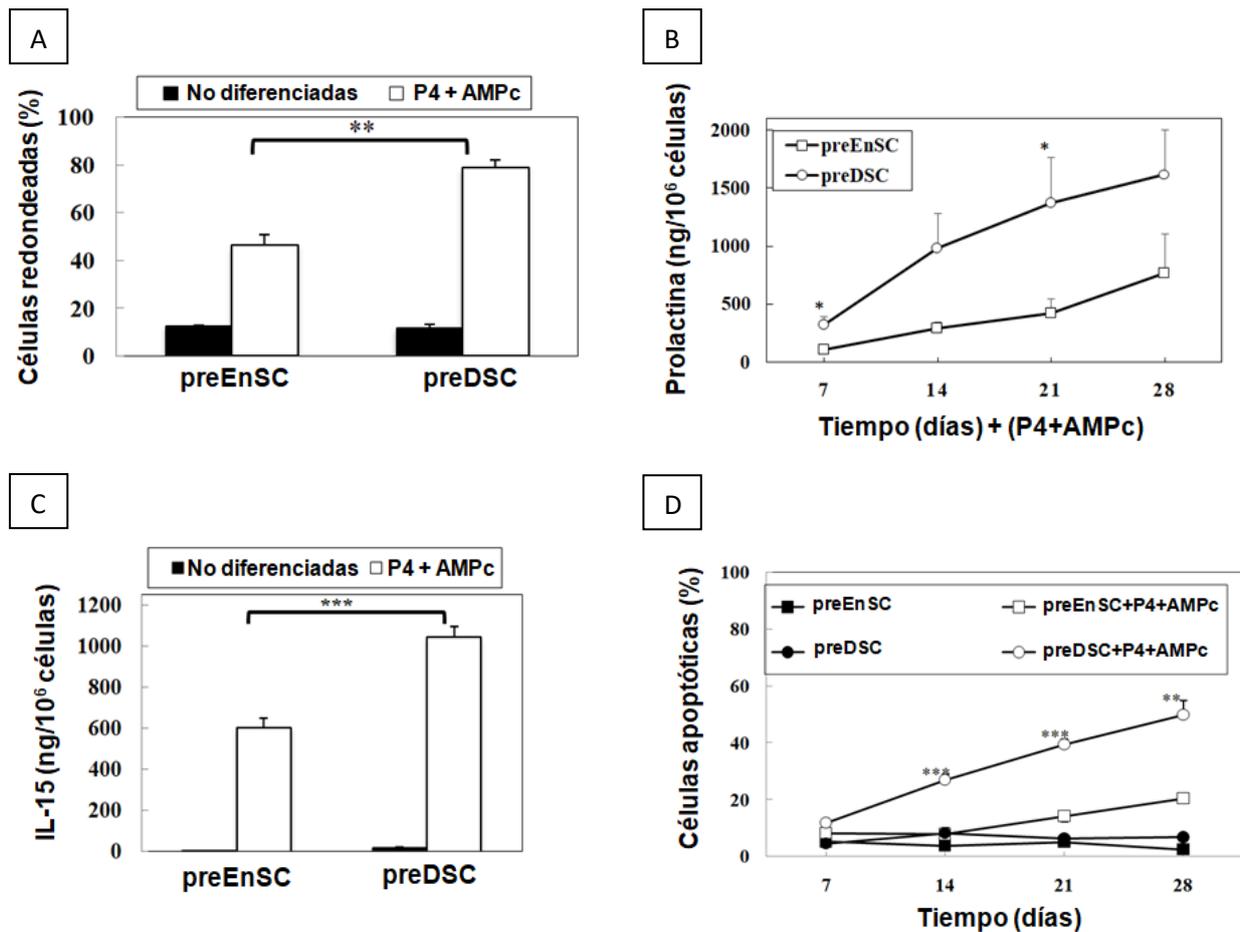


Figura 17. Análisis comparativo de la respuesta a la decidualización en EnSC y DSC. A) Cambios morfológicos en preEnSC y preDSC cultivadas con P4 y AMPc durante 7 días. Las barras muestran el porcentaje de células redondeadas tras la cuantificación de áreas representativas (n = 3 por muestra) con ImageJ. B) Evolución temporal de la secreción de PRL por preEnSC y preDSC tras la incubación con P4 y AMPc. La producción de PRL por células no decidualizadas fue 0 en todos los puntos temporales (datos no mostrados). C) Secreción de IL-15 por preEnSC y preDSC tras 7 días en cultivo con P4 y AMPc y sin dichos factores. D) Inducción de apoptosis en respuesta a la decidualización prolongada durante 28 días. Las células apoptóticas sub-G1 se analizaron cada 7 días. Las barras de error muestran la media \pm SD de cinco (B y D) y tres (A y C) experimentos independientes con diferentes líneas celulares. (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001).

3.2. Expresión de proteínas relacionadas con la decidualización

Los receptores nucleares de la progesterona (PR) y la PKA desempeñan una función clave en el proceso de decidualización. El receptor de la progesterona tiene dos isoformas (PR-A y PR-B), mientras que la PKA es un complejo enzimático formado por dos subunidades reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C); existen tres subunidades C distintas (C α /C β /C γ) y cuatro subunidades R (R1 α /R1 β y R2 α /R2 β)²²⁶.

Estudios previos muestran que las EnSC expresan las subunidades C α y C β , así como las cuatro subunidades reguladoras de la PKA, aunque la expresión de la isoforma R1 α es mayor que el resto^{36,227}.

En base a ello, se comparó la expresión de PR y PKA entre preEnSC y preDSC²¹³. Los resultados muestran que ambos tipos de células expresan niveles basales similares de las dos isoformas de PR y de las subunidades catalítica (Ca/β/γ) y reguladora R1α/β de la PKA. Además, la expresión de la subunidad reguladora de la PKA y de la isoforma PR-A aumentó tras la decidualización en ambos tipos celulares. Se observó que dicho incremento de la expresión de la PKA R1α/β fue significativamente mayor en las dDSC que en las dEnSC (**Figura 18A**). Estos resultados se confirmaron mediante un análisis de la expresión de la PKA R1α/β en respuesta a la decidualización durante 14 días (**Figura 18B**).

Por otra parte, se analizaron las posibles diferencias en las rutas de señalización en respuesta a la decidualización, mediante el estudio de la expresión del factor de transcripción FOXO1. Los resultados mostraron que la incubación con P4 y AMPc indujo la expresión de FOXO1 en las preEnSC y preDSC, pero sin diferencias significativas entre ambos tipos celulares (**Figura 18A**).

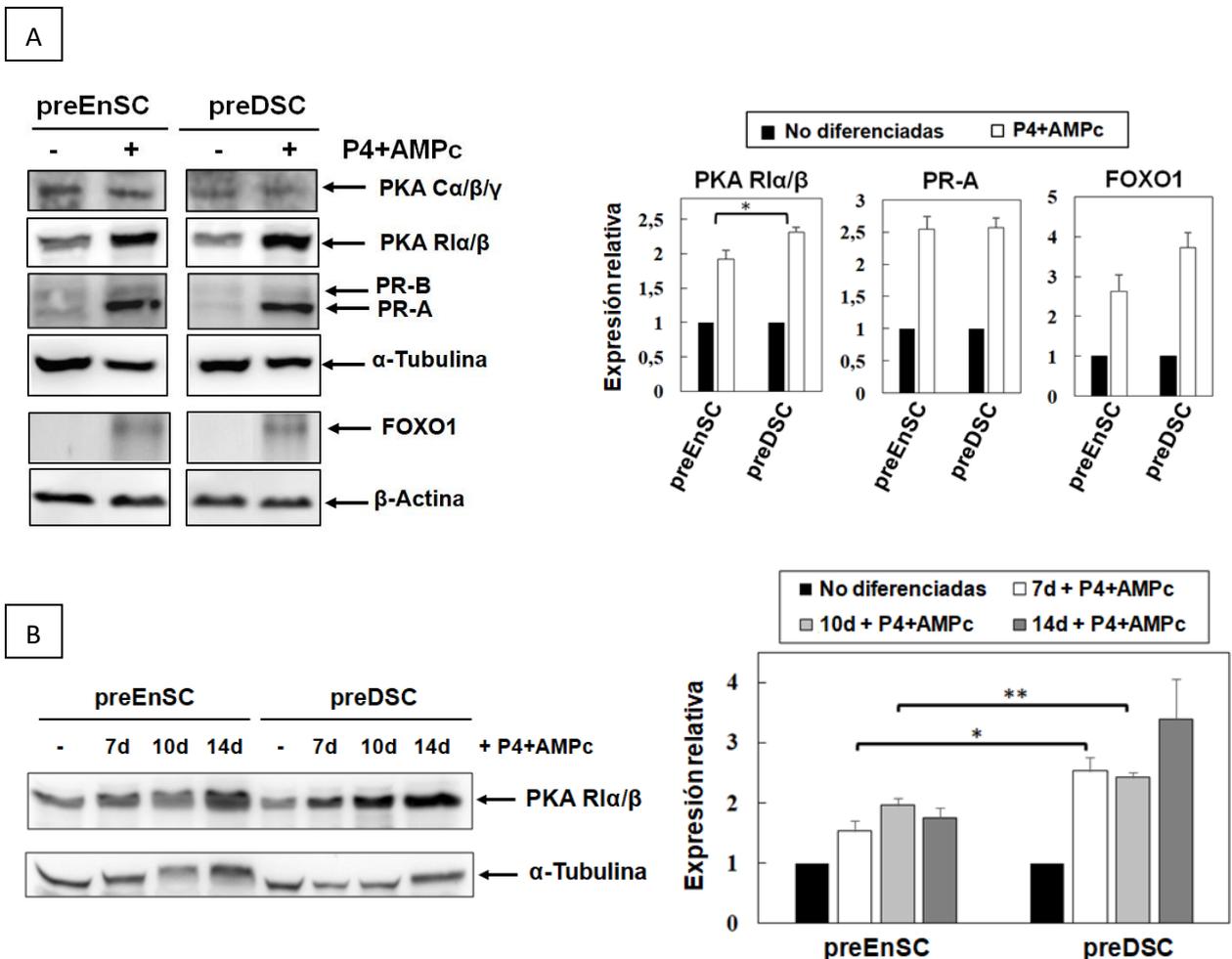


Figura 18. Expresión de PR, PKA y FOXO1 en respuesta a la decidualización. (A) preEnSC y preDSC se incubaron con P4 y AMPc durante 10 días. La expresión de las isoformas de PR, las subunidades de la PKA catalítica (Ca/β/γ) y reguladora (R1α/β), y FOXO1 fue analizada por Western Blot. (B) Se estudió la expresión de PKA R1α/β mediante Western Blot en preEnSC y preDSC tras la incubación durante 7, 10 y 14 días con P4+AMPc. α-tubulina y β-actina se utilizaron como controles de carga. En los paneles de la izquierda se muestra un experimento representativo en cada caso. Los gráficos de barras muestran la expresión relativa de PR-A (A), PKA R1α/β (A, B) y FOXO1 (A) tras el análisis de la intensidad de banda de

tres experimentos de Western Blot con tres líneas diferentes de EnSC y DSC (paneles de la derecha). (*P < 0,05; **P < 0,01).

3.3. Comparación del fenotipo antigénico de preDSC y preEnSC

Tal como se ha detallado anteriormente, nuestras líneas de preDSC y preEnSC presentan un fenotipo antigénico compatible con el de MSC de médula ósea y expresan antígenos de células perivasculares. Partiendo de esta base, realizamos un estudio comparativo del fenotipo antigénico de las preDSC y las preEnSC (**Figura 19**), con el objetivo de poder demostrar la estrecha relación que existe entre ambos tipos celulares a nivel de su perfil fenotípico.

Los resultados muestran que no hay diferencias significativas en la expresión de los marcadores de MSC CD10, CD29, CD44, CD73, CD105 y podoplanina. Tampoco encontramos diferencias al comparar la expresión de marcadores de pericitos como CD105, CD140b, CD146, SUSD2, MFG-E8, nestina y STRO-1 (**Figura 19**). Estos resultados confirman que las preDSC y las preEnSC tienen un fenotipo antigénico equivalente y se encuentran en una localización perivascular, tanto en el endometrio no gestante (preEnSC) como en el endometrio gestante (preDSC).

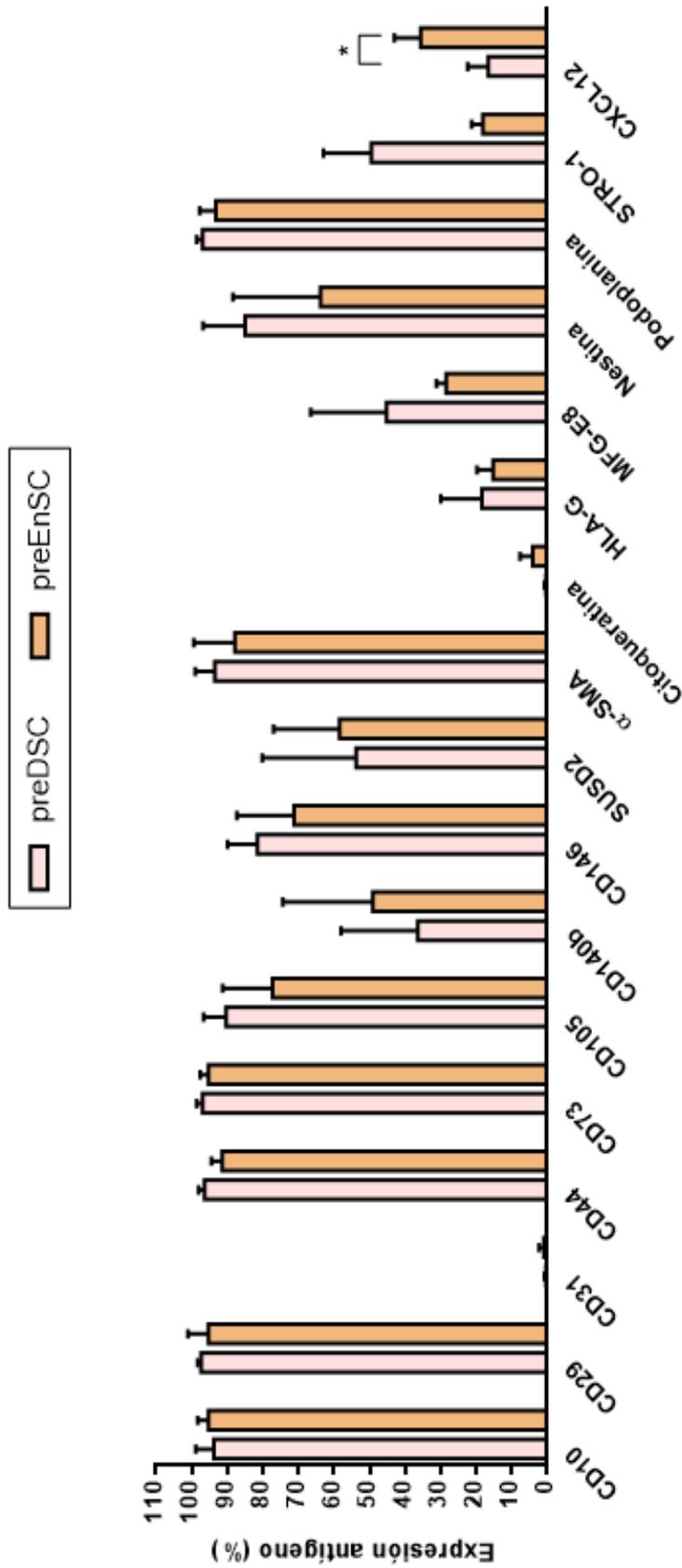


Figura 19. Comparación del perfil fenotípico entre preDSC y preEnSC. Expresión de los antígenos CD10, CD29, CD31, CD44, CD73, CD105, CD140b, CD146, SUSD2, α-SMA, citoqueratina, HLA-G, MFG-E8, nestina, podoplanina, STRO-1 y CXCL12 en preDSC (rosa) y preEnSC (naranja). Las barras representan la media del porcentaje de células que expresan cada antígeno ± SD. Los experimentos se realizaron con 10 muestras de preDSC y 10 muestras de preEnSC. (*P < 0,05).

3.4. Expresión y secreción de quimioquinas por DSC y EnSC

Con el objetivo de seguir realizando un análisis comparativo entre DSC y EnSC, analizamos la expresión y secreción en las EnSC de las quimioquinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11, responsables de la atracción de linfocitos activados al endometrio y a la decidua.

Los resultados obtenidos muestran que, con la decidualización de las preEnSC, tiene lugar una disminución de la expresión del ARNm de CXCL9 y CXCL11; no obstante, la expresión de CXCL10 se incrementa en las dEnSC (**Figura 20A**).

Tras el análisis transcripcional, realizamos un estudio de los niveles de proteína en los MC de preEnSC y dEnSC (**Figuras 20B, 20C y 20D**). Nuevamente, como en las DSC, se encontró que hay una secreción más elevada de CXCL9 que de CXCL10 y CXCL11. Por otra parte, como en las dDSC, y tal y como habíamos comprobado con el análisis de la expresión del ARNm, en todas las muestras de dEnSC tiene lugar un descenso significativo de la secreción de CXCL9 respecto a las preEnSC. No obstante, al contrario que con las DSC, la decidualización de las preEnSC induce una mayor secreción de CXCL10. En cuanto a CXCL11, encontramos niveles muy bajos (inferiores a 3 pg/mL) en DSC y EnSC. Al comparar los niveles de cada quimioquina en el MC de preDSC y preEnSC, comprobamos que la secreción proteica es significativamente mayor en las preDSC, resultado que confirma la importante actividad quimiotáctica de estas células en su localización alrededor de los vasos sanguíneos.

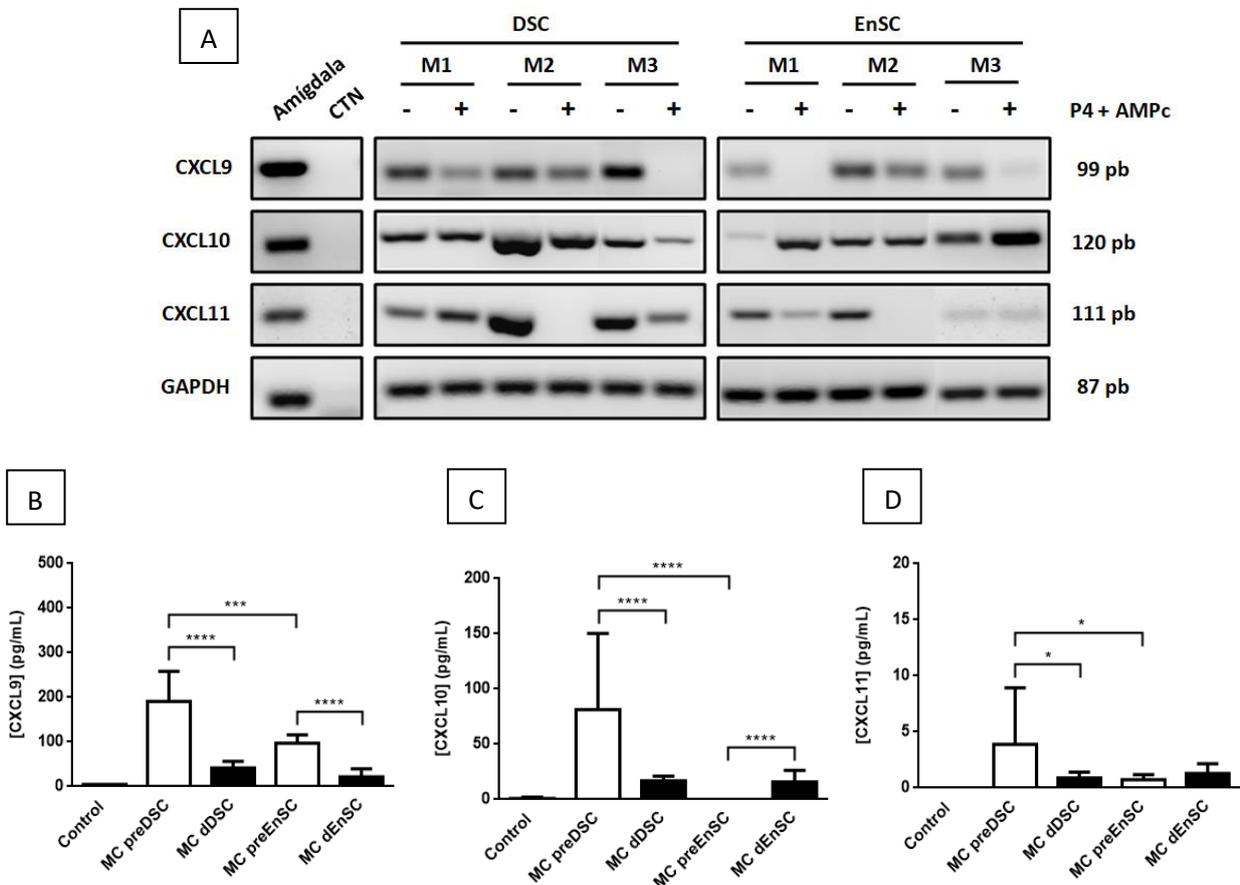


Figura 20. Comparación del efecto de la decidualización en la expresión de citoquinas por DSC y EnSC. A) Se muestra la expresión de CXCL9, CXCL10, CXCL11 y GAPDH por RT-PCR en tres líneas celulares, tanto en preDSC y preEnSC (-), como en dDSC y dEnSC (+). Las células decidualizadas fueron tratadas con P4 y AMPc durante 8 días. Como gen de expresión constitutiva se usó la GAPDH (“housekeeping gene”). Se muestran los niveles (pg/mL) de las quimioquinas CXCL9 (B), CXCL10 (C) y CXCL11 (D) secretadas por DSC y EnSC al MC. Como Control (ausencia de proteína) se empleó el medio de cultivo Opti-MEM. Las barras representan la media \pm SD. Los experimentos se llevaron a cabo a partir de 4 muestras independientes y se realizaron triplicados de cada una de ellas. (*P < 0,05; ***P < 0,001; ****P < 0,0001).

3.5. Actividad quimiotáctica de DSC y EnSC sobre células T obtenidas de sangre periférica

Los resultados explicados en el apartado anterior están estrechamente relacionados con la quimiotaxis de células sanguíneas, al estar en contacto con los factores secretados por las células estromales uterinas. Es por esto que continuamos el análisis comparativo de la actividad quimiotáctica de las DSC y las EnSC, evaluando la migración de PBL activados en los MC de estas células.

Nuestros datos muestran que, al igual que en las preDSC (**Figura 13A**), el MC de preEnSC incrementa significativamente la migración de PBL activados en comparación con el medio Control (Opti-MEM); pero el MC de dEnSC inhibe de forma significativa la migración (**Figura 21**). Por otra parte, la menor secreción de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en las preEnSC respecto a las preDSC (**Figuras 20B, 20C y 20D**) está directamente relacionada con la significativamente menor migración linfocitaria observada en el MC de preEnSC al comparar con el MC de preDSC (**Figura 21**).

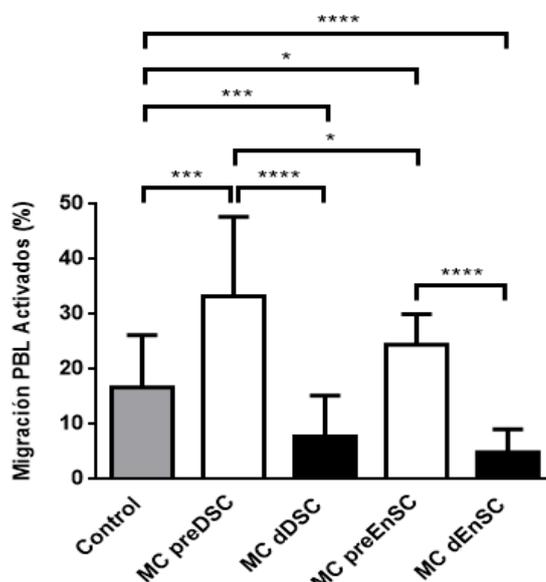


Figura 21. Comparación de la actividad quimiotáctica de DSC y EnSC sobre PBL activados. Efecto del medio Control (Opti-MEM) y el MC de preDSC, dDSC, preEnSC y dEnSC en la migración de PBL activados durante 24 horas en Cámara Transwell. Las barras representan la media del porcentaje de migración de PBL activados \pm SD de 10 (DSC) y 6 (EnSC) determinaciones independientes. En los experimentos con DSC, las muestras de sangre periférica se obtuvieron de 5 donantes sanas y se emplearon 10 líneas de DSC para obtener los MC. En los experimentos con EnSC, las muestras de sangre periférica se obtuvieron

de 3 donantes sanas y se emplearon 6 líneas de EnSC para obtener los MC. El MC de dDSC y dEnSC se obtiene de células decidualizadas durante 8 días en todos los experimentos. (*P < 0,05; ***P < 0,001; ****P < 0,0001).

4. Endometriosis

4.1. Características generales de las eEnSC

Tras caracterizar fenotípica y funcionalmente las células estromales obtenidas del endometrio y la decidua humanas, y realizar un análisis comparativo de ambos tipos celulares, nos concentramos en el estudio de una condición patológica, la endometriosis.

El tercer tipo de células que hemos estudiado en nuestro trabajo son las eEnSC, obtenidas a partir de endometriomas ováricos. Se establecieron líneas de eEnSC con las que, al igual que en las DSC y las EnSC, se realizó una caracterización morfológica de la población celular y se estudió la capacidad de estas células para decidualizarse *in vitro*.

Como las preDSC y las preEnSC, las preeEnSC presentan una morfología alargada y fibroblástica, y crecen de forma adherente (**Figura 22A**). Con el fin de estudiar la capacidad de decidualización de las preeEnSC, se trataron las líneas celulares con P4 y AMPc durante 14 días. Tal y como nuestro grupo de investigación había demostrado anteriormente²⁰⁴, nuestras líneas de preeEnSC, tras el proceso de decidualización, apenas alteraron su morfología fibroblástica, observándose un bajo porcentaje de células redondeadas. Por otra parte, no se detectó PRL en los cultivos sin P4 y AMPc; no obstante, al añadir estos factores al medio de cultivo, se induce la secreción de PRL (**Figura 22A**), aunque los niveles son más bajos que los observados anteriormente en dDSC y dEnSC (**Figuras 1A** y **16A**). Por lo tanto, los resultados obtenidos prueban la menor capacidad de nuestras líneas de preeEnSC para sufrir cambios de morfología y expresar PRL en respuesta a la decidualización.

De nuevo se analizó, por citometría de flujo, el fenotipo antigénico de las preeEnSC aisladas. El resultado del estudio de 20 antígenos mostró que más del 95% de células expresaban los biomarcadores propios de MSC CD10, CD29, CD44, CD73 y CD90. Las células no expresaron CD31, CD34, CD45 y tampoco citoqueratina. Las líneas de preeEnSC también expresaron los marcadores de eMSC CD140b, CD146 y SUSD2 (**Figura 22B**) (**Tabla 16**). Los datos obtenidos confirman la pureza del cultivo de preeEnSC y la ausencia de células de origen hematopoyético.

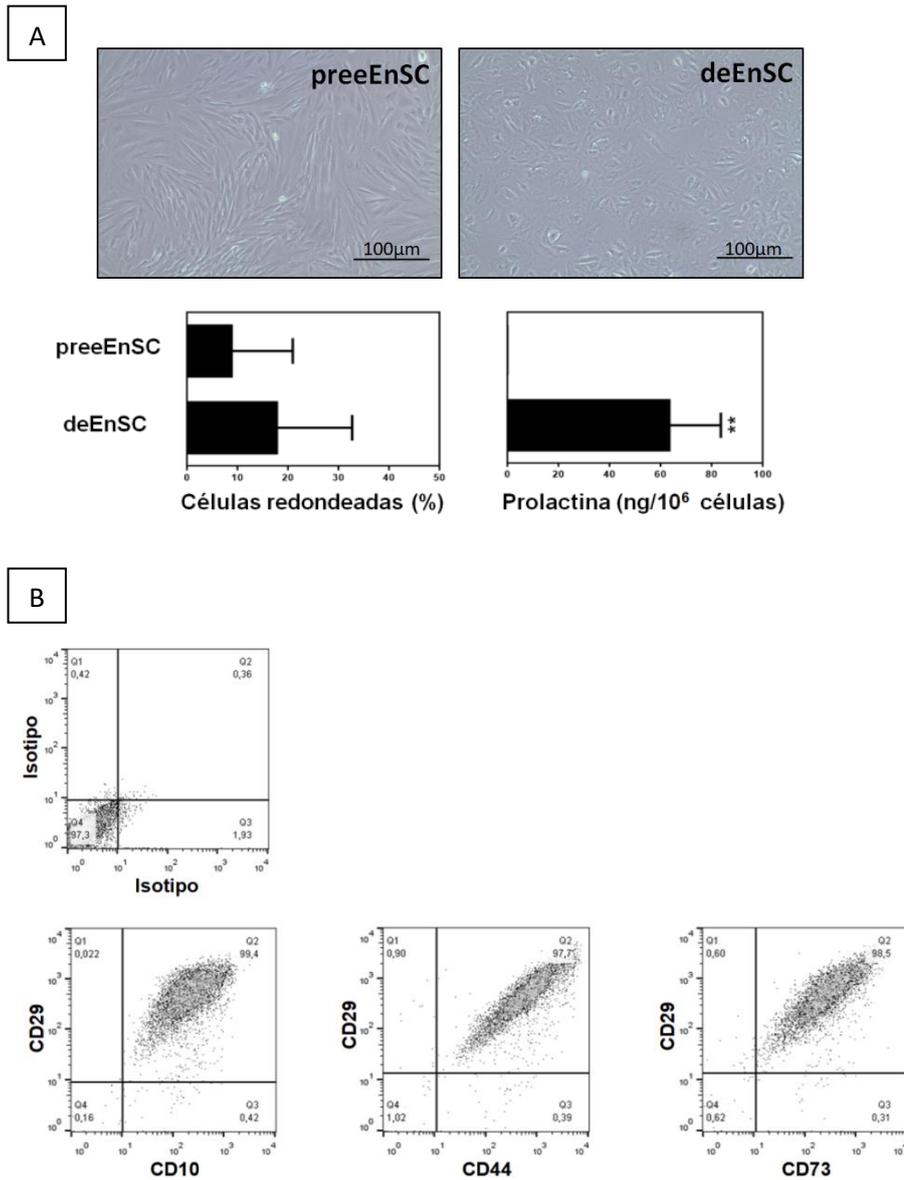


Figura 22. Características generales de líneas de preeEnSC. A) Decidualización de preeEnSC. Tras 14 días en cultivo con P4 y AMPc, las preeEnSC no presentan un cambio significativo de morfología fibroblástica a una redondeada, pero sí secretan PRL. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo de aumento de 4x. Las barras representan el porcentaje de células redondeadas tras la cuantificación de áreas representativas (n = 3 por muestra) con ImageJ y la secreción de PRL, por tres líneas de preeEnSC (media \pm SD). B) Análisis del fenotipo antigénico de una línea de preeEnSC por citometría de flujo (citogramas de un experimento representativo). El estudio se realizó en tres muestras independientes. (**P < 0,01).

Tabla 16. Expresión de antígenos, determinada por citometría de flujo, en líneas de preeEnSC y MSC de médula ósea obtenidas en las mismas condiciones. ND: no determinado; ^aNegrita: antígenos asociados a pericitos.

Antígeno	% Células positivas	
	MSC (n=7)	preeEnSC (n=10)
CD10	>95	>95
CD29	>95	>95
CD31	<1	<1
CD34	<1	<1
CD44^a	>95	>95
CD45	<1	<1
CD73	>95	>95
CD90^a	>95	>95
CD105^a	>95	25-99
CD140b^a	ND	0-39
CD146^a	68-75	30-97
SUSD2	21-35	13-85
α-SMA^a	>95	57-99
Citoqueratina	ND	<1
HLA-G	<1	0-18
MFG-E8^a	ND	1-33
Nestina^a	>95	10-97
Podoplanina	>95	30-97
STRO-1^a	7-48	0-12
CXCL12	ND	0-37

4.2. Fenotipo compatible con MSC de médula ósea

La caracterización fenotípica de las preeEnSC nos permitió evaluar y confirmar la existencia de un perfil de expresión de antígenos equivalente al de MSC de médula ósea (**Tabla 16**), al igual que en los dos tipos celulares estudiados anteriormente (**Tabla 13** y **Tabla 15**).

Tal y como se ha explicado anteriormente, el análisis mostró que más del 95% de las preeEnSC expresaban los biomarcadores característicos de MSC. No obstante, la expresión de los marcadores de pericitos CD105, α-SMA y nestina mostró variabilidad entre las distintas muestras estudiadas y fue ligeramente menor que en las MSC; así como también presentó cierto grado de variabilidad la expresión de la podoplanina. Las preeEnSC mostraron una menor expresión del antígeno STRO-1, característico de precursores estromales de médula ósea. Finalmente, las líneas de preeEnSC también expresaron los marcadores de eMSC CD140b, CD146 y SUSD2, aunque también obtuvimos variabilidad entre las distintas muestras.

5. Diferencias entre EnSC y eEnSC

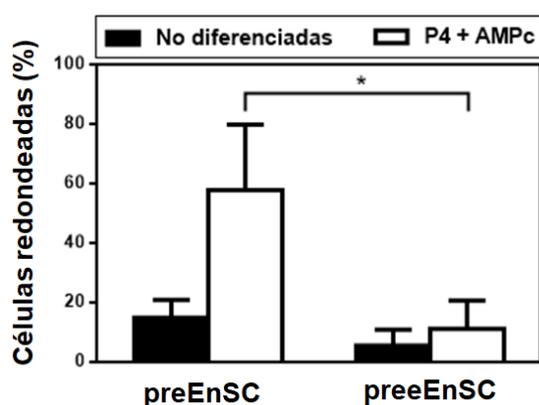
5.1. Marcadores y funciones asociadas a la decidualización

El efecto en el fenotipo y funciones celulares que tiene el proceso de decidualización ha sido extensamente estudiado en esta tesis, es por esto que decidimos evaluar la capacidad de decidualización de las preeEnSC y compararla con la de las preEnSC, que nos sirven de control (modelo no patológico).

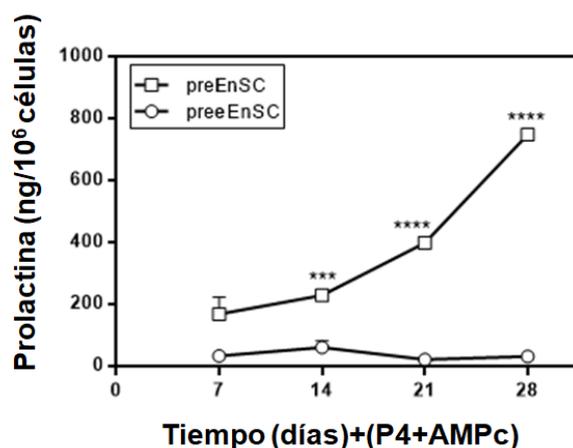
Los resultados obtenidos muestran que, tras 7 días de tratamiento, las preeEnSC a penas alteraron su morfología al visualizarlas al microscopio. Tras cuantificar el número de células redondeadas antes y después de la decidualización en ambos tipos celulares, obtenemos un porcentaje de células redondeadas significativamente menor en las deEnSC que en las dEnSC (**Figura 23A**). Por otro lado, se analizó comparativamente la secreción de PRL al MC. La concentración de PRL fue medida cada 7 días y expresada en ng por cada 10^6 células. Los datos ponen de manifiesto que las preEnSC son más sensibles al tratamiento con P4 y AMPc que las preeEnSC, ya que los niveles de PRL son significativamente más elevados a los 14, 21 y 28 días de tratamiento (**Figura 23B**). Además, también evaluamos cada 7 días la sensibilidad de las diferentes líneas a la apoptosis inducida por la decidualización y pudimos comprobar que las preeEnSC son resistentes al proceso de muerte celular (**Figura 23C**). Este resultado era esperable, debido a la mayor expresión de proteínas antiapoptóticas en estas células.

Todos estos resultados demuestran la menor capacidad de las células estromales procedentes de los focos ectópicos de endometriosis para experimentar cambios de morfología, apoptosis y secretar PRL en respuesta a la decidualización. De manera que podemos concluir que las preeEnSC son más resistentes a dicho proceso que las preEnSC.

A



B



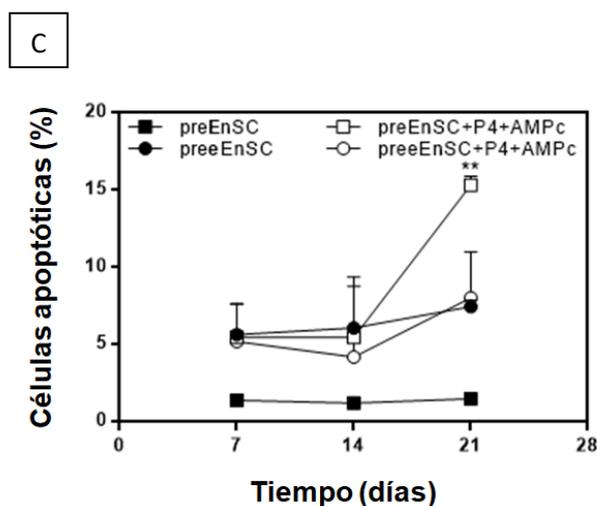


Figura 23. Análisis comparativo de los efectos de la decidualización en las preEnSC y preeEnSC. A) Cambios morfológicos en preEnSC y preeEnSC cultivadas con P4 y AMPc durante 7 días. Las barras muestran el porcentaje de células redondeadas tras la cuantificación de áreas representativas (n = 3 por muestra) con ImageJ. B) Evolución temporal de la secreción de PRL por preEnSC y preeEnSC tras la incubación con P4 y AMPc. La producción de PRL por células no decidualizadas fue 0 en todos los puntos temporales (datos no mostrados). C) Inducción de apoptosis en respuesta a la decidualización prolongada durante 21 días. Las células apoptóticas sub-G1 se analizaron cada 7 días. Las barras de error muestran la media \pm SD de tres experimentos independientes con diferentes líneas celulares. (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001).

5.2. Comparación del fenotipo antigénico de preEnSC y preeEnSC

Continuamos la caracterización de las células procedentes de endometriomas ováricos estudiando comparativamente el fenotipo antigénico de estas células en relación a las preEnSC.

Los resultados muestran (**Figura 24**) que no hay diferencias significativas en la expresión de los marcadores de MSC CD10, CD29, CD44, CD73 y α -SMA. No obstante, sí encontramos diferencias al comparar la expresión de algunos marcadores de pericitos. Concretamente, la expresión de CD140b, SUSD2 y nestina es significativamente más baja en preeEnSC; además, también se observa una menor expresión de MFG-E8 y STRO-1 en dichas células. La expresión de podoplanina también desciende significativamente en las preeEnSC.

Esto nos indica que en las células procedentes de focos de endometrio ectópico, con las características fenotípicas de MSC de médula ósea, se modula a la baja la expresión de algunos marcadores de pericitos y de eMSC (CD140b y SUSD2).

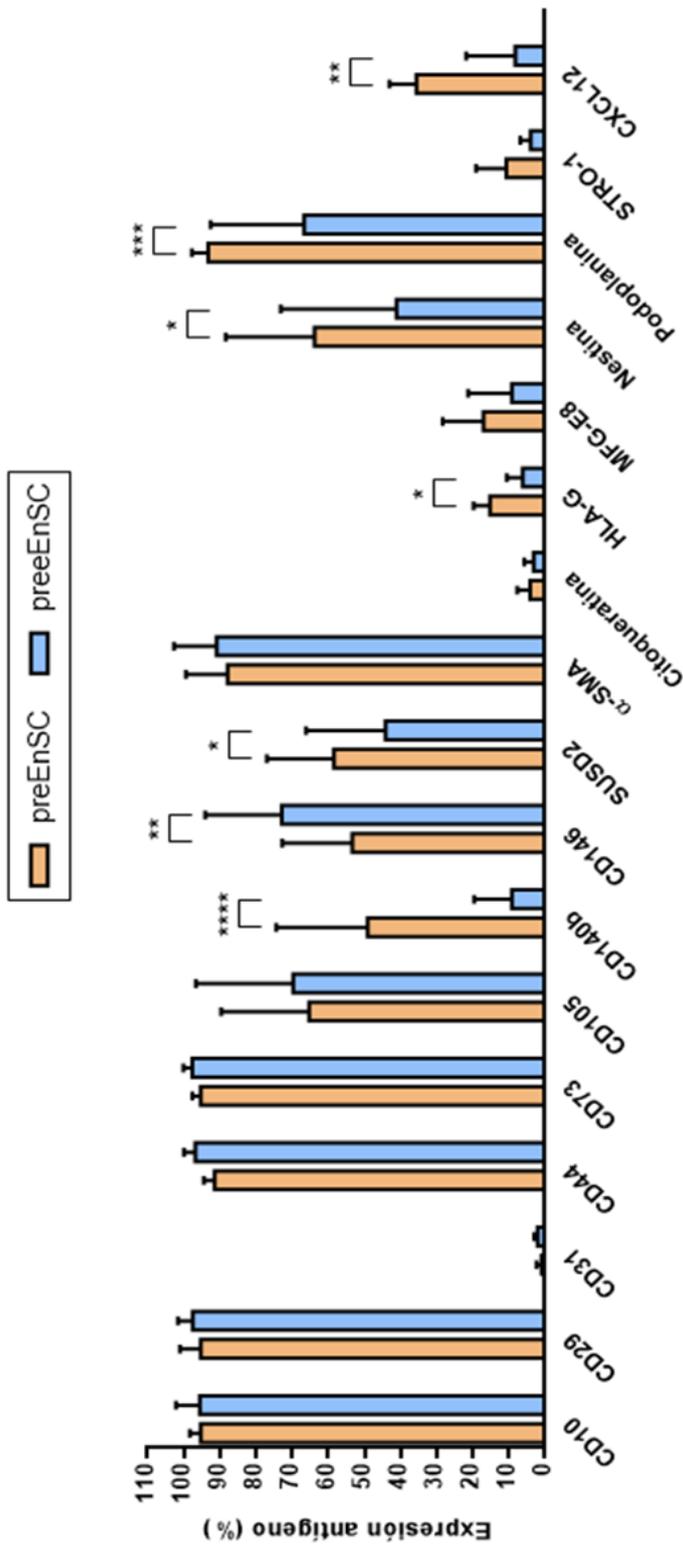


Figura 24. Comparación del perfil fenotípico entre preEnSC y preeEnSC. Expresión de los antígenos CD10, CD29, CD31, CD44, CD73, CD105, CD140b, CD146, SUSD2, α-SMA, citoqueratina, HLA-G, MFG-E8, nestina, podoplanina, STRO-1 y CXCL12 en preEnSC (naranja) y preeEnSC (azul). Las barras representan la media del porcentaje de células que expresan cada antígeno ± SD. Los experimentos se realizaron con 10 muestras de preEnSC y 10 muestras de preeEnSC. (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001).

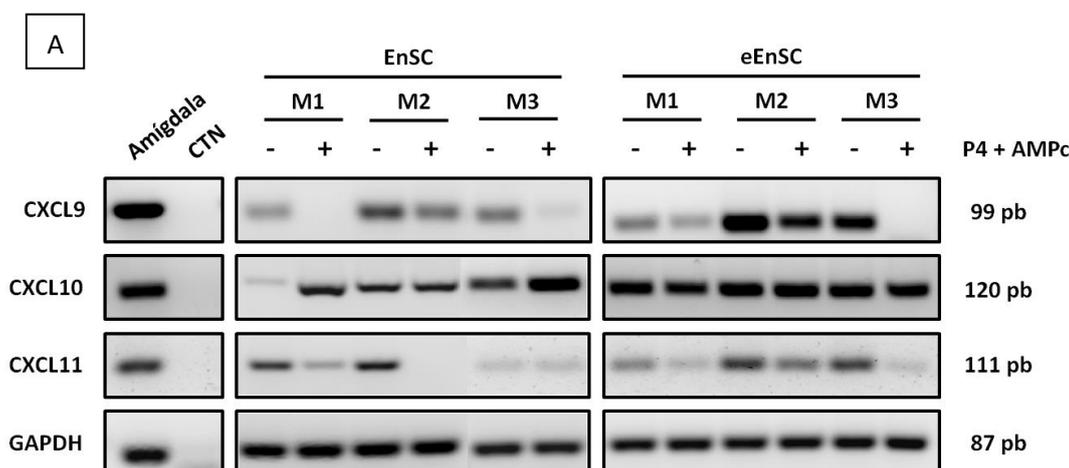
5.3. Expresión y secreción de quimioquinas por EnSC y eEnSC

Tras obtener los resultados mostrados en los apartados anteriores, quisimos comprobar si el proceso de decidualización afecta de manera diferente a la expresión y secreción de las quimioquinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en EnSC y eEnSC. Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

Pudimos comprobar que en las preeEnSC, el tratamiento con P4 y AMPc induce una disminución significativa de la expresión génica de CXCL9 y CXCL11; sin embargo, la expresión de CXCL10 no experimenta variación en las diferentes muestras (**Figura 25A**).

El análisis de la concentración de cada proteína en los MC de preeEnSC y deEnSC (**Figuras 25B, 25C y 25D**) mostró que la decidualización induce una significativamente menor secreción de CXCL9. En el caso de CXCL10 y CXCL11, no obtuvimos diferencias en la secreción proteica, siendo la concentración muy baja tanto en células no decidualizadas como en células decidualizadas (inferior a 12 pg/mL en el caso de CXCL10 e inferior a 3 pg/mL en el caso de CXCL11) (**Figuras 25C y 25D**).

Al comparar los niveles de cada quimioquina en el MC de preEnSC y preeEnSC, comprobamos que la secreción proteica de CXCL9 y CXCL10 es significativamente mayor en las preeEnSC, debido probablemente a su papel en el reclutamiento de linfocitos al foco inflamatorio. También es importante destacar que la diferencia en la secreción de CXCL9 entre los MC de células no decidualizadas y decidualizadas es mayor en el caso de las EnSC (**Figura 25B**), debido probablemente a la menor capacidad de las eEnSC a sufrir cambios funcionales en respuesta a la decidualización.



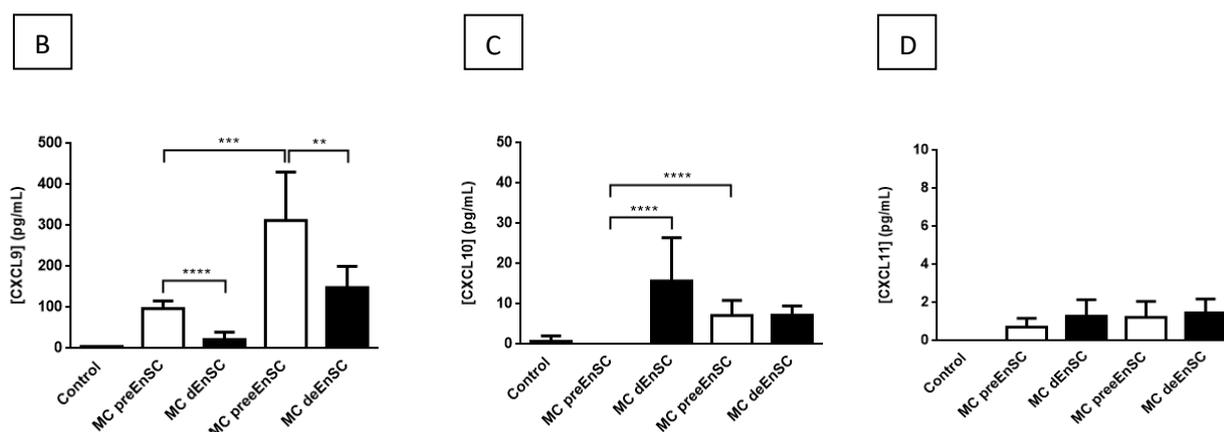


Figura 25. Comparación del efecto de la decidualización en la expresión de citoquinas por EnSC y eEnSC. A) Se muestra la expresión de CXCL9, CXCL10, CXCL11 y GAPDH por RT-PCR en tres líneas celulares, tanto en preEnSC y preeEnSC (-), como en dEnSC y deEnSC (+). Las células decidualizadas fueron tratadas con P4 y AMPc durante 8 días. Como gen de expresión constitutiva se usó la GAPDH (“housekeeping gene”). Se muestran los niveles (pg/mL) de las quimioquinas CXCL9 (B), CXCL10 (C) y CXCL11 (D) secretadas por EnSC y eEnSC al MC. Como Control (ausencia de proteína) se empleó el medio de cultivo Opti-MEM. Las barras representan la media \pm SD. Los experimentos se llevaron a cabo a partir de 4 muestras independientes y se realizaron triplicados de cada una de ellas. (**P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001).

5.4. Actividad quimiotáctica de EnSC y eEnSC

5.4.1. Actividad quimiotáctica de EnSC y eEnSC sobre PBL activados de sangre periférica

Uno de los componentes celulares involucrados en la patogenia de la endometriosis son los linfocitos T, por eso se estudió la quimiotaxis de PBL activados (mayoritariamente Th1 y Tc) debida a los factores secretados por EnSC y eEnSC. Después de un tiempo de migración de 24 horas, en cámara Transwell (**Figura 26A**), se observó una activación de la migración de PBL activados con los MC de preEnSC y preeEnSC en comparación con el Control (Opti-MEM); no obstante, el incremento solo fue significativo con el MC de preEnSC. Por otra parte, se inhibió la migración con los MC de ambos tipos de líneas celulares decidualizadas en comparación con el Control. En el caso de las dEnSC, la decidualización prolongada en el tiempo resulta en una mayor capacidad de inhibición de la migración de PBL activados (significativa con MC de 8 y 16 días de decidualización). La inhibición de la migración con los MC de deEnSC solo fue significativa con los correspondientes a los 8 días de decidualización. Además, dicha inhibición con los MC de deEnSC parece ser menor que con los MC de dEnSC y esto se observa más claramente con los MC obtenidos a los 16 días de decidualización. Este hecho puede deberse a que las eEnSC son menos efectivas al decidualizarse, es decir, son más resistentes a este proceso y, por lo tanto, estarían secretando menos factores responsables de la inhibición de la migración; o a la mayor secreción de CXCL9 en deEnSC que en dEnSC (**Figura 25B**).

Al estudiar la quimiotaxis de PBL durante 48 horas (**Figura 26B**), se observó una migración muy baja de los PBL no activados, siendo inferior a un 10% en todos los medios, y sin diferencias significativas entre los MC y el Control. Por otra parte, la migración de PBL activados aumentó en todos los medios respecto a la quimiotaxis durante 24 horas. De nuevo, se observó una activación significativa de la migración celular con los MC de preEnSC y preeEnSC en comparación con el Control; siendo en el MC de preeEnSC donde se obtiene la migración de PBL activados más

elevada de todas las muestras estudiadas (63,36%) y significativamente mayor que la migración en el MC de preEnSC. En cuanto a los MC de las células decidualizadas, se observó un descenso o inhibición de la migración en todos los MC de dEnSC y deEnSC en comparación con el Control. Después de 48 horas, no se obtuvieron diferencias significativas en la migración de PBL activados entre los MC de dEnSC y deEnSC.

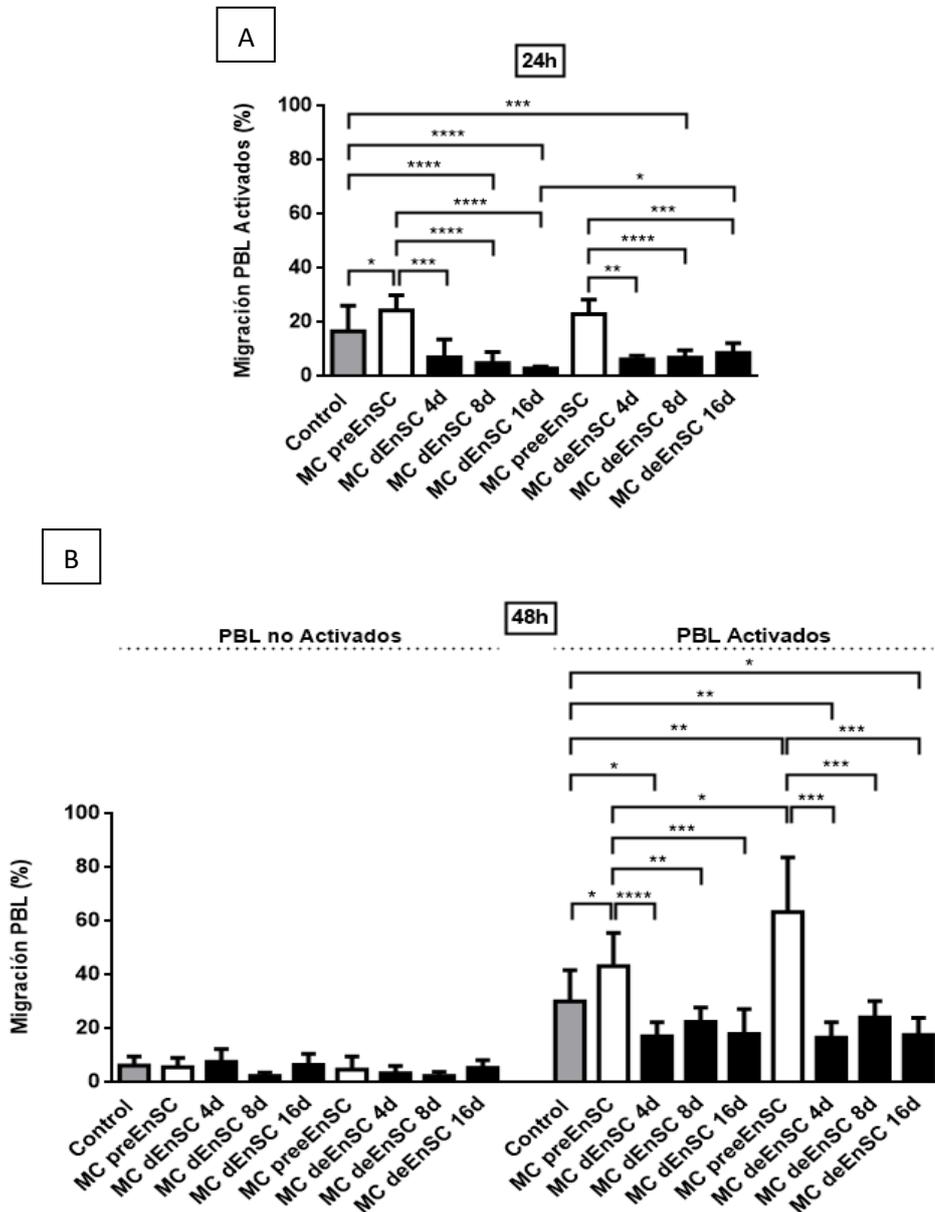


Figura 26. Análisis comparativo de la migración de PBL con MC de EnSC y eEnSC. A) Efecto del medio Control (Opti-MEM) y los MC de preEnSC, dEnSC, preeEnSC y deEnSC en la migración, durante 24 horas en Cámara Transwell, de PBL activados. B) Efecto del medio Control (Opti-MEM) y los MC de preEnSC, dEnSC, preeEnSC y deEnSC en la migración, durante 48 horas en Cámara Transwell, de PBL no activados y activados. En los apartados A y B las barras representan la media del porcentaje de migración de PBL \pm SD de 6 determinaciones independientes. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de 3 donantes sanas y se emplearon 6 líneas de EnSC y eEnSC para obtener los MC. Las líneas celulares se decidualizaron durante 4, 8 y 16 días para recoger los MC de dEnSC y deEnSC. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$).

5.4.1.1. Efecto de los MC de EnSC y eEnSC sobre la quimiotaxis de las subpoblaciones de PBL activados

Previamente al análisis del efecto de los factores secretados por EnSC y eEnSC sobre la quimioatracción de las diferentes subpoblaciones de PBL activados, se estudió el fenotipo basal de las células tras el periodo de activación y el fenotipo de las células tras permanecer en contacto con los MC de EnSC y eEnSC durante 48 horas. Los antígenos estudiados fueron CXCR3, CD3, CD4, CD8 y CD56. Los resultados obtenidos (*datos no mostrados*) señalaron que los factores secretados por EnSC y eEnSC no producen cambios significativos en el fenotipo de los PBL activados (**Figura 12**).

Teniendo en cuenta este dato y, tras examinar la migración de los PBL activados, se llevó a cabo el estudio de las subpoblaciones linfocitarias que habían experimentado quimiotaxis con los MC de EnSC y eEnSC (**Figuras 27A-27E**), atendiendo a la expresión de los marcadores mencionados anteriormente. Dicho estudio se realizó en células migradas durante 48 horas, ya que tras 24 horas de migración no obteníamos un número de células suficiente para poder realizar un estudio consistente. Además, en este caso se presentan los resultados obtenidos con MC de células deciduadas durante 8 días, ya que los resultados son equivalentes a los obtenidos con MC de 4 y 16 días de deciduación.

El análisis, por citometría de flujo, de las subpoblaciones de PBL activados migrados después de la exposición al medio Control (Opti-MEM) y los MC (**Figura 27**) mostró un perfil parecido al obtenido en los datos de quimiotaxis (**Figura 26**). El efecto activador de la migración del MC de preEnSC se observó sobre células T activadas (CD3+/CXCR3+), obteniendo diferencias significativas respecto al Control solamente en la subpoblación de células Tc (CD8+/CXCR3+) (**Figura 27D**). Por otra parte, la activación de la migración del MC de preeEnSC también se observó sobre células T activadas (CD3+/CXCR3+) y, en concreto, en la subpoblación de células Tc (CD8+/CXCR3+) (**Figuras 27A, 27B y 27D**). En cuanto al efecto inhibitorio de la migración de los MC de las células deciduadas, se obtuvo inhibición de la migración de células T activadas (CD3+/CXCR3+) por parte del MC de dEnSC, concretamente de la subpoblación de células Th1 (CD4+/CXCR3+) (**Figuras 27A, 27B y 27C**); mientras que el MC de deEnSC inhibió la llegada de células Th1 (CD4+/CXCR3+) y Tc (CD8+/CXCR3+) (**Figuras 27C y 27D**). En cuanto a las células NK activadas (CD56+/CXCR3+), no hemos evidenciado activación de la migración con los MC de preEnSC (en este caso disminuye) y preeEnSC, pero sí que se observa inhibición de la quimiotaxis con los MC de dEnSC y deEnSC (**Figura 27E**). Los resultados también señalan que hay una quimioatracción significativamente mayor de células T (CD3+/CXCR3+) y células NK (CD56+/CXCR3+) en el MC de preeEnSC que en el MC de preEnSC (**Figuras 27B y 27E**).

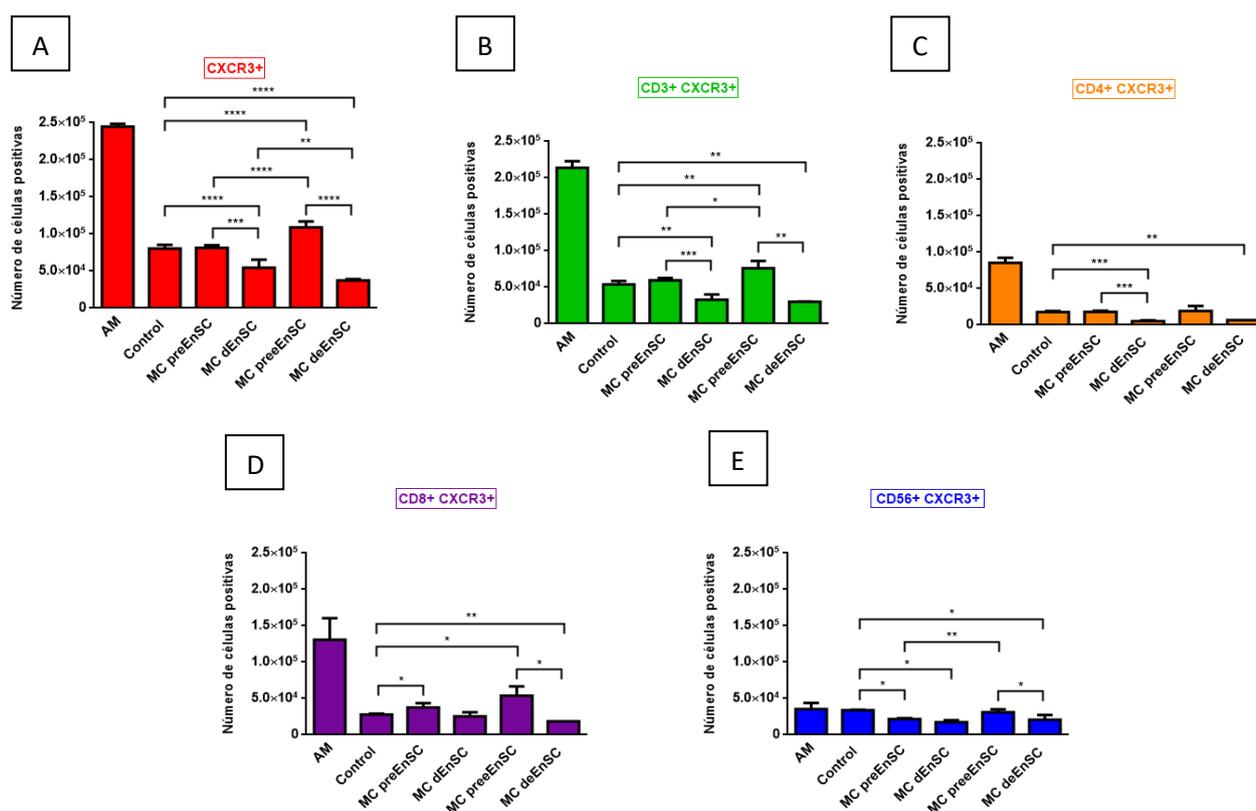


Figura 27. Análisis comparativo del efecto de los MC de EnSC y eEnSC en la quimioatracción de diferentes subpoblaciones de PBL activados. Número de células positivas para el marcador CXCR3 (A), CD3 (B), CD4 (C), CD8 (D) y CD56 (E), antes de migrar (AM) y migradas en el medio Control (Opti-MEM) y los MC de preEnSC, dEnSC, preeEnSC y deEnSC, durante 48 horas en Cámara Transwell. En todos los casos las barras representan el número de células positivas para cada marcador tras la migración \pm SD de 6 determinaciones independientes. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de 3 donantes sanas y se emplearon 6 líneas de EnSC y eEnSC para obtener los MC. Las líneas celulares se decidualizaron durante 8 días para recoger los MC de dEnSC y deEnSC. (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001).

5.4.2. Actividad quimiotáctica de EnSC y eEnSC sobre monocitos de sangre periférica

Siguiendo con el estudio de la inmunopatología de la endometriosis, otro componente celular que desempeña un papel muy importante en el desarrollo de la lesión y la inflamación son los macrófagos. El número de macrófagos se encuentra elevado en el fluido peritoneal y en el foco de endometrio ectópico. Partiendo de esta base, estudiamos la actividad quimiotáctica de las eEnSC que aislamos del quiste de endometriosis sobre monocitos de sangre periférica y la comparamos con la actividad quimiotáctica de las EnSC de mujeres sanas (**Figura 28** y **Figura 30**). También analizamos la diferenciación o polarización que experimentan los monocitos hacia un fenotipo característico de macrófago M1 o M2, al estar en contacto con los MC de EnSC y eEnSC (**Figura 29**).

En primer lugar, estudiamos la migración de los monocitos obtenidos de sangre periférica que es debida a los factores secretados por EnSC y eEnSC. Al analizar la quimiotaxis durante 24 horas, se observó que los valores obtenidos eran muy bajos, por eso se presentan los resultados obtenidos tras 48 horas de migración celular (**Figura 28**). Tras dicho periodo de incubación en Cámara Transwell, se observó una activación de la migración con los MC de preEnSC y preeEnSC en comparación con el Control (Opti-MEM); no obstante, el incremento solo fue significativo con el MC de preeEnSC. Por otra parte, se inhibió la migración con los MC de ambos tipos de líneas celulares decidualizadas en comparación con el Control, aunque esta inhibición no fue significativa. Además, el MC de preeEnSC parece presentar un mayor efecto activador de la migración que el MC de preEnSC, de manera que atrae a un mayor número de monocitos, aunque no se han obtenido diferencias significativas entre ambos MC. De igual manera, la inhibición de la migración con el MC de deEnSC es mayor que con el MC de dEnSC, pero tampoco se han obtenido diferencias significativas.

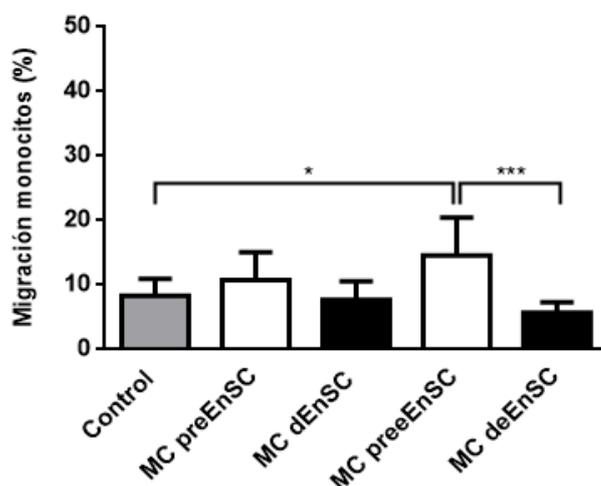


Figura 28. Análisis comparativo de la migración de monocitos de sangre periférica con MC de EnSC y eEnSC. Efecto del medio Control (Opti-MEM) y los MC de preEnSC, dEnSC, preeEnSC y deEnSC en la migración, durante 48 horas en Cámara Transwell, de monocitos. Las barras representan la media del porcentaje de migración de monocitos \pm SD de 5 determinaciones independientes. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de 3 donantes sanas y se emplearon 5 líneas de EnSC y eEnSC para obtener los MC. Las líneas celulares se decidualizaron durante 8 días para recoger los MC de dEnSC y deEnSC. (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$).

5.4.2.1. Cambios en el fenotipo antigénico de monocitos de sangre periférica en contacto con los MC de EnSC y eEnSC

Tal y como se llevó a cabo el estudio con los PBL activados, en monocitos de sangre periférica también analizamos el fenotipo basal de las células tras su purificación y el fenotipo tras permanecer en contacto con los MC de EnSC y eEnSC durante 48 horas. Los antígenos analizados fueron CD14, CD86, CD163 y CD206. Los resultados obtenidos señalan que los factores secretados por EnSC y eEnSC no producen cambios significativos en la expresión de CD14 y CD163 (*datos no mostrados*), pero sí en la expresión de CD86 y CD206, tal y como se muestra en las **Figuras 29A** y **29B**. Es importante destacar la expresión significativamente mayor de CD86 en los MC de las células decidualizadas al comparar con el medio Control y los MC de las células no decidualizadas; además, es equivalente a la obtenida en el fenotipo basal de los monocitos (T0: Tiempo 0). Por otra parte, en cuanto al antígeno CD206, se observa una expresión significativamente menor en los MC de dEnSC y deEnSC al comparar con el Control y los MC de preEnSC y preeEnSC. Además, en el análisis del fenotipo basal, los monocitos no expresan el marcador CD206, pero sí adquieren la expresión de dicho antígeno al estar en contacto con los MC de preEnSC y preeEnSC, así como en el Control.

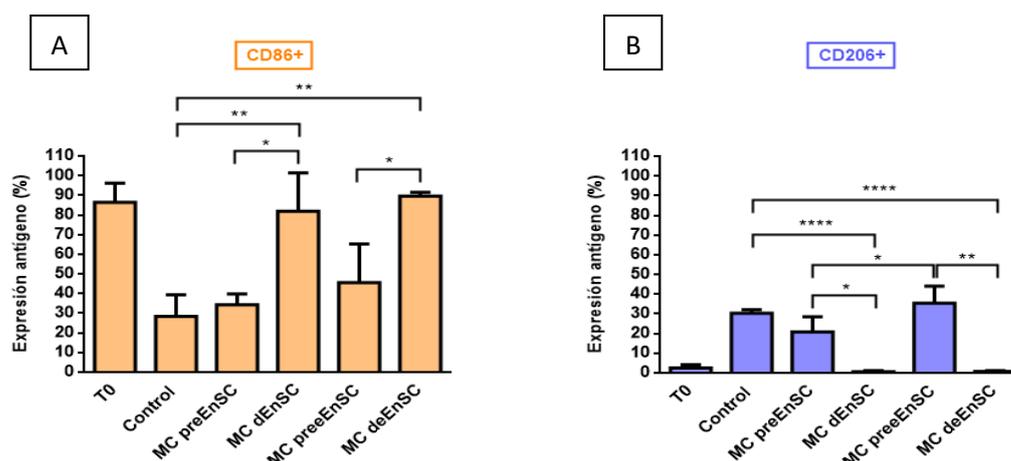


Figura 29. Estudio del fenotipo antigénico de monocitos de sangre periférica en contacto con MC de EnSC y eEnSC durante 48 horas. Se muestra el porcentaje de expresión de los marcadores CD86 (A) y CD206 (B) en los monocitos antes de la siembra en placa (T0: Tiempo 0) y después de estar en contacto durante 48 horas con los diferentes medios: Control (Opti-MEM), MC preEnSC, MC dEnSC, MC preeEnSC y MC deEnSC. En todos los apartados, las barras representan la media del porcentaje de expresión antigénica \pm SD de 4 determinaciones independientes. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de 3 donantes sanas y se emplearon 4 líneas de EnSC y eEnSC para obtener los MC. Se utilizaron MC de células tratadas con P4 y AMPc durante 8 días. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$).

5.4.2.2. Fenotipo antigénico de los monocitos quimioatraídos por los MC de EnSC y eEnSC

Teniendo en cuenta estos resultados, también se examinó la expresión antigénica de los monocitos quimioatraídos por los MC de EnSC y eEnSC en los experimentos que definen la **Figura 28**. El análisis se realizó por citometría de flujo y se presentan los resultados como porcentaje de expresión de cada marcador (CD14, CD86, CD163, CD206) en las células migradas (**Figura 30**).

Los resultados muestran que en el Control y en todos los MC hay quimioatracción de células que expresan los marcadores CD14 y CD86, siendo la expresión en ambos casos de entre un 80%-99% (**Figuras 30A y 30B**). Los siguientes dos marcadores estudiados (CD163 y CD206) son característicos de un fenotipo M2 antiinflamatorio y se observaron diferencias en la atracción de células CD163+ y CD206+ entre los MC (**Figuras 30C y 30D**). En cuanto a las células CD163+, se observó una mayor atracción en los MC de preEnSC y preeEnSC que en el Control, siendo significativa solamente en el MC de preeEnSC. No obstante, la migración de células CD163+ es significativamente menor en los MC de células decidualizadas al comparar con el Control y con los MC de células no decidualizadas. Estos resultados son equivalentes a los obtenidos al estudiar el marcador CD206, es decir, hay una alta quimioatracción de células CD206+ en los MC de preEnSC y preeEnSC, la cual es significativamente mayor que en el Control. Mientras que estas células no migran en los MC de dEnSC y deEnSC.

En resumen, cabe destacar que los factores secretados por las preeEnSC tienen un mayor efecto quimioatrayente sobre los monocitos que los de preEnSC. Además, en dicho MC de preeEnSC hay una elevada atracción de monocitos polarizados hacia un fenotipo M2 (CD163+/CD206+). Por otra parte, la decidualización de las EnSC y eEnSC resulta en una inhibición de la llegada de monocitos, principalmente de aquellos que son CD163+ y/o CD206+.

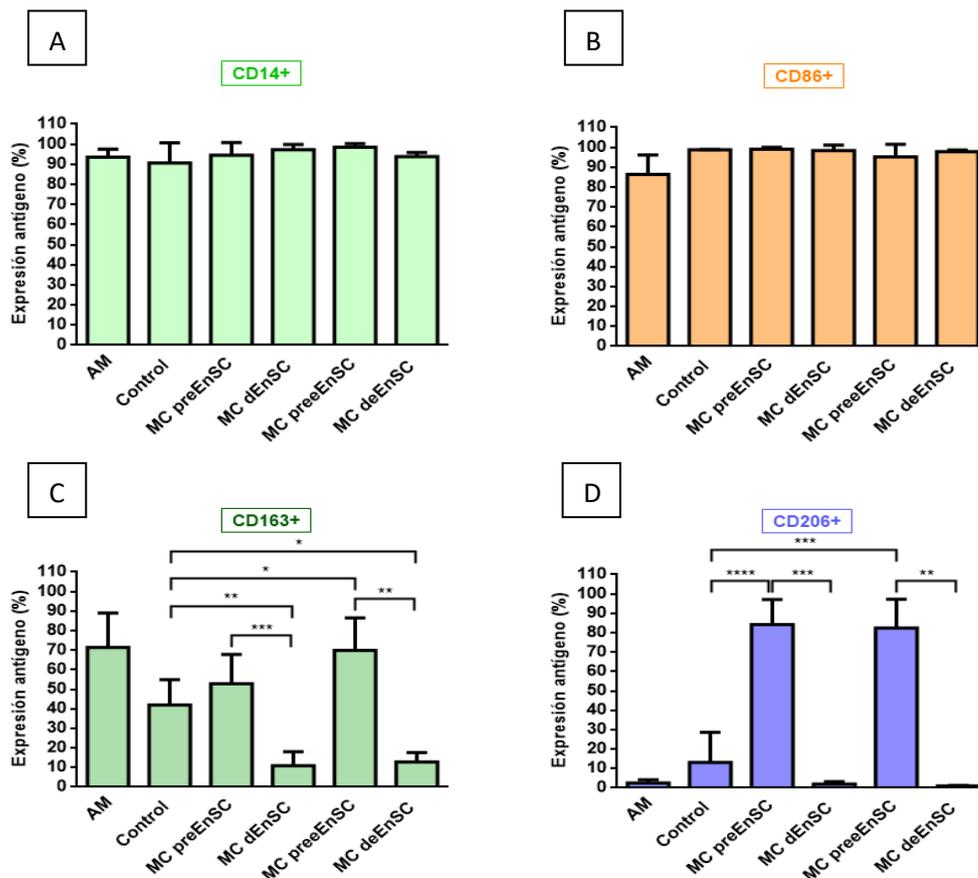


Figura 30. Análisis comparativo del fenotipo antigénico de monocitos de sangre periférica que han experimentado quimiotaxis en los MC de EnSC y eEnSC. Expresión del marcador CD14 (A), CD86 (B), CD163 (C) y CD206 (D) en monocitos antes de migrar (AM) y migrados en el medio Control (Opti-MEM) y los MC de preEnSC, dEnSC, preeEnSC y deEnSC, durante 48 horas en Cámara Transwell. En todos los casos las barras representan la media del porcentaje de expresión antigénica \pm SD de 5 determinaciones

independientes. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de 3 donantes sanas y se emplearon 5 líneas de EnSC y eEnSC para obtener los MC. Las líneas celulares se deciduizaron durante 8 días para recoger los MC de dEnSC y deEnSC. (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001).

5.4.3. Actividad quimiotáctica de EnSC y eEnSC sobre células tumorales: Jurkat y THP-1

Además del análisis realizado con linfocitos y monocitos de sangre periférica, se estudió el efecto quimiotáctico de los factores secretados por EnSC y eEnSC sobre dos de las líneas tumorales con las que habíamos trabajado anteriormente, es decir, con la línea Jurkat (células Th) y la línea THP-1 (monocitos). Se presentan los resultados tras una incubación de 24 horas con los MC, ya que en este tiempo el porcentaje de migración celular obtenido nos permitió realizar un análisis comparativo entre los distintos medios. El objetivo de dichos experimentos fue comprobar si también se observaban, sobre líneas celulares tumorales, los efectos activadores e inhibidores de la migración de linfocitos y monocitos de sangre periférica, que tienen los MC de EnSC y eEnSC. Se decidió realizar este análisis con células Jurkat y THP-1, ya que son líneas purificadas y la variabilidad en los resultados obtenidos es menor que empleando líneas primarias.

Los resultados mostraron que, frente a los resultados obtenidos con PBL activados en los que se observó una activación de la migración con los MC de preEnSC y preeEnSC (**Figura 26**), en el caso de las células Jurkat dichos MC tenían un efecto inhibitorio (**Figura 31A**). No obstante, al igual que en los PBL activados (**Figura 26**), la quimiotaxis de las células Jurkat se vio inhibida en los MC de dEnSC y deEnSC (**Figura 31A**). Como se detalló anteriormente, la menor eficacia en la quimiotaxis de esta línea linfocítica tumoral Jurkat, en comparación con los PBL activados, al estar en contacto con MC de células estromales uterinas no deciduizadas puede explicarse por la menor expresión del receptor de quimioquinas CXCR3 en estas células tumorales (**Figura 15C**).

Con el objetivo de comprobar que la inhibición de la migración de las células Jurkat en los MC de EnSC y eEnSC no se debía a un posible efecto citotóxico sobre estos linfocitos tumorales, se pusieron en contacto dichas células con los MC durante 24 horas. Los resultados mostraron que el porcentaje de células apoptóticas era inferior a un 5% en todos los MC (*datos no mostrados*), de manera que los factores secretados por EnSC y eEnSC no tienen un efecto citotóxico significativo sobre las células Jurkat. Este resultado confirma los datos obtenidos anteriormente con MC de preDSC y dDSC, los cuales mostraban que las células Jurkat no se veían afectadas en su viabilidad al ser incubadas durante 4 días con estos MC (**Figura 11**).

Los resultados obtenidos con la línea tumoral THP-1 (**Figura 31B**) muestran que el proceso de deciduización aumenta la secreción en las EnSC y eEnSC, al igual que en las DSC (**Figura 15B**), de factores quimiotácticos para monocitos (células THP-1); aunque estos MC no mostraron un efecto significativo sobre la migración de monocitos purificados de sangre periférica (**Figura 28**). No obstante, la activación de la migración de células THP-1 con el MC de preeEnSC sí fue equivalente a la observada en monocitos obtenidos de sangre periférica (**Figura 28**).

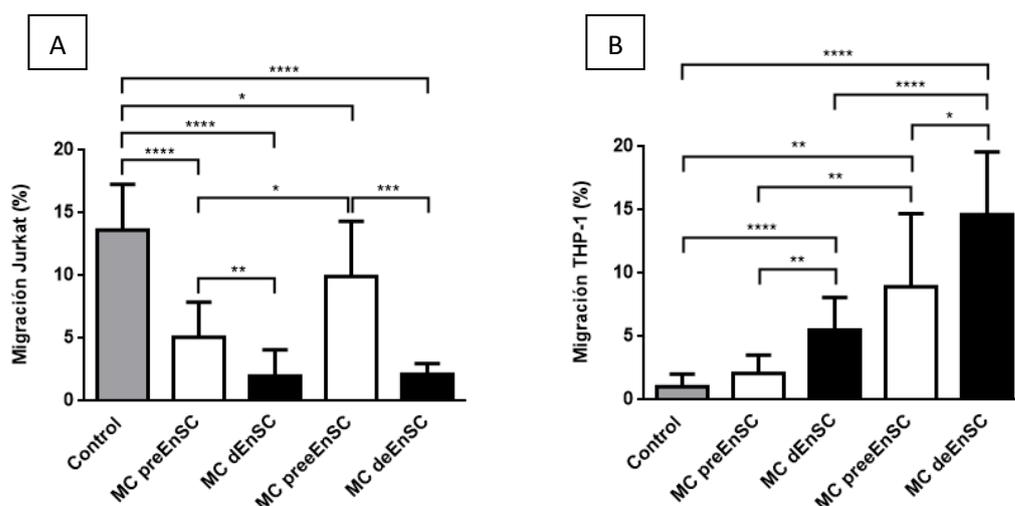


Figura 31. Análisis comparativo de la migración de células Jurkat y THP-1 con MC de EnSC y eEnSC. Efecto del medio Control (Opti-MEM) y los MC de preEnSC, dEnSC, preeEnSC y deEnSC en la migración, durante 24 horas en Cámara Transwell, de células Jurkat (A) y células THP-1 (B). Las barras representan la media del porcentaje de migración de ambas líneas celulares \pm SD de 5 determinaciones independientes. Se emplearon 5 líneas de EnSC y eEnSC para obtener los MC. Las líneas celulares se deciduizaron durante 8 días para recoger los MC de dEnSC y deEnSC. (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001).

5.4.3.1. Cambios en el fenotipo antigénico de células THP-1 en contacto con los MC de EnSC y eEnSC

En paralelo al estudio realizado con monocitos de sangre periférica, se analizó el fenotipo basal de las células THP-1 y el fenotipo tras estar en contacto con los MC de EnSC y eEnSC durante 48 horas. Nuevamente, los antígenos analizados fueron CD14, CD86, CD163 y CD206. Los resultados obtenidos muestran que la línea de células THP-1 con la que trabajamos no expresa los antígenos CD163 y CD206; además, los factores secretados por las células estromales no producen cambios en la expresión de estos antígenos, la cual es inferior a un 10% en todos los casos (**Figuras 32C y 32D**). No obstante, tal como se muestra en las **Figuras 32A y 32B**, sí se obtienen diferencias en la expresión de CD14 y CD86. Los datos nos permiten comprobar que esta línea tumoral THP-1 adquiere la expresión del marcador CD14 al estar en contacto con los MC, siendo en todos los casos significativamente mayor que en el Control. Es importante destacar que en los MC de células deciduizadas se obtiene una elevada expresión de CD14 y CD86 (alrededor de un 90%), la cual es significativamente mayor que la obtenida en el Control y en los MC de las células no deciduizadas. Por otra parte, la expresión de ambos antígenos es significativamente más alta en el MC de preeEnSC que en el MC de preEnSC.

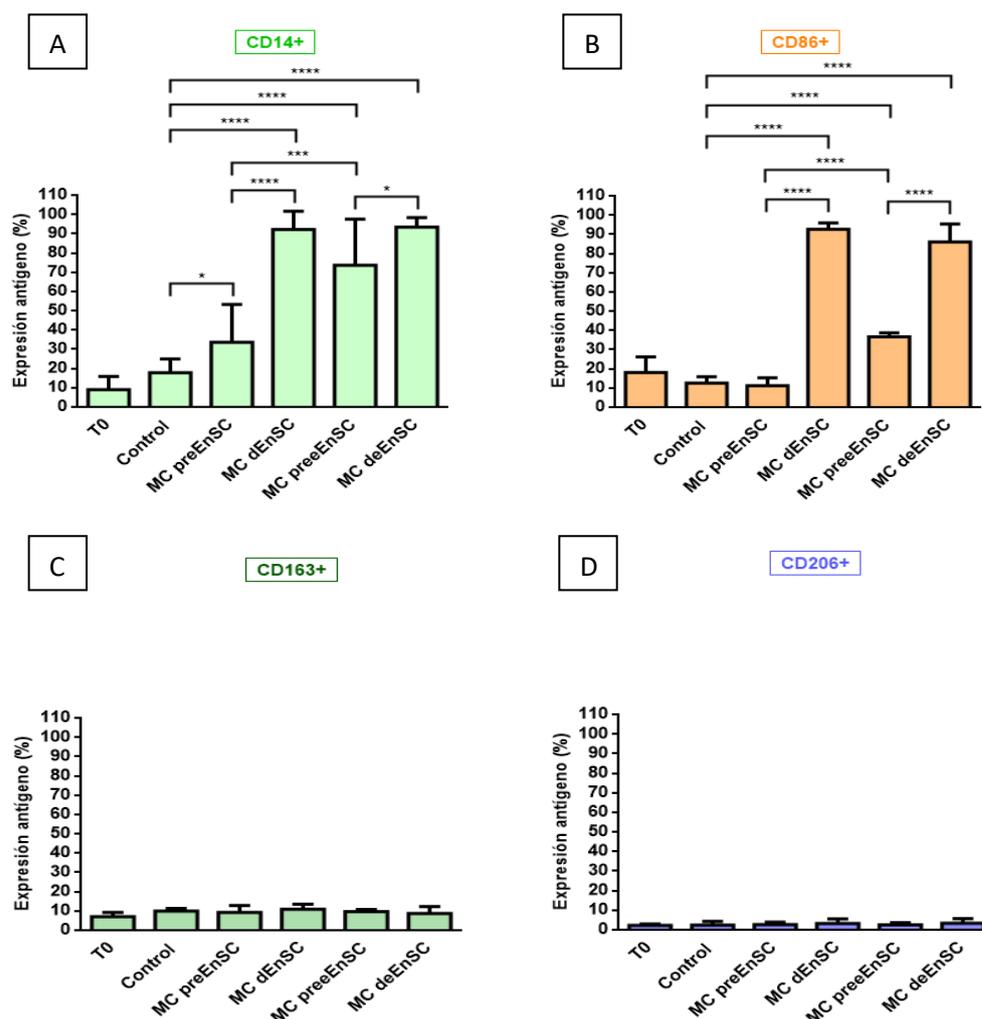


Figura 32. Estudio del fenotipo antigénico de células THP-1 en contacto con MC de EnSC y eEnSC durante 48 horas. Se muestra el porcentaje de expresión de los marcadores CD14 (A), CD86 (B), CD163 (C) y CD206 (D) en las THP-1 antes de la siembra en placa (T0: Tiempo 0) y después de estar en contacto durante 48 horas con los diferentes medios: Control (Opti-MEM), MC preEnSC, MC dEnSC, MC preeEnSC y MC deEnSC. En todos los apartados, las barras representan la media del porcentaje de expresión antigénica \pm SD de 4 determinaciones independientes. Se emplearon 4 líneas de EnSC y eEnSC para obtener los MC. Se utilizaron MC de células tratadas con P4 y AMPc durante 8 días. (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$).

5.4.3.2. Fenotipo antigénico de células THP-1 quimioatraídas por los MC de EnSC y eEnSC

Posteriormente, se examinó la expresión antigénica de las células THP-1 que habían experimentado quimiotaxis al estar en contacto con los MC de EnSC y eEnSC durante 48 horas en Cámara Transwell. Se presentan los resultados como porcentaje de expresión de los antígenos CD14 y CD86 en las células migradas (**Figuras 33A y 33B**). En cuanto a CD163 y CD206, no se muestran los resultados porque no hay migración de células positivas para dichos marcadores (*datos no mostrados*).

Podemos observar que el medio Control y todos los MC atraen células que expresan CD14 y CD86. Los resultados explicados en la **Figura 31B** mostraban una migración significativamente mayor de células THP-1 en el MC de preeEnSC que en el MC de preEnSC, y el análisis fenotípico indica que la quimioatracción de células CD14+ y CD86+ es significativamente más elevada en dicho MC (**Figura 33**). Además, también observábamos que en los MC de células decidualizadas aumenta más la migración de células THP-1 que en los MC de células no decidualizadas (**Figura 31B**), y hemos podido comprobar que los factores secretados por dEnSC y deEnSC incrementan la migración de células CD14+ y CD86+, comparado con el Control y con los MC de preEnSC y preeEnSC (**Figura 33**).

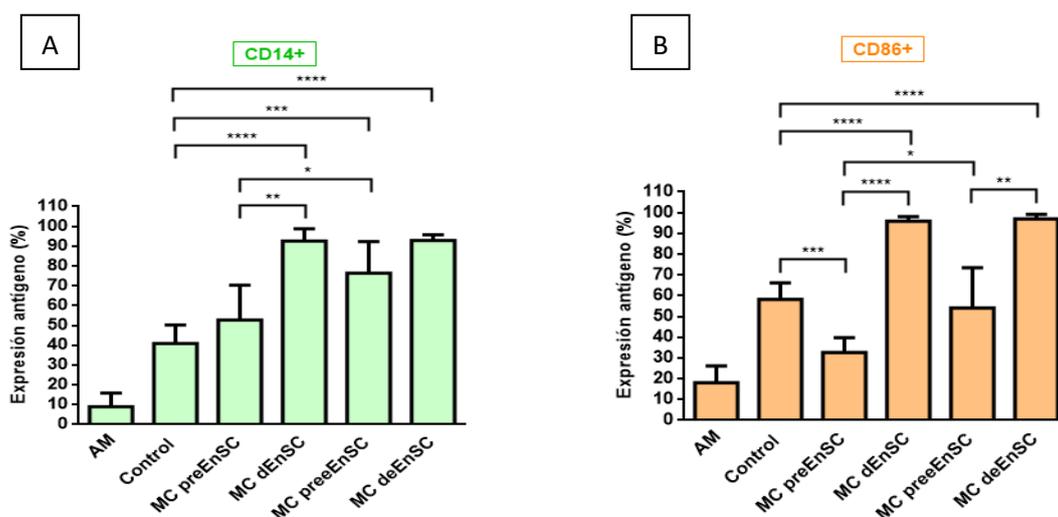


Figura 33. Análisis comparativo del fenotipo antigénico de células THP-1 que han experimentado quimiotaxis en los MC de EnSC y eEnSC. Expresión del marcador CD14 (A) y CD86 (B) en células THP-1 antes de migrar (AM) y migradas en el medio Control (Opti-MEM) y los MC de preEnSC, dEnSC, preeEnSC y deEnSC, durante 48 horas en Cámara Transwell. En todos los casos, las barras representan la media del porcentaje de expresión antigénica \pm SD de 3 determinaciones independientes. Se emplearon 3 líneas de EnSC y eEnSC para obtener los MC. Las líneas celulares se decidualizaron durante 8 días para recoger los MC de dEnSC y deEnSC. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$).



DISCUSIÓN



Las MSC forman un conjunto heterogéneo de células estromales que pueden ser aisladas de los tejidos adultos. El gran interés terapéutico en la medicina regenerativa que ha generado el estudio de estas células se debe a su capacidad de autorenovación, pluripotencia y a su capacidad para interactuar con las células inmunitarias, modulando las respuestas innata y adaptativa. Las MSC pueden ser aisladas de tejidos adultos (células madre adultas), por ejemplo, la piel, el tejido adiposo o la médula ósea^{198,228}. En la presente investigación, hemos realizado un análisis detallado del fenotipo antigénico y funciones de diferentes tipos de células con potencial de célula progenitora mesenquimal; concretamente, las células estromales procedentes de la decidua (DSC) y del endometrio (EnSC, obtenidas de sangre menstrual). A su vez, hemos analizado las características fenotípicas y las propiedades inmunoregulatoras de células endometriales de localización ectópica, en pacientes con endometriosis (eEnSC).

En diversos estudios de investigación básica y estudios clínicos se han empleado células estromales procedentes de sangre menstrual y de decidua. Por ejemplo, *Hida et al.* utilizaron células estromales de sangre menstrual para reparar tejido cardíaco dañado tras diferenciarlas a cardiomiocitos²²⁹; también se han empleado en estudios clínicos con pacientes de esclerosis múltiple²³⁰; por otra parte, las células deciduales se han usado en estudios clínicos para el tratamiento de la enfermedad de injerto contra el hospedador, gracias a sus propiedades inmunosupresoras²³¹.

Origen mesenquimal de las DSC y las EnSC

Las líneas de preDSC con las que hemos trabajado experimentan, bajo el efecto de los factores decidualizantes (AMPc y P4), una diferenciación equivalente a la que tiene lugar de manera fisiológica durante la fase secretora del ciclo endometrial y que se prolonga en el tiempo si se produce la gestación⁵³ (**Figura 1A**).

Por otra parte, el fenotipo antigénico de las preDSC es similar y compatible con el de MSC de médula ósea (**Figura 1B**) (**Tabla 13**). Dicho fenotipo, junto a la adherencia al plástico del frasco de cultivo y la capacidad de diferenciación a células de tres linajes mesenquimales, es decir, a adipocitos, osteoblastos y condrocitos (**Figura 2C**), son propiedades que las identifican como MSC, según los criterios mínimos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT)²³.

Otras características de las MSC son la expresión de marcadores de células progenitoras y la clonogenicidad¹⁹⁸, las cuales también fueron analizadas en nuestras líneas de preDSC. Los resultados mostraron que estas células expresan los marcadores de células multipotentes OCT-4, NANOG y ABCG2 (**Figura 2A**). Además, la eficiencia clonogénica obtenida se encuentra entre un 4% y un 15% (**Figura 2B**).

Nuestros resultados confirman que las preDSC estudiadas están estrechamente relacionadas con las MSC, tal y como se resume en la siguiente tabla (**Tabla 17**).

Tabla 17. Comparativa entre las propiedades de las preDSC y las MSC.

Características	preDSC	MSC	Referencias
Fenotipo antigénico	Tabla 13	Tabla 13	80,232,233
Criterios mínimos ISCT	+	+	23,232
Decidualización	PRL (ARNm+, proteína+)	PRL (ARNm+, proteína-)	80
Diferenciación mesenquimal	+	+	23,210
Contractilidad	+	+	232,234
Marcadores de célula madre (<i>stem cell</i>)	+	+	210,212
Clonogenicidad	+	+	210,235
Resistencia a la apoptosis	+	+	103,236
Interacción con células hematopoyéticas	+	+	237,238
Supervivencia en xenotrasplantes	+	+	210,239,240
Localización perivascular	+	+	90,232
Actividad inmunoreguladora <i>in vivo e in vitro</i>	+	+	80,82,199,210

De forma equivalente a las líneas de preDSC, las líneas de preEnSC con las que hemos trabajado experimentan, en presencia de AMPc y P4 en el medio de cultivo, una decidualización equivalente a la que tiene lugar de manera fisiológica durante la fase secretora del ciclo endometrial⁵³ (**Figura 16A**). Por otra parte, pudimos comprobar que el fenotipo antigénico de las preEnSC es similar y compatible con el de MSC de médula ósea (**Figura 16B**) (**Tabla 15**).

Si nos centramos en la relación de preDSC y preEnSC con MSC, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por *Dimitrov et al.* que caracterizaron células estromales con capacidad clonogénica procedentes del endometrio y la decidua, las cuales presentaban características propias de células madre mesenquimales, en concreto, la capacidad de autorenovación y diferenciación a células de distintos linajes, clonogenicidad y expresión de marcadores de MSC^{202,209}. Nuestros resultados lo confirman al mostrar que ambos precursores estromales tienen un fenotipo antigénico compatible con el de MSC (**Tablas 13 y 15**) y apoyan la hipótesis de que las MSC de médula ósea son la fuente o el origen de las EnSC y las DSC^{143,144}.

Dicha relación sugiere que las MSC se dirigen, desde médula ósea, bien al endometrio no gestante o bien a la decidua, dando lugar en el primer caso a las preEnSC y en el segundo, a las preDSC. Esta afirmación se sustenta en el descubrimiento de células endometriales derivadas de células madre de una donante de médula ósea, en el útero de la mujer que recibió el trasplante de médula ósea¹⁴³.

A pesar de la existencia de estas similitudes, encontramos diferencias en la expresión de algunos antígenos. Por ejemplo, los antígenos BAFF y CXCL13 se expresaban en preDSC y preEnSC, pero no en MSC (**Tablas 13 y 15**). Esta diferencia puede estar asociada a las interacciones que establecen las MSC con las células inmunitarias al llegar al endometrio o la decidua⁸². La expresión de dichos marcadores a nivel decidual es determinante, ya que CXCL13 es una quimioquina que atrae células Treg, las cuales desempeñan un papel clave en la tolerancia inmunitaria materno-fetal^{80,241,242}; por su parte, BAFF participa en la modulación de la tolerancia y

la homeostasis de las células B, y a nivel de la decidua parece estar involucrado en la inducción de una respuesta tolerogénica Th2^{80,243,244,245}.

También encontramos diferencias asociadas al proceso de decidualización, ya que las MSC mostraron una baja capacidad de diferenciación y no secretaron PRL (**Figura 3**). Debido a ello, nuestros resultados sugieren que las MSC adquieren de manera gradual la capacidad de decidualización, desde su origen en médula ósea hasta el tejido endometrial o decidual⁴².

Por lo anteriormente descrito, las preDSC y las preEnSC parecen ser MSC endometriales (eMSC) por su capacidad clonogénica, autorenovación y multipotencia para diferenciarse en células del linaje adipogénico, osteogénico, condrogénico y miogénico. Tal como las preDSC y las preEnSC, las eMSC expresan los marcadores CD140b, CD146 y SUSD2; son capaces de decidualizarse y se encuentran en localizaciones perivasculares^{18,25,26,246,247,248,249}. No obstante, estas eMSC fueron aisladas de un endometrio no gestante, al igual que las preEnSC; mientras que nuestras líneas de preDSC fueron obtenidas y aisladas de muestras de decidua humana.

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado, en un modelo murino de aborto espontáneo recurrente, que las preDSC humanas tienen efecto terapéutico²¹⁰. Esto sugiere que las DSC, como las EnSC, pueden emplearse en terapia celular para tratar enfermedades de origen inmunológico, gracias a su capacidad inmunoreguladora *in vivo* e *in vitro*⁸². La ventaja de este tipo de tratamientos frente al uso de MSC de médula ósea radicaría, en parte, a la facilidad de obtención (principalmente en el caso de las EnSC) y cultivo de estas células estromales, aunque se necesitarían más estudios que permitieran dilucidar qué tipo celular es más adecuado.

DSC como pericitos

El análisis de la expresión del marcador de pericitos α -SMA y el estudio de la actividad contráctil de las líneas de preDSC había llevado, anteriormente, a proponer una relación entre las preDSC y estas células perivasculares^{79,101,102}. En la presente investigación hemos estudiado un mayor número de antígenos para poder definir el fenotipo antigénico de las preDSC. Los resultados muestran que de los 36 antígenos analizados por citometría de flujo, 14 se expresaban en las preDSC y eran marcadores de pericitos (**Tabla 13**). Actualmente no se conoce ningún marcador que sea específico de pericitos y permita diferenciarlos de otras células; además, la expresión de los marcadores más comunes de estas células varía en función del estado del desarrollo, de la ausencia o presencia de patología, del cultivo *in vitro*, etc²⁵⁰. No obstante, uno de los antígenos que sí los caracterizan es la α -SMA, proteína responsable de la actividad contráctil de muchos tipos celulares²⁵¹. Junto a este marcador, hay otros antígenos comúnmente asociados a pericitos, tales como CD140b²⁵⁰ y CD146²⁵².

Además, al igual que estas células perivasculares^{94,95}, las líneas de preDSC expresan ARNm de diversos factores angiogénicos (ANGPT1, FGF2, HGF, PGF y VEGF) y presentan contractilidad inducida por citoquinas (**Figura 4**). Haber podido comprobar que las preDSC presentan estas propiedades es muy importante, ya que demuestra que estas células desarrollan una función relevante en la angiogénesis, un proceso imprescindible para el éxito y progreso de un embarazo²⁵³. El antígeno CD146, el cual se asocia a pericitos implicados en la angiogénesis²⁵⁴, fue detectado en las líneas de preDSC (**Tabla 13**) (**Tabla 14**) y en preDSC perivasculares *in vivo* (**Figuras 5B y 5C**).

Mediante el análisis de las criosecciones de decidua humana, pudimos comprobar que, al igual que los pericitos, las preDSC humanas se encuentran *in vivo* alrededor de los vasos sanguíneos. Pero bajo efecto hormonal, estas células se decidualizan y, por lo tanto, se diferencian y se desplazan por todo el estroma en el endometrio gestante (**Figura 5A**). Mediante microscopía confocal, observamos que las células que expresan α -SMA colocalizan con aquellas que expresan CD140b, CD146, SUSD2, MFG-E8, nestina y STRO-1 (**Figura 5B**). Es importante señalar que el análisis, por citometría de flujo, también había confirmado que dichos marcadores de pericitos eran expresados por nuestras líneas de preDSC (**Tabla 13**). Este resultado confirma que las células perivasculares eran preDSC y estas, a su vez, estaban estrechamente relacionadas con los pericitos.

Por su parte, *Vento-Tormo et al.* identificaron, mediante transcriptómica de célula única, diferentes tipos celulares en muestras de decidua humana del primer trimestre de embarazo. La composición celular de la decidua humana incluía células estromales perivasculares que presentaban un fenotipo antigénico CD45-, CD34-, CD140b+, CD146+, SUSD2+, α -SMA+, ANGPT1+, VEGF-A+ y PRL-²¹⁷, equivalente al detectado en nuestras líneas de preDSC (**Tabla 13**) (**Figura 4A**).

Otra característica de los pericitos es su relación con MSC¹⁹⁹. Muchos de los antígenos, incluidos los marcadores de pericitos expresados por las líneas de preDSC, también se expresan en MSC (**Tabla 13**). Además, las eMSC, al igual que nuestras líneas de preDSC, expresan CD140b y CD146, y se detectan en localizaciones perivasculares²⁴⁹.

Los resultados obtenidos, que relacionan las preDSC con los pericitos y las MSC, coinciden con lo que otros investigadores han descubierto. En sus estudios con MSC, *Castrechini et al.* propusieron la existencia de un nicho vascular de MSC en la decidua a término y, en consonancia con ello, nuestros resultados también sugieren que las preDSC de la decidua humana son pericitos que representan el nicho vascular de las MSC en la decidua²⁵⁵.

La localización perivascular de las preDSC favorece su actividad quimiotáctica sobre leucocitos de sangre periférica que llegan al endometrio y la decidua, especialmente células NK y monocitos^{82,110}. Además, la actividad contráctil de las preDSC probablemente tenga un efecto en la regulación del flujo sanguíneo de los vasos en los cuales se localizan¹⁰².

Es importante señalar que todas las características propias de pericitos fueron presentadas por nuestras líneas de preDSC, tal y como se resume en la siguiente tabla (**Tabla 18**).

Tabla 18. Comparativa entre las propiedades de las preDSC y los pericitos.

Características	preDSC	pericitos	Referencias
Localización perivascular	+	+	232,250
Expresión de marcadores de pericitos	+	+	199,232,250
Contractilidad inducida por citoquinas	+	+	95,102,232
Expresión de factores angiogénicos	+	+	94,232
Actividad quimiotáctica	+	+	96,232
Actividad fagocítica	+	+	201,256
Actividad inmunoreguladora	+	+	84,98
Relación con MSC	+	+	99,199
Decidualización	+	¿?	84

Decidualización de las DSC

Una vez demostrada la relación fenotípica y funcional de las preDSC con MSC y pericitos, estudiamos detalladamente el proceso de decidualización de las preDSC y cómo dicho proceso modifica algunas de las propiedades de MSC/pericitos que presentan estas células.

Como mencionamos anteriormente, al decidualizar las diferentes líneas de preDSC vimos que las dDSC adquirieron una morfología redondeada y secretaron PRL (**Figura 1A**) (**Ilustración 17**). El estudio *in vivo* que hemos realizado en cortes de decidua humana de primer trimestre de embarazo muestra que las preDSC tienen un aspecto fibroblástico y se encuentran alrededor de los vasos sanguíneos (**Figura 5A**). Tanto en el análisis *in vivo* como en el estudio *in vitro* por citometría de flujo, hemos podido comprobar que las preDSC expresan el marcador de células endometriales estromales, CD10; así como marcadores de MSC/pericitos, es decir, α -SMA, nestina, CD140b, CD146, SUSD2, podoplanina y STRO-1 (**Tabla 13**) (**Figura 5B**) (**Figuras 7A y 7B**). No obstante, durante la decidualización, las dDSC adquieren una morfología redondeada y son capaces de migrar hacia una zona extravascular, es decir, hacia el estroma (**Figura 5A**) (**Ilustración 17**). Además, mediante citometría de flujo, observamos que mantienen la expresión de CD10, pero la expresión de α -SMA, nestina, CD140b, CD146 y SUSD2 disminuye (**Figuras 7A y 7B**) (**Ilustración 17**). Analizamos también la variación de la IMF del antígeno α -SMA a medida que aumenta el tiempo de decidualización y comprobamos que esta disminuye significativamente (**Figura 7C**). Anteriormente, demostramos que la polimerización de la α -SMA en las fibras de estrés de la célula es la responsable de la contractilidad y la morfología fibroblástica de las preDSC; de manera que la menor expresión de este antígeno en las dDSC puede ser la causa de que adquieran una morfología redondeada y de que disminuya su contractilidad celular⁷⁹, fenómenos determinantes para la implantación del blastocisto^{232,257}.

Nuestros resultados también coinciden con los datos obtenidos por *Vento-Tormo et al.* en su estudio transcriptómico de decidua humana del primer trimestre de embarazo. Como se ha mencionado anteriormente, esta investigación mostró que la decidua está formada por diferentes poblaciones de células estromales perivasculares y no perivasculares. Las células perivasculares no expresaban PRL y tenían un fenotipo antigénico equivalente al de las preDSC (α -SMA+, CD140b+, CD146+ y SUSD2+); mientras que las células no perivasculares eran equivalentes a

nuestras dDSC, ya que expresaban PRL, pero la expresión de α -SMA, CD140b, CD146 y SUSD2 disminuyó o fue negativa²¹⁷. Por su parte, *Suryawanshi et al.* también demostraron, en un estudio transcriptómico, que las células estromales decidualizadas expresaban PRL y diferentes genes relacionados con la remodelación de la matriz extracelular²⁵⁸.

El hecho de que las preDSC expresen los antígenos CD140b y CD146 puede explicarse por su localización perivascular, ya que estas moléculas participan en la interacción de las preDSC con las células endoteliales durante la angiogénesis²⁵⁹. No obstante, al decidualizarse y abandonar la localización perivascular y, por lo tanto, el contacto con las células endoteliales, la expresión en dDSC es menor (**Figuras 7A y 7B**). También disminuye la expresión en dDSC extravasculares de antígenos implicados en la angiogénesis y la homeostasis vascular, tales como, α -SMA, nestina, SUSD2, podoplanina y STRO-1^{26,260,261,262}.

No obstante, cuando posteriormente estudiamos la expresión de otros factores angiogénicos, tales como ANGPT1, HGF, FGF2 y VEGF comprobamos que no hay diferencias de expresión entre preDSC y dDSC (**Figuras 10A y 10B**); e incluso, en otros factores como PGF y CXCL12 la expresión aumenta en dDSC (**Figuras 7A, 7B, 10A y 10B**). Esto puede deberse a una compensación, en la zona extravascular, de la inhibición de la expresión de algunas moléculas relacionadas con la angiogénesis en el espacio perivascular. Además, por lo que respecta a PGF, su presencia en el estroma es determinante ya que regula la maduración de células uNK, necesaria para la invasión, crecimiento y desarrollo del trofoblasto; también estimula el reclutamiento y activación de monocitos e incrementa la proliferación y supervivencia de macrófagos²⁶³. Por su parte, la molécula CXCL12 también está implicada en la invasión del trofoblasto, en el mantenimiento de su homeostasis y en el establecimiento de los mecanismos de tolerancia materno-fetal; ya que participa en el reclutamiento de células Th2 y células NK, que se diferencian adquiriendo un fenotipo característico de uNK²⁶⁴.

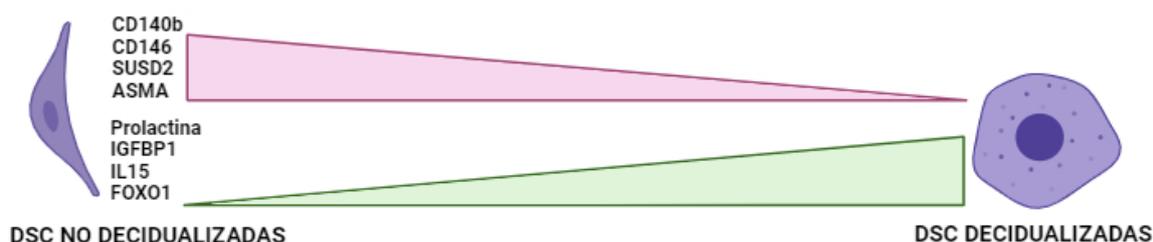


Ilustración 17. Esquema representativo de la evolución de la expresión de diferentes marcadores en DSC durante el proceso de decidualización. Imagen creada con el software BioRender.

El crecimiento embrionario va acompañado de una importante remodelación e involución de la decidua y dicha regresión se produce por apoptosis^{265,266,267}. En este proceso parecen estar involucradas citoquinas y otros factores del microambiente materno-fetal. Previamente, nuestro grupo de investigación demostró que, tras la decidualización, las dDSC (pero no las preDSC) secretan factores que inducen la apoptosis de preDSC y dDSC¹⁰³. Probablemente este resultado explique el adelgazamiento fisiológico gradual que tiene lugar en la decidua permitiendo así el crecimiento del trofoblasto durante el embarazo⁷⁷. Por otra parte, también habíamos comprobado

que las DSC son capaces de secretar factores que inhiben la apoptosis espontánea de células T y células NK, es decir, favorecen la supervivencia de los linfocitos en la interfaz materno-fetal²³⁷. Es por esto que las DSC son capaces de atraer de manera selectiva leucocitos desde el torrente circulatorio a la decidua, pero también de favorecer la supervivencia de las células inmunitarias que atraen. En contraste, hemos observado que las dDSC presentan un efecto antitumoral sobre algunas líneas tumorales.

El análisis del efecto antitumoral de las preDSC y las dDSC que llevamos a cabo en la presente investigación mostró que el MC de dDSC induce apoptosis en las líneas celulares tumorales Raji, A375, HeLa y SKBR3. En estos casos, el porcentaje de células apoptóticas en el MC de dDSC es significativamente mayor que el obtenido en el MC de preDSC. No obstante, la apoptosis de las líneas tumorales Jurkat, THP-1 y Cal33 con el MC de dDSC no fue significativamente mayor que en el medio Control (**Figura 11**). De forma semejante, se ha observado que un tipo células relacionadas también con MSC, las "*Wharton's jelly mesenchymal stem cells*", secretan factores que inducen apoptosis en diversas líneas celulares tumorales^{219,220,221}. En este contexto, se ha visto, recientemente, en modelo murino y mediante transcriptómica de célula única, la existencia de una subpoblación de células DSC con la capacidad de inducir apoptosis en células tumorales²⁶⁸.

Las moléculas proapoptóticas secretadas por las DSC aún no han sido identificadas, es por ello que se precisan estudios de proteómica para llevarlo a cabo. No obstante, este efecto antitumoral de las DSC tal vez no represente una actividad fisiológica propia de estas células, sino más bien sea una consecuencia de otros efectos fisiológicos, como la apoptosis autoinducida de las DSC mencionada anteriormente para permitir el crecimiento controlado del trofoblasto⁷⁷.

Los resultados que hemos obtenido sugieren un efecto potencial de las DSC en la terapia antitumoral. Y, teniendo en cuenta el efecto protector del MC de dDSC en PBL en reposo y activados y su efecto antitumoral, proponemos que las DSC pueden ser útiles en la inmunoterapia contra el cáncer basada en linfocitos activados²⁶⁹.

En resumen, durante el proceso de decidualización se modulan algunas características de pericitos/MSK que presentan las DSC, tales como la morfología fibroblástica; la localización perivascular; la contractilidad celular; y la expresión de los marcadores CD140b, CD146, SUSD2 y α -SMA. No obstante, se conservan o activan procesos como la angiogénesis y la protección linfocitaria, la actividad inmunoreguladora y la secreción de factores antitumorales (**Tabla 19**). Estos cambios asociados a la decidualización pueden desempeñar un papel clave en el establecimiento de la tolerancia materno-fetal y demuestran el potencial terapéutico de las DSC, para tratar enfermedades inflamatorias y el cáncer.

Tabla 19. Características de preDSC y dDSC.

Características	preDSC	dDSC	Referencias
Localización	Perivascular	Extravascular	83,232
Morfología	Fibroblástica	Redondeada	83
Secreción de PRL e IL-15	-	+	53,83,207,270
Expresión de marcadores de MSC/pericitos	+	↓	214,232
Expresión de factores angiogénicos	+	+ / ↑ PGF	214,232
Contractilidad	+	↓	232
Actividad fagocítica	+	↓	201
Actividad inmunoreguladora	+	↑	78,80,210
Apoptosis de PBL	-	- / ↓	80,103,214
Apoptosis de DSC	-	+	103,214
Actividad antitumoral	- / +	+	214

Las propiedades de DSC, MSC y pericitos se asocian a un mismo tipo de célula

Para descartar que las características de DSC, MSC y pericitos detectadas en nuestras líneas de preDSC se debieran a una mezcla de diferentes poblaciones celulares, obtuvimos tres clones de tres líneas de preDSC diferentes. En ausencia de P4 y AMPc, estos clones tenían morfología fibroblástica y no secretaban PRL. No obstante, cuando se cultivaron con estos factores, adquirieron una morfología más redondeada y secretaron PRL (**Figura 6**). Este resultado demuestra que, al igual que nuestras líneas de preDSC iniciales, en ausencia de factores deciduales en el medio de cultivo, los tres clones también estaban formados por preDSC. Nuestros clones de preDSC mostraron un fenotipo antigénico equivalente al de las líneas de preDSC originales y expresaron antígenos de MSC y pericitos (**Tabla 14**). Por otra parte, en condiciones de cultivo adecuadas, los tres clones se diferenciaron en adipocitos, condrocitos y osteoblastos (**Figura 6**). Estos resultados demuestran que tanto las características de DSC, como las de pericitos y MSC se asocian con el mismo tipo de célula.

Papel de las DSC en la tolerancia inmunológica materno-fetal

El embarazo conlleva un desafío para el sistema inmunitario, el cual tiene que defender al organismo de posibles patógenos pero, por otro lado, debe ser capaz de tolerar los aloantígenos paternos expresados por los tejidos del feto. En un embarazo normal, diversos mecanismos hacen posible el establecimiento de la tolerancia inmunológica materno-fetal para evitar un aborto. Uno de ellos es la inhibición de la diferenciación a células Th1 o de la llegada de estas células a la decidua, de manera que se establece un entorno antiinflamatorio de tipo Th2^{64,271,272,273}. Estos mecanismos tienen lugar durante la etapa antiinflamatoria del embarazo, la cual se asocia al crecimiento fetal. Otras células inmunitarias también contribuyen al establecimiento del microambiente antiinflamatorio en esta etapa, incluidos los macrófagos, las uNK y las células Treg⁶⁴.

En modelo murino, *Nancy et al.* demostraron previamente que la decidualización de las DSC inhibe en estas células la expresión de quimioquinas que atraen células Th1 y Tc (CXCL9, CXCL10, CXCL11 y CCL5)⁸¹. No obstante, debemos mencionar que existen diferencias en cuanto a la metodología entre este estudio y la investigación que nosotros hemos desarrollado, ya que *Nancy et al.* analizaron la expresión de quimioquinas en DSC de origen murino activadas con citoquinas, mientras que en nuestro caso analizamos el efecto directo de la decidualización en DSC humanas.

A pesar de estas diferencias, nuestros datos en DSC humanas confirman los resultados previos. En primer lugar, no se detectó expresión de CXCL9 en preDSC y en dDSC decidualizadas durante 14 días (**Figuras 8A y 8B**). No obstante, al repetir este estudio con dDSC decidualizadas durante 8 días usando dos nuevos oligonucleótidos que reconocieran la secuencia de CXCL9, comprobamos que las DSC realmente expresan CXCL9 y que la decidualización inhibe la expresión de esta quimioquina (**Figura 9A**). En segundo lugar, también obtuvimos inhibición de la expresión de CXCL10 y CXCL11 con la decidualización (**Figuras 8A, 8B y 9A**). Al analizar los niveles de estas quimioquinas en el MC, confirmamos que la decidualización inhibe significativamente la secreción de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 (**Figuras 9B, 9C y 9D**).

Las quimioquinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 son ligandos del receptor CXCR3²⁷⁴, el cual se expresa en células Th1, Tc y NK²⁷⁵, y los datos obtenidos confirman que el proceso de decidualización en DSC inhibe la expresión de estas quimioquinas, que atraen linfocitos activados a la decidua. A diferencia de *Nancy et al.* no obtuvimos diferencias en la expresión de CCL5 en dDSC al comparar con preDSC (**Figura 8A**). Esto puede ser debido a que dicha quimioquina está implicada en diversas funciones necesarias durante el establecimiento de un embarazo humano normal; por ejemplo, favorece la invasión del trofoblasto en la decidua²⁷⁶ y participa en el reclutamiento de células Treg durante la decidualización²⁷⁷. Por otra parte, los receptores de CCL5 se expresan en diferentes células inmunitarias, como los monocitos, los cuales llegan a la decidua en un embarazo normal^{278,279}.

En base a lo anteriormente explicado, todo indica que el proceso de decidualización controla la actividad quimiotáctica de las DSC. Podemos afirmar esto ya que las preDSC secretan las quimioquinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11, las cuales atraen a linfocitos T activados; mientras que en las dDSC se inhibe la secreción de dichos factores. La función activadora de la migración del MC de preDSC, debida a la presencia de estas quimioquinas, quedó demostrada en los experimentos realizados bloqueando el receptor CXCR3 en PBL activados. Se pudo comprobar que el bloqueo de dicho receptor inhibe la migración linfocitaria en este MC (**Figura 13B**). Por otra parte, nuestros resultados sugieren que la inhibición de la secreción de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 no explica la inhibición significativa de la migración de PBL activados en el MC de dDSC, ya que dicho descenso de la migración debería darnos un resultado equivalente al obtenido con el medio Control y no ser significativamente menor que este (**Figura 13A**). El descenso de la migración puede implicar la existencia de un mecanismo activo de inhibición de la migración por parte de las dDSC.

Una explicación posible es que las dDSC estarían secretando factores que inducirían la apoptosis de linfocitos, como se ha observado en algunas líneas tumorales estudiadas anteriormente en esta investigación, como las Raji (linfoma de células B) (**Figura 11**). No obstante, hemos comprobado que los factores secretados por las dDSC o bien no tienen efecto sobre PBL, o bien los protegen de la apoptosis (**Figura 11**)²³⁷. Es por esto que sugerimos la

existencia de factores inhibidores de la quimiotaxis de células T (TCIF) por parte de las dDSC, los cuales inhiben activamente la migración de estas células. Aunque en esta tesis no hemos descrito la naturaleza de este o estos factores, la investigación realizada sí nos permite conocer algunas de sus características. Por ejemplo, hemos visto que los TCIF tienen un peso molecular inferior a los 6-8 kDa (**Figura 13D**) y son termoestables (**Figura 13C**). Además, también comprobamos que no están asociados a exosomas, ya que la eliminación de los exosomas del MC de dDSC por ultracentrifugación no parece modificar los efectos de este medio sobre la migración de PBL activados (*datos no mostrados*).

En base a estos resultados proponemos, para futuras investigaciones, detallar las características de los TCIF, los cuales parecen estar implicados en el establecimiento de la tolerancia inmunológica materno-fetal. En cuanto a la posible naturaleza bioquímica de estos, es importante mencionar que actualmente se conocen algunos factores “antiquimiotácticos” producidos por patógenos (parásitos, bacterias y virus), tales como proteínas de unión a quimioquinas (“chemokine binding proteins”, CKBP), que bloquean su actividad^{280,281,282,283}. Otros factores que inhiben la quimiotaxis leucocitaria son las efrinas; por ejemplo, la efrina-A1, producida por el trofoblasto extravascular invasivo, es capaz de inhibir la quimiotaxis de células T^{284,285}. Por otra parte, se ha descubierto que la proteína soluble TR6/DcR3 (perteneciente a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral, TNFR), la cual es expresada por células endometriales y deciduales, también es capaz de inhibir la quimiotaxis de células T^{286,287}. Otros investigadores han demostrado que el factor, de naturaleza lipídica, PGE₂ secretada por células deciduales y macrófagos, puede (a altas dosis) inhibir la quimiotaxis de macrófagos^{288,289}. Otro factor de naturaleza lipídica, la esfingosina-1-fosfato (S1P), generada por distintas células inmunitarias, también inhibe (a altas dosis) el reclutamiento de células T^{290,291}.

Por ello, los factores detectados en la interfase materno-fetal, algunos de los cuales están asociados al proceso de decidualización, podrían estar relacionados con los TCIF.

En cuanto al fenotipo de las células inmunitarias quimioatraídas por DSC, hemos comprobado que el efecto activador de la migración del MC de preDSC y el efecto inhibidor del MC de dDSC afectan a la quimiotaxis de células Th1 y Tc, pero no a las células NK activadas, ya que no se obtienen diferencias significativas (**Figura 14C**). Además, pudimos comprobar que la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IFN- γ , producidas por células Th1, disminuye en los PBL activados quimioatraídos por dDSC (**Figuras 14A y 14B**). Esto demuestra que la decidualización no solo inhibe la quimiotaxis de células Th1 y Tc, sino que también inhibe la expresión de citoquinas propias de células Th1 en los linfocitos activados.

Por otra parte, al realizar los experimentos de migración celular en la línea monocítica tumoral THP-1 no obtuvimos inhibición de la migración con el MC de dDSC (**Figura 15B**), indicando que probablemente la actividad de los TCIF se restringe a linfocitos T activados. Es por esto que sí observamos una inhibición significativa de la migración de células Jurkat en el MC de dDSC (**Figura 15A**).

Los factores secretados por las dDSC tienen un efecto activador de la migración de monocitos tumorales THP-1. Aunque estos experimentos no se han realizado con monocitos de sangre periférica, los datos obtenidos con la línea THP-1 son indicativos de la presencia de los macrófagos en el entorno decidual. Los macrófagos deciduales tienen un fenotipo similar a M2 y secretan predominantemente citoquinas antiinflamatorias; además, desempeñan una función

importante en la renovación de tejidos durante la invasión del trofoblasto y el crecimiento placentario^{64,119,120,121}.

Los resultados que hemos obtenido, analizados en conjunto, confirman la existencia de un mecanismo de tolerancia inmunológica materno-fetal asociado a la decidualización de las DSC, que controla la llegada de linfocitos T activados a la decidua. Esto se evidencia por la inhibición de la secreción en dDSC de CXCL9, CXCL10 y CXCL11, las cuales son quimioquinas que atraen células Th1 y Tc; la secreción de uno o varios factores, de bajo peso molecular y termoestables, que inhiben la quimiotaxis de linfocitos T activados; y la inhibición de la expresión de TNF- α e IFN- γ por los linfocitos quimioatraídos.

El mecanismo explicado tendría lugar en un embarazo normal; pero en otras situaciones patológicas, como una infección, donde las moléculas inflamatorias inhiben la decidualización⁴³, el efecto activador de la quimiotaxis de las preDSC sería predominante, de manera que las células Th1 y Tc sí llegarían a la decidua, desencadenando un aborto²⁹² (**Ilustración 18**).

Es necesario tener en cuenta que la implantación y la placentación constituyen una etapa proinflamatoria. Las preDSC probablemente están relacionadas con esta etapa inflamatoria (en nuestros datos secretan CXCL9, CXCL10 y CXCL11); mientras que las dDSC estarían relacionadas con la etapa intermedia antiinflamatoria, en la que tendría lugar el crecimiento fetal. En la implantación el número de preDSC debe de predominar sobre el número de dDSC; pero en la etapa antiinflamatoria, en la que la P4 está muy elevada, las dDSC predominarían sobre las preDSC.

La actividad tolerogénica de las DSC puede ser de gran utilidad en la terapéutica de enfermedades inflamatorias en humanos. Por ello, la identificación y el aislamiento de los TCIF puede ser una línea de investigación muy prometedora en el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, mediadas por células Th1 y Tc. Además, tal como hemos indicado anteriormente, las MSC tienen una baja capacidad de decidualización en comparación con las DSC; por esta razón, el uso terapéutico de las dDSC puede convertirse en una alternativa a las MSC de médula ósea.

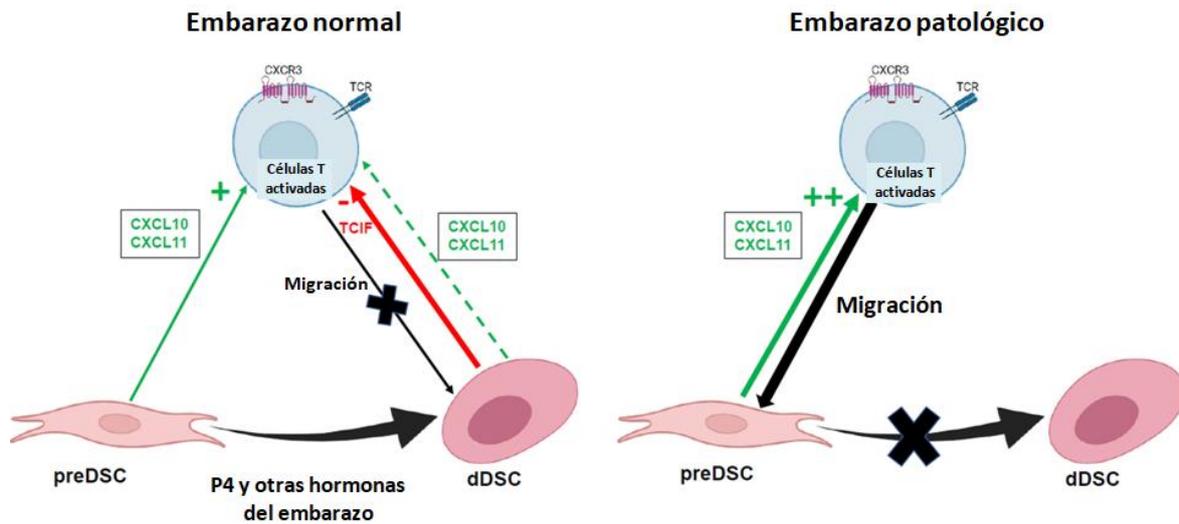


Ilustración 18. Esquema representativo del posible mecanismo de acción de los factores secretados por DSC en la decidua humana, en un embarazo normal y en un contexto patológico. *Imagen creada con el software BioRender.*

Diferencias entre DSC y EnSC

Actualmente sigue existiendo controversia a la hora de identificar y nombrar a las células estromales procedentes del endometrio y de la decidua (EnSC y DSC respectivamente). Debido a que el endometrio no gestante pasa a denominarse decidua cuando hay embarazo, algunos investigadores consideran que las EnSC son células precursoras de las DSC. No obstante, el hecho de que, tanto *in vivo* como *in vitro*, ambos tipos celulares experimenten la decidualización sugiere que deben existir precursores endometriales y precursores deciduales^{83,84,85,293}. Este proceso de diferenciación empieza durante la fase secretora del ciclo endometrial y se mantiene en el embarazo. Dado que una de las hipótesis de esta tesis considera que podrían existir diferencias fenotípicas y funcionales entre las EnSC y las DSC, a las células precursoras las denominamos preEnSC y preDSC, respectivamente⁸⁴. Hay que tener en cuenta que, aunque son células equivalentes, se encuentran en distinto contexto fisiológico y funcional.

En nuestra investigación hemos tratado de aportar más datos que permitan esclarecer las características de estos precursores estromales, realizando un estudio comparativo del fenotipo y de la respuesta a la decidualización, entre preDSC y preEnSC.

El análisis, por citometría de flujo, de un conjunto de 36 antígenos en preDSC y preEnSC mostró que ambos tipos de células tienen un perfil de marcadores equivalente (**Tablas 13 y 15**) (**Figura 19**). Los datos obtenidos concuerdan con lo que otros investigadores han comprobado sobre la expresión de antígenos de pericitos en células endometriales. Por ejemplo, *Darzi et al.* asociaron la expresión de CD140b, CD146 y SUSD2 con células perivasculares en el endometrio²⁹⁴ y *Wang et al.*, en su estudio transcriptómico de célula única, detectaron diferentes poblaciones de células perivasculares positivas para α -SMA que expresaban CD140b, CD146 y SUSD2²⁹⁵. Únicamente hemos encontrado diferencias en la expresión de CXL12, que es

significativamente mayor en preEnSC; esto puede deberse a que CXCL12 es una quimioquina modulable, implicada en el cambio de endometrio a decidua y responsable de la quimioatracción de células NK, entre otras células⁴³. Las preEnSC de sangre menstrual con las que hemos trabajado se obtienen mediante un procedimiento no invasivo. No obstante, consideramos necesario destacar que, a pesar de no obtener diferencias fenotípicas entre preEnSC y preDSC, estamos comparando células estromales de un tejido (el endometrio) que ha experimentado un proceso de descamación, con células de un tejido que está experimentando crecimiento y desarrollo (la decidua); por lo tanto, se trata de un contexto funcional diferente. Sin embargo, podemos asegurar la fiabilidad de los datos obtenidos, ya que nuestro grupo de investigación ha demostrado que tampoco existen diferencias fenotípicas, ni en la respuesta a la decidualización, entre EnSC obtenidas a partir de sangre menstrual y a partir de biopsia de endometrio²¹³. Por esta razón, podemos decir que tampoco habría diferencias fenotípicas al comparar las células estromales procedentes de los dos tejidos, endometrial y decidual, establecidos.

También existen diferencias asociadas a la decidualización entre estos precursores; de manera que las preDSC son más sensibles a este proceso y, en consecuencia, experimentan un mayor cambio morfológico y muerte celular por apoptosis, y también secretan más PRL e IL-15^{42,77,103} (**Figura 17**).

La correcta decidualización celular tiene lugar tras la activación de la PKA dependiente de AMPc. Teniendo esto en cuenta, en la presente investigación hemos estudiado y comparado la expresión de las subunidades $C\alpha/\beta/\gamma$ y $R1\alpha/\beta$ entre preEnSC y preDSC. Los resultados muestran que hay una expresión equivalente de estas proteínas en ambos tipos de células. Por un lado, vimos que la decidualización no regula la expresión de la PKA $C\alpha/\beta/\gamma$; no obstante, la expresión de la PKA $R1\alpha/\beta$ sí aumenta en ambos tipos celulares y dicho aumento es proporcional al tiempo de decidualización, siendo significativamente mayor este incremento en las dDSC. Debido a que la PKA formada por las subunidades RI es un activador más eficiente de la respuesta dependiente de AMPc que la PKA formada por las subunidades RII²⁹⁶, el incremento de la expresión de RI en dDSC explica su mayor capacidad de decidualización (**Figura 18**).

Además, también estudiamos la expresión del PR como mediador del proceso de decidualización. Los resultados obtenidos señalan que no existen diferencias en la expresión del PR entre preEnSC y preDSC. Aunque en las dEnSC y las dDSC aumenta la expresión de la isoforma PR-A respecto al nivel basal como consecuencia de la decidualización, no existen diferencias entre ambos tipos de células (**Figura 18A**). Esto sugiere que el estadio inicial de la señalización vía P4 no es responsable de la distinta respuesta a la decidualización observada entre EnSC y DSC. También se estudió la expresión del factor de transcripción FOXO1, cuya expresión está regulada positivamente en las primeras etapas del proceso de decidualización, y el cual participa en la diferenciación de las células endometriales y la regulación de genes proapoptóticos^{297,298,299}. Aunque su expresión aumentó tras la decidualización, no se obtuvieron diferencias significativas entre EnSC y DSC; es por ello que la expresión de dicho factor no parece ser determinante en las diferencias observadas entre estos dos tipos de células al decidualizarse (**Figura 18A**).

Ya que el embarazo supone un desafío para el sistema inmunitario de la madre, los cambios fisiológicos y funcionales a nivel endometrial son esenciales para permitir el establecimiento de un endometrio gestante. En este contexto, las DSC tienen un papel clave en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica materno-fetal^{42,78,80,81,237}. La información de la que disponemos hasta la

fecha, y que se ha detallado en los apartados anteriores, sugiere que las preDSC y las preEnSC son el mismo tipo de célula, por su fenotipo antigénico, su ubicación perivascular y su relación con MSC; no obstante, estas se encuentran en dos contextos fisiológicos distintos. A pesar de ello, sí hemos encontrado pequeñas diferencias fenotípicas y funcionales entre ambos tipos de células. Esto puede explicarse por el hecho de que las preDSC han permanecido *in vivo* un periodo más largo que las preEnSC, antes de ser aisladas y de establecerse líneas celulares con ellas. El microambiente diferente y los factores hormonales, paracrinos y autocrinos, a los que cada una de estas células ha estado expuesta, puede ser determinante en las diferencias encontradas²⁴⁶. Además, estas diferencias parecen estar asociadas al proceso de decidualización, al cual las preDSC son más sensibles. Este es un proceso complejo y se precisan más estudios que detallen el papel de todas las moléculas involucradas y cómo influyen los factores genéticos y epigenéticos.

En cuanto a la actividad quimiotáctica de las EnSC, hemos comprobado que la decidualización inhibe la secreción de la quimioquina CXCL9; no obstante, la secreción de CXCL10 aumenta a nivel endometrial (**Figuras 20B y 20C**). Este resultado concuerda con lo que otros investigadores han descubierto, concretamente que en la fase secretora premenstrual aumenta la producción de una serie de mediadores inflamatorios por parte de las células endometriales decidualizadas, entre los que se encuentra CXCL10. Muchos de esos factores median el reclutamiento y la activación de leucocitos, particularmente macrófagos, neutrófilos, células uNK y eosinófilos, que liberan enzimas que participan en la destrucción del tejido endometrial durante la menstruación y también se encargan de la protección frente a posibles infecciones³⁰⁰.

Al comparar los niveles de secreción de las quimioquinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 entre preDSC y preEnSC hemos encontrado que, en los tres casos, la secreción en preDSC es significativamente más alta (**Figuras 20B, 20C y 20D**). Dicho resultado concuerda con el análisis de la migración linfocitaria, ya que las preDSC atraen a un mayor número de PBL activados que las preEnSC (**Figura 21**). El hecho de que las preDSC secreten niveles más altos de las quimioquinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11, las cuales atraen a más linfocitos T activados, puede estar relacionado con la función que desempeñan estas células inmunitarias en las primeras etapas de un embarazo, concretamente en el momento de la implantación, la invasión del trofoblasto y la placentación, que constituyen un estadio proinflamatorio⁶⁴. Además, mediante la secreción de quimioquinas, como CXCL10 (además de CXCL12 y CX₃CL₁), las DSC participan en el reclutamiento de células NK desde sangre periférica hasta el tejido decidual¹¹⁰. Por otra parte, tanto dDSC como dEnSC inhiben la quimiotaxis de PBL activados (**Figura 21**), lo cual estaría relacionado con la inhibición de la secreción de la quimioquina CXCL9 en ambos tipos de células (**Figura 20B**) y la probable producción de TCIF.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que el proceso de decidualización a partir de precursores endometriales y deciduales ocurre tanto en el endometrio como en la decidua y es un proceso activo durante el embarazo. En base a ello, las preDSC y las preEnSC son el mismo tipo celular y están estrechamente relacionadas con las MSC y los pericitos, pero se encuentran en dos contextos fisiológicos diferentes, la decidua y el endometrio respectivamente (**Ilustración 19**). Por esta razón, ambas presentan algunas diferencias fenotípicas y funcionales asociadas al proceso de decidualización, siendo las preDSC más sensibles y mostrando una mayor capacidad de diferenciación.

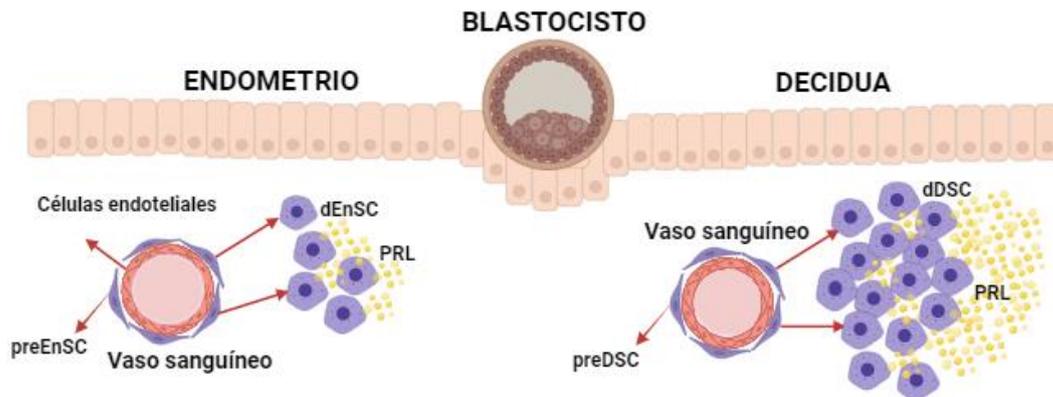


Ilustración 19. Esquema representativo de la decidualización de células endometriales estromales precursoras (preEnSC) a células endometriales estromales decidualizadas (dEnSC) y de la decidualización de células deciduales estromales precursoras (preDSC) a células deciduales estromales decidualizadas (dDSC). *Imagen creada con el software BioRender.*

eEnSC y su papel en el establecimiento del foco ectópico de endometriosis

Conocer la etiología y el mecanismo de la patogenia de la endometriosis sigue siendo un reto hoy día. Aunque se han realizado estudios comparativos entre las células y tejidos endometriósicos, y las células y tejidos endometriales sanos, se desconoce cuál es el factor o factores básicos etiológicos que determinan el inicio y el desarrollo de la enfermedad, aunque existen evidencias que sugieren que la endometriosis es una enfermedad multifactorial^{130,131,301}. En la investigación llevada a cabo hemos intentado ampliar el conocimiento que se tiene hasta el momento sobre la comunicación intercelular entre las eEnSC y las células del sistema inmunitario, para intentar dilucidar cuáles son los mecanismos relacionados con el proceso inflamatorio que caracteriza a la endometriosis. Los datos de los que disponemos hasta el momento no aclaran si es el proceso inflamatorio el que favorece el desarrollo de focos de endometriosis o si es el foco de endometriosis el que induce el proceso inflamatorio³⁰².

En primer lugar, hemos realizado un análisis comparativo del fenotipo antigénico entre las células obtenidas a partir de endometriomas ováricos y las células del tejido endometrial de mujeres sanas, y hemos evaluado la diferente respuesta a la decidualización.

La resistencia a la P4 es una de las propiedades principales de las células endometriósicas, lo cual ha sido corroborado al decidualizar nuestras líneas de eEnSC (**Figura 22A**). El aumento de la proporción ER- β /ER- α en las eEnSC, al comparar con las EnSC, se asocia a la supresión del PR, lo que contribuye a su resistencia a la P4^{158,159}.

Anteriormente mostrábamos que la decidualización induce un cambio morfológico y funcional en las DSC y en las EnSC, aunque en estas últimas en menor medida (**Figura 1A** y **Figura 16A**). Al comparar la respuesta a este proceso entre las EnSC y las eEnSC, se ha observado que las células procedentes de focos ectópicos de endometriosis se decidualizan parcialmente, ya que conservan en su mayoría la morfología fibroblástica, apenas producen PRL y no sufren apoptosis

tras la exposición prolongada a AMPc y P4 (**Figura 23**). La resistencia a la decidualización es una propiedad que relaciona a las eEnSC con las MSC (**Figura 3**).

Los datos experimentales obtenidos por *Klemmt et al.* indican que las células estromales procedentes de endometriomas ováricos conservan la capacidad de diferenciarse morfológicamente (aunque estos cambios no empiezan a observarse de forma inmediata, sino durante el día 6 de decidualización) y de secretar marcadores bioquímicos de decidualización, como PRL e IGFBP-1, pero a un nivel mucho más bajo que las células del estroma endometrial de una mujer sana³⁰³. Las discrepancias con nuestros datos pueden deberse a la diferente metodología empleada en el cultivo celular. En nuestro caso empleamos el medio de cultivo Opti-MEM suplementado con un bajo porcentaje de FBS (3%), asegurándonos de esta manera que estamos trabajando con células que mantienen su estado indiferenciado; mientras que en la investigación citada se emplea medio de cultivo DMEM al 10%. Por otra parte, en dicho estudio las células se decidualizaron únicamente con AMPc, mientras que nosotros empleamos el protocolo estándar de decidualización con AMPc y P4²⁹.

La resistencia a la apoptosis de las eEnSC permite su supervivencia en localizaciones ectópicas. Esta característica se debe, en parte, a la sobreexpresión del gen antiapoptótico Bcl-2 y también a la expresión alterada del ligando de muerte FasL. Diferentes investigaciones han demostrado que la susceptibilidad de las células endometriales ectópicas a la apoptosis espontánea es significativamente menor que la de las células endometriales eutópicas de mujeres sanas^{154,155,204,304}.

En cuanto a la caracterización fenotípica, las eEnSC muestran una expresión de marcadores similar a las MSC (**Figura 22B**) (**Tabla 16**). Este resultado, común con otras células estromales uterinas, concuerda con la teoría sobre el origen de la endometriosis que indica que esta enfermedad surge del crecimiento ectópico y aberrante de células mesenquimales de médula ósea (“homing erróneo”), las cuales desempeñan un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad. Nuestros resultados coinciden con los datos obtenidos en un estudio que demostró la presencia de células estromales con un fenotipo de MSC en el tejido endometrial ectópico de mujeres con endometriosis. Dichas células expresaban los marcadores típicos de MSC CD29, CD44, CD90 y CD105, al igual que nuestras líneas de eEnSC³⁰⁵.

Las EnSC y las eEnSC, con propiedades de MSC, comparten una expresión similar de marcadores de superficie. No obstante, el estudio comparativo del fenotipo antigénico mostró una menor expresión de los marcadores de pericitos CD140b, SUSD2, MFG-E8, nestina y STRO-1 en las preeEnSC que en las preEnSC (**Figura 24**). Nuestros resultados difieren de los datos presentados recientemente por *Chunmei Li et al.*, quienes obtuvieron una expresión equivalente de marcadores de células perivasculares, como CD140b y SUSD2, entre EnSC y eEnSC. Las diferencias entre ambas investigaciones pueden ser atribuibles al menor tamaño muestral y a la variabilidad en la expresión antigénica entre las distintas muestras de endometrio eutópico, que asumen los autores de dicho estudio³⁰⁶.

En cuanto a la actividad quimiotáctica de las eEnSC, hemos comprobado que la decidualización inhibe la secreción de la quimioquina CXCL9, tal como ocurre en las DSC y en las EnSC. No obstante, la secreción de CXCL10 y CXCL11 no varía con la decidualización (**Figuras 25B, 25C y 25D**). Al comparar los niveles de secreción de las tres quimioquinas estudiadas entre preEnSC y preeEnSC hemos encontrado que la secreción de CXCL9 y CXCL10 es

significativamente más alta en preeEnSC (**Figuras 25B y 25C**). Dicho resultado concuerda con el análisis de la migración linfocitaria, ya que las preeEnSC atraen a un mayor número de PBL activados que las preEnSC (tras 48 horas de incubación de los linfocitos con los MC) (**Figura 26B**). El hecho de que las preeEnSC secreten niveles más altos de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 puede estar relacionado con la quimioatracción de células NK (con actividad citotóxica reducida) al líquido peritoneal de mujeres con endometriosis^{130,307}. Comprobamos este resultado al estudiar el fenotipo antigénico de las poblaciones linfocitarias quimioatraídas al estar en contacto con los factores secretados por preEnSC y preeEnSC, encontrando un incremento significativo del número de células CD56+/CXCR3+ migradas en el MC de preeEnSC (**Figura 27E**).

El efecto activador de la migración de preEnSC y preeEnSC también se observó sobre la subpoblación de células Tc (CD8+/CXCR3+) (**Figura 27D**). En el caso de las preEnSC, este resultado se explica porque la presencia de linfocitos T citotóxicos a nivel endometrial es especialmente importante durante la fase proliferativa del ciclo cuando constituyen aproximadamente el 33% de la población total de leucocitos; se encuentran principalmente formando agregados linfoides, pero también dispersos en el estroma endometrial. La capacidad citotóxica de estas células ejerce una función protectora en el endometrio. Aunque dichas células también están presentes durante la fase secretora en los agregados linfoides ya formados, su actividad citotóxica disminuye porque puede producirse la concepción^{3,4}. Por lo que respecta al endometrioma, se ha comprobado que el tejido ectópico contiene linfocitos T CD8+; además, la concentración de células CD8+ en el líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis se incrementa en comparación con el líquido peritoneal de mujeres sanas^{185,186}.

Por otra parte, tanto dEnSC como deEnSC inhiben la quimiotaxis de PBL activados (**Figura 26**), lo cual estaría relacionado con la inhibición de la secreción de la quimioquina CXCL9 en ambos tipos de células (**Figura 25B**) y la probable producción de TCIF. En cuanto a la quimiotaxis de las subpoblaciones de PBL activados, obtuvimos inhibición de la migración de células Th1 (CD4+/CXCR3+) por parte de las dEnSC (**Figura 27C**); mientras que las deEnSC también inhibieron la llegada de células Th1 (CD4+/CXCR3+) y Tc (CD8+/CXCR3+) (**Figuras 27C y 27D**). En primer lugar, estos resultados pueden estar relacionados con la baja proporción de células Th1 a nivel endometrial durante la fase secretora del ciclo, cuando se produce la deciduización. En dicho estadio también tiene lugar una elevada reducción del número de linfocitos Treg CD4+/CD25+/Foxp3+^{4,15}. Al realizar los experimentos de quimiotaxis con la línea linfocítica tumoral Jurkat observamos, de nuevo, una inhibición significativa de la migración en el MC de dEnSC y deEnSC (**Figura 31A**).

Continuamos con el estudio de la inmunopatología de la endometriosis y nos centramos en analizar el efecto de los factores secretados por EnSC y eEnSC sobre la quimioatracción de monocitos de sangre periférica y tumorales (línea THP-1). Hemos trabajado con monocitos con el objetivo de estudiar su migración hacia el tejido endometrial de una mujer sana y el tejido endometrial ectópico, así como su diferenciación en dichas localizaciones hasta adquirir un fenotipo típico de macrófagos.

Los resultados obtenidos mostraron que las preEnSC y las preeEnSC son capaces de atraer monocitos, aunque las preeEnSC atraen a un mayor número de estas células inmunitarias (**Figura 28**). Este resultado se confirmó al repetir los experimentos de migración celular con la línea monocítica tumoral THP-1, de manera que la quimioatracción de dichas células por el efecto de los factores secretados por las preeEnSC es significativamente mayor que por las preEnSC

(**Figura 31B**). La explicación fisiológica de los resultados correspondientes a las preEnSC se sustenta en el hecho de que durante la fase proliferativa del ciclo endometrial se incrementa la quimioatracción de monocitos desde sangre periférica. Los macrófagos llegan a representar entre el 1-2% del total de células del endometrio durante la fase proliferativa, siendo los leucocitos más abundantes durante el proceso de reparación y regeneración del endometrio^{12,14}. En el contexto del endometrioma, la llegada de monocitos desde sangre periférica determina, en parte, el elevado número de macrófagos en el líquido peritoneal y en el tejido ectópico, cuya función es fundamental para el desarrollo de la lesión^{167,169}.

En cuanto al fenotipo de las células quimioatraídas, podemos decir que hay una elevada atracción de monocitos polarizados hacia M2 (CD163+/CD206+) por parte de las preEnSC y las preeEnSC (**Figura 30**). Además, los resultados también sugieren que los factores secretados por ambos tipos celulares diferencian los monocitos hacia un fenotipo M2 antiinflamatorio (**Figura 29**). Estos resultados nos llevaron a preguntarnos cuál es el papel de los macrófagos antiinflamatorios en el tejido endometrial eutópico y ectópico. Hay que tener en cuenta que una simple clasificación de los macrófagos en fenotipos M1 y M2 no explica la elevada diversidad fenotípica de estas células en los diferentes tejidos. *Gordon et al.* sugirieron que la activación de los macrófagos se lleva a cabo en diferentes etapas de diferenciación y está determinada por el microambiente tisular, compuesto por una combinación de citoquinas y quimioquinas moduladoras. Además, las poblaciones de macrófagos residentes en los tejidos pueden cambiar su fenotipo y función, e incluso expresar simultáneamente marcadores proinflamatorios y antiinflamatorios^{14,308}. A lo largo del ciclo, el aumento del número de macrófagos a nivel endometrial ocurre debido a la quimiotaxis de monocitos desde sangre periférica y a la proliferación local. Nuestros resultados coinciden con las investigaciones que demuestran que, durante la fase proliferativa, los macrófagos con actividad antiinflamatoria están presentes en el endometrio y desempeñan funciones clave en la reparación del tejido, tras la menstruación, y la angiogénesis^{14,309}. En la endometriosis, el establecimiento de la lesión se caracteriza por el crecimiento del tejido endometrial y la formación de vasos sanguíneos, eventos que se ven interrumpidos en ausencia de macrófagos, tal y como demostraron *Bacci et al.* Los macrófagos endometriósicos participan en la eliminación, mediante fagocitosis, de glóbulos rojos envejecidos y de restos de células endometriales; además, envían señales tróficas y antiapoptóticas que facilitan la supervivencia de las células endometriales ectópicas. Estas funciones caracterizan a los macrófagos que han adquirido un fenotipo reparador M2. Dicho fenotipo es propio tanto de los macrófagos presentes en el peritoneo, como de los macrófagos infiltrantes en la lesión ectópica, los cuales expresan niveles elevados de los marcadores CD163 y CD206^{167,309}.

Por otro lado, tanto dEnSC como deEnSC inhiben la migración de monocitos de sangre periférica, aunque no de forma significativa, (**Figura 28**) y, particularmente, la de aquellos que presentan un fenotipo M2 (**Figura 30**). Además, los resultados también sugieren que los factores secretados por ambos tipos de células decidualizadas inhiben la diferenciación de los monocitos hacia un fenotipo M2 (**Figura 29**). A nivel endometrial, este resultado indicaría que el proceso de decidualización inhibe la llegada de macrófagos antiinflamatorios y, en parte, concuerda con los datos de otros investigadores que demuestran que en la fase secretora se genera un ambiente proinflamatorio, el cual desempeña un papel esencial en la preparación del endometrio para la posible implantación del embrión. Respecto a la endometriosis, las deEnSC también inhiben la llegada de monocitos diferenciados hacia un fenotipo M2. Teniendo en cuenta que los macrófagos M2 favorecen el desarrollo de la enfermedad, los gestágenos utilizados en el tratamiento de la

endometriosis desarrollan su actividad terapéutica al inducir decidualización en las eEnSC y, en consecuencia, reducir la presencia de macrófagos M2.

No obstante, los resultados obtenidos con monocitos de sangre periférica parecen entrar en contradicción con los obtenidos en la línea monocítica tumoral THP-1. Esto se observa por el hecho de que la migración de las células THP-1 se incrementa significativamente en los MC de dEnSC y deEnSC, al contrario de lo que ocurre en monocitos sanguíneos (**Figura 31B**); además, las células quimioatraídas por los factores secretados por EnSC y eEnSC no decidualizadas y decidualizadas no están polarizadas hacia un fenotipo M2 (**Figura 33**). Una explicación de los resultados obtenidos puede ser que la quimioatracción de las células THP-1 no disminuye en los MC de dEnSC y deEnSC porque se trata de una línea tumoral, que no experimenta diferenciación a un fenotipo M2, tal como sí ocurre en monocitos de sangre periférica.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que el microambiente de las lesiones endometriósicas es altamente complejo y dinámico, y confluyen señales proinflamatorias, antiinflamatorias y angiogénicas. En los años recientes se han realizado numerosos estudios para intentar explicar la composición del microambiente inmunitario de las lesiones y cómo este contribuye al establecimiento del foco ectópico. En nuestra experiencia hemos podido determinar que existe una importante quimioatracción de células NK, células Tc y monocitos polarizados hacia un fenotipo M2, por parte de las células endometriales ectópicas, aunque la decidualización inhiba la llegada de estas últimas células. En base al reciente éxito de las terapias inmunomoduladoras dirigidas a la inflamación crónica en otras enfermedades inflamatorias, es posible que en el futuro se puedan desarrollar estrategias terapéuticas basadas en el bloqueo de las moléculas implicadas en la comunicación intercelular, entre las eEnSC y las células del sistema inmunitario.



CONCLUSIONES



1. Las preDSC de la decidua humana son MSC que se localizan en el nicho perivascular.
2. La decidualización de las DSC humanas (dDSC) favorece la inhibición de la quimiotaxis de linfocitos T activados con actividad proabortígena a la decidua, constituyendo así un mecanismo de tolerancia inmunológica materno-fetal.
3. Las DSC tienen una mayor capacidad para decidualizarse que las EnSC. Esta diferencia es debida, probablemente, a los distintos contextos fisiológicos en los que se encuentran: endometrio no gestante (EnSC) y decidua (DSC).
4. Las eEnSC están relacionadas con las MSC. Esto puede explicar el establecimiento de focos de endometriosis en localizaciones peritoneales y extraperitoneales.
5. Las eEnSC tienen una mayor capacidad de atracción de linfocitos T y células NK activadas que las EnSC, lo cual podría estar relacionado con la patogénesis de la enfermedad.



BIBLIOGRAFÍA



1. Salamonsen LA, Hutchison JC, Gargett CE. Cyclical endometrial repair and regeneration. *Development*. 2021;148(17):dev199577.
2. Gargett CE, Nguyen HPT, Ye L. Endometrial regeneration and endometrial stem/progenitor cells. *Rev Endocr Metab Disord*. 2012;13(4):235-251.
3. Yeaman GR, Collins JE, Fanger MW, Wira CR. CD8+ T cells in human uterine endometrial lymphoid aggregates: Evidence for accumulation of cells by trafficking. *Immunology*. 2001;102(4):434-440.
4. Vanderstraeten A, Tuyaeerts S, Amant F. The immune system in the normal endometrium and implications for endometrial cancer development. *J Reprod Immunol*. 2015;109:7-16.
5. Wira CR, Rodriguez-Garcia M, Patel MV. The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nat Publ Gr*. 2015;15(4):217-230.
6. Azlan A, Salamonsen LA, Hutchison J, Evans J. Endometrial inflammasome activation accompanies menstruation and may have implications for systemic inflammatory events of the menstrual cycle. *Hum Reprod*. 2020;35(6):1363-1376.
7. Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D. Granulated lymphocytes in human endometrium: Histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod*. 1991;6(6):791-798.
8. Hickey DK, Patel MV, Fahey JV, Wira CR. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: Stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *J Reprod Immunol*. 2011;88(2):185-194.
9. Evans J, Salamonsen LA. Inflammation, leukocytes and menstruation. *Rev Endocr Metab Disord*. 2012;13(4):277-288.
10. Yang Z, Kong B, Mosser DM, Zhang X. TLRs, macrophages, and NK cells: Our understandings of their functions in uterus and ovary. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(10):1442-1450.
11. Arici A, Senturk LM, Seli E, Bahtiyar MO, Kim G. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in human endometrial stromal cells by estrogen and progesterone. *Biol Reprod*. 1999;61(1):85-90.
12. Jones RL, Hannan NJ, Kaitu'u TJ, Zhang J, Salamonsen LA. Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(12):6155-6167.
13. Padykula HA, Coles LG, Okulicz WC, et al. The basalis of the primate endometrium: A bifunctional germinal compartment. *Biol Reprod*. 1989;40(3):681-690.
14. Thiruchelvam U, Dransfield I, Saunders PTK, Critchley HOD. The importance of the macrophage within the human endometrium. *J Leukoc Biol*. 2013;93(2):217-225.
15. Arruvito L, Sanz M, Banham AH, Fainboim L. Expansion of CD4+ CD25+ and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J Immunol*. 2007;178(4):2572-2578.
16. Lobo SC, Huang STJ, Germeyer A, et al. The immune environment in human endometrium during the window of implantation. *Am J Reprod Immunol*. 2004;52(4):244-251.

17. Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HPT, Wu D. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod.* 2009;80(6):1136-1145.
18. Gargett CE, Schwab KE, Deane JA. Endometrial stem/progenitor cells: The first 10 years. *Hum Reprod Update.* 2016;22(2):137-163.
19. Valentijn AJ, Paliyal K, Al-Lamee H, et al. SSEA-1 isolates human endometrial basal glandular epithelial cells: Phenotypic and functional characterization and implications in the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod.* 2013;28(10):2695-2708.
20. Cousins FL, Pandoy R, Jin S, Gargett CE. The elusive endometrial epithelial stem/progenitor cells. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:1-14.
21. Nguyen HPT, Xiao L, Deane JA, et al. N-cadherin identifies human endometrial epithelial progenitor cells by in vitro stem cell assays. *Hum Reprod.* 2017;32(11):2254-2268.
22. Ma S, Hirata T, Arakawa T, et al. Expression of ALDH1A isozymes in human endometrium with and without endometriosis and in ovarian endometrioma. *Reprod Sci.* 2020;27(1):443-452.
23. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-317.
24. Schwab KE, Gargett CE. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum Reprod.* 2007;22(11):2903-2911.
25. Gargett CE, Masuda H. Adult stem cells in the endometrium. *Mol Hum Reprod.* 2010;16(11):818-834.
26. Masuda H, Anwar SS, Bühring HJ, Rao JR, Gargett CE. A novel marker of human endometrial mesenchymal stem-like cells. *Cell Transplant.* 2012;21(10):2201-2214.
27. Cervelló I, Gil-Sanchis C, Mas A, et al. Human endometrial side population cells exhibit genotypic, phenotypic and functional features of somatic stem cells. *PLoS One.* 2010;5(6):e10964.
28. Masuda H, Matsuzaki Y, Hiratsu E, et al. Stem cell-like properties of the endometrial side population: Implication in endometrial regeneration. *PLoS One.* 2010;5(4):e10387.
29. Gellersen B, Brosens J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: A decidualizing affair. *J Endocrinol.* 2003;178(3):357-372.
30. Brosens JJ, Gellersen B. Death or survival - Progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma. *J Mol Endocrinol.* 2006;36(3):389-398.
31. Li X, O'Malley BW. Unfolding the action of progesterone receptors. *J Biol Chem.* 2003;278(41):39261-39264.
32. Mote PA, Balleine RL, McGowan EM, Clarke CL. Colocalization of progesterone receptors a and b by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(8):2963-2971.

33. Brar AK, Frank GR, Kessler CA, Cedars MI, Handwerger S. Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. *Endocrine*. 1997;6(3):301-307.
34. Vinketova K, Mourdjeva M, Oreshkova T. Human decidual stromal cells as a component of the implantation niche and a modulator of maternal immunity. *J Pregnancy*. 2016;2016:8689436.
35. Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(18):8517-8521.
36. Telgmann R, Maronde E, Taskén K, Gellersen B. Activated protein kinase A is required for differentiation-dependent transcription of the decidual prolactin gene in human endometrial stromal cells. *Endocrinology*. 1997;138(3):929-937.
37. Tamura I, Asada H, Maekawa R, et al. Induction of IGFBP-1 expression by cAMP is associated with histone acetylation status of the promoter region in human endometrial stromal cells. *Endocrinology*. 2012;153(11):5612-5621.
38. Tierney EP, Tulac S, Huang STJ, Giudice LC. Activation of the protein kinase A pathway in human endometrial stromal cells reveals sequential categorical gene regulation. *Physiol Genomics*. 2004;16(39):47-66.
39. Christian M, Zhang X, Schneider-Merck T, et al. Cyclic AMP-induced forkhead transcription factor, FKHR, cooperates with CCAAT/enhancer-binding protein β in differentiating human endometrial stromal cells. *J Biol Chem*. 2002;277(23):20825-20832.
40. Mak IYH, Brosens JJ, Christian M, et al. Regulated expression of signal transducer and activator of transcription, Stat5, and its enhancement of PRL expression in human endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(6):2581-2588.
41. Takano M, Lu Z, Goto T, et al. Transcriptional cross talk between the forkhead transcription factor forkhead box O1A and the progesterone receptor coordinates cell cycle regulation and differentiation in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol*. 2007;21(10):2334-2349.
42. Dunn CL, Kelly RW, Critchley HOD. Decidualization of the human endometrial stromal cell: An enigmatic transformation. *Reprod Biomed Online*. 2003;7(2):151-161.
43. Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev*. 2014;35(6):851-905.
44. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the Endometrial Biopsy. *Fertil Steril*. 1950;1(1):3-25.
45. Van Den Heuvel MJ, Chantakru S, Xie X, et al. Trafficking of circulating pro-NK cells to the decidualizing uterus: Regulatory mechanisms in the mouse and human. *Immunol Invest*. 2005;34(3):273-293.
46. Ashkar AA, Black GP, Wei Q, et al. Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. *J Immunol*. 2003;171(6):2937-2944.
47. Godbole G, Modi D. Regulation of decidualization, interleukin-11 and interleukin-15 by homeobox A 10 in endometrial stromal cells. *J Reprod Immunol*. 2010;85(2):130-139.

48. Salker MS, Nautiyal J, Steel JH, et al. Disordered IL-33/ST2 activation in decidualizing stromal cells prolongs uterine receptivity in women with recurrent pregnancy loss. *PLoS One*. 2012;7(12):e52252.
49. Kitaya K, Yasuda J, Yagi I, Tada Y, Fushiki S, Honjo H. IL-15 expression at human endometrium and decidua. *Biol Reprod*. 2000;63(3):683-687.
50. Anne Croy B, Van Den Heuvel MJ, Borzychowski AM, Tayade C. Uterine natural killer cells: A specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunol Rev*. 2006;214(1):161-185.
51. Russell P, Sacks G, Tremellen K, Gee A. The distribution of immune cells and macrophages in the endometrium of women with recurrent reproductive failure. III: Further observations and reference ranges. *Pathology*. 2013;45(4):393-401.
52. Kajihara T, Tanaka K, Oguro T, et al. Androgens modulate the morphological characteristics of human endometrial stromal cells decidualized in vitro. *Reprod Sci*. 2014;21(3):372-380.
53. Bergeron C. Morphological changes and protein secretion induced by progesterone in the endometrium during the luteal phase in preparation for nidation. *Hum Reprod*. 2000;15:119-128.
54. Chen GTC, Getsios S, MacCalman CD. Cadherin-11 is a hormonally regulated cellular marker of decidualization in human endometrial stromal cells. *Mol Reprod Dev*. 1999;52(2):158-165.
55. Iwahashi M, Muragaki Y, Ooshima A, Yamoto M, Nakano R. Alterations in distribution and composition of the extracellular matrix during decidualization of the human endometrium. *J Reprod Fertil*. 1996;108(1):147-155.
56. Maslar IA, Riddick DH. Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol*. 1979;135(6):751-754.
57. Jabbour HN, Critchley HOD, Yu-Lee LY, Boddy SC. Localization of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) in nonpregnant human endometrium: Expression of IRF-1 is up-regulated by prolactin during the secretory phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(11):4260-4265.
58. Jabbour HN, Critchley HOD. Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy. *Reproduction*. 2001;121(2):197-205.
59. Stefanoska I, Jovanović Krivokuća M, Vasilijić S, Čujić D, Vićovac L. Prolactin stimulates cell migration and invasion by human trophoblast in vitro. *Placenta*. 2013;34(9):775-783.
60. Corbacho AM, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol*. 2002;173(2):219-238.
61. Carter AM, Hills F, O'Gorman DB, et al. The insulin-like growth factor system in mammalian pregnancy - A workshop report. *Placenta*. 2004;25:53-56.
62. Dimitriadis E, Robb L, Salamonsen LA. Interleukin 11 advances progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod*. 2002;8(7):636-643.
63. Verma S, Hiby SE, Loke YW, King A. Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. *Biol Reprod*. 2000;62(4):959-968.

64. Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(8):469-482.
65. Bulmer JN, Pace D, Ritson A. Immunoregulatory cells in human decidua: morphology, immunohistochemistry and function. *Reprod Nutr Dev*. 1988;28(6B):1599-1613.
66. Abelius MS, Janefjord C, Ernerudh J, et al. The placental immune milieu is characterized by a Th2- and anti-inflammatory transcription profile, regardless of maternal allergy, and associates with neonatal immunity. *Am J Reprod Immunol*. 2015;73(5):445-459.
67. Muzzio DO, Soldati R, Ehrhardt J, et al. B cell development undergoes profound modifications and adaptations during pregnancy in mice. *Biol Reprod*. 2014;91(5):1-11.
68. Fettke F, Schumacher A, Costa SD, Zenclussen AC. B cells: The old new players in reproductive immunology. *Front Immunol*. 2014;5:285.
69. Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Mor G. Inflammation and implantation. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(1):17-21.
70. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000;164(12):6166-6173.
71. Abrahams VM, Kim YM, Straszewski SL, Romero R, Mor G. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2004;51(4):275-282.
72. Vacca P, Cantoni C, Vitale M, et al. Crosstalk between decidual NK and CD14+ myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(26):11918-11923.
73. Rowe JH, Ertelt JM, Xin L, Way SS. Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. *Nature*. 2012;490(7418):102-106.
74. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):601-610.
75. Lindström TM, Bennett PR. The role of nuclear factor kappa B in human labour. *Reproduction*. 2005;130(5):569-581.
76. Macklon NS, Brosens JJ. The human endometrium as a sensor of embryo quality. *Biol Reprod*. 2014;91(4):1-8.
77. Sharma S, Godbole G, Modi D. Decidual control of trophoblast invasion. *Am J Reprod Immunol*. 2016;75(3):341-350.
78. Blanco O, Tirado I, Muñoz-Fernández R, et al. Human decidual stromal cells express HLA-G. Effects of cytokines and decidualization. *Hum Reprod*. 2008;23(1):144-152.
79. Kimatrai M, Blanco O, Muñoz-Fernández R, et al. Contractile activity of human decidual stromal cells. II. Effect of interleukin-10. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(11):6126-6130.
80. Muñoz-Fernández R, Prados A, Leno-Durán E, et al. Human decidual stromal cells secrete C-X-C motif chemokine 13, express B cell-activating factor and rescue B lymphocytes from apoptosis: Distinctive characteristics of follicular dendritic cells. *Hum Reprod*. 2012;27(9):2775-2784.
81. Nancy P, Tagliani E, Tay CS, Asp P, Levy DE, Erlebacher A. Chemokine gene silencing in decidual stromal cells limits T cell access to the maternal-fetal interface. *Science*. 2012;336(6086):1317-1321.

82. Vacca P, Montaldo E, Vitale C, Croxatto D, Moretta L, Mingari MC. MSC and innate immune cell interactions: A lesson from human decidua. *Immunol Lett.* 2015;168(2):170-174.
83. Wynn RM. Ultrastructural development of the human decidua. *Am J Obstet Gynecol.* 1974;118(5):652-670.
84. 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(3):609-615.
85. Huang JR, Tseng L, Bischof P, Jänne OA. Regulation of prolactin production by progestin, estrogen, and relaxin in human endometrial stromal cells. *Endocrinology.* 1987;121(6):2011-2017.
86. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119(11):2204-2213.
87. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology, and potential applications. *Stem Cells.* 2001;19(3):180-192.
88. Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res.* 1998;13(5):828-838.
89. Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, Ashton BA, Griffin-Jones C, Canfield AE. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation.* 2004;110(15):2226-2232.
90. Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008;3(3):301-313.
91. Richardson RL, Hausman GJ, Campion DR. Response of pericytes to thermal lesion in the inguinal fat pad of 10-day-old rats. *Acta anat.* 1982;114:41-57.
92. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Gonzalez P, Varela H. Inducible perivascular cells contribute to the neochondrogenesis in grafted perichondrium. *Anat Rec.* 1991;229(1):1-8.
93. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Lopez-Alonso A, Gonzalez R, Varela H. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res.* 1992;275:280-286.
94. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol.* 2005;7(4):452-464.
95. Fernández-Klett F, Offenhauser N, Dirnagl U, Priller J, Lindauer U. Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(51):22290-22295.
96. Stark K, Eckart A, Haidari S, et al. Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and "instruct" them with pattern-recognition and motility programs. *Nat Immunol.* 2013;14(1):41-51.
97. Thomas WE. Brain macrophages: On the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999;31(1):42-57.
98. Balabanov R, Beaumont T, Dore-Duffy P. Role of central nervous system microvascular pericytes in activation of antigen-primed splenic T-lymphocytes. *J Neurosci Res.* 1999;55(5):578-587.

99. 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(12):1151-1157.
100. Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(26):12240-12244.
101. Oliver C, Montes MJ, Galindo JA, Ruiz C, Olivares EG. Human decidual stromal cells express α -smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum Reprod.* 1999;14(6):1599-1605.
102. 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(2):844-849.
103. Leno-Durán E, Ruiz-Magaña MJ, Munoz-Fernández R, Requena F, Olivares EG, Ruiz-Ruiz C. Human decidual stromal cells secrete soluble pro-apoptotic factors during decidualization in a cAMP-dependent manner. *Hum Reprod.* 2014;29(10):2269-2277.
104. Montes MJ, Tortosa CG, Borja 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(3):188-194.
105. Engert S, Rieger L, Kapp M, Becker JC, Dietl J, Kämmerer U. Profiling chemokines, cytokines and growth factors in human early pregnancy decidua by protein array. *Am J Reprod Immunol.* 2007;58(2):129-137.
106. Simón 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(4):847-854.
107. 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(3):379-387.
108. 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(7):2054-2065.
109. Tran J, Rak J, Sheehan C, 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(3):781-788.
110. Carlino C, Stabile H, Morrone S, et al. Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: A possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy. *Blood.* 2008;111(6):3108-3115.
111. Keskin DB, Allan DSJ, Rybalov B, et al. TGF β 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.* 2007;104(9):3378-3383.
112. Siewiera J, Gouilly J, Hocine HR, et al. Natural cytotoxicity receptor splice variants orchestrate the distinct functions of human natural killer cell subtypes. *Nat Commun.* 2015;6:10183.

113. Yang HL, Zhou WJ, Lu H, et al. Decidual stromal cells promote the differentiation of CD56^{bright}CD16⁻ NK cells by secreting IL-24 in early pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2019;81.
114. Vacca P, Vitale C, Montaldo E, et al. CD34⁺ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(6):2402-2407.
115. Croxatto D, Vacca P, Canegallo F, et al. Stromal cells from human decidua exert a strong inhibitory effect on NK cell function and dendritic cell differentiation. *PLoS One*. 2014;9(2):1-11.
116. Hu WT, Huang LL, Li MQ, Jin LP, Li DJ, Zhu XY. Decidual stromal cell-derived IL-33 contributes to Th2 bias and inhibits decidual NK cell cytotoxicity through NF- κ B signaling in human early pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2015;109:52-65.
117. Shi JW, Lai ZZ, Yang HL, et al. An IGF1-expressing endometrial stromal cell population is associated with human decidualization. *BMC Biol*. 2022;20(1):1-22.
118. Segerer SE, Rieger L, Kapp M, et al. MIC-1 (a multifunctional modulator of dendritic cell phenotype and function) is produced by decidual stromal cells and trophoblasts. *Hum Reprod*. 2012;27(1):200-209.
119. Deng BP, Zhang Y, Wang QJ, et al. Soluble BAFF-R produced by decidual stromal cells plays an inhibitory role in monocytes and macrophages. *Reprod Biomed Online*. 2012;24(6):654-663.
120. Lindau R, Vondra S, Spreckels J, et al. Decidual stromal cells support tolerance at the human foetal-maternal interface by inducing regulatory M2 macrophages and regulatory T-cells. *J Reprod Immunol*. 2021;146:103330.
121. Yang HL, Wang CJ, Lai ZZ, et al. Decidual stromal cells maintain decidual macrophage homeostasis by secreting IL-24 in early pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2020;84(2):e13261.
122. Erkers T, Nava S, Yosef J, Ringdén O, Kaipe H. Decidual stromal cells promote regulatory T cells and suppress alloreactivity in a cell contact-dependent manner. *Stem Cells Dev*. 2013;22(19):2596-2605.
123. Valero-Pacheco N, Tang EK, Massri N, et al. Maternal IL-33 critically regulates tissue remodeling and type 2 immune responses in the uterus during early pregnancy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119(35):1-12.
124. He YY, He XJ, Guo PF, et al. The decidual stromal cells-secreted CCL2 induces and maintains decidual leukocytes into Th2 bias in human early pregnancy. *Clin Immunol*. 2012;145(2):161-173.
125. Wu HX, Jin LP, Xu B, Liang SS, Li DJ. Decidual stromal cells recruit Th17 cells into decidua to promote proliferation and invasion of human trophoblast cells by secreting IL-17. *Cell Mol Immunol*. 2014;11(3):253-262.
126. Vacca P, Montaldo E, Croxatto D, et al. Identification of diverse innate lymphoid cells in human decidua. *Mucosal Immunol*. 2015;8(2):254-264.
127. Mebius RE, Miyamoto T, Christensen J, et al. The fetal liver counterpart of adult common lymphoid progenitors gives rise to all lymphoid lineages, CD45⁺CD4⁺CD3⁻ cells, as well as macrophages. *J Immunol*. 2001;166(11):6593-6601.

128. Mebius RE. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(4):292-303.
129. Blois SM, Barrientos G, Garcia MG, et al. Interaction between dendritic cells and natural killer cells during pregnancy in mice. *J Mol Med.* 2008;86(7):837-852.
130. Symons LK, Miller JE, Kay VR, et al. The immunopathophysiology of endometriosis. *Trends Mol Med.* 2018;24(9):748-762.
131. Bulun SE, Yilmaz BD, Sison C, et al. Endometriosis. *Endocr Rev.* 2019;40(4):1048-1079.
132. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 1927;14(4):422-469.
133. Liu DT, Hitchcock A. Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynaecol.* 1986;93(8):859-862.
134. Asghari S, Valizadeh A, Aghebati-Maleki L, Nouri M, Yousefi M. Endometriosis: Perspective, lights, and shadows of etiology. *Biomed Pharmacother.* 2018;106:163-174.
135. Ha JK, Choi CW, Kim HW, et al. An extremely rare case of gastric subepithelial tumor: Gastric endometriosis. *Clin Endosc.* 2015;48(1):74-77.
136. Savone R, Salvatore G, Di Francesco A. Endometriosis in a patient with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *Gazz Medica Ital Arch per le Sci Mediche.* 2014;173(3):141-143.
137. Al-Obaidy KI, Idrees MT. Endometriosis with cystic degeneration: A rare disease of males. *Int J Surg Pathol.* 2019;27(3):311-314.
138. Ueki M. Histologic study of endometriosis and examination of lymphatic drainage in and from the uterus. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165(1):201-209.
139. Burney RO, Guidice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril.* 2012;98(3):511-519.
140. Signorile PG, Baldi A, Viceconte R, Ronchi A, Montella M. Pathogenesis of endometriosis: focus on adenogenesis-related factors. *In Vivo.* 2023;37(5):1922-1930.
141. Konrad L, Dietze R, Kudipudi PK, Horné F, Meinhold-Heerlein I. Endometriosis in MRKH cases as a proof for the coelomic metaplasia hypothesis? *Reproduction.* 2019;158(2):R41-R47.
142. Wang Y, Nicholes K, Shih IM. The origin and pathogenesis of endometriosis. *Annu Rev Pathol.* 2020;15:71-95.
143. Taylor HS. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *Jama.* 2004;292(1):81-85.
144. Du H, Taylor HS. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells.* 2007;25(8):2082-2086.
145. Meng X, Ichim TE, Zhong J, et al. Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population. *J Transl Med.* 2007;5:1-10.
146. Simpson JL, Elias S, Malinak LR, Buttram VC. Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol.* 1980;137(3):327-331.
147. Hadfield RM, Mardon HJ, Barlow DH, Kennedy SH. Endometriosis in monozygotic twins. *Fertil Steril.* 1997;68(5):941-942.

148. Hsieh YY, Bau DT, Chang CC, Tsai CH, Chen CP, Tsai FJ. XRCC4 codon 247*A and XRCC4 promoter -1394*T related genotypes but not XRCC4 intron 3 gene polymorphism are associated with higher susceptibility for endometriosis. *Mol Reprod Dev.* 2008;75(5):946-951.
149. Treloar SA, Wicks J, Nyholt DR, et al. Genomewide linkage study in 1,176 affected sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis on chromosome 10q26. *Am J Hum Genet.* 2005;77(3):365-376.
150. Painter J, Anderson C, Nyholt D, et al. Genome-wide association study identifies a locus at 7p15.2 associated with endometriosis. *Nat Genet.* 2011;43:51–54.
151. Peinado FM, Olivás-Martínez A, Lendínez I, et al. Expression profiles of genes related to development and progression of endometriosis and their association with paraben and benzophenone exposure. *Int J Mol Sci.* 2023;24(23):1-17.
152. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-257.
153. Béliard A, Noël A, Foidart JM. Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertil Steril.* 2004;82(1):80-85.
154. Jones RK, Searle RF, Bulmer JN. Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod.* 1998;13(12):3496-3502.
155. Garcia-Velasco JA, Mulayim N, Kayisli UA, Arici A. Elevated soluble Fas ligand levels may suggest a role for apoptosis in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2002;78(4):855-859.
156. Nasu K, Kawano Y, Kai K, Aoyagi Y, Abe W, Okamoto M, Narahara H. Aberrant histone modification in endometriosis. *Front Biosci.* 2014;19(8):1202-1214.
157. Dyson MT, Roqueiro D, Monsivais D, et al. Genome-wide DNA methylation analysis predicts an epigenetic switch for GATA factor expression in endometriosis. *PLoS Genet.* 2014;10(3):e1004158.
158. Shao R, Cao S, Wang X, Feng Y, Billig H. The elusive and controversial roles of estrogen and progesterone receptors in human endometriosis. *Am J Transl Res.* 2014;6(2):104-113.
159. Bulun SE, Monsavais D, Pavone ME, et al. Role of estrogen receptor- β in endometriosis. *Semin Reprod Med.* 2012;30(1):39-45.
160. Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, et al. Deficient 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: Failure to metabolize 17 β -estradiol. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(12):4474-4480.
161. Ahn SH, Khalaj K, Young SL, Lessey BA, Koti M, Tayade C. Immune-inflammation gene signatures in endometriosis patients. *Fertil Steril.* 2016;106(6):1420-1431
162. Suryawanshi S, Huang X, Elishaev E, et al. Complement pathway is frequently altered in endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2014;20(23):6163-6174.
163. Milewski Ł, Dziunycz P, Barcz E, et al. Increased levels of human neutrophil peptides 1, 2, and 3 in peritoneal fluid of patients with endometriosis: Association with neutrophils, T cells and IL-8. *J Reprod Immunol.* 2011;91(1-2):64-70.

164. Tariverdian N, Siedentopf F, Rücke M, et al. Intraperitoneal immune cell status in infertile women with and without endometriosis. *J Reprod Immunol*. 2009;80(1-2):80-90.
165. Monsanto SP, Edwards AK, Zhou J, et al. Surgical removal of endometriotic lesions alters local and systemic proinflammatory cytokines in endometriosis patients. *Fertil Steril*. 2016;105(4):968-977
166. Lin YJ, Lai MD, Lei HY, Wing LYC. Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology*. 2006;147(3):1278-1286.
167. Bacci M, Capobianco A, Monno A, et al. Macrophages are alternatively activated in patients with endometriosis and required for growth and vascularization of lesions in a mouse model of disease. *Am J Pathol*. 2009;175(2):547-556.
168. Sugamata M, Ihara T, Uchiide I. Increase of activated mast cells in human endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2005;53(3):120-125.
169. Berbic M, Schulke L, Markham R, Tokushige N, Russell P, Fraser IS. Macrophage expression in endometrium of women with and without endometriosis. *Hum Reprod*. 2009;24(2):325-332.
170. Chuang PC, Wu MH, Shoji Y, Tsai SJ. Downregulation of CD36 results in reduced phagocytic ability of peritoneal macrophages of women with endometriosis. *J Pathol*. 2009;219(2):232-241.
171. Lousse JC, Van Langendonck A, González-Ramos R, Defrère S, Renkin E, Donnez J. Increased activation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) in isolated peritoneal macrophages of patients with endometriosis. *Fertil Steril*. 2008;90(1):217-220.
172. Montagna P, Capellino S, Villaggio B, et al. Peritoneal fluid macrophages in endometriosis: Correlation between the expression of estrogen receptors and inflammation. *Fertil Steril*. 2008;90(1):156-164.
173. Chan RWS, Lee CL, Ng EHY, Yeung WSB. Co-culture with macrophages enhances the clonogenic and invasion activity of endometriotic stromal cells. *Cell Prolif*. 2017;50(3):1-9.
174. Tran LVP, Tokushige N, Berbic M, Markham R, Fraser IS. Macrophages and nerve fibres in peritoneal endometriosis. *Hum Reprod*. 2009;24(4):835-841.
175. Capobianco A, Rovere-Querini P. Endometriosis, a disease of the macrophage. *Front Immunol*. 2013;4:9
176. Maeda N, Izumiya C, Oguri H, Kusume T, Yamamoto Y, Fukaya T. Aberrant expression of intercellular adhesion molecule-1 and killer inhibitory receptors induces immune tolerance in women with pelvic endometriosis. *Fertil Steril*. 2002;77(4):679-683.
177. González-Foruria I, Santulli P, Chouzenoux S, Carmona F, Batteux F, Chapron C. Soluble ligands for the NKG2D receptor are released during endometriosis and correlate with disease severity. *PLoS One*. 2015;10(3):1-15.
178. Guo SW, Du Y, Liu X. Platelet-derived TGF- β 1 mediates the down-modulation of NKG2D expression and may be responsible for impaired natural killer (NK) cytotoxicity in women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2016;31(7):1462-1474.
179. Kang YJ, Jeung IC, Park A, et al. An increased level of IL-6 suppresses NK cell activity in peritoneal fluid of patients with endometriosis via regulation of SHP-2 expression. *Hum Reprod*. 2014;29(10):2176-2189.

180. Yu JJ, Sun HT, Zhang ZF, et al. IL15 promotes growth and invasion of endometrial stromal cells and inhibits killing activity of NK cells in endometriosis. *Reproduction*. 2016;152(2):151-160.
181. Yang HL, Zhou WJ, Chang KK, et al. The crosstalk between endometrial stromal cells and macrophages impairs cytotoxicity of NK cells in endometriosis by secreting IL-10 and TGF- β . *Reproduction*. 2017;154(6):815-825.
182. Schulke L, Berbic M, Manconi F, Tokushige N, Markham R, Fraser IS. Dendritic cell populations in the eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2009;24(7):1695-1703.
183. Izumi G, Koga K, Takamura M, et al. Mannose receptor is highly expressed by peritoneal dendritic cells in endometriosis. *Fertil Steril*. 2017;107(1):167-173
184. Santulli P, Borghese B, Chouzenoux S, et al. Serum and peritoneal interleukin-33 levels are elevated in deeply infiltrating endometriosis. *Hum Reprod*. 2012;27(7):2001-2009.
185. Riccio L da GC, Santulli P, Marcellin L, Abrão MS, Batteux F, Chapron C. Immunology of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;50:39-49.
186. Ho HN, Ming-Yih WU, Yang YUS. Peritoneal cellular immunity and endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 1997;38(6):400-412.
187. Podgaec S, Abrao MS, Dias JA, Rizzo LV, de Oliveira RM, Baracat EC. Endometriosis: An inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum Reprod*. 2007;22(5):1373-1379.
188. Antsiferova YS, Sotnikova NY, Posiseeva LV, Shor AL. Changes in the T-helper cytokine profile and in lymphocyte activation at the systemic and local levels in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2005;84(6):1705-1711.
189. Ahn SH, Edwards AK, Singh SS, Young SL, Lessey BA, Tayade C. IL-17A contributes to the pathogenesis of endometriosis by triggering proinflammatory cytokines and angiogenic growth factors. *J Immunol*. 2015;195(6):2591-2600.
190. Gogacz M, Winkler I, Bojarska-Junak A, et al. Increased percentage of Th17 cells in peritoneal fluid is associated with severity of endometriosis. *J Reprod Immunol*. 2016;117:39-44.
191. Olkowska-Truchanowicz J, Bocian K, Maksym RB, et al. CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells in peripheral blood and peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Hum Reprod*. 2013;28(1):119-124.
192. Berbic M, Hey-Cunningham AJ, Ng C, et al. The role of Foxp3+ regulatory T-cells in endometriosis: A potential controlling mechanism for a complex, chronic immunological condition. *Hum Reprod*. 2010;25(4):900-907.
193. Wang Y, Yu J, Luo X, et al. Abnormal regulation of chemokine TECK and its receptor CCR9 in the endometriotic milieu is involved in pathogenesis of endometriosis by way of enhancing invasiveness of endometrial stromal cells. *Cell Mol Immunol*. 2010;7(1):51-60.
194. Li MQ, Wang Y, Chang KK, et al. CD4+Foxp3+ regulatory T cell differentiation mediated by endometrial stromal cell-derived TECK promotes the growth and invasion of endometriotic lesions. *Cell Death Dis*. 2014;5(10):e1436.

195. Wild RA, Shivers CA. Antiendometrial antibodies in patients with endometriosis. *Am J Reprod Immunol Microbiol*. 1985;8(3):84-86.
196. Randall GW, Gantt PA, Poe-Zeigler RL, et al. Serum antiendometrial antibodies and diagnosis of endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2007;58(4):374-382.
197. Hirata T, Osuga Y, Hamasaki K, et al. Interleukin (IL)-17A stimulates IL-8 secretion, cyclooxygenase-2 expression, and cell proliferation of endometriotic stromal cells. *Endocrinology*. 2008;149(3):1260-1267.
198. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):726-736.
199. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(9):2287-2299.
200. Caplan AI, Correa D. The MSC: An injury drugstore. *Cell Stem Cell*. 2011;9(1):11-15.
201. Ruiz C, Montes MJ, Abadía-Molina AC, Olivares EG. Phagocytosis by fresh and cultured human decidual stromal cells: Opposite effects of interleukin-1 α and progesterone. *J Reprod Immunol*. 1997;33(1):15-26.
202. Dimitrov R, Timeva T, Kyurkchiev D, et al. Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium. *Reproduction*. 2008;135(4):551-558.
203. Dimitrov R, Kyurkchiev D, Timeva T, et al. First-trimester human decidua contains a population of mesenchymal stem cells. *Fertil Steril*. 2010;93(1):210-219.
204. Ruiz-Magaña MJ, Puerta JM, Llorca T, et al. Influence of the ectopic location on the antigen expression and functional characteristics of endometrioma stromal cells. *Reprod Biomed Online*. 2023;46(3):460-469.
205. Kleinman HK, McGoodwin EB, Rennard SI, Martin GR. Preparation of collagen substrates for cell attachment: Effect of collagen concentration and phosphate buffer. *Anal Biochem*. 1979;94(2):308-312.
206. 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(2):314-319.
207. Richards RG, Brar AK, Frank GR, Hartman SM, Jikihara H. Fibroblast cells from term human decidua closely resemble endometrial stromal cells: Induction of prolactin and insulin-like growth factor binding protein-1 expression. *Biol Reprod*. 1995;52(3):609-615.
208. Muñoz-Fernández R, de la Mata C, Prados A, et al. Human predecidual stromal cells have distinctive characteristics of pericytes: Cell contractility, chemotactic activity, and expression of pericyte markers and angiogenic factors. *Placenta*. 2018;61:39-47.
209. Dimitrov R, Kyurkchiev D, Timeva T, et al. First-trimester human decidua contains a population of mesenchymal stem cells. *Fertil Steril*. 2010;93(1):210-219.
210. Muñoz-Fernández R, de La Mata C, Requena F, et al. Human predecidual stromal cells are mesenchymal stromal/stem cells and have a therapeutic effect in an immune-based mouse model of recurrent spontaneous abortion. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):1-13.

211. Muñoz-Fernández R, Prados A, Leno-Durán E, et al. Human decidual stromal cells secrete C-X-C motif chemokine 13, express B cell-activating factor and rescue B lymphocytes from apoptosis: Distinctive characteristics of follicular dendritic cells. *Hum Reprod.* 2012;27(9):2775-2784.
212. Guillot PV, Gotherstrom C, Chan J, Kurata H, Fisk NM. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem Cells.* 2007;25(3):646-654.
213. Ruiz Magaña MJ, Puerta JM, Martínez-Aguilar R, et al. Endometrial and decidual stromal precursors show a different decidualization capacity. *Reproduction.* 2020;160(1):83-91.
214. Martínez-aguilar R, Llorca T, Ruiz-maga MJ, Abadia-molina AC, Ruiz-ruiz C, Olivares EG. Decidualization modulates the mesenchymal stromal/stem cell and pericyte characteristics of human decidual stromal cells. Effects on antigen expression, chemotactic activity on monocytes and antitumoral activity. 2021;145: 103326.
215. Ao D, Li DJ, Li MQ. CXCL12 in normal and pathological pregnancies: A review. *Am J Reprod Immunol.* 2020;84(3):1-11.
216. Ruiz-Magaña MJ, Llorca T, Martínez-Aguilar R, Abadia-Molina AC, Ruiz-Ruiz C, Olivares EG. Stromal cells of the endometrium and decidua: In search of a name and an identity. *Biol Reprod.* 2022;107(5):1166-1176.
217. Vento-Tormo R, Efremova M, Botting RA, et al. Single-cell reconstruction of the early maternal–fetal interface in humans. *Nature.* 2018;563(7731):347-353.
218. Galland S, Stamenkovic I. Mesenchymal stromal cells in cancer: A review of their immunomodulatory functions and dual effects on tumor progression. *J Pathol.* 2020;250(5):555-572.
219. Ganta C, Chiyo D, Ayuzawa R, et al. Rat umbilical cord stem cells completely abolish rat mammary carcinomas with no evidence of metastasis or recurrence 100 days post-tumor cell inoculation. *Cancer Res.* 2009;69(5):1815-1820.
220. Fong CY, Chak LL, Biswas A, et al. Human Wharton's Jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev Reports.* 2011;7(1):1-16.
221. Lin DH, Biswas A, Choolani M, Fong CY, Bongso A. Induction of immunogenic cell death in lymphoma cells by Wharton's Jelly mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Rev Reports.* 2017;13(6):801-816.
222. Segerer SE, Martignoni F, Bogdan A, et al. Thrombopoietin modulates the proliferation, migration and cytokine profile of decidual cell subsets during early gestation. *Mol Hum Reprod.* 2013;19(6):361-368.
223. Booth V, Keizer DW, Kamphuis MB, Clark-Lewis I, Sykes BD. The CXCR3 binding chemokine IP-10/CXCL10: Structure and receptor interactions. *Biochemistry.* 2002;41(33):10418-10425.
224. Booth V, Clark-Lewis I, Sykes BD. NMR structure of CXCR3 binding chemokine CXCL11 (ITAC). *Protein Sci.* 2004;13(8):2022-2028.
225. Llorca T, Ruiz-Magaña MJ, Martínez-Aguilar R, et al. Decidualized human decidual stromal cells inhibit chemotaxis of activated T cells: a potential mechanism of maternal-fetal immune tolerance. *Front Immunol.* 2023;14:1223539.

226. Skalhegg BS, Tasken K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci.* 2000;5:D678-D693.
227. Kim JJ, Jaffe RC, Fazleabas AT. Comparative studies on the in vitro decidualization process in the baboon (*Papio anubis*) and human. *Biol Reprod.* 1998;59(1):160-168.
228. Cacciottola L, Vitale F, Donnez J, Dolmans MM. Use of mesenchymal stem cells to enhance or restore fertility potential: A systematic review of available experimental strategies. *Hum Reprod Open.* 2023;2023(4):hoad040.
229. Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, et al. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells.* 2008;26(7):1695-1704.
230. Zhong Z, Patel AN, Ichim TE, et al. Feasibility investigation of allogeneic endometrial regenerative cells. *J Transl Med.* 2009;7:15.
231. Sadeghi B, Remberger M, Gustafsson B, et al. Long-term follow-up of a pilot study using placenta-derived decidual stromal cells for severe acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019;25(10):1965-1969.
232. Muñoz-Fernández R, de la Mata C, Prados A, et al. Human predecidual stromal cells have distinctive characteristics of pericytes: Cell contractility, chemotactic activity, and expression of pericyte markers and angiogenic factors. *Placenta.* 2018;61:39-47.
233. Prados A, Muñoz-Fernández R, Fernandez-Rubio P, Olivares EG. Characterization of mesenchymal stem/stromal cells with lymphoid tissue organizer cell potential in tonsils from children. *Eur J Immunol.* 2018;48(5):829-843.
234. Kinner B, Zaleskas JM, Spector M. Regulation of smooth muscle actin expression and contraction in adult human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 2002;278(1):72-83.
235. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3213-3218.
236. Dimitriou H, Perdikogianni C, Martimianaki G, Choumerianou DM, Pelagiadis J, Kalmanti M. Are mesenchymal stromal cells from children resistant to apoptosis? *Cell Prolif.* 2009;42(3):276-283.
237. Blanco O, Leno-Durán E, Morales JC, Olivares EG, Ruiz-Ruiz C. Human decidual stromal cells protect lymphocytes from apoptosis. *Placenta.* 2009;30(8):677-685.
238. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 2010;466(7308):829-834.
239. Niemeyer P, Vohrer J, Schmal H, et al. Survival of human mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue after xenogenic transplantation in immunocompetent mice. *Cytotherapy.* 2008;10(8):784-795.
240. Paul A, Srivastava S, Chen G, Shum-Tim D, Prakash S. Functional assessment of adipose stem cells for xenotransplantation using myocardial infarction immunocompetent models: Comparison with bone marrow stem cells. *Cell Biochem Biophys.* 2013;67(2):263-273.

241. Lee BP, Chen W, Shi H, Der SD, Förster R, Zhang L. CXCR5/CXCL13 interaction is important for double-negative regulatory T cell homing to cardiac allografts. *J Immunol.* 2006;176(9):5276-5283.
242. Leber A, Teles A, Zenclussen AC. Regulatory T cells and their role in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63(6):445-459.
243. Gorelik L, Gilbride K, Dobles M, Kalled SL, Zandman D, Scott ML. Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells. *J Exp Med.* 2003;198(6):937-945.
244. Langat DL, Wheaton DA, Platt JS, Sifers T, Hunt JS. Signaling pathways for B cell-activating factor (BAFF) and a proliferation-inducing ligand (APRIL) in human placenta. *Am J Pathol.* 2008;172(5):1303-1311.
245. Phillips TA, Ni J, Hunt JS. Cell-specific expression of B lymphocyte (APRIL, BLyS)- and Th2 (CD30L/CD153)-promoting tumor necrosis factor superfamily ligands in human placentas. *J Leukoc Biol.* 2003;74(1):81-87.
246. Kyurkchiev S, Shterev A, Dimitrov R. Assessment of presence and characteristics of multipotent stromal cells in human endometrium and decidua. *Reprod Biomed Online.* 2010;20(3):305-313.
247. Spitzer TLB, Rojas A, Zelenko Z, et al. Perivascular human endometrial mesenchymal stem cells express pathways relevant to self-renewal, lineage specification, and functional phenotype. *Biol Reprod.* 2012;86(2):58.
248. Aghajanova L, Horcajadas JA, Esteban FJ, Giudice LC. The bone marrow-derived human mesenchymal stem cell: Potential progenitor of the endometrial stromal fibroblast. *Biol Reprod.* 2010;82(6):1076-1087.
249. Schwab KE, Gargett CE. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum Reprod.* 2007;22(11):2903-2911.
250. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: Developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell.* 2011;21(2):193-215.
251. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell.* 2001;12(9):2730-2741.
252. Li Q, Yu Y, Bischoff J, Mulliken JB, Olsen BR. Differential expression of CD146 in tissues and endothelial cells derived from infantile haemangioma and normal human skin. *J Pathol.* 2003;201(2):296-302.
253. Torry DS, Leavenworth J, Chang M, et al. Angiogenesis in implantation. *J Assist Reprod Genet.* 2007;24(7):303-315.
254. Blocki A, Wang Y, Koch M, et al. Not all MSCs can act as pericytes: Functional in vitro assays to distinguish pericytes from other mesenchymal stem cells in angiogenesis. *Stem Cells Dev.* 2013;22(17):2347-2355.
255. Castrechini NM, Murthi P, Qin S, et al. Decidua parietalis-derived mesenchymal stromal cells reside in a vascular niche within the choriodecidua. *Reprod Sci.* 2012;19(12):1302-1314.

256. Thomas WE. Brain macrophages: On the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Rev.* 1999;31(1):42-57.
257. Brosens JJ, de Souza NM, Barker FG. Uterine junctional zone: Function and disease. *Lancet.* 1995;346(8974):558-560.
258. Suryawanshi H, Morozov P, Straus A, et al. A single-cell survey of the human first-trimester placenta and decidua. *Sci Adv.* 2018;4(10):eaau4788.
259. Wiater J, Niedziela M, Posmysz A, et al. Identification of perivascular and stromal mesenchymal stem/progenitor cells in porcine endometrium. *Reprod Domest Anim.* 2018;53(2):333-343.
260. Cras A, Larghero J, Rossi E, Blandinières A, Gaussem P, Smadja DM. Nestin is a new partner in endothelial colony forming cell angiogenic potential. *Stem Cell Rev Reports.* 2023;19(7):2541-2550.
261. Huang Y, Lu M, Wang Y, Zhang C, Cao Y, Zhang X. Podoplanin: A potential therapeutic target for thrombotic diseases. *Front Neurol.* 2023;14:1118843.
262. Ning H, Lin G, Lue TF, Lin CS. Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75 kd endothelial antigen. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;413(2):353-357.
263. Albonici L, Giganti MG, Modesti A, Manzari V, Bei R. Multifaceted role of the placental growth factor (PLGF) in the antitumor immune response and cancer progression. *Int J Mol Sci.* 2019;20(12):2970.
264. Ao D, Li DJ, Li MQ. CXCL12 in normal and pathological pregnancies: A review. *Am J Reprod Immunol.* 2020;84(3):e13280.
265. Gu Y, Jow GM, Moulton BC, et al. Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization. *Endocrinology.* 1994;135(3):1272-1279.
266. 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(5):2305-2313.
267. Chan J, Rabbitt EH, Innes BA, et al. Glucocorticoid-induced apoptosis in human decidua: A novel role for 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in late gestation. *J Endocrinol.* 2007;195(1):7-15.
268. Yang M, Ong J, Meng F, et al. Spatiotemporal insight into early pregnancy governed by immune-featured stromal cells. *Cell.* 2023;186(20):4271-4288.
269. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: From T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(11):651-668.
270. Braverman MB, Bagni A, De Ziegler D, Den T, Gursipide E. Isolation of prolactin-producing cells from first and second trimester decidua. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984;58(3):521-525.
271. Graham JJ, Longhi MS, Heneghan MA. T helper cell immunity in pregnancy and influence on autoimmune disease progression. *J Autoimmun.* 2021;121:102651.
272. Guo L, Guo A, Yang F, et al. Alterations of cytokine profiles in patients with recurrent implantation failure. *Front Endocrinol.* 2022;13:949123.

273. Wang W, Sung N, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. T helper (Th) cell profiles in pregnancy and recurrent pregnancy losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh cells. *Front Immunol.* 2020;11:2025.
274. Clark-Lewis I, Mattioli I, Gong JH, Loetscher P. Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *J Biol Chem.* 2003;278(1):289-295.
275. Qin S, Rottman JB, Myers P, et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest.* 1998;101(4):746-754.
276. Sato Y. Endovascular trophoblast and spiral artery remodeling. *Mol Cell Endocrinol.* 2020;503:110699.
277. Grasso E, Papparini D, Agüero M, Mor G, Leirós CP, Ramhorst R. VIP contribution to the decidualization program: Regulatory T cell recruitment. *J Endocrinol.* 2014;221(1):121-131.
278. Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: A versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* 2001;22(2):83-87.
279. Kayisli UA, Mahutte NG, Arici A. Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology. *Am J Reprod Immunol.* 2002;47(4):213-221.
280. Alcamí A, Saraiva M. Chemokine binding proteins encoded by pathogens. *Adv Exp Med Biol.* 2009;666:167-79.
281. González-Motos V, Kropp KA, Viejo-Borbolla A. Chemokine binding proteins: An immunomodulatory strategy going viral. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;30:71-80.
282. Stark LE, Guan W, Colvin ME, LiWang PJ. The binding and specificity of chemokine binding proteins, through the lens of experiment and computation. *Biomed J.* 2022;45(3):439-453.
283. Déruaz M, Bonvin P, Severin IC, et al. Evasin-4, a tick-derived chemokine-binding protein with broad selectivity can be modified for use in preclinical disease models. *FEBS J.* 2013;280(19):4876-4887.
284. Sharfe N, Freywald A, Toro A, Dadi H, Roifman C. Ephrin stimulation modulates T cell chemotaxis. *Eur J Immunol.* 2002;32(12):3745-3755.
285. Goldman-Wohl D, Greenfield C, Haimov-Kochman R, et al. Eph and ephrin expression in normal placental development and preeclampsia. *Placenta.* 2004;25(7):623-630.
286. Shi G, Wu Y, Zhang J, Wu J. Death decoy receptor TR6/DcR3 inhibits T cell chemotaxis in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2003;171(7):3407-3414.
287. Chen HF, Chen JS, Shun CT, Tsai YF, Ho HN. Decoy receptor 3 expression during the menstrual cycle and pregnancy, and regulation by sex steroids in endometrial cells in vitro. *Hum Reprod.* 2009;24(6):1350-1358.
288. Rogers LM, Anders AP, Doster RS, et al. Decidual stromal cell-derived PGE2 regulates macrophage responses to microbial threat. *Am J Reprod Immunol.* 2018;80(4):e13032.
289. Osma-García IC, Punzón C, Fresno M, Díaz-Muñoz MD. Dose-dependent effects of prostaglandin E2 in macrophage adhesion and migration. *Eur J Immunol.* 2016;46(3):677-688.

290. Goetzl EJ, Gräler MH. Sphingosine 1-phosphate and its type 1 G protein-coupled receptor: Trophic support and functional regulation of T lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 2004;76(1):30-35.
291. Brünnert D, Sztachelska M, Bornkessel F, et al. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate metabolic pathways and their receptors are differentially regulated during decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod.* 2014;20(10):1016-1025.
292. Nigro G, Mazzocco M, Mattia E, Di Renzo GC, Carta G, Anceschi MM. Role of the infections in recurrent spontaneous abortion. *J Matern Neonatal Med.* 2011;24(8):983-989.
293. Ferenczy A, Guralnick M. Endometrial microstructure: structure-function relationships throughout the menstrual cycle. *Semin Reprod Med.* 1983;1(03):205-219.
294. Darzi S, Werkmeister JA, Deane JA, Gargett CE. Identification and characterization of human endometrial mesenchymal stem/stromal cells and their potential for cellular therapy. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(9):1127-1132.
295. Wang W, Vilella F, Alama P, et al. Single-cell transcriptomic atlas of the human endometrium during the menstrual cycle. *Nat Med.* 2020;26(10):1644-1653.
296. Stakkestad O, Larsen AC, Kvissel AK, Eikvar S, Ørstavik S, Skålhegg BS. Protein kinase A type I activates a CRE-element more efficiently than protein kinase A type II regardless of C subunit isoform. *BMC Biochem.* 2011;12(1):7.
297. Buzzio OL, Lu Z, Miller CD, Unterman TG, Kim JJ. FOXO1A differentially regulates genes of decidualization. *Endocrinology.* 2006;147(8):3870-3876.
298. Labied S, Kajihara T, Madureira PA, et al. Progestins regulate the expression and activity of the Forkhead transcription factor FOXO1 in differentiating human endometrium. *Mol Endocrinol.* 2006;20(1):35-44.
299. Kajihara T, Brosens JJ, Ishihara O. The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy. *Med Mol Morphol.* 2013;46(2):61-68.
300. Evans J, Salamonsen LA. Decidualized human endometrial stromal cells are sensors of hormone withdrawal in the menstrual inflammatory cascade. *Biol Reprod.* 2014;90(1):14.
301. Szukiewicz D, Stangret A, Ruiz-Ruiz C, et al. Estrogen- and Progesterone (P4)-mediated epigenetic modifications of endometrial stromal cells (EnSCs) and/or mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) in the etiopathogenesis of endometriosis. *Stem Cell Rev Reports.* 2021;17(4):1174-1193.
302. Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(5):261-275.
303. Klemmt PAB, Carver JG, Kennedy SH, Koninckx PR, Mardon HJ. Stromal cells from endometriotic lesions and endometrium from women with endometriosis have reduced decidualization capacity. *Fertil Steril.* 2006;85(3):564-572.
304. Imai A, Takagi A, Tamaya T. Gonadotropin-releasing hormone analog repairs reduced endometrial cell apoptosis in endometriosis in vitro. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182(5):1142-1146.

305. Kao AP, Wang KH, Chang CC, et al. Comparative study of human eutopic and ectopic endometrial mesenchymal stem cells and the development of an in vivo endometriotic invasion model. *Fertil Steril*. 2011;95(4):1308-1315.
306. Li C, Wang T, Luo S, et al. Expression profiles of human somatic mesenchymal stem cells derived from fresh endometrium, ectopic-endometrium and umbilical cord. *Ginekol Pol*. 2023;94(12):950-958.
307. Bellelis P, Barbeiro DF, Rizzo LV, Baracat EC, Abrão MS, Podgaec S. Transcriptional changes in the expression of chemokines related to natural killer and T-regulatory cells in patients with deep infiltrative endometriosis. *Fertil Steril*. 2013;99(7):1987-1993.
308. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. *Immunity*. 2010;32(5):593-604.
309. Cominelli A, Gaide Chevonnay HP, Lemoine P, Courtoy PJ, Marbaix E, Henriët P. Matrix metalloproteinase-27 is expressed in CD163+/CD206+ M2 macrophages in the cycling human endometrium and in superficial endometriotic lesions. *Mol Hum Reprod*. 2014;20(8):767-775.