



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 3 e Inmunología

Universidad de Granada

TESIS DOCTORAL

**COMPARACIÓN DE LAS CÉLULAS DECIDUALES ESTROMALES HUMANAS Y
SUS PRECURSORAS LAS CÉLULAS ENDOMETRIALES: FENOTIPO
ANTIGÉNICO, DIFERENCIACIÓN, APOPTOSIS Y RELACIÓN FUNCIONAL
CON LINFOCITOS**

**Tesis Doctoral presentada por Ester Leno Durán para optar al título de
Doctora por la Universidad de Granada**

Granada, 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Ester Leno Durán
D.L.: GR 613-2012
ISBN: 978-84-694-6681-0

Dr. ENRIQUE GARCÍA OLIVARES Catedrático de Inmunología de la Universidad de Granada y **Dra. M. CARMEN RUIZ RUIZ**, Profesora Titular de Inmunología de la Universidad de Granada

CERTIFICAN:

Que la presente tesis titulada **“COMPARACIÓN DE LAS CÉLULAS DECIDUALES ESTROMALES HUMANAS Y SUS PRECURSORAS LAS CÉLULAS ENDOMETRIALES: FENOTIPO ANTIGÉNICO, DIFERENCIACIÓN, APOPTOSIS Y RELACIÓN FUNCIONAL CON LINFOCITOS”**, de la que es autora **ESTER LENO DURÁN**, superó el programa de doctorado “Inmunología” y ha sido dirigida bajo su dirección en la Unidad de Inmunología del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 3 e Inmunología de la Universidad de Granada.

Revisado el presente trabajo, los directores consideran que reúne las condiciones necesarias para ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, expedimos y firmamos el presente certificado en Granada, a 7 de junio de 2011.

Fdo. Enrique García Olivares

Fdo. M. Carmen Ruiz Ruiz

ÍNDICE

SUMMARY	1
RESUMEN.....	5
ABREVIATURAS.....	11
INTRODUCCIÓN	13
1. ENDOMETRIO.....	15
2. DECIDUA.....	16
2.1. Implantación y formación de la interfase materno-fetal.....	17
2.2. Regulación inmunológica de la interfase materno-fetal.....	17
2.3 Evasión inmunológica del trofoblasto.....	18
2.4. Leucocitos maternos en la interfase materno-fetal	20
2.5. El paradigma Th1/Th2	24
3. CÉLULAS ENDOMETRIALES ESTROMALES	26
3.1. Células endometriales estromales como células troncales	26
4. CELULAS DECIDUALES ESTROMALES	28
4.1. Células deciduales estromales como células troncales	28
4.2. La célula decidual estromal como una forma de miofibroblasto.....	29
4.3. Relación de las células deciduales estromales y las células foliculares dendríticas	30
4.4. Las células deciduales estromales como células fagocíticas.....	31
4.5. Las células deciduales estromales como presentadoras de antígeno...	32
5. DECIDUALIZACIÓN	32
5.1. Decidualización en células deciduales y endometriales estromales	33
5.2. Progesterona en la decidualización	34
5.3. cAMP en la decidualización	35
5.3.1. Mecanismo de acción de cAMP en la decidualización.....	36
5.3.2 Control de la vía de activación de cAMP.....	37
5.4. Otros factores que regulan la decidualización	38

6. APOPTOSIS	39
6.1. Caspasas	40
6.2. Rutas de inducción de apoptosis	41
6.2.1. <i>Vía de los receptores de muerte o vía extrínseca de inducción de apoptosis</i>	42
6.2.2. <i>Ruta mitocondrial o intrínseca</i>	43
6.3. Proteínas reguladoras de la apoptosis	45
OBJETIVOS	49
MATERIALES Y MÉTODOS	53
1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS	55
2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS	56
3. PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS	57
4. REACTIVOS Y ANTICUERPOS	58
4.1. Anticuerpos usados en citometría de flujo	58
4.2. Anticuerpos usados en Western blot.....	58
4.3. Reactivos inductores de apoptosis	58
4.4. Citoquinas, hormonas y otros reactivos.....	59
5. DECIDUALIZACION DE CÉLULAS	59
6. ANÁLISIS DEL FENOTIPO ANTIGÉNICO POR CITOMETRÍA DE FLUJO	59
7. DETERMINACIÓN DE IL-15 Y PROLACTINA SECRETADAS EN SOBRENADANTES DE CULTIVO	60
8. DETECCIÓN DE CÉLULAS APOPTÓTICAS	60
9. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	61
10. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE LA ACTIVACIÓN DE BAK	61
11. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	61
12. PCR ARRAY	62

13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
RESULTADOS.....	67
1. RELACIÓN ENTRE CÉLULAS ENDOMETRIALES ESTROMALES Y CÉLULAS DECIDUALES ESTROMALES.....	69
1.1. Comparación del fenotipo antigénico de células endometriales estromales y células deciduales estromales	69
1.2. Modulación del fenotipo antigénico en células deciduales estromales decidualizadas.....	70
1.3. Expresión de receptores de prolactina en células deciduales estromales y en células deciduales estromales decidualizadas.....	73
1.4. Modulación del fenotipo antigénico de células endometriales estromales decidualizadas	74
1.5. Producción de prolactina por células endometriales estromales y células deciduales estromales decidualizadas	76
1.6. Proliferación de células deciduales estromales y células endometriales estromales durante la decidualización	77
2. EFECTOS DE LAS CÉLULAS DECIDUALES ESTROMALES Y CÉLULAS ENDOMETRIALES ESTROMALES SOBRE LA SUPERVIVENCIA Y PROLIFERACIÓN LINFOCITOS.....	79
2.1 Las células deciduales estromales mejoran la supervivencia de los linfocitos primarios	79
2.2. Proliferación de linfocitos T y NK deciduales cultivados con células deciduales estromales.....	82
2.3. Las células endometriales estromales favorecen la supervivencia de linfocitos T menstruales	83
2.4. Proliferación de linfocitos T menstruales cultivados con células endometriales estromales.....	84
2.5. Producción de IL-15 por células deciduales estromales y células endometriales estromales.....	85
3. INDUCCIÓN Y REGULACIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DECIDUALES ESTROMALES	87
3.1 Efecto sobre células deciduales estromales de diferentes agentes inductores de muerte celular por apoptosis.....	87

3.2. El proceso de decidualización induce apoptosis en células deciduales estromales	88
3.3. Inducción de apoptosis en células endometriales estromales durante la decidualización.....	92
3.4. Estudio de la expresión y activación de factores implicados en la inducción de apoptosis en células deciduales estromales	94
3.4.1. Activación de caspasas	94
3.4.2. Proteínas anti-apoptóticas.....	96
3.4.3. Proteínas pro-apoptóticas.....	98
3.4.4. Expresión de genes implicados en la inducción de apoptosis	100
3.5. Efecto sobre células deciduales estromales decidualizadas de diferentes agentes inductores de apoptosis	104
3.5.1. Expresión de CD95 (Fas) en DSC	106
3.6. Inducción de apoptosis por sobrenadantes de cultivo de células deciduales estromales decidualizadas	107
3.6.1. Estudio del efecto de la prolactina en la inducción de apoptosis durante la decidualización.....	109
3.6.2. Inducción de apoptosis en células deciduales estromales no decidualizadas por diferentes factores presentes en la decidua	114
3.7. Efecto de la decidualización sobre células deciduales estromales recién obtenidas	118
3.7.1. Producción de prolactina por células deciduales estromales frescas.....	118
3.7.2. Apoptosis en células deciduales estromales recién obtenidas.....	120
DISCUSIÓN	125
CONCLUSIONES.....	145
BIBLIOGRAFÍA	149
PUBLICACIONES	169

SUMMARY

Human endometrium is characterized by an exclusively intensive and cyclic regeneration in the course of the menstrual cycle. During the female reproductive period, the endometrium undergoes hormone-driven dynamic changes including self-renewal, proliferation, differentiation, and shedding off. These changes are due to cell proliferation and differentiation, which are under strict hormonal control. Adhesion of the blastocyst results in the differentiation of the endometrial stromal cells (ESC) into functionally distinct cells, termed decidual stromal cells (DSC), which are the main cellular component of the decidua, the maternal tissue which is in close contact with the fetal trophoblast. DSC are an important component of the implantation process. During normal pregnancy, DSC differentiate (decidualize) by the effect of progesterone and other hormones which induce an increase in intracellular cAMP levels. Decidualized DSC change their morphology to a rounder shape and secrete prolactin. Decidualization of the endometrium is essential for successful implantation and pregnancy. The decidualization reaction is initiated in the stroma of the late luteal phase and spreads throughout the decidua in pregnant woman.

During normal pregnancy, DSC result in apoptosis, and this process is thought to limit the lifespan of these cells, allowing placental expansion and development. Differentiation and apoptosis of DSC during the decidualization of the receptive decidua are crucial for the controlled invasion of trophoblasts. The majority of DSC regress in a time-dependent manner, and their removal is important because they provide space for the growth of the embryo. However, the molecular mechanisms controlling DSC death are poorly understood.

In the present work, we have analyzed the similarities and differences between ESC and DSC: two different functional cell states of uterine stromal cells. ESC and DSC lines were isolated and maintained in cell culture. By flow cytometry, we observed that both cell types were similar in their antigenic phenotype: they expressed CD10, CD29, CD73, CD54 and BAFF.

Moreover, ESC and DSC decreased the spontaneous apoptosis of lymphocytes when these lymphocytes were co-cultured with either type of cells. By flow cytometry analysis, we determined the percentage of apoptotic cells in decidual lymphocyte cultures either incubated alone or co-incubated with DSC. We found that established DSC lines protected purified decidual NK cells and decidual T cells from spontaneous apoptosis and increased their proliferation. Moreover, DSC improved survival of peripheral NK lymphocytes, which show phenotypic differences with decidual NK cells. Our results suggest that DSC may play a role in the maintenance of lymphocyte survival at the materno-fetal interface. A similar effect was observed with ESC lines, which increased the viability of purified T cells from menstrual blood. This activity was due to soluble factors, since culture supernatants of the cell lines exhibited similar protective effects on the spontaneous apoptosis of lymphocytes.

We have studied by flow cytometry the effects of decidualization on the antigen phenotype and functions of DSC and ESC. Decidualization was confirmed by the detection of prolactin in the culture medium. When ESC or DSC lines were treated with progesterone and cAMP, we detected production of prolactin in both cases, although DSC significantly secreted more prolactin than ESC. Likewise, the secretion of IL-15 by DSC was significantly higher than by ESC, when treated with progesterone and cAMP. We have also observed that decidualization decreased the expression of CD54, CD29 and BAFF by DSC, but it did not change the expression of CD73, CD10, CD21, CD106 and CD14 on these cells. Decidualized ESC, however, only decreased the expression of CD29.

We observed that decidualization induced apoptosis in DSC and ESC, although this process was much more significant in the former cells. We also demonstrated that DSC were paradoxically resistant to most of apoptosis-inducer substances.

By western-blot, we have studied molecular changes in the level of pro- and anti-apoptotic proteins during decidualization. In decidualized DSC, we observed

a decrease in the anti-apoptotic proteins Bcl_x_L, cFLIP and XIAP as well as in the pro-apoptotic proteins Bax, Bid and Apaf-1. In addition, we found an increase in the pro-apoptotic protein Bim. This latter result was confirmed by PCR array.

We tested the effect of culture supernatants from decidualized DSC on undifferentiated DSC and we found that they increased the apoptosis of these cells, although paradoxically, and as it was said before, they decreased the spontaneous apoptosis of decidual lymphocytes.

In summary, our results showed that DSC and ESC exhibited a similar antigen phenotype and equivalent capacity to protect lymphocytes from spontaneous apoptosis. Moreover, treatment with progesterone and cAMP induced decidualization, together with apoptosis, of DSC and ESC. However, ESC were less sensitive to the effects of decidualization by progesterone and cAMP: the amount of prolactin and IL-15 secreted and the proportion of apoptotic cells were significantly lower in decidualized ESC than in decidualized DSC. The changes in the antigen phenotype were also less intense in the former than in the latter cells. Finally, we found that decidualization provoked an imbalance between pro and anti-apoptotic proteins.

Our results suggest that DSC and ESC release soluble factors to the supernatant that are responsible for the observed protective effect on lymphocytes and that decidualization provokes the production of soluble factors which induce apoptosis on DSC.

RESUMEN

El endometrio humano se caracteriza por su regeneración cíclica e intensa durante el periodo reproductivo femenino, que es regulado por las variaciones en los niveles hormonales durante el ciclo menstrual. Estos cambios conllevan a la proliferación y diferenciación de las células endometriales. En el embarazo, la adhesión del blastocisto al endometrio lleva consigo la diferenciación de células endometriales estromales (ESC) a células funcionalmente distintas, llamadas células deciduales estromales (DSC), las cuales son el principal componente de la decidua, el tejido materno en íntimo contacto con el trofoblasto fetal. Las DSC son esenciales para la implantación. Durante el embarazo, las DSC se diferencian (decidualizan) por la progesterona y otras hormonas que producen un aumento en los niveles intracelulares de cAMP.

En el embarazo, las DSC van muriendo por apoptosis, al mismo tiempo que se desarrollan otras estructuras de la placenta. La diferenciación y apoptosis de las DSC durante la decidualización en la decidua es crucial para que se produzca una invasión controlada del trofoblasto. Además, la apoptosis de las células deciduales permite el crecimiento del embrión. A pesar de la importancia de la apoptosis en la decidua, no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales se produce la muerte celular.

En nuestro trabajo de tesis hemos comparado las células ESC y DSC: dos tipos celulares de células estromales uterinas que, como hemos mencionado, difieren en su estado funcional. Las líneas celulares DSC y ESC, mantenidas en cultivo presentaron el mismo fenotipo antigénico, expresando CD10, CD29, CD73, CD54 y BAFF.

Además, tanto DSC como ESC protegieron de la apoptosis espontánea a los linfocitos. El porcentaje de linfocitos apoptóticos se determinó por citometría de flujo y detectamos que las DSC protegen de la apoptosis a linfocitos NK deciduales, y a linfocitos T y NK periféricos, los cuales presentan diferencias fenotípicas con respecto a los linfocitos NK deciduales. Nuestros resultados sugieren que las DSC pueden jugar un papel importante en el mantenimiento de

la supervivencia de los linfocitos en la interfase materno-fetal. Las ESC presentaron un efecto similar en la protección de la apoptosis espontánea de linfocitos T procedentes de sangre menstrual. El efecto protector de las DSC sobre los linfocitos está mediado por factores solubles secretados por dichas DSC, ya que la protección observada al cultivar los linfocitos con sobrenadantes de cultivo de DSC fue similar a la detectada en el co-cultivo con estas células.

También estudiamos por citometría de flujo el efecto de la decidualización sobre el fenotipo antigénico y funciones de DSC y ESC. La decidualización se confirmó mediante la detección de prolactina en el medio de cultivo. Tanto DSC como ESC decidualizadas con progesterona y cAMP produjeron prolactina, aunque las DSC secretaron cantidades mayores que las ESC. Del mismo modo, las DSC decidualizadas produjeron más IL-15 que las ESC decidualizadas. En la diferenciación de DSC también se detectó un cambio en la expresión de marcadores fenotípicos, ya que disminuyó la expresión de CD54, CD29 y BAFF, aunque no cambió la expresión de otros marcadores estudiados como CD73, CD10, CD106 y CD14. Sin embargo, al decidualizar las ESC solo se observaron cambios en la expresión de CD29.

La decidualización de DSC y ESC indujo apoptosis en las propias DSC y ESC, aunque la muerte celular fue mayor en las DSC. Paradójicamente, las DSC fueron resistentes a diferentes inductores de apoptosis.

Mediante western-blot, se analizaron los niveles de factores pro- y anti-apoptóticos durante la decidualización. En las células DSC decidualizadas se observó una disminución de las proteínas pro-apoptóticas Bcl_x_L, cFLIP y XIAP, así como en las proteínas pro-apoptóticas Bax, Bid y Apaf-1. Además encontramos un aumento de Bim, una proteína pro-apoptótica. Estos resultados fueron confirmados por PCR-array.

Por otro lado, analizamos el efecto que tenían los sobrenadantes procedentes de DSC decidualizadas sobre células DSC indiferenciadas, y sobre otros tipos

celulares relacionados como ESC y FDC, encontrando que dichos sobrenadantes inducían apoptosis en todas ellas, sorprendentemente, los mismos sobrenadantes que protegieron de la apoptosis espontánea a los linfocitos deciduales.

En resumen, nuestros resultados demostraron que DSC y ESC tienen un fenotipo antigénico similar y capacidad para proteger a los linfocitos de la apoptosis espontánea. Además, encontramos que el tratamiento con progesterona y cAMP induce decidualización, junto con apoptosis, en DSC y ESC. Sin embargo, las ESC parecen menos sensibles a la decidualización que las DSC, como demostró la menor secreción de prolactina y de IL-15, al igual que la menor inducción de apoptosis observada en ESC; además, se encontraron menos cambios en el fenotipo antigénico de las ESC al decidualizar. Finalmente, demostramos que la decidualización en DSC produce un desequilibrio en los niveles de proteínas pro- y anti-apoptóticas.

Nuestros resultados sugieren que DSC y ESC liberan al sobrenadante factores solubles que son responsables del efecto protector de la supervivencia de linfocitos y que la decidualización promueve la producción de factores solubles con capacidad de inducir apoptosis en DSC.

Abreviaturas

- APC: Célula presentadora de antígeno (antigen presenting cell)
- cAMP: Adenosín Monofosfato-3',5'cíclico (3'-5'cyclic Adenosine Monophosphate)
- CRH: Hormona Liberadora de Corticotropina (Corticotropin Releasing Hormone)
- dNK: NK deciduales (decidual Natural Killer)
- DSC: Células Deciduales Estromales (Decidual Stromal cells)
- E: Estradiol
- ESC: Células Endometriales Estromales (Endometrial Stromal Cells)
- FDC: Células Foliculares Dendríticas (Follicular Dendritic Cells)
- hCG: Gonadotropina coriónica humana (human Chorionic Gonadotrophin)
- IDO: Indolamina 2,3-dioxigenasa
- IFN: Interferón
- IL: Interleuquina
- LH: Hormona Luteinizante (Luteinizing Hormone)
- LIF: Factor inhibidor de la leucemia (Leukaemia Inhibitor Factor)
- OPG: Osteoprotegerina
- P4: Progesterona
- PBL: Linfocitos Periféricos (Peripheral Blood Lymphocytes)
- PG: Prostaglandina
- PR: Receptor de Progesterona (Progesterone Receptor)
- PRL: Prolactina
- RLX: Relaxina
- SD: Desviación estándar (Standard Deviation)
- TGF: Factor de Crecimiento Transformante (Transforming Growth Factor)
- TNF: Factor de Necrosis Tumoral (Tumor Necrosis Factor)

INTRODUCCIÓN

1. ENDOMETRIO

El endometrio humano está dividido en dos capas, *la capa funcional* que comprende de 2 a 3 partes del endometrio y *la capa basal* que permanece durante la menstruación y es la responsable de producir una nueva capa funcional en el siguiente ciclo menstrual. La proliferación celular y diferenciación que se produce en la capa funcional, está regulada por cambios secuenciales en las hormonas ováricas, mientras la basal es relativamente insensible a los cambios hormonales (Figura 1). El endometrio está formado por células epiteliales, glandulares, lumbinales, fibroblastos estromales, células endometriales estromales (ESC), células del músculo liso y células endoteliales; además contiene varias poblaciones de células inmunitarias, entre las cuales podemos encontrar células NK, macrófagos, células T, células B y neutrófilos.

En el ciclo menstrual se pueden diferenciar dos fases. En la *fase proliferativa* se elevan progresivamente los niveles de estradiol (E), los cuales inducen un aumento en la expresión de los receptores de progesterona (PR) y de estrógenos en el epitelio y en el estroma. En esta fase se produce un rápido crecimiento y una extensa proliferación de las células glandulares, epiteliales y de ESC. Sin embargo, en la *fase secretoria*, que comienza después de la ovulación, caen los niveles de estrógenos, la proliferación cesa gradualmente y la capa funcional que se ha ido formando comienza a diferenciarse bajo la influencia de la progesterona (P4), preparando el endometrio para la implantación del blastocisto (Figura 1). Si el embarazo no tiene lugar, se produce una caída de los niveles hormonales y se desprende la capa funcional del endometrio durante la menstruación.

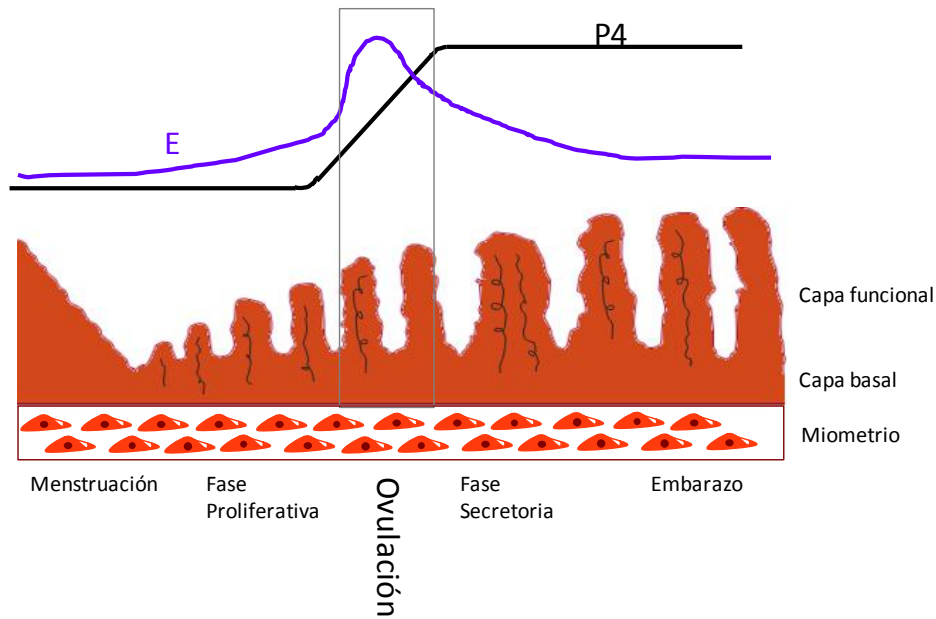


Figura 1. Ciclo menstrual humano. La figura representa el crecimiento, diferenciación y desprendimiento de la capa funcional del endometrio, regulado por hormonas esteroideas, en mujeres no gestantes y la continuación de la diferenciación del endometrio en el embarazo. La capa basal no sufre cambios, siendo relativamente insensible a cambios hormonales. El ciclo menstrual está dividido dos fases, la fase proliferativa donde se van elevando los niveles de E y la fase secretoria con un predominio de P4.

2. DECIDUA

LA DECIDUA puede ser considerada como un tejido constituido a partir de células procedentes del endometrio, siendo el componente materno de la interfase materno-fetal. Está compuesto fundamentalmente por células deciduales estromales (DSC), que representan el 50% del total de células en la decidua, así como por células glandulares, epiteliales y leucocitos. Una variedad de funciones han sido atribuidas a la decidua, como la de proporcionar una fuente de factores de crecimiento y citoquinas que apoyarían el desarrollo del embrión, controlar la proliferación, diferenciación e invasión del trofoblasto, además de tener un papel inmunorregulador durante el embarazo (Ramathal et al. 2010).

2.1. Implantación y formación de la interfase materno-fetal

La implantación se produce cinco o seis días después de la fertilización, cuando tiene lugar la fijación del blastocisto en el endometrio materno. En respuesta a la fijación del blastocisto y a la presencia de P4, las células del endometrio materno aumentan de tamaño y se incrementa el número de arterias espirales. A los cambios celulares y a la vascularización del endometrio se le llama reacción decidual. Pocos días después de la implantación, el endometrio es transformado en **decidua**. En el primer estadio del embarazo, se pueden identificar tres compartimentos: decidua basal, decidua capsular y decidua parietal. La *decidua basal* es la parte materna de la placenta que contacta directamente con el trofoblasto invasivo, la *decidua capsular* contacta con el corion y la *decidua parietal* es la que se encuentra entre el miometrio y la luz de la cavidad uterina. A medida que avanza la gestación, el embrión va creciendo y la decidua capsular se mezcla con la decidua parietal, así en el embarazo a término solo pueden ser identificadas la decidua basal y parietal. Todos los tejidos deciduales son de origen materno, mientras que las células extraembrionarias dan lugar a la parte fetal de la placenta y a las membranas fetales amnios y corion.

El **trofoblasto**, es el tejido primario fetal en íntimo contacto con el sistema inmunológico materno. Las capas del trofoblasto que contactan con tejido materno son: el *sincitiotrofoblasto*, con la sangre materna en el espacio intervelloso, el *trofoblasto extravelloso*, que migra dentro de la decidua y el *trofoblasto endovascular* que invade la decidua materna y reemplaza el endotelio de las arterias espirales. El *trofoblasto intravellositario*, sin embargo, no contacta con los tejidos maternos (Makrigiannakis et al. 2008).

2.2. Regulación inmunológica de la interfase materno-fetal

El feto puede ser considerado como un injerto semialogénico, ya que expresa antígenos paternos que pueden ser reconocidos como extraños por el sistema

inmunológico materno. En el embarazo, células semialogénicas del trofoblasto invaden la decidua materna, pero permanecen a salvo del ataque del sistema inmunológico materno, lo que sigue siendo una paradoja sin resolver en el área de la Inmunología. Muchos mecanismos han sido propuestos para explicar la tolerancia inmunológica y la aceptación del embrión durante el embarazo temprano. El trofoblasto fetal juega un papel esencial para evitar un ataque inmunológico materno, mostrando un perfil alterado en la expresión de HLA y expresión de proteínas inhibitorias como la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y Fas ligando (FasL). Además, en la decidua se encuentran linfocitos maternos con capacidad de generar una respuesta aloinmunológica que coexisten con otras subclases de linfocitos que regulan dicha respuesta.

2.3 Evasión inmunológica del trofoblasto

Expresión de moléculas HLA. Para evitar el ataque del sistema inmunológico materno, el trofoblasto fetal no expresa las moléculas HLA-A, HLA-B, HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP, que son las principales dianas para las células T aloreactivas en trasplantes. Sin embargo, subclases de trofoblasto, como el trofoblasto extraveloso y membranas fetales, expresan HLA-C y moléculas no clásicas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I, como HLA-E, HLA-F y HLA-G. HLA-C y HLA-E, pueden evitar la citotoxicidad de células NK uniéndose a sus receptores inhibidores (Tilburgs et al. 2010), aunque HLA-C también puede inducir repuestas alogénicas en linfocitos T maternos (Moffett-King 2002). La función de HLA-F no es todavía conocida. Con respecto a HLA-G, se conoce que tiene un bajo polimorfismo, contando con 7 isoformas, y presenta importantes funciones inmunomoduladoras, como la capacidad de inhibir la citotoxicidad de células T y NK (Hunt et al. 2005, LeMaoult et al. 2004, Tilburgs et al. 2010).

Además de la expresión de moléculas HLA, el trofoblasto también contiene otros factores, que pueden jugar un importante papel en la evasión inmunitaria. Describiremos en el próximo párrafo los más relevantes, aunque muchos

estudios funcionales han sido realizados en el modelo de ratón y su importancia en humano no ha sido totalmente esclarecida.

Miembros de la familia B7. Moléculas como CD80 (B7-1)/CD86 (B7-2) se unen a las moléculas CD28 y proporcionan señales coestimuladoras, las cuales, en combinación con TCR-MHC, activan a las células T. Recientemente, se han identificado nuevos subtipos de moléculas B7 que se expresan en el trofoblasto veloso (B7-H1, B7-H2, B7-H3) y células del sincitiotrofoblasto (B7-H1, B7-DC). B7-H2 estimula la respuesta Th2, uniéndose al coestimulador inducible de células T (ICOS; inducible costimulator of T cells), el cual aumenta la producción de interleuquina (IL)-10. B7-H1 y B7-DC son críticas para la inducción de la tolerancia, ya que se ha demostrado que se unen a PD (programmed death)-1, un miembro de la familia CD28 expresado por linfocitos T activados. Se ha observado que ratones que no expresan PD-1 desarrollan enfermedades autoinmunes (Petroff et al. 2005, Petroff and Perchellet 2010). Además, en el modelo de ratón con aborto de repetición, la ausencia de señal B7-H1 mejora la viabilidad de los fetos singénicos pero pierden los alogénicos. Por tanto, parece que las moléculas B7 son críticamente importantes en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica materno-fetal (Guleria et al. 2005, Petroff and Perchellet 2010).

IDO. Es una enzima que cataboliza el triptófano, inhibiendo así la proliferación de los linfocitos T por depleción del triptófano o por producción de metabolitos tóxicos (Mellor and Munn 2004). IDO es expresada por células del trofoblasto, pero también por células presentadoras de antígeno (APC) cuando son estimuladas con interferon (IFN)- γ . La inhibición química de IDO determina el fracaso de la gestación en ratones alogénicos; sin embargo, la eliminación genética de IDO no evita el embarazo alogénico (Baban et al. 2004, Munn et al. 1998).

FasL. También llamado APO-1 o CD95L, es una molécula pro-apoptótica que puede inducir apoptosis en células que expresen Fas, como los linfocitos T

activados CD4⁺ y CD8⁺, linfocitos B, monocitos y macrófagos. FasL es expresado también por linfocitos activados, así como en células del trofoblasto, células deciduales y gránulos intracelulares de células T y NK. Aunque la principal función de la interacción Fas-FasL es la inducción de apoptosis, su papel en el embarazo aún no está claro. A pesar de que el trofoblasto expresa Fas y FasL, es resistente a la muerte celular mediada por la interacción de ambas moléculas (Makrigiannakis et al. 2008). Ratonas preñadas con pérdida de FasL se caracterizan por una extensa infiltración de linfocitos y necrosis en la interfase materno fetal (Hunt et al. 1997, Makrigiannakis et al. 2008). Por otra parte, se ha observado que las células deciduales humanas que expresan FasL pueden limitar la infiltración de leucocitos maternos que expresen Fas a través de la inducción de apoptosis por este sistema Fas/FasL (Qiu et al. 2005).

2.4. Leucocitos maternos en la interfase materno-fetal

La decidua alberga varias poblaciones de células inmunitarias, incluyendo células NK, macrófagos, células T, neutrófilos y una población casi inexistente de células B. Siendo los linfocitos NK los más abundantes, estas células poseen la capacidad de regular el crecimiento de la placenta, la invasión del trofoblasto y el remodelado vascular.

Células NK deciduales (dNK). Las células NK uterinas aumentan su número después de la ovulación, volviéndose la clase mayoritaria de linfocitos en el endometrio. Si el embarazo tiene lugar, las células NK continúan acumulándose hasta alcanzar el 70% de la población linfocitaria, al final del primer trimestre de gestación. A partir de este periodo, su número va disminuyendo, aunque se encuentran presentes en el embarazo hasta que se produce el parto, en una proporción del 3% (Abadia-Molina et al. 1996, Sindram-Trujillo et al. 2003).

Las células dNK, pueden ser consideradas como una subclase de linfocitos diferentes a las dos clases de linfocitos NK existentes en sangre periférica (pNK), aunque comparte características con cada una de ellas. Al igual que las pNK

CD56^{dim} CD16⁺, las dNK tienen gránulos citolíticos, (Cooper et al. 2001) y expresan receptores tipo KIR. Sin embargo, dNK no presentan CD16 y expresan intensamente CD56, CD94/NKG2A, y receptores activadores, como NKp30, NKp44, NKp46 y NKG2D, aunque tienen una actividad citotóxica reducida y producen un elevado número de moléculas inmunorreguladoras (Keskin et al. 2007), recordando en este sentido a las pNK CD56^{bright} CD16⁻. Cabe destacar la producción de factores angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento placentario (PLGF), por parte de células dNK, no siendo producidos por las células periféricas. Dichos factores inducen migración y la formación de una red de células endoteliales (Hanna et al. 2006).

En el embarazo normal, dNK expresan como citoquinas predominantes el factor de crecimiento transformante (TGF)- β e IL-10, lo que puede sugerir un papel en la inducción de tolerancia. Sin embargo, en el aborto espontáneo, dNK aumenta la producción de IFN- γ , lo que contribuye a la muerte del trofoblasto extravellositario (Gomez-Lopez et al. 2010). Otras funciones posibles de linfocitos dNK son el control de la invasión del trofoblasto, ya que se ha visto que los linfocitos dNK pueden producir apoptosis sobre estas células controlando la invasión excesiva de este tejido (Olivares et al. 2002); el remodelado vascular uterino, en el cual parece tener una gran importancia el IFN- γ producido por las células dNK (Murphy et al. 2009); y la actividad antiviral. Por todo ello, se ha propuesto que las células dNK pueden ser la clave que regule el equilibrio en la interfase materno-fetal.

El origen de dNK es aún controvertido. Diversos autores han propuesto, dado su fenotipo CD16⁻ CD56^{bright}, que puedan provenir de pNK CD16⁻ CD56^{bright}. Estas células migrarían al útero desde la sangre periférica, adquiriendo características específicas de dNK, debido al microambiente decidual en el que se encontrarían: presencia de citoquinas y hormonas específicas de este tejido, y el contacto con células de la decidua (Moffett-King 2002). Sin embargo, las células CD16⁻ CD56^{bright} son minoritarias en sangre periférica (5% de todas las pNK). El grupo de Strominger observó que TGF- β promovía la conversión de linfocitos

pNK CD16⁺ CD9⁻, que son los mayoritarios en sangre periférica, a células CD16⁻ CD9⁺, marcadores característicos de dNK. Por otro lado, demostraron que la decidua contiene una población de células CD34⁺, CD45⁺ con un fenotipo de células progenitoras hematopoyéticas (HPC) (Keskin et al. 2007). Recientemente se ha sugerido que dNK pueden derivar directamente de precursores CD34⁺ presentes en la decidua, bajo interacciones con componentes del microambiente decidual (Vacca et al. 2011). Las diferentes hipótesis que han sido propuestas sobre el origen de células dNK no son excluyentes, pudiendo originarse de precursores celulares que residen en el tejido uterino y de la diferenciación de pNK que migran a la decidua procedentes de la sangre periférica.

Macrófagos deciduales. Son la clase más abundante de APC en la interfase materno-fetal, constituyendo alrededor del 15% de los linfocitos deciduales. Están presentes a lo largo del embarazo, aumentando significativamente su número en el parto. Los macrófagos deciduales son CD14⁺, CD68⁺ y tienen una alta expresión de marcadores activadores, HLA-DR y CD86, aunque la expresión de CD80 es reducida. Tienen múltiples funciones, muchas de ellas relacionadas con la producción de IL-1, IL-6 y CXCL8 (Gomez-Lopez et al. 2010).

Células dendríticas (DC). Son células presentadoras de antígeno, con capacidad de iniciar una activación específica o tolerancia inmunológica. Las células dendríticas DC-SIGN⁺ tienen un bajo potencial para activar a las células T y se han identificado en la decidua de embarazo temprano (Gardner and Moffett 2003, Kammerer et al. 2003), mientras que las DC CD83⁺ presentan gran potencial para estimular a los linfocitos T, pero su cantidad en decidua es muy baja en los primeros estadios del embarazo (Kammerer et al. 2000, Miyazaki et al. 2003). Con frecuencia, se ha sugerido que estas células podrían tener un papel regulador en la tolerancia del embarazo, pero estos estudios son difíciles de realizar dado el bajo número de células y las similitudes fenotípicas con los macrófagos deciduales (Tirado-Gonzalez et al. 2010).

Células T deciduales. Comprende una subclase de células, diferentes a las células T periféricas, constituyendo el 10% de linfocitos deciduales en el embarazo temprano. La composición de linfocitos es altamente variable entre individuos, aunque el porcentaje de células T se incrementa conforme progresa el embarazo, llegando a constituir entre un 40 y un 90% de los linfocitos en el embarazo a término (Abadia-Molina et al. 1996). Los linfocitos T deciduales TCR $\alpha\beta$ son CD4⁺ y CD8⁺, siendo los más abundantes estos últimos. Las células más estudiadas son las T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ (Treg). Además, hay poblaciones de células TCR $\alpha\beta$ CD4⁻CD8⁻, TCR $\gamma\delta$ ⁺, y NKT.

Las Treg aumentan su concentración en sangre periférica y en decidua durante el embarazo (Hori and Sakaguchi 2004). Se ha demostrado que las células Treg son reclutadas a la decidua desde la periferia (Tilburgs et al. 2008) a consecuencia de un mecanismo que probablemente implica estrógenos y citoquinas producidas por el trofoblasto (Makrigiannakis et al. 2008). Las células Treg son importantes para el mantenimiento de la tolerancia materno-fetal. Se ha observado que bajos niveles de Treg en mujeres están asociados con abortos recurrentes (Sasaki et al. 2004). En ratón, la deficiencia de Treg conlleva a fallos en la gestación de fetos alogénicos, pero no de singénicos (Aluvihare et al. 2004).

Las células NKT son un 0,48% de las células deciduales CD3⁺, proporción 10 veces mayor que lo encontrado en sangre periférica. Las NKT son una subclase inusual de células T que expresan marcadores de células NK y T, siendo capaces de producir citoquinas Th1 y Th2. Reconocen glicopéptidos presentados por CD1d (MHC class I-like molecule), molécula que es expresada por el trofoblasto (Boyson et al. 2002). La activación de NKT pueden jugar un papel inmunorregulador en la interfase materno-fetal, regulando los linfocitos dNK, aunque también podría mediar la respuesta inflamatoria en determinadas condiciones (Boyson et al. 2008).

2.5. El paradigma Th1/Th2

El embarazo es una condición natural única, en la cual en la madre se produce tolerancia a un tejido genéticamente distinto como es el feto. Alteraciones en el delicado balance inmunológico en la interfase materno-fetal tienen como resultado la pérdida del embrión o complicaciones gestacionales. Varias citoquinas, que pueden ser producidas por células inmunitarias maternas, se han relacionado con el equilibrio inmunológico. Los linfocitos T deciduales producen tanto citoquinas Th1 como Th2 (Wegmann et al. 1993). Las citoquinas de tipo Th1: IFN- γ , TNF e IL-2, favorecen el aborto, por impedir la invasión del trofoblasto en la decidua materna. TNF aumenta la apoptosis en células del trofoblasto, IFN- γ incrementa la muerte mediada por el TNF y activa la respuesta inmunitaria innata y adaptativa (Hill et al. 1995, Murphy et al. 2009, Yui et al. 1994). La IL-2 inhibe la decidualización e incrementa la contractilidad de células DSC (Kimatrai et al. 2003). A su vez, IL-2 e IFN- γ activan a dNK, lo que puede inducir daños en el trofoblasto. Sin embargo, las citoquinas Th2: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, estimulan el desarrollo e invasión del trofoblasto. Entre estas citoquinas, hay que destacar el papel de IL-10, que ha sido extensamente estudiada. Se ha observado que esta citoquina es decisiva para el éxito del embarazo, ya que la disminución de IL-10 está asociada a patologías gestacionales. Como posibles funciones de la IL-10, se encuentra la inhibición de la síntesis de citoquinas Th1, supresión de la actividad de células NK y regulación de la expresión de antígenos por el trofoblasto como HLA-G, en detrimento de otras MHC de clase I y II (Vigano et al. 2002). Se ha visto que tanto en decidua como en sangre periférica de mujeres embarazadas existe un predominio de citoquinas Th2 (Piccinni et al. 2000, Saito et al. 1999, Wilczynski 2005).

Las citoquinas Th1/Th2 también afectan al sistema Fas/FasL, ya que se ha observado que las citoquinas Th1 (IFN- γ y TNF- α) promueven la expresión y sensibilidad a Fas en el trofoblasto, que como hemos mencionado anteriormente expresa Fas y FasL; mientras que las citoquinas Th2 (IL-6 e IL-10) incrementan la resistencia del trofoblasto a la apoptosis mediada por Fas, por

inducir cFLIP (FLICE-like inhibitory protein), una proteína anti-apoptótica que inhibe la activación de la caspasa-8 (Makrigiannakis et al. 2008).

El balance Th1/Th2, por tanto, es crítico en el embarazo, ya que un desplazamiento hacia Th1 genera una respuesta inmunitaria que desemboca en aborto, mientras que la prevalencia de un ambiente Th2 supone la supervivencia del feto y la progresión del embarazo (Piccinni et al. 2001).

La P4, hormona predominante en el embarazo, contribuye a la inmunosupresión de la inmunidad celular que acompaña al embarazo, favoreciendo un estado Th2 (Piccinni et al. 2000, Saito 2000), ya que suprime la activación y citotoxicidad de linfocitos T (Kyurkchiev et al. 2010, Szekeres-Bartho et al. 1989). La P4 promueve la producción de IL-4 y IL-5. A su vez, IL-4 y P4 regulan positivamente la producción de LIF (leukaemia inhibitor factor), esencial en el desarrollo embrionario (Piccinni et al. 2001). Algunas de las propiedades inmunomoduladoras de la P4 son mediadas por la inducción de una proteína específica llamada PIBF (progesterone-induced blocking factor), la cual ha sido estudiada en detalle por Polgar y Szekeres-Bartho (Polgar et al. 2003, Szekeres-Bartho et al. 2001), demostrando que PIBF es el principal responsable del cambio de la respuesta Th1 hacia Th2 y de la supresión de la actividad citotóxica de NK, fenómenos necesarios para el progreso del embarazo. Las células DSC expresan constitutivamente PIBF intracelular. Se ha observado que en presencia de P4 hay una disminución de su expresión, probablemente debido a su secreción, que induciría una respuesta Th2 (Kyurkchiev et al. 2010). Este podría ser un mecanismo de control paracrino en la interfase materno-fetal, en el que las DSC contribuirían al mantenimiento de la tolerancia inmunológica durante el embarazo.

A pesar de la importancia del predominio de citoquinas Th2 sobre Th1, las citoquinas inflamatorias son también esenciales en el desarrollo del embarazo. Cabe destacar el papel que desempeña el IFN- γ en el establecimiento y mantenimiento de la interfase materno-fetal en roedores, ya que se ha

demostrado que es el responsable de iniciar el remodelado vascular endometrial y de promover la angiogénesis. También desempeña un amplio papel en la activación de la inmunidad innata y adaptativa en respuesta a virus y tumores. Por otro lado, se ha observado que IFN- γ aumenta la transcripción de genes involucrados en la regulación del ciclo celular, apoptosis y procesamiento y presentación de antígenos. A pesar de todo, complicaciones gestacionales que pueden terminar con pérdida del embrión están asociadas con elevaciones intensas de IFN- γ (Murphy et al. 2009).

3. CÉLULAS ENDOMETRIALES ESTROMALES

3.1. Células endometriales estromales como células troncales

El endometrio humano está sometido a procesos cíclicos de regeneración, proliferación, diferenciación y desprendimiento, en el transcurso del ciclo menstrual. Al final de cada ciclo, el estroma de la capa funcional se regenera a partir de la capa basal que perdura después de la menstruación. La elevada capacidad de regeneración del endometrio, ha sugerido que pueda residir en éste una población de células troncales o progenitoras. Puesto que no hay evidencias suficientes para distinguir si la población de células encontradas correspondería a células troncales o progenitoras, en nuestro estudio designaremos a todas ellas como troncales.

Diversos grupos de investigación, han estudiado la capacidad que tienen las ESC de ser consideradas como células troncales. Sin embargo, la detección de este tipo de células en diversos tejidos plantea dificultades, debido a que son una población minoritaria dentro ellos, y no existen todavía marcadores concretos para su identificación y caracterización.

Entre los marcadores que pueden ser usados para identificar las células troncales, con frecuencia se ha usado el marcaje fluorescente Hoechst 33342. La subpoblación celular que expulsa el fluorocromo después del marcaje es

denominada SP (side-population) (Goodell et al. 1996). Al igual que en otros tejidos, se han detectado estas poblaciones en el endometrio humano en las diferentes fases del ciclo menstrual (Kato et al. 2007).

En cuanto al fenotipo antigénico que presentan las ESC, se han aislado células endometriales de la capa basal del endometrio que expresan los típicos marcadores de MSC procedentes de médula ósea y tejido adiposo como CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, siendo negativas para marcadores hematopoyéticos (CD45, CD34, CD14, CD3, CD13, CD19, CD16/56 y HLA-DR) (Dimitrov et al. 2008, Schwab and Gargett 2007). Otra fuente de obtención de estas células ha sido la sangre menstrual, la cual solo tiene componentes de la capa funcional del endometrio. Estas células fueron cultivadas y tuvieron un fenotipo similar al anteriormente descrito (Meng et al. 2007).

Para que una célula pueda ser definida como célula troncal debe cumplir tres propiedades fundamentales: capacidad de renovarse y reemplazarse a ellas mismas, capacidad para diferenciarse a uno o más linajes o tipos de células especializadas y tener potencial de renovar y poblar tejidos (Gargett 2007). A continuación describiremos estas propiedades en ESC.

La capacidad de diferenciación a otros linajes es una de las características más importantes de una célula troncal. Tanto las ESC obtenidas de la capa basal del endometrio, como las procedentes de sangre menstrual pudieron ser diferenciadas a diferentes linajes como osteocitos, adipocitos y condrocitos, entre otros (Dimitrov et al. 2008, Meng et al. 2007, Schwab and Gargett 2007), por lo que parece posible que existan células troncales tanto en la capa basal, como en la capa funcional del endometrio.

Con respecto a la clonogenicidad, una característica de pluripotencialidad, se han obtenido clones de ESC, indicando que una sola célula puede formar colonias y promover un número consecutivo de clones y demostrando así las propiedades auto-renovadoras que son fundamentales para la identificación de

estas células como troncales. El fenotipo antigénico de superficie de estas células clonadas se corresponde con el fenotipo característico en ESC, al igual que su capacidad de diferenciación a otros linajes (Chan et al. 2004, Dimitrov et al. 2008, Gargett et al. 2009).

Estos resultados demostraron que el endometrio humano contiene ESC con características de células troncales, las cuales parecen estar relacionadas con la familia de MSC.

El origen de ESC continua siendo controvertido, a pesar de los numerosos estudios citológicos y morfológicos que se han realizado. Algunos estudios indican que el endometrio contiene dos tipos de células, unas derivadas de médula ósea, y otras células estromales que residirían en el endometrio. Las glándulas endometriales derivarían de células infiltradas procedentes de la médula ósea, mientras que las células endometriales estromales surgirían a partir de células estromales residentes en el endometrio (Bell 1990). Sin embargo, otros autores han encontrado evidencias en el endometrio de ratón de que ambos tipos celulares procederían de células derivadas de médula ósea (Gambel et al. 1985).

4. CELULAS DECIDUALES ESTROMALES

Las DSC constituyen un tipo particular de células que aparecen en el endometrio uterino durante el embarazo, después de la implantación del blastocisto, aunque su función, linaje celular y origen no son del todo conocidos. Parece que proceden de la proliferación y diferenciación de un precursor estromal, preDSC, localizado en el endometrio no gestante y relacionado con las ESC.

4.1. Células deciduales estromales como células troncales

Dado que las DSC están relacionadas con las ESC, se ha estudiado también la capacidad de estas células de ser consideradas células troncales. La expresión

en las DSC de STRO-1, un antígeno que identifica a MSC de médula ósea (Simmons and Torok-Storb 1991), y el hecho de que DSC expresen marcadores del linaje mesenquimal (CD29, CD73, CD90, CD105, CD10, CD13) y sean negativos para marcadores del linaje hematopoyético (CD45, CD19, CD56/16 y CD3) relaciona estos dos tipos de células. (Garcia-Pacheco et al. 2001, Kyurkchiev et al. 2010).

Además, se ha detectado que las DSC obtenidas a partir de la decidua de primer trimestre de embarazo forman colonias. Estas células tenían una morfología fibroblástica y capacidad proliferativa y han podido ser diferenciadas a adipocitos, osteocitos, condrocitos y células endoteliales. (Dimitrov et al. 2008).

Todo ello aporta evidencias de que en la decidua residen DSC que, al igual que las ESC, podrían ser consideradas como células troncales, ya que expresan los marcadores fenotípicos de este linaje, tienen potencial de diferenciación y capacidad para formar colonias, características propias de células troncales.

En cuanto el origen de estas células, algunos estudios realizados en modelo de ratón proponen que DSC aparecerían en el embarazo originadas a partir de ESC residentes en el endometrio. A su vez, el precursor de estas células se originaría de células troncales, procedentes de médula ósea (Kearns and Lala 1982). En un estudio posterior, se comprobó que estas células procedían del saco vitelino de embriones, que migrarían desde su origen (saco vitelino y/o médula ósea) hasta el útero en algún momento entre la etapa embrionaria y el comienzo de la vida reproductiva, y a partir de este periodo se auto-replicarían a nivel local (Lysiak and Lala 1992). No obstante, este tipo de estudios han sido realizados hasta el momento únicamente en roedores.

4.2. La célula decidual estromal como una forma de miofibroblasto

La morfología que presentan las DSC es similar a la de los miofibroblastos, una forma especializada de fibroblasto con actividad contráctil que participa en la

retracción de las cicatrices. De forma semejante a DSC, el miofibroblasto también presenta funciones inmunológicas. La detección a nivel de mRNA y de proteína de α -SM-actina (un marcador de miofibroblasto) en DSC, confirma la relación entre estos dos tipos de células. Otros filamentos intermedios como son la vimentina y la desmina también son expresados en miofibroblastos y DSC (Oliver et al. 1999). Los miofibroblastos están relacionados con distintos tipos celulares, cada uno de ellos con una localización tisular y función diferente: pericitos, células estrelladas del hígado, osteoblastos y probablemente también las DSC. La actividad contráctil (propia de los miofibroblastos) de las DSC, demostrada por nuestro grupo, nos confirmó que estas células no solo tienen una morfología y fenotipo antigénico semejante a los miofibroblastos, sino que tienen la capacidad de contraerse como ellos. El hecho de que esta actividad contráctil fuera estimulada por IL-2 (citoquina Th1 que se incrementa en el aborto espontáneo), nos hizo proponer que las DSC, mediante su actividad contráctil, podrían contribuir a la expulsión del trofoblasto durante el aborto (Kimatrai et al. 2003). Por otra parte, hemos observado que la IL-10, una citoquina asociada al embarazo normal, relaja las DSC, lo que probablemente favorece el desarrollo fisiológico del embarazo (Kimatrai et al. 2005).

4.3. Relación de las células deciduales estromales y las células foliculares dendríticas

Las células foliculares dendríticas (FDC) se localizan en los folículos de los órganos linfoides secundarios, dentro de los centros germinales. Estas células retienen durante meses antígenos en su forma nativa, formando inmunocomplejos unidos a receptores de membrana y se los presentan a las células B durante la respuesta secundaria. Las FDC rescatan de la apoptosis a las células B e inducen la diferenciación de células B memoria y células productoras de anticuerpos (Park et al. 2004).

La relación entre DSC y FDC es estrecha, ya que las DSC expresan antígenos específicos de FDC (DCR-1, CNA.42, HJ2) y carecen como las FDC de CD45

(Montes et al. 1996, Muñoz-Fernandez et al. 2006). Ambos tipos celulares muestran una morfología fibroblástica y capacidad proliferativa. Las FDC expresan STRO-1, por tanto, al igual que las DSC están relacionadas con las MSC. Además, las FDC expresan α -SM-actina, por lo que presentan la capacidad de contraerse y relajarse cuando son tratadas en cultivo con diferentes citoquinas y también pueden ser consideradas, al igual que las DSC, una forma de miofibroblasto derivada de las MSC (Muñoz-Fernandez et al. 2006).

Por último, experimentos realizados en nuestro grupo de investigación, han demostrado que ambos tipos de células comparten un fenotipo antigénico similar, resultando positivas para CD29, CD73 y CD10, y expresando una proporción de ellas CD14, CD21, CD23, CD54 y BAFF. Además, ambas son capaces de rescatar de la apoptosis espontánea a linfocitos B. Se ha observado que FDC al igual que DSC, en presencia de P4 y cAMP son capaces de secretar prolactina (PRL) (marcador de decidualización) aunque, naturalmente, la cantidad producida por FDC es mucho menor que por DSC (Muñoz-Fernandez et al., sometido).

4.4. Las células deciduales estromales como células fagocíticas

La actividad fagocítica en la decidua es debida fundamentalmente a la presencia de macrófagos. Las DSC, además, son capaces de fagocitar partículas y podrían internalizar los antígenos para posteriormente mostrarlos en superficie (Ruiz et al. 1997). La IL-1, citoquina pro-inflamatoria, activa la fagocitosis de las DSC, mientras que la P4 la reduce. Existen resultados que sugieren la existencia de una red inmunológica-endocrina que involucra a las DSC, y según la cual, la IL-1 y el TNF- α aumentarían las funciones inmunológicas de las mismas para la defensa contra una posible infección ó incluso la eliminación del trofoblasto en situaciones patológicas, mientras que la P4 favorecería el crecimiento fetal y el estado gestacional por inhibición de las funciones mencionadas (Ruiz et al. 1997).

4.5. Las células deciduales estromales como presentadoras de antígeno

Las DSC humanas expresan CD80, CD86 y HLA de clase II, tres moléculas expresadas por APC, sugiriendo que DSC pueden desempeñar esta función. Además, su capacidad de estimular células T alogénicas (Olivares et al. 1997) y la actividad fagocítica demostrada (Ruiz et al. 1997) favorecería esta posibilidad. Por otro lado, se ha demostrado que las células deciduales APC son capaces de estimular eficientemente la proliferación de linfocitos T, estímulo que es inhibido si tratamos con un anticuerpo anti-HLA de clase II (Oksenberg et al. 1986). Además, estudios realizados en ratón han demostrado que las células estromales uterinas son capaces de procesar antígenos administrados por vía intravenosa y presentarlos de forma que es reconocible para los linfocitos T *in vivo*, habilidad que se reduce cuando se administra TGF- β o E (Wira and Rossoll 2003), por lo que parece posible que las DSC en ratón y humano también tengan esta propiedad.

5. DECIDUALIZACIÓN

El inicio del embarazo simboliza el éxito de dos procesos independientes: el desarrollo del embrión y la decidualización del endometrio, transformándose en decidua. Este último proceso está estrechamente regulado por hormonas esteroideas, E y P4.

La decidualización comienza en las ESC que rodean las arterias espirales, en la capa funcional del endometrio. Se produce en la fase secretoria, alrededor del día 23 del ciclo menstrual, coincidiendo con la ventana de implantación, periodo en el cual el endometrio es receptivo a la implantación del blastocisto. En esta fase tiene lugar una extensa remodelación de la capa funcional del endometrio, en respuesta a las elevadas concentraciones de P4, lo que implica un cambio en la secreción de las glándulas del endometrio, seguido de la diferenciación de las ESC.

Si el embarazo tiene lugar, la decidua es sometida por un lado a la regulación de hormonas esteroideas que continúan estando elevadas, y por otro a factores producidos por el blastocisto, como la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG). Todo ello proporciona el ambiente hormonal necesario para completar la decidualización, que es esencial para el éxito del embarazo.

5.1. Decidualización en células deciduales y endometriales estromales

La decidualización es esencial para la implantación del blastocisto y participa en el control de la invasión del trofoblasto y formación de la placenta. La decidualización de ESC y DSC implica cambios morfológicos, fenotípicos y secretorios, adquiriendo diversas funciones. Puesto que ESC y DSC parecen ser la misma célula en distinta situación funcional, sospechamos que los procesos de decidualización, uno de los objetivos de estudio de esta tesis doctoral, van a ser semejantes en ambos tipos celulares.

En ausencia de P4, tanto DSC como ESC cultivadas *in vitro* presentan un aspecto alargado similar a los fibroblastos. Durante la decidualización, estas células aumentan de tamaño, cambiando su forma a una morfología poligonal, se produce una expansión del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, y se acumulan en el citoplasma gotas de glucógeno y lípidos, por lo que clásicamente se les ha atribuido una *función nutricional* (Gellersen and Brosens 2003).

Ambos tipos de células decidualizadas, adquieren una *función secretoria*, ya que comienzan a secretar factores, como PRL y proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGFBP-1). Estas dos proteínas han sido usadas como marcadores fenotípicos de células decidualizadas (Gellersen and Brosens 2003). Además, estas células decidualizadas tienen una *función inmunológica*, puesto que producen una variedad de citoquinas, como por ejemplo IL-11 e IL-15, que proporcionan señales quimiotácticas, proliferativas y de diferenciación en las células inmunitarias especializadas (Dimitriadis et al. 2005b). También producen factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico

(EGF), EGF de unión a la heparina (HB-EGF), activina A y neuropéptidos como somatostatina y grelina, los cuales podrían servir para amplificar y propagar los procesos deciduales de manera autocrina o paracrina (Gellersen et al. 2007).

La transformación decidual de ESC, también envuelve cambios en receptores hormonales y de citoquinas, remodelado de la matriz extracelular y citoesqueleto, expresión de enzimas intracelulares e inducción de moduladores de la apoptosis (Popovici et al. 2000).

El proceso de decidualización es inducido por la P4 y un conjunto de hormonas que incrementan los niveles de cAMP, que se describirán en los siguientes apartados.

5.2. Progesterona en la decidualización

La P4, como otras hormonas esteroideas, puede desencadenar rápidos eventos citoplasmáticos que son independientes de sus acciones genómicas (Boonyaratanakornkit et al. 2001, Cato et al. 2002). No obstante, regula cientos de genes durante varias fases del ciclo menstrual.

Las acciones genómicas de la P4 están mediadas por la unión y activación del PR, un miembro de la llamada superfamilia de receptores nucleares, que son factores de transcripción dependientes de ligando. Dos isoformas de PR, denominadas PR-A y PR-B, son co-expresadas en todos los tejidos diana de P4, incluyendo el endometrio. PR-A difiere de la isoforma PR-B en la pérdida de 164 aminoácidos. (Kastner et al. 1990). PR-A es transcripcionalmente menos activa y funciona como un inhibidor dominante de la transcripción de PR-B y otros receptores esteroideos (Christian et al. 2002).

Cada isoforma puede tener distintas respuestas a la acción de la P4, aunque la función exacta de PR-A y PR-B no se conoce con exactitud. Se ha demostrado que en la decidualización se produce una disminución en la expresión de PR-B,

siendo PR-A la isoforma dominante (Gellersen and Brosens 2003). En ratones knock-out (KO) para PR-A, a diferencia de los KO para PR-B, se inhibe la diferenciación de ESC. La activación de PR-B en el útero de KO para PR-A, conlleva una inducción de la proliferación celular, por lo que parece que PR-A es importante para limitar la proliferación de las células e inducir su decidualización (Mulac-Jericevic and Conneely 2004). Sin embargo, otros autores han demostrado que la decidualización requiere una disminución de los niveles de PR (Brosens et al. 1999).

A pesar de que la P4 es un factor clave en la decidualización, y es necesaria para el mantenimiento del fenotipo decidual en los cultivos prolongados, los mecanismos por los cuales ejerce su acción en la decidualización no están todavía aclarados. Se piensa que el efecto pueda estar mediado por coactivadores y diversos factores de transcripción que requieren la activación de la vía del cAMP (Brosens and Gellersen 2006, Christian et al. 2002).

5.3. cAMP en la decidualización

Es ampliamente asumido que la P4 inicia la decidualización, sin embargo las células indiferenciadas en cultivos celulares son muy resistentes a las señales de P4 y es necesario añadir cAMP para que tenga lugar el proceso decidual. Esto puede ser debido a que las células deciduales están sometidas a elevados niveles de P4 durante la decidualización, pero además, después de la ovulación y durante el embarazo, el endometrio o decidua se encuentra bajo la influencia de una variedad de factores locales y endocrinos, tales como Prostaglandina (PG) E₂, relaxina (RLX), hormona liberadora de corticotropina (CRH) y hCG. Todas estas hormonas incrementan la producción de cAMP por parte de ESC o DSC, lo que explicaría la necesidad de añadir cAMP en los cultivos celulares para llevar a cabo la decidualización (Gellersen and Brosens 2003).

5.3.1. Mecanismo de acción de cAMP en la decidualización

El cAMP es un segundo mensajero ubicuo que se produce tras la activación de un receptor de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR). Cuando el ligando se une a este receptor, se produce la liberación de la subunidad α del complejo de proteína G formado por tres subunidades, $G\alpha\beta\gamma$. La subunidad α liberada y activa, regula la enzima adenilato ciclasa, la cual produce cAMP a partir de ATP. Una vez ciclado, el cAMP va a activar a la proteína quinasa A (PKA), dependiente de cAMP, una enzima citoplasmática que en su estado basal está compuesta por dos subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas. Tras la unión de dos moléculas de cAMP a cada una de las subunidades reguladoras, se produce un cambio conformacional y se liberan y activan las subunidades catalíticas, las cuales pueden fosforilar a sus dianas citoplasmáticas o bien difundir dentro del núcleo y modular por fosforilación la actividad de factores de transcripción.

Las principales dianas de PKA son CREB (cAMP response element binding) y CREM (cAMP response element modulator). CREB y CREM activados se unen a una región CRE (elemento de respuesta a cAMP) y reclutan al coactivador CBP (proteína de unión a CREB; CREB-binding protein). CBP tiene actividad histona acetiltransferasa, facilitando la transcripción de genes (Gellersen and Brosens 2003). El coactivador transcripcional CBP interacciona y aumenta la actividad de C/EBP β (CCAAT/enhancer-binding protein β), el cual es un importante mediador de las señales de cAMP (Gellersen and Brosens 2003). La expresión de C/EBP β aumenta durante la decidualización, indicando que es un factor crítico en este proceso; de hecho, cuando se atenúa su expresión usando un mutante dominante negativo, el proceso de decidualización es inhibido (Ramathal et al. 2010). C/EBP β interacciona con una variedad de proteínas nucleares, como la FOXO1a que controla la expresión de genes esenciales para la respuesta metabólica, la regulación del ciclo celular y apoptosis y confiere resistencia al estrés oxidativo (Gellersen and Brosens 2003).

El mecanismo por el cual el cAMP sensibiliza a la acción de la P4 es objeto de debate. Además de C/EBP β , el cAMP induce la expresión o activación de varios factores de transcripción como SP1, FOXO1, STAT (signal transducers and activators of transcription)-3 y -5. Todos ellos son capaces de interactuar directamente con PR. Por lo cual se especula que, en ESC, la isoforma PR-A podría formar complejos multiméricos transcripcionales con FOXO1a, STAT5 y C/EBP β que regularían la expresión de genes deciduales específicos (Gellersen and Brosens 2003).

5.3.2 Control de la vía de activación de cAMP

La señal de cAMP es controlada por diversos mecanismos, como a nivel de su receptor, mediante regulación de su síntesis o catabolismo, modificación de la composición de la holoenzima PKA, expresión de isoformas para CREB y CREM con una alterada actividad transcripcional y cambios en la expresión de coactivadores o correpresores (Gellersen and Brosens 2003).

A los receptores acoplados a proteína G se unen hormonas peptídicas y prostanoideas, como la hormona luteinizante (LH), hCG, CRH, RLX y PGE₂. Todas ellas, al unirse a sus receptores, aumentan el cAMP. En ESC en cultivo se han detectado receptores para hCG (Han et al. 1997) así como dos subtipos de los receptores para la PGE₂, denominados EP₂ y EP₄. También se ha observado mRNA para el receptor R1 de CRH durante el ciclo menstrual (Di Blasio et al. 1997, Milne et al. 2001), y recientemente se han encontrado dos receptores huérfanos, LGR7 y LGR8, a los que se puede unir la RLX (Hsu et al. 2002, Sudo et al. 2003).

No solo la síntesis determina los niveles intracelulares de cAMP, sino también su degradación. Fosfodiesterasas convierten cAMP en AMP, incapaz de estimular PKA (Mehats et al. 2002). Parece que el aumento de cAMP en la decidualización es debido en parte a la inhibición de fosfodiesterasas. La RLX es una de las hormonas a la que se le atribuye esta función en la decidua (Bartsch et al. 2001).

Por otro lado, se ha estudiado que CREB y CREM, dianas de PKA, pueden ser expresados en multitud de isoformas, pudiendo ser represores o activadores de la transcripción, regulando por tanto la transcripción de proteínas relacionadas con la decidualización (Gellersen and Brosens 2003).

Además, la actividad y abundancia de muchos factores de transcripción, incluyendo PR, están reguladas por diversas modificaciones postraduccionales como acetilación, ubiquitinación y otros mecanismos regulados por proteínas de la familia SUMO (Gellersen and Brosens 2003).

EL concepto de que la diferenciación del endometrio requiere, además de P4, altos niveles de cAMP está empezando a ser explotado en la práctica clínica. Por ejemplo, la gonadotropina menopáusica humana (hMG) y hCG han sido usadas para tratar a mujeres con abortos espontáneos recurrentes, aunque deben ser realizados ensayos más controlados para confirmar la eficacia de este enfoque (Li et al. 2002).

5.4. Otros factores que regulan la decidualización

Además de todos los factores comentados anteriormente que inducen decidualización, se ha visto que determinadas citoquinas juegan un papel importante ayudando a la implantación, siendo necesarias para la fertilidad (Salamonsen et al. 2000). Cabe destacar la función de la IL-11, la cual tiene acciones pleiotrópicas en diferentes tejidos. Para que se pueda llevar a cabo la implantación en ratón, la IL-11 debe estar presente. Los ratones que no expresan la cadena α del receptor de IL-11 (IL-11R) son infértiles, debido a defectos en la decidualización (Robb et al. 1998). En el endometrio humano se han observado altos niveles de IL-11 en la fase secretoria del ciclo menstrual, momento en el que comienza la decidualización de ESC, siendo bajos o ausentes en la fase proliferativa (Dimitriadis et al. 2000). Además, las células ESC decidualizadas en cultivo producen IL-11 y expresan mRNA para IL-11 e IL-11R. Así mismo, la neutralización de IL-11 reduce la producción de PRL e IGFBP-1.

Todo ello sugiere que esta citoquina promueve o induce la decidualización. (Dimitriadis et al. 2002). Además se ha demostrado que RLX, cAMP y PGE₂ están relacionadas con la IL-11, incrementando su secreción (Dimitriadis et al. 2005a).

La diferenciación del endometrio también está controlada por señales inhibitorias. Se sabe que el endometrio expresa varios factores capaces de inhibir la expresión de PRL *in vitro*, como anexina-1, ácido retinoico, TGF- β , endotelinas y citoquinas proinflamatorias como IL-1, TNF- α e IFN- γ (Gellersen and Brosens 2003). Con respecto a la IL-1, cabe señalar que puede tener efectos contradictorios en la decidualización: por un lado, previene la producción de PRL y los cambios morfológicos de las células deciduales, ya que inhibe la decidualización inducida por cAMP; por otra parte, la IL-1 puede inducir decidualización posiblemente por inducir la síntesis de PGE. (Dunn et al. 2003).

6. APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso genéticamente controlado por el cual la célula induce su propia muerte en respuesta a determinados estímulos (Kerr et al. 1972). Está presente tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, caracterizado por un conjunto de cambios bioquímicos y morfológicos como son la reducción del volumen celular y nuclear debido a la condensación del citoplasma y a la compactación de la cromatina, generando densos agregados que posteriormente serán degradados por endonucleasas en fragmentos oligonucleosomales de 180 pares de bases o múltiplos de éstos (Wyllie et al. 1980). De forma paralela se producen alteraciones del citoesqueleto y dilatación del retículo endoplasmático, formando vesículas que le confieren a la célula el fenotipo característico en forma de "burbuja". Por último, la célula se fragmenta en los denominados cuerpos apoptóticos que son fagocitados por macrófagos y otras células circundantes, evitando así la liberación del material intracelular y su exposición al sistema inmunitario que conllevaría al desarrollo de una respuesta inflamatoria. La regulación de la apoptosis es compleja y está

mediada por diversas familias de proteínas que pueden promover o inhibir este proceso.

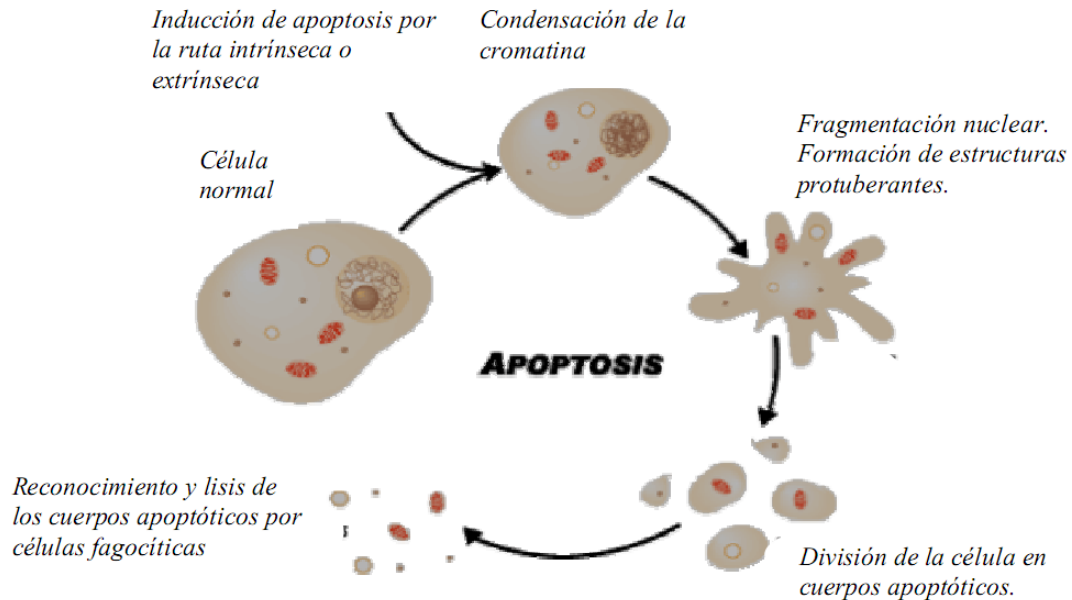


Figura 2. Cambios morfológicos de la célula durante el proceso de muerte celular por apoptosis.

6.1. Caspasas

Las Caspasas (**C**ysteine **A**Spartyl-specific prote**A**SES) son una familia de cisteín-proteasas que tienen especificidad de corte en residuos de aspártico. Estas enzimas se encuentran expresadas de manera constitutiva en forma de proenzimas o zimógenos inactivos que requieren proteólisis para activarse (Thornberry and Lazebnik 1998). Son un componente esencial de la maquinaria de inducción de apoptosis al ser las principales enzimas responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren durante el proceso de muerte celular.

Según su función en el proceso de muerte por apoptosis, las caspasas pueden clasificarse en iniciadoras o efectoras.

Las caspasas iniciadoras: son las primeras en activarse tras un estímulo apoptótico gracias a la presencia en su prodominio de motivos de interacción proteína-proteína que les permiten asociarse a proteínas adaptadoras con dominios homólogos. Existen dos tipos de motivos de interacción con proteínas: dominios efectores de muerte (DED), presentes en las caspasas-8 y -10, y dominios de activación y reclutamiento de caspasas (CARD), en las caspasas-2 y -9. El reclutamiento de las caspasas iniciadoras a proteínas adaptadoras determinó la aparición de la teoría de activación por un mecanismo de autocatálisis por proximidad (Salvesen and Dixit 1999). Estudios más recientes han demostrado que la activación de caspasas iniciadoras requiere la formación de homodímeros, a partir de las formas proenzimáticas monoméricas, en los cuales dichas formas proenzimáticas adoptan una conformación activa (Boatright et al. 2003).

Las caspasas efectoras o ejecutoras: carecen de dominios DED o CARD y son activadas tras ser procesadas por las caspasas iniciadoras. Entre las caspasas efectoras se encuentran las caspasas-3, -6 y -7 y son las encargadas de degradar los distintos sustratos celulares que provocan los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la muerte por apoptosis.

Además de las caspasas implicadas en apoptosis existen otros miembros de esta familia como la caspasa-1, -4, -5, -11 y -13, que participan en la respuesta inflamatoria.

6.2. Rutas de inducción de apoptosis

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

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

6.2.1. Vía de los receptores de muerte o vía extrínseca de inducción de apoptosis

La célula puede entrar en apoptosis en respuesta al estímulo desencadenado por la unión de los denominados **ligandos de muerte** a sus correspondientes receptores de muerte, tanto en situaciones fisiológicas como en patológicas. Los ligandos de muerte son proteínas transmembrana tipo II pertenecientes a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). Entre ellos se encuentran el propio TNF, FasL/CD95L y TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand).

Los receptores pro-apoptóticos a los que se unen estos ligandos son proteínas transmembrana tipo I de la superfamilia del receptor de TNF y reciben el nombre de **receptores muerte**. Se caracterizan por presentar en su región intracelular los denominados dominios de muerte (DD) a través de los cuales se transmite la señal apoptótica. Existen además receptores *anti-apoptóticos* o “*decoy*”, que carecen de estos dominios DD y por ello no transmiten la señal de apoptosis tras la unión al ligando, y receptores solubles (Gruss and Dower 1995). Todos los receptores presentan en su región extracelular unos dominios ricos en cisteína (CRDs) que se asocian los denominados dominios de homología a TNF (THD) de los ligandos de muerte por medio de puentes disulfuro, formando multímeros funcionales (Banner et al. 1993).

La unión del ligando de muerte a su receptor pro-apoptótico provoca la trimerización del mismo y el reclutamiento de proteínas adaptadoras, como FADD o TRADD, con dominios DD homólogos al del receptor. Además, estas proteínas presentan dominios efectores de muerte (DED) que permiten a su vez el reclutamiento de las caspasas iniciadoras -8 y -10 formando el llamado complejo inductor de señales de muerte (DISC), donde se produce la activación de dichas caspasas (Kischkel et al. 2000). Una vez activas, las caspasas iniciadoras pueden procesar directamente a las caspasas efectoras -3 y -7, y/o cortar a la proteína “BH3-only” Bid para activar la ruta mitocondrial (Sprick et al. 2000).

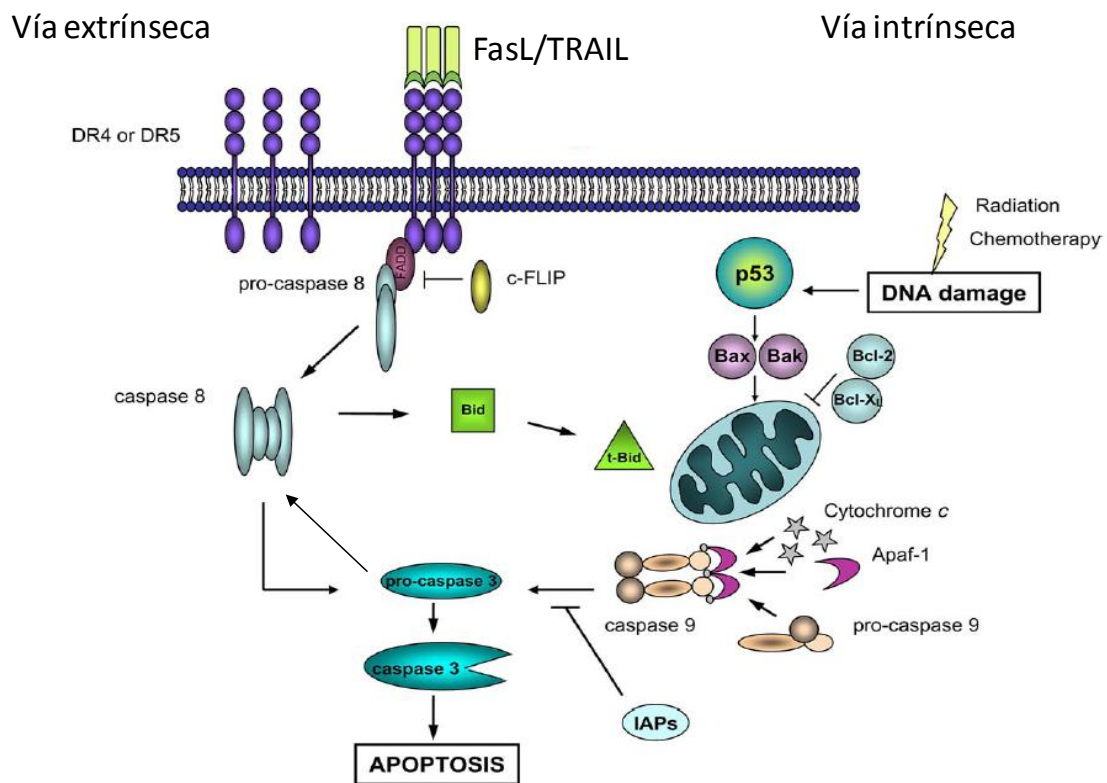


Figura 3. Diferentes rutas de inducción de apoptosis: vía extrínseca e intrínseca.

6.2.2. Ruta mitocondrial o intrínseca

La mitocondria juega un papel fundamental en esta ruta intrínseca de inducción de apoptosis al actuar como reservorio de proteínas que se localizan en el espacio intermembrana de la mitocondria y cuya salida al citoplasma, como consecuencia de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (PMME), constituye el inicio de una serie de reacciones que traen como consecuencia la apoptosis de la célula. Esta ruta se activa en respuesta a diversos estímulos como daño al DNA, estrés oxidativo o privación de factores de crecimiento.

El mecanismo por el cual se produce la PMME es todavía un tema discutido. Dos mecanismos han sido propuestos para explicarlo:

- La formación de un poro de permeabilidad transitoria (PPT), que permite el paso de agua y moléculas de hasta aproximadamente 1.5kDa. Este

poro estaría formado por un transportador de nucleótidos de adenina en la membrana interna y del canal de aniones voltaje dependiente (VDAC) en la membrana externa (Mattson and Kroemer 2003).

- La formación de canales proteicos constituidos por la dimerización de distintos componentes pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2 que actuarían sobre la membrana mitocondrial externa.

La permeabilización de la membrana mitocondrial externa precipita a la célula a la muerte a través de tres mecanismos: desorganización de la cadena de transporte de electrones, lo que conlleva una caída en la producción de ATP; alteración del potencial de oxidación-reducción (redox) generándose especies reactivas de oxígeno (ROS); y liberación de proteínas al citoplasma desde el espacio intermembranal de la mitocondria, las cuales inducen apoptosis por activación de caspasas o por neutralización de inhibidores citolíticos de este proceso.

Una de las proteínas que se libera de la mitocondria y que contribuye de forma importante al proceso de muerte por apoptosis es el **citocromo c**. Una vez liberado al citosol, el citocromo c se une a la proteína **Apaf-1** permitiendo la unión del nucleótido dATP o ATP. La interacción de estas proteínas da lugar a la formación de un complejo llamado *apoptosoma*, donde se recluta y se activa la procaspasa-9. La caspasa-9 activada es capaz de cortar y activar caspasas efectoras, como la caspasa-3.

Otras proteínas que se liberan son **AIF** (Apoptosis Inducing Factor) que tiene capacidad de translocación al núcleo en respuesta a estímulos apoptogénicos produciendo la fragmentación del DNA y la compactación de la cromatina (Wang et al. 2000) y **endonucleasa G** que actúa de forma similar a AIF originando la fragmentación del DNA nuclear. En ambos casos, esta fragmentación es independiente de la actividad caspasa (Li et al. 2001).

6.3. Proteínas reguladoras de la apoptosis

Debido al elevado número de señales que pueden inducir apoptosis en la célula, es necesaria la existencia de mecanismos que regulen la entrada en este proceso. Entre estos mecanismos podemos señalar el balance de receptores pro- y anti-apoptóticos (Zhang et al. 2000) y los niveles intracelulares de proteínas anti-apoptóticas como cFLIP y los miembros de las familias IAPs y Bcl-2.

IAPs: son una familia de proteínas inhibidoras de caspasas, que impiden principalmente la activación de las caspasas -3, -7 y -9 (Deveraux et al. 1997, Shiozaki and Shi 2004). Entre ellas se encuentran XIAP, c-IAP1, c-IAP2, IAP asociado a melanoma (ML-IAP), proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP), BRUCE y survivina. (Wright and Duckett 2005) La capacidad de unión e inhibición de caspasas reside en los llamados dominios BIR (Baculoviral IAP Repeat). También contienen dominios RING, que actúan como ubiquitín-ligasa induciendo la autodegradación de la propia proteína (Yang and Li 2000) y posiblemente también la degradación de la caspasa unida a ella.

La proteína **XIAP** se une y secuestra a la caspasa-3 activa, así como a la caspasa-9 en el apoptosoma inhibiendo su activación y bloqueando la cascada proteolítica (Bratton et al. 2001). Uno de los antagonistas de XIAP y de otros miembros de la familia de los IAPs es la proteína mitocondrial Smac/DIABLO, que es liberada junto al citocromo c tras la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y es capaz de unirse e inactivar a dichos IAPs (Du et al. 2000).

c-FLIP: Existen dos isoformas de esta proteína, larga ó c-FLIP_L y corta ó c-FLIP_S (Scaffidi et al. 1997). Es una proteína inhibidora de la activación de las caspasas -8 y -10 (Bertin et al. 1997). Ambas isoformas contienen dominios DED iguales a los de dichas caspasas, a través de los cuales puede unirse a FADD en el

complejo DISC, compitiendo con la unión de las caspasas e impidiendo su activación.

Familia Bcl-2: Constituida por un grupo de proteínas que se caracterizan por presentar entre uno y cuatro dominios de homología a Bcl-2 o dominios BH (BH1-BH4) (Ottillie et al. 1997). Incluye una veintena de miembros, algunos de los cuales inhiben (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, A1, Mcl-1) mientras que otros activan (Bad, Bik, Blk, Hrk, Bid, Bim) la muerte por apoptosis.

Los miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2 se dividen en dos clases:

- Proteínas tipo Bax. En este grupo se encuentran **Bax**, **Bak** y **Bok**, que presentan dominios BH1-BH3. Estas proteínas forman canales de permeabilización en la membrana mitocondrial o interaccionan con las proteínas formadoras de canales provocando la PMME.
- Proteínas "BH3-only". A este grupo pertenecen **Bad**, **Bim**, **Bid**, **Bik**, **Blk**, **Hrk** y **Noxa**, entre otras. Presentan solo el dominio BH3 y actúan como mediadores de la apoptosis permitiendo la transmisión de señales de muerte por unión y neutralización de miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 (Cory and Adams 2002) o por activación directa de Bax y Bak (Wei et al. 2000), aunque son incapaces de inducir apoptosis por ellas mismas (Zong et al. 2001). Cabe destacar el papel de Bid que presenta un papel fundamental en la inducción de apoptosis al conectar las dos rutas de inducción, intrínseca y extrínseca (Luo et al. 1998), ya que puede ser cortado por la caspasa-8 activada formándose tBid (Bid truncado) que se translocará a la membrana mitocondrial facilitando su permeabilización y la liberación de factores apoptogénicos al citoplasma (Li et al. 1998, Lutter et al. 2001, Van Gurp et al. 2003).

Los miembros anti-apoptóticos presentan cuatro dominios BH (BH1-BH4). Entre ellos se encuentran **Bcl-2**, **Bcl-x_L** y **Mcl-1**, proteínas que inhiben la apoptosis

mediante la formación de heterodímeros con Bax y Bak que impiden su función y evitan así la salida de citocromo c y otros factores apoptogénicos de la mitocondria (Yang et al. 1997). Por otro lado, Bcl-2 también forma complejos con la proteína Apaf-1, formando un heterotrímero Bcl-2-Apaf-1-caspasa-9 que bloquea la unión del citocromo c a Apaf-1 en respuesta al estímulo apoptótico. El estudio de esta proteína ha tenido gran relevancia en la interfase materno-fetal, ya que varios investigadores han encontrado un aumento de expresión de Bcl-2 en la decidua de ratas y ratones en los primeros estadios de gestación, pero esta expresión no se mantiene a medida que progresa el embarazo (Dai et al. 2000, Joswig et al. 2003). De hecho, la expresión de Bcl-2 disminuye en la decidua cuando estas células son tratadas con diferentes hormonas (Dai et al. 2000).

OBJETIVOS

Aunque en el embarazo las células deciduales estromales (DSC) proceden de las endometriales estromales (ESC) del endometrio no gestante y, por tanto, son el mismo tipo de célula en distinta etapa funcional, ambos tipos de células podrían presentar diferencias fenotípicas y funcionales, al encontrarse en distintos ambientes hormonales y citoquímicos. *Por ello, el primer objetivo de esta tesis doctoral es comparar ESC y DSC en cuanto a sus características fenotípicas y funcionales.*

Para el éxito del embarazo es necesaria la decidualización de las células estromales, la cual comienza a producirse en la fase secretoria del ciclo menstrual y continúa durante el embarazo. La decidualización de DSC y ESC implica cambios morfológicos, fenotípicos y secretorios, adquiriendo nuevas funciones. *El segundo objetivo es el estudio de los efectos de la decidualización sobre las características fenotípicas y funcionales de las ESC y DSC.*

Puesto que durante el embarazo normal se ha observado una muerte progresiva por apoptosis de las DSC y este fenómeno juega un papel esencial en procesos tan relevantes como la implantación y la invasión del trofoblasto. *El tercer objetivo de este trabajo es el estudio de la apoptosis en las DSC y ESC.*

MATERIALES Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de decidua se obtuvieron de interrupciones voluntarias de embarazo en primer trimestre (6-10 semanas) de mujeres sanas entre 20 y 30 años, previo consentimiento informado de las mismas. Dichas muestras fueron proporcionadas por las clínicas EL Sur (Málaga) y Ginegranada (Granada). Ninguno de los abortos fue farmacológicamente inducido. La extracción del material se realizó mediante legrado o aspiración más legrado.

Las muestras de sangre menstrual se obtuvieron de donantes sanas entre 20-30 años. Se recogieron aproximadamente 5 ml de sangre, de los primeros días de menstruación.

Las muestras de sangre periférica utilizadas procedían de donantes voluntarios sanos de entre 20 y 35 años y fueron recogidas en tubos con citrato.

En la recogida de ambos tipos de muestras fueron excluidos donantes que estuvieran recibiendo medicación o presentaran alguna infección, enfermedad autoinmune u otra enfermedad local o sistémica.

Las muestras de amígdala fueron obtenidas de pacientes con amigdalitis del Hospital Universitario de San Cecilio (Granada, España). Los pacientes (de 3 a 10 años de edad) estaban en remisión completa antes de la intervención. Los padres o tutores de los pacientes fueron convenientemente informados concediendo el correspondiente permiso para la utilización de las muestras.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético y de Investigación del Hospital Universitario San Cecilio, Granada.

2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS

Obtención de DSC y linfocitos deciduales. Las muestras de decidua fueron examinadas visualmente para excluir la presencia de patologías que pudieran alterar los resultados. Las muestras fueron lavadas con tampón salino (PBS, phosphate buffered saline) (Gibco, California, USA) y la decidua fue desmenuzada con un bisturí, a la vez que se iba separando del trofoblasto en un volumen pequeño de PBS. A continuación, el tejido se incubó en una solución de colagenasa V (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), a una concentración de 5 mg/ml, durante 30 minutos a 37 °C en agitación. Cuando la muestra estuvo digerida, se añadió PBS, se filtró la suspensión a través de una gasa estéril y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. El botón de células se resuspendió en PBS y las células mononucleares fueron separadas centrifugando la suspensión sobre un gradiente de Ficoll-Hisotpaque (Sigma-Aldrich), a 2200 rpm y 20°C durante 20 minutos. Las células de la interfase resultante fueron recogidas y se lavaron añadiendo PBS y centrifugando durante 5 minutos a 1500 rpm. Finalmente fueron resuspendidas en medio de cultivo Opti-MEM (Invitrogen, Grand Island, NY) suplementado con suero fetal bobino (FBS) al 3%, 100 IU/ml de penicilina, 100 IU/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina (Sigma-Aldrich). Después de la incubación de las células durante la noche, las DSC quedaron adheridas al plástico y de este modo se separaron de los linfocitos deciduales que permanecieron en suspensión en el medio de cultivo.

La pureza de las líneas de DSC obtenidas fue confirmada por citometría de flujo detectando la coexpresión de CD10 y CD29, y la pérdida de CD45 (que identifica a los linfocitos). Los cultivos presentaron entre un 95% y un 100% de pureza de DSC. Las células proliferaron en Opti-MEM hasta 12 semanas en cultivo manteniendo un fenotipo constante. El medio de cultivo fue cambiado cada 3-4 días.

Obtención de ESC y linfocitos menstruales Para la obtención y cultivo de ESC, la sangre menstrual fue diluida con PBS y centrifugada en gradiente Ficoll-

Histopaque, realizando el mismo procedimiento que con DSC. Al final del procedimiento se obtuvieron ESC adheridas al plástico y linfocitos procedentes de sangre menstrual, suspendidos en el medio de cultivo.

Obtención de FDC. Para establecer las líneas de FDC, las muestras de amígdalas fueron minuciosamente lavadas con PBS y desmenuzadas con el bisturí, en un volumen pequeño de PBS. La suspensión se mezcló con una solución de colagenasa tipo V y se procedió a realizar el mismo método descrito para DSC.

Obtención de linfocitos periféricos (PBL). La sangre periférica fue diluida en PBS en una proporción 1:2. Las células mononucleares se obtuvieron por centrifugación en gradiente de Ficoll-Histopaque, los monocitos del cultivo se eliminaron por adhesión al plástico durante 1 hora a 37°C y los PBL se cultivaron en OPTI-MEM.

3. PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS

Los linfocitos NK deciduales fueron purificados a partir de linfocitos deciduales por selección positiva marcando las células con un anticuerpo anti-CD56 (mouse IgG, Invitrogen), seguido de un marcaje con bolitas magnéticas (goat anti-mouse IgG MicroBeads) y separación por columnas (Miltenyi Biotec, GmbH).

Los linfocitos T procedentes de sangre periférica o menstrual fueron aislados por selección negativa mediante un sistema de unión indirecta a partículas magnéticas compuesto por anticuerpos frente a CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 y CD235a asociados a biotina (Human Pan T Cells Isolation Kit II, Miltenyi Biotec, GmbH).

La pureza de los linfocitos NK y T fue superior al 90%, establecida mediante análisis por citometría de flujo de la expresión de CD56 y CD3, respectivamente. Los linfocitos purificados fueron resuspendidos en Opti-MEM al 3% de FBS y cultivados.

4. REACTIVOS Y ANTICUERPOS

4.1. Anticuerpos usados en citometría de flujo

Los anticuerpos monoclonales CD10-PE, CD14-FITC, CD21-PE, CD29-FITC, CD54-FITC y CD73-PE fueron obtenidos de Caltag Laboratories (Burlingame, CA). Los anticuerpos monoclonales BAFF-FITC, CD106 (VCAM-1)-FITC y el anticuerpo bloqueante de los receptores de PRL se obtuvieron R&D Systems (Minneapolis, MN). Los controles de isotipos usados fueron IgG1-FITC, IgG1-PE (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), IgG2-FITC e IgG2-PE (Caltag Laboratories). El anticuerpo monoclonal anti-Bak (Ab-1), se obtuvo de Calbiochem (Darmstadt, Germany).

4.2. Anticuerpos usados en Western blot

El anticuerpo monoclonal anti-caspasa-8 se obtuvo de Cell Diagnostica (Munster, Germany). Los anticuerpos monoclonales anti-caspasa-9 y anti-Apaf-1 se obtuvieron de R&D Systems (Minneapolis, MN) y el anticuerpo policlonal anti-caspasa-3 de Stressgen (Ann Arbor, MI). Los anticuerpos monoclonales anti-XIAP y anti-Bax se obtuvieron de BD Biosciences (San Jose, CA). El anticuerpo monoclonal anti-Bid fue de Cell signaling Technology (Boston, USA). El anticuerpo monoclonal anti-cFLIP NF6 se obtuvo de Alexis Biochemicals (San Diego, CA). El anticuerpo monoclonal anti-Bcl-2 fue obtenido de Dako (Glostrup, Denmark). E anticuerpo monoclonal anti-Bcl-x_L se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA). El anticuerpo anti-β-actina se obtuvo de Sigma-Aldrich (St.Louis, MO).

4.3. Reactivos inductores de apoptosis

El inhibidor de las DNA metiltransferasas (DNMT) decitabine, el inhibidor LY 294002 y los compuestos nocodazol, ácido valproico (VPA), doxorubicina, cicloheximida y etopósido se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St.Louis, MO). El inhibidor del proteosoma Velcade (bortezomib) de Janssen-Cilag SA (Madrid,

España). El inhibidor de DNMT zebularine y los compuestos PD 98059 (inhibidor de MEK), SP 600125 (inhibidor de JNK), SKF 86002 (inhibidor de p38 MAPK) y bisindolilmaleimida (inhibidor de PKC) fueron obtenidos de Calbiochem (Darmstadt, Germany). El ligando de muerte TRAIL recombinante fue cedido por el Dr. Abelardo López Rivas (CABIMER, Sevilla). El anticuerpo anti-CD95 CH11 (IgM) fue obtenido de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY).

4.4 Citoquinas, hormonas y otros reactivos

La IL-10 humana, IFN- γ , TNF- α , P4, 8-bromo-cAMP, PRL y β -estradiol fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. La IL-2 recombinante humana fue generosamente obtenida a través del AIDS Research and Reference Reagent Program (National Institute of Health, Rockville, MD, USA). La IL-6 fue obtenida de Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). La hCG fue adquirida de los laboratorios Angelini-Farma-Lepori (Barcelona).

5. DECIDUALIZACION DE CÉLULAS

Para inducir decidualización, DSC, ESC y FDC fueron tratadas con 300 nM P4 y 500 μ M cAMP. Además, en algunos tratamientos se añadió β -estradiol a 30 nM. La decidualización fue confirmada por cambios en la morfología celular y secreción de PRL.

6. ANÁLISIS DEL FENOTIPO ANTIGÉNICO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células DSC o ESC cultivadas, fueron lavadas con abundante PBS, a continuación se despegaron del frasco de cultivo con Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich). Las células despegadas fueron recogidas y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se desechó y el botón celular se resuspendió en PBS a una concentración de 10^6 células/ml. Para el marcaje directo, 100 μ l de la suspensión celular fueron incubados con 10 μ l del mAb correspondiente en la oscuridad durante 30 minutos a 4 $^{\circ}$ C. Después las células

fueron lavadas con PBS y se resuspendieron en un volumen de 200 μ l para ser inmediatamente analizadas en el citómetro de flujo (Ortho-Cyton, Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ, USA).

Para el análisis intracitoplasmático de BAFF, las DSC fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a 4°C y lavadas con PBS-saponina (Merck, Darmstadt, Germany) al 0,05%. A continuación se resuspendieron en 100 μ l de PBS-saponina, se añadió 10 μ l del anticuerpo anti-BAFF y tras 30 minutos de incubación, las células fueron lavadas con PBS-saponina y resuspendidas en 200 μ l de PBS-saponina para el análisis por citometría de flujo.

7. DETERMINACIÓN DE IL-15 Y PROLACTINA SECRETADAS EN SOBRENADANTES DE CULTIVO

En los sobrenadantes de cultivo se determinó la presencia de PRL mediante ensayos de electro quimioluminiscencia (Roche, Basel, Switzerland). La presencia de IL-15 también fue determinada en sobrenadantes mediante la técnica de ELISA (R&D, Minneapolis, MN). Los ensayos fueron realizados de acuerdo a las instrucciones de los Kits correspondientes.

8. DETECCIÓN DE CÉLULAS APOPTÓTICAS

Las células apoptóticas hipodiploides fueron detectadas por citometría de flujo de acuerdo con el protocolo publicado (Gong et al. 1994). Brevemente, las células se lavaron con PBS, se resuspendieron en 100 μ l del mismo y se fijaron con 900 μ l de etanol al 70% durante 5 minutos a 4°C. Después de lavar las células con PBS centrifugando a 3500 rpm durante 2 min, se resuspendieron en 250 μ l de PBS añadiendo otros 250 μ l de una solución de extracción de DNA (0,2 M NaHPO₄, 0,1 M ácido cítrico pH 7.8) y se incubaron 10 minutos a 37°C. Por último se tiñó el DNA incubando las células en 200 μ l de una mezcla de PBS, RNAsa (100 μ g/ml) y ioduro de propidio (Sigma-Aldrich) (40 μ g/ml) durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. El análisis cuantitativo de la región sub-G1 del

ciclo celular se realizó midiendo la fluorescencia del DNA en el detector FL-2 con el citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson) utilizando el programa Cell Quest (BD Biosciences).

9. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Para la determinación de la proliferación las células se incubaron con CFDA-SE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) a una concentración de 2,5 μ M, durante 5 minutos a 37°C en oscuridad. A continuación se realizaron 3 lavados con 20 ml de PBS suplementado al 20% de FBS, centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos. Entre el segundo y tercer lavado las células se dejaron en PBS, otros 10 minutos adicionales a 37°C en oscuridad. La proliferación celular se determinó detectando la fluorescencia en la región de emisión correspondiente a FL1 del citómetro de flujo.

10. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE LA ACTIVACIÓN DE BAK

Para detectar la activación de Bak, 250.000 células se lavaron con PBS y a continuación se fijaron en paraformaldehído al 0,25%, durante 5 minutos a 4 °C. Las células se lavaron con PBS tres veces a 1500 rpm durante 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo anti-Bak en 100 μ l de una solución de PBS con 1% de FBS y 100 μ g/ml de digitonina, durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación las células fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor-488 (Molecular Probes, Invitrogen), durante 30 minutos a 4 °C y en oscuridad. Por último las células se lavaron, se resuspendieron en PBS y se analizaron en un citómetro de flujo FACScan con el programa Cell Quest software.

11. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Las células control y las tratadas fueron lavadas con PBS. La detección de proteínas se llevó a cabo a partir de extractos celulares totales. Para ello, se

lisaron las membranas celulares mediante congelación y descongelación de las células previamente resuspendidas en PBS, se añadió tampón de carga y se procedió a la sonicación de la muestra.

En todos los casos, las proteínas se cuantificaron por el método Bradford (Sigma) antes de añadir en tampón de carga.

Las proteínas se separaron en geles de SDS-poliacrilamida (Bio-Rad) al 7,5%, 10% ó 12%, en función del tamaño de la proteína a detectar, en el sistema Mini Protean (Bio-Rad) durante 80 minutos a 140 voltios. Una vez separadas las proteínas por tamaño, se transfirieron desde el gel a una membrana de PVDF (Millipore) por transferencia semiseca empleando el sistema Trans-Blot SD (Bio-Rad) durante 50 minutos a 50 mA.

La membrana se bloqueó con una solución de PBS al 0.1% de Tween (PBSt) y 5% de leche en polvo durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavó con PBSt antes de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C con el anticuerpo frente a la proteína a detectar, diluido previamente en PBSt con leche en polvo al 1%. Tras la incubación se hicieron tres lavados a la membrana con PBSt durante 5 minutos cada uno, y finalmente se incubó durante otra hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón o de conejo según el anticuerpo primario empleado) marcado con peroxidasa de rábano (HRP), preparado en solución de bloqueo. Tras otros tres lavados de 5 minutos con PBSt, la membrana se reveló por quimioluminiscencia empleando el reactivo ECL (Amersham Biosciences), quedando la señal recogida en placas fotográficas (AGFA).

12. PCR ARRAY

El RNA total se purificó utilizando el reactivo RNeasy Mini Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células (5×10^6) se lavaron dos veces con PBS y se lisaron con un buffer con β -mercaptoetanol y tiocianato de

guanidina. Las muestras se homogenizaron en columnas proporcionadas por el kit, y se les añadió etanol al 70%. Posteriormente se realizó una digestión con DNAsa para degradar el DNA y se lavó la columna. Finalmente, se añadió agua libre de RNAsa para recoger el eluido.

Para eliminar cualquier posible contaminación con DNA genómico (gDNA) en la muestra, y evitar así falsos positivos, al RNA total purificado se le agregó un buffer de eliminación de gDNA conteniendo DNAsa, proporcionado por el reactivo RT² First Strand Kit (SABiosciences). Se incubó durante 5 minutos a 42°C y tras este tiempo se enfrió inmediatamente en hielo.

Una vez obtenido el RNA purificado se cuantificó en un espectrofotómetro. Para llevar a cabo la síntesis del DNA complementario (cDNA), se preparó una mezcla con buffer de retrotranscripción, primer poliA, enzima retrotranscriptasa y agua libre de RNAsa, todo ello proporcionado por el RT² First Strand Kit. Esta mezcla se añadió a la muestra de RNA total y el proceso de retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador 2720 Thermal Cycler Applied Biosystems mediante incubación a 42°C durante 15 minutos, seguido de 5 minutos a 95 °C. La PCR a tiempo real se realizó mezclando el cDNA, producto de la retrotranscripción, con el reactivo RT² SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (SABiosciences), de acuerdo con las instrucciones facilitadas por el fabricante. A continuación se agregó 25 µl de la mezcla a cada pocillo de la placa de RT² Profiler PCR Array System y se llevó a cabo la PCR en el sistema ABI 7500 de Applied Biosystem, mediante los siguientes pasos: 10 minutos a 95 °C y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C.

El agente intercalante SYBR Green se une al DNA de doble cadena inmediatamente después de su síntesis emitiendo fluorescencia tras su estimulación (absorción a 497 nm y emisión a 520 nm). La emisión es recogida por el sistema detector del equipo en cada uno de los ciclos de PCR, siendo la fluorescencia proporcional a la cantidad de DNA formado. El ciclo de la PCR en el cual comienza a detectarse el incremento de la señal se denomina ciclo

umbral o Ct (threshold cycle) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de DNA de la muestra. Los valores de Ct de cada muestra se normalizaron con respecto a cinco genes de referencia de expresión estable (“housekeeping”) que incluye el propio kit de PCR Array. La cuantificación relativa de la expresión génica se determinó usando un método comparativo donde el número de veces de inducción es igual a $2^{-\Delta\Delta Ct}$, siendo $\Delta\Delta Ct$ la diferencia entre el ΔCt de la muestra tratada y el ΔCt de la muestra control (normalizados según la expresión del los genes de referencia) (Qian et al. 2005).

13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados mediante el test de la t de Student, no pareado. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos; $p < 0,05-0,01$ *, $p < 0,01-0,001$ **, $p < 0,001$ ***

RESULTADOS

1. RELACIÓN ENTRE CÉLULAS ENDOMETRIALES ESTROMALES Y CÉLULAS DECIDUALES ESTROMALES

1.1. Comparación del fenotipo antigénico de células endometriales estromales y células deciduales estromales

Con el objeto de conocer la equivalencia entre ESC procedentes de sangre menstrual y DSC obtenidas de decidua de primer trimestre de embarazo, se realizó mediante citometría de flujo un análisis comparativo del fenotipo antigénico que presentaban dichas células en cultivo. Tanto DSC como ESC presentaron una morfología alargada, similar a fibroblastos. Ambos tipos celulares tuvieron un porcentaje de expresión cercano al 100% de marcadores característicos de células mesenquimales, como CD29, CD10 y CD73, resultando una proporción de ellas positivas para otros antígenos estudiados, CD21, CD54 y BAFF citoplasmático (cBAFF), y negativas para CD14 (Figura 1A). En cuanto al análisis de la intensidad de fluorescencia que presentaban estas células para los antígenos determinados, tampoco se obtuvieron diferencias entre ambos tipos celulares, a excepción del antígeno CD29 que presentó una disminución en la intensidad de fluorescencia en ESC con respecto a DSC, aunque la diferencia no fue significativa (Figura 1B).

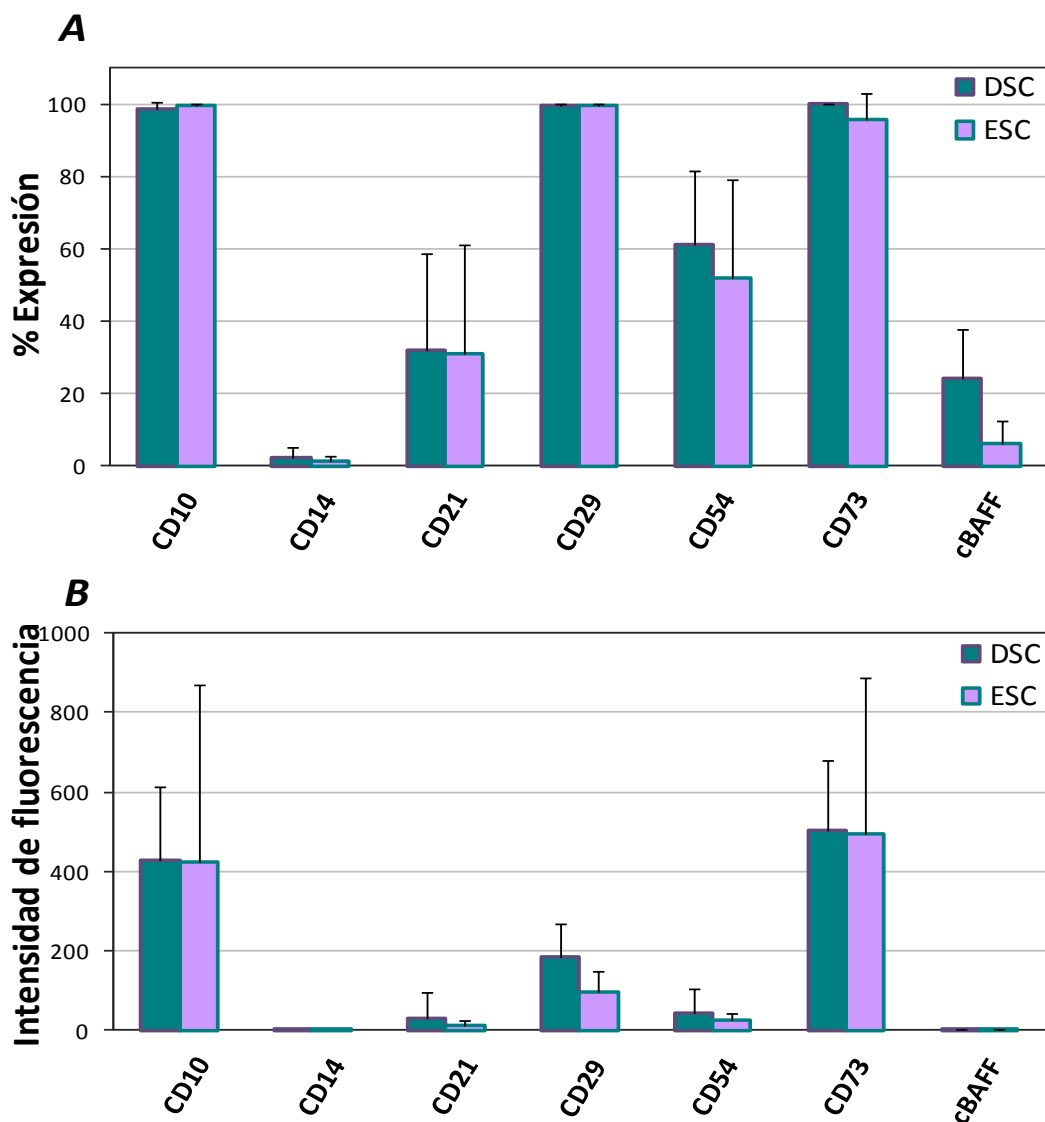


Figura 1. Fenotipo antigénico de DSC y ESC. Se analizaron por citometría de flujo diferentes antígenos expresados por DSC y ESC en cultivo, determinando su porcentaje de expresión (A) o su intensidad de fluorescencia (B). Las barras de error corresponden a la desviación estándar (SD) de al menos tres experimentos independientes con diferentes líneas celulares.

1.2. Modulación del fenotipo antigénico en células deciduales estromales decidualizadas

Para aproximarnos a las condiciones fisiológicas que presentan las DSC en la decidua, se estudió el fenotipo antigénico expresado por las DSC decidualizadas, por ser el estado de diferenciación en el cual se encuentran durante el embarazo, y se comparó con el fenotipo que presentaban las DSC en cultivo no

decidualizadas. Para ello, las DSC fueron diferenciadas con P4 y cAMP durante 12 días, que es el tratamiento más frecuentemente utilizado para inducir decidualización. Tras este periodo, se observó un cambio de forma, desde un aspecto fibroblástico a una morfología poligonal (Figura 2). Como se puede observar en la figura 3, DSC decidualizadas mantuvieron constante el porcentaje de expresión de CD10 y CD73, alrededor del 100%, y de otros antígenos estudiados como CD14, CD106, CD21 y BAFF en membrana citoplasmática (mBAFF). Sin embargo, se observó una disminución, tanto en porcentaje de expresión como en intensidad de fluorescencia de cBAFF, cuando las DSC fueron decidualizadas. Por otro lado, también encontramos una reducción estadísticamente significativa en el porcentaje de expresión de CD54, aunque no lo fue con respecto a la variación en la intensidad de fluorescencia. Cabe destacar la disminución observada en la intensidad de fluorescencia de CD29 en las células diferenciadas, del mismo modo que en su porcentaje de expresión, aunque una población superior al 90% continuó expresando dicho marcador.

Hay que señalar la variación producida en la intensidad de fluorescencia en las células decidualizadas, en las cuales se observó una disminución en la intensidad de CD73, aunque no fue estadísticamente significativa.

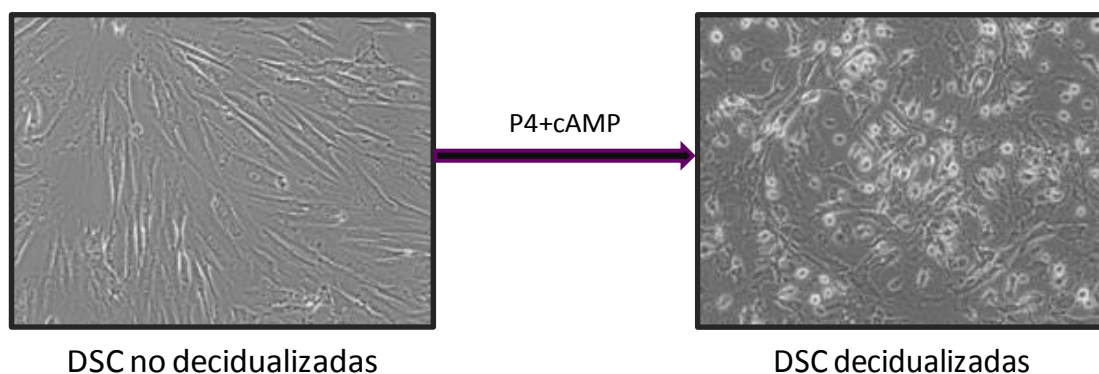


Figura 2. Decidualización de DSC en cultivo. Células DSC indiferenciadas con morfología fibroblástica (izquierda) fueron decidualizadas con P4 y cAMP durante 12 días adquiriendo una morfología redondeada (derecha).

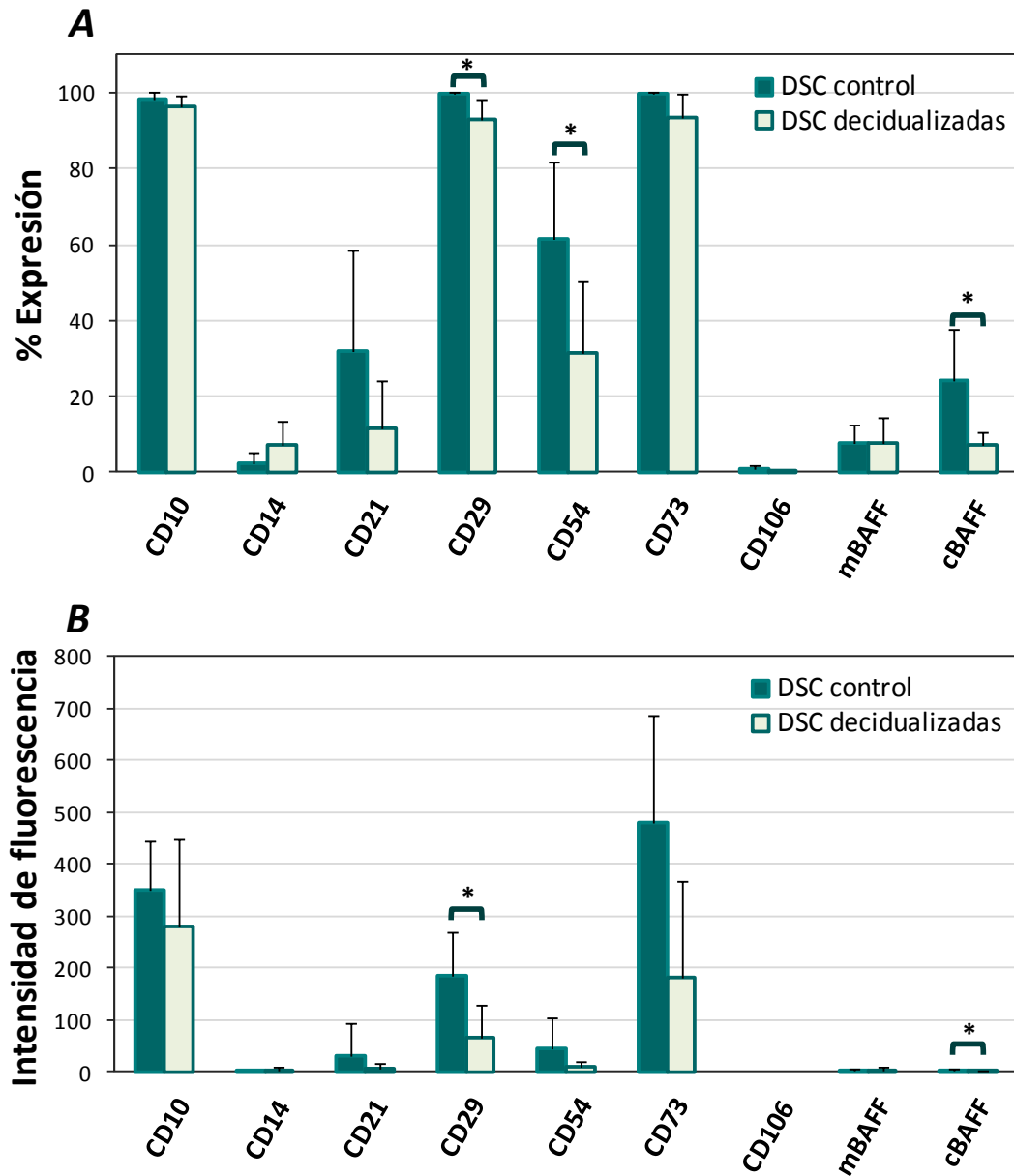


Figura 3. Variación del fenotipo antigénico de DSC decidualizadas. DSC fueron decidualizadas o no (control) durante 12 días con P4 y cAMP. Mediante citometría de flujo se analizó la variación del fenotipo antigénico que presentaron las células decidualizadas, determinando porcentaje de expresión (A) e intensidad de fluorescencia (B). Las barras de error corresponden a la SD de al menos cinco experimentos independientes con diferentes líneas celulares, * $p < 0,05$.

1.3. Expresión de receptores de prolactina en células deciduales estromales y en células deciduales estromales decidualizadas

Para conocer si la decidualización ejercía algún efecto sobre el nivel de expresión de PR, las DSC fueron tratadas durante 8 días con P4 y cAMP y se analizó mediante citometría de flujo en células no decidualizadas y decidualizadas. Como se observa en la figura 4, DSC no decidualizadas presentaron una baja expresión de este receptor, sin embargo cuando las células se decidualizaron se produjo un leve aumento en su expresión. Este incremento se observó tanto en el porcentaje de expresión del receptor, como en la intensidad de fluorescencia, siendo estadísticamente significativo en ambos casos.

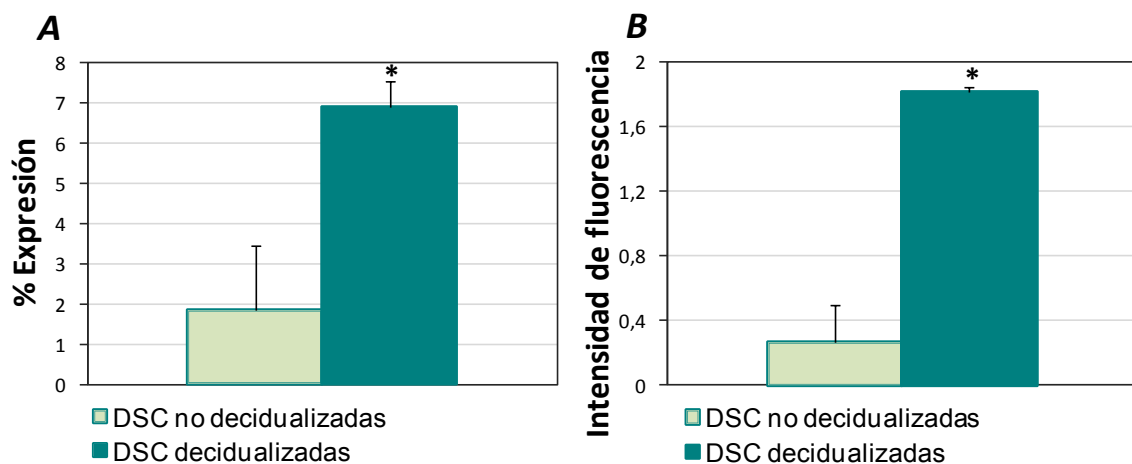


Figura 4. Expresión de PR por DSC. Las células fueron cultivadas en ausencia (no decidualizadas) o en presencia de P4 y cAMP (decidualizadas) durante 8 días. La expresión de PR se determinó por citometría de flujo, analizando su porcentaje de expresión (A) y su intensidad de fluorescencia (B). Las barras de error corresponden a la SD de tres experimentos independientes realizados con diferentes líneas celulares, *p<0,05.

1.4. Modulación del fenotipo antigénico de células endometriales estromales decidualizadas

Del mismo modo que procedimos con DSC, ESC fueron decidualizadas durante 12 días. Estas células también cambiaron su morfología desde un aspecto fibroblástico a redondeado (Figura 5).

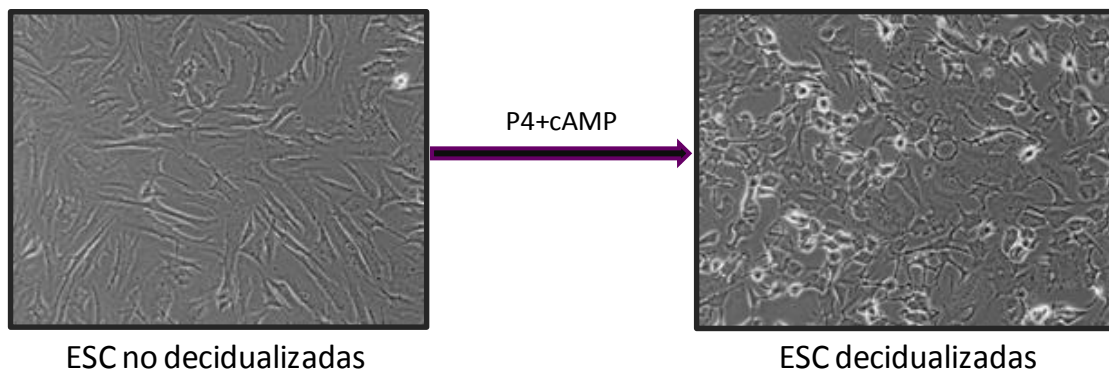


Figura 5. Decidualización de ESC en cultivo. Células ESC indiferenciadas con morfología fibroblástica (izquierda) fueron decidualizadas durante 12 días con P4 y cAMP, adquiriendo una morfología redondeada (derecha).

A continuación, se analizó el fenotipo antigénico que presentaban tanto las células indiferenciadas como las decidualizadas. A diferencia de los resultados obtenidos con DSC, durante la diferenciación de ESC no se observaron variaciones significativas ni en la intensidad de fluorescencia ni en el porcentaje de expresión de los marcadores estudiados, con la excepción de CD29 que presentó una reducción leve, pero estadísticamente significativa, en el porcentaje de expresión, aunque no se correspondió con una disminución en la intensidad de fluorescencia (Figura 6).

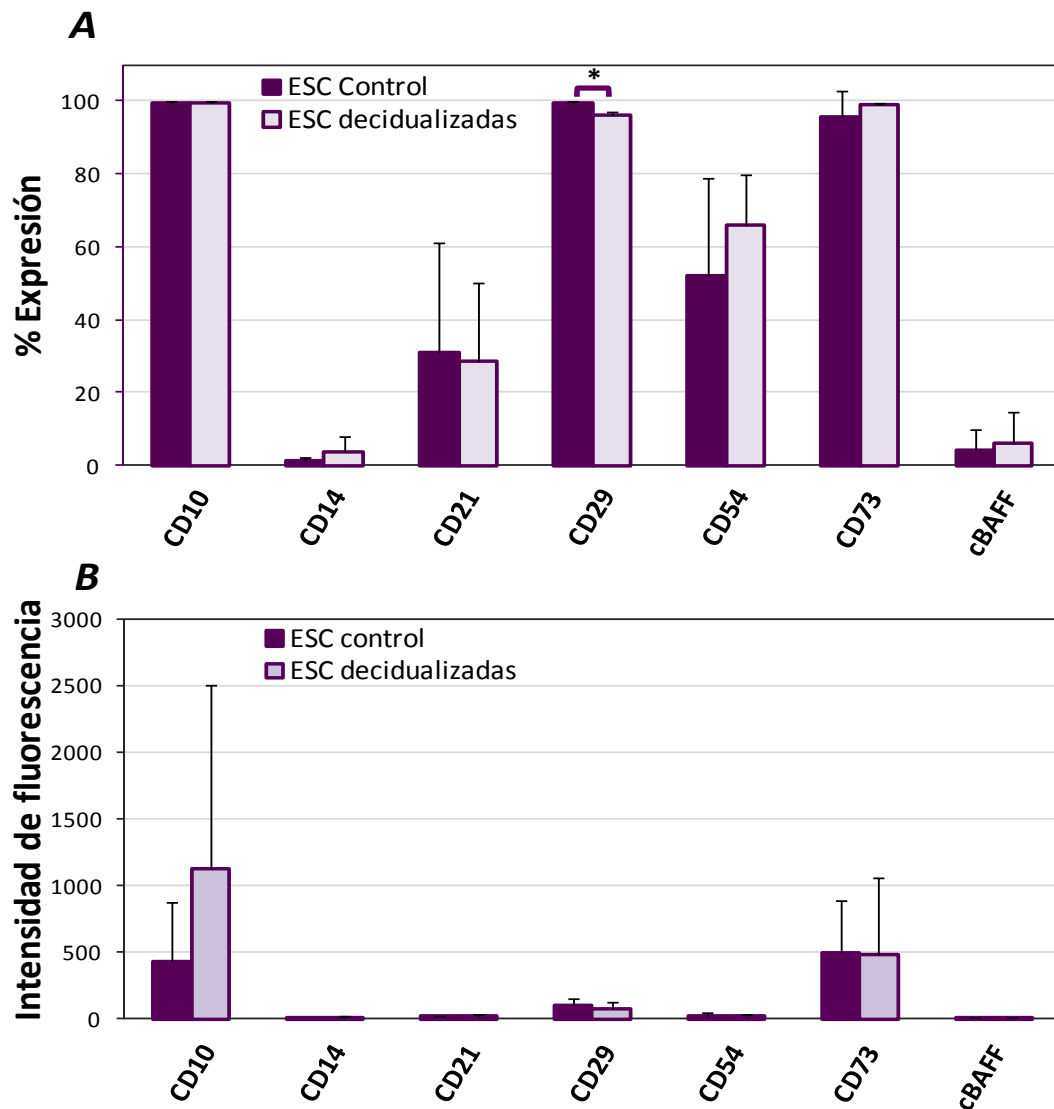


Figura 6. Variación del fenotipo antigénico de ESC decidualizadas. Células ESC fueron decidualizadas o no (control) durante 12 días con P4 y cAMP. Mediante citometría de flujo se analizó la variación del fenotipo antigénico que presentaron las ESC en cuanto a porcentaje de expresión (A) e intensidad de fluorescencia (B). Las barras de error corresponden a la SD de tres experimentos independientes realizados con diferentes líneas celulares, * $p < 0,05$.

1.5. Producción de prolactina por células endometriales estromales y células deciduales estromales decidualizadas

Como hemos comentado anteriormente, la PRL es uno de los factores que identifica a las células decidualizadas, mientras que no es producida por las células en cultivo no diferenciadas.

Comparamos la producción de PRL por ESC y DSC decidualizadas en presencia de P4 y cAMP. Además se añadió E a este tratamiento para comprobar si se producía una modificación en la decidualización, ya que esta hormona está presente durante el ciclo menstrual y en el embarazo. Por lo tanto, DSC y ESC fueron tratadas con P4 y cAMP, o con E, P4 y cAMP durante 28 días, recogiendo el sobrenadante de las células para la determinación de PRL cada 7 días. Como se observa en la figura 7, ambos tipos celulares secretaron PRL en cada uno de los tiempos determinados y con cada tratamiento utilizado, a diferencia de sus respectivos controles que son las células ESC y DSC sin tratar a día cero de cultivo que no producen nada de PRL, por lo que en cada tratamiento y a cada tiempo de determinación la producción de PRL fue estadísticamente significativa, tanto para DSC como para ESC, con respecto a su control.

En DSC, se observó un aumento gradual en la producción de PRL a lo largo del tiempo, al tratar las células con P4 y cAMP. Cuando además se añadió E, aumentó la producción de PRL en cada uno de los tiempos determinados, aunque dichos incrementos no fueron significativos.

Con respecto a ESC, el tratamiento con P4 y cAMP produjo una cantidad menor de PRL que la secretada por DSC, siendo la diferencia estadísticamente significativa en cada tiempo de determinación. Al igual que ocurrió con DSC, la secreción de PRL incrementó, aunque levemente, con el tiempo de cultivo hasta el día 21. Sin embargo, al contrario que lo observado en DSC, la producción de PRL no incrementó al añadir E al tratamiento de decidualización.

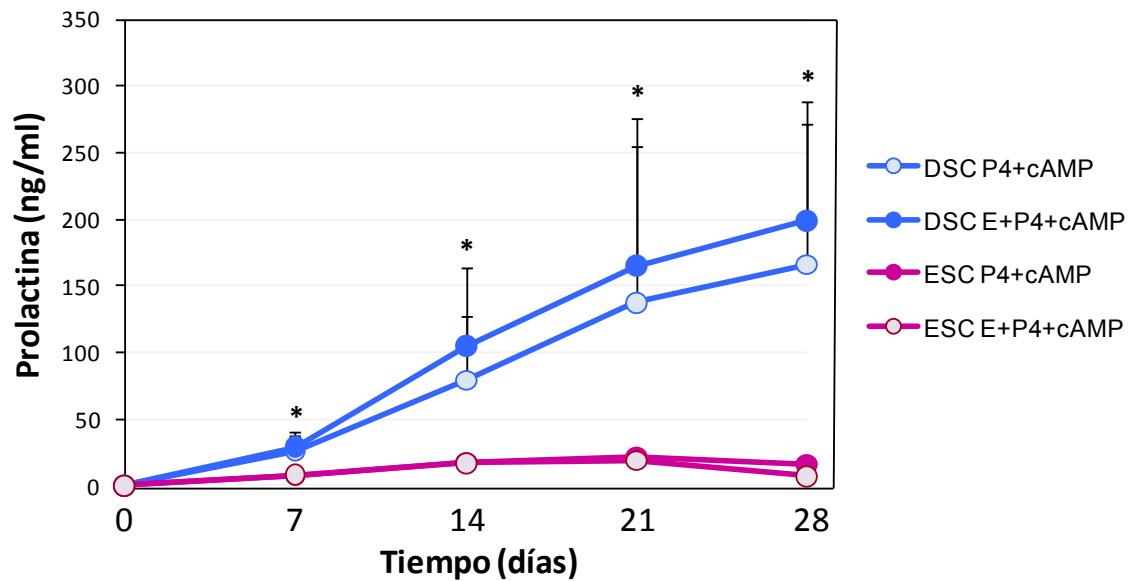


Figura 7. Producción de PRL por DSC y ESC. Ambos tipos celulares fueron tratadas, con P4 y cAMP o P4, cAMP y E, durante 28 días. Las determinaciones de PRL se realizaron cada 7 días, mediante ELISA. Las barras de error corresponden a la SD de al menos tres experimentos independientes con diferentes líneas celulares. La significación estadística se refiere a la producción de PRL por DSC con respecto a ESC, * $p < 0,05$.

1.6. Proliferación de células deciduales estromales y células endometriales estromales durante la decidualización

Para continuar el estudio sobre la decidualización de DSC y ESC en cultivo, medimos la proliferación celular que mostraban durante la diferenciación. Para ello, marcamos ambos tipos celulares a tiempo cero con la sonda fluorescente CFDA-SE. A continuación, DSC y ESC fueron tratadas con E, P4 y cAMP por separado o en una combinación de P4 y cAMP, o E, P4 y cAMP, durante 6 días. Como se observa en la figura 8, ambos tipos celulares cultivados con P4 o E, presentaron la misma intensidad de fluorescencia que las células control. Sin embargo, tanto DSC como ESC tratadas con cAMP, con P4 y cAMP, o con E, P4 y cAMP, presentaron una intensidad de fluorescencia mayor que sus respectivos controles, lo que indica un menor índice de división celular, o dicho de otro modo, una menor proliferación.

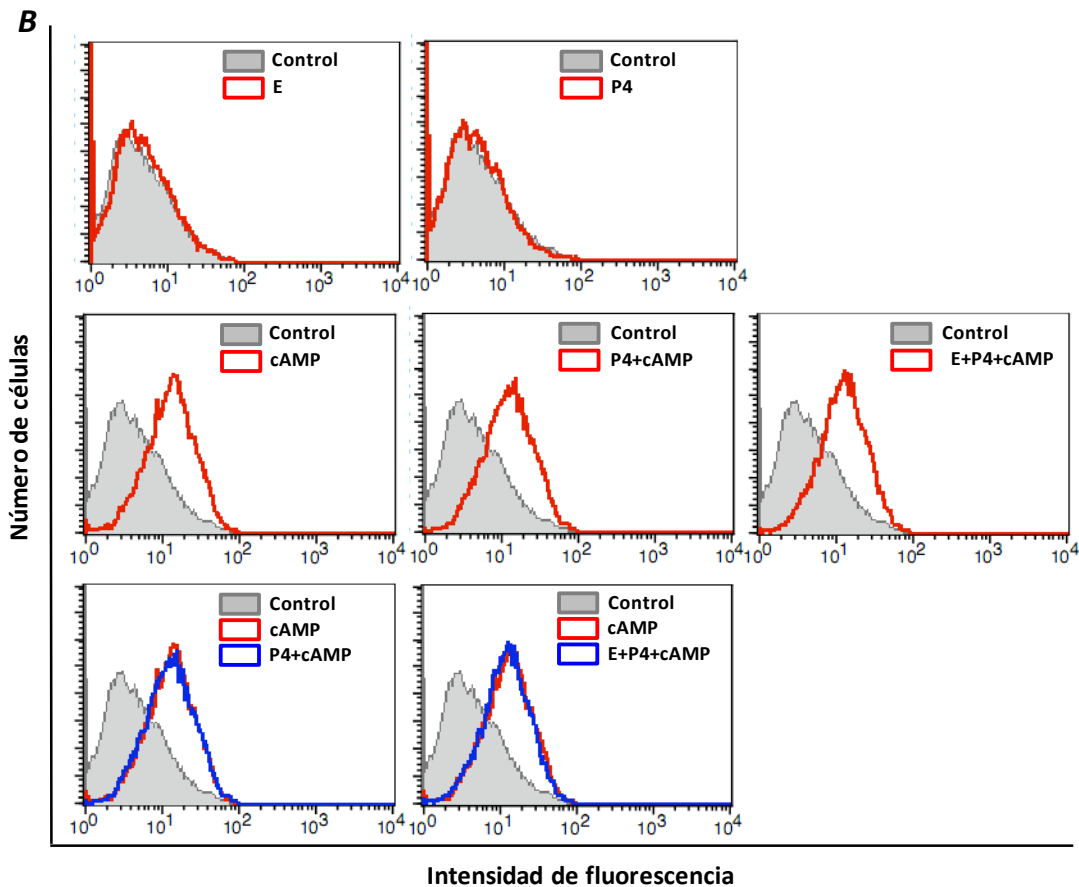
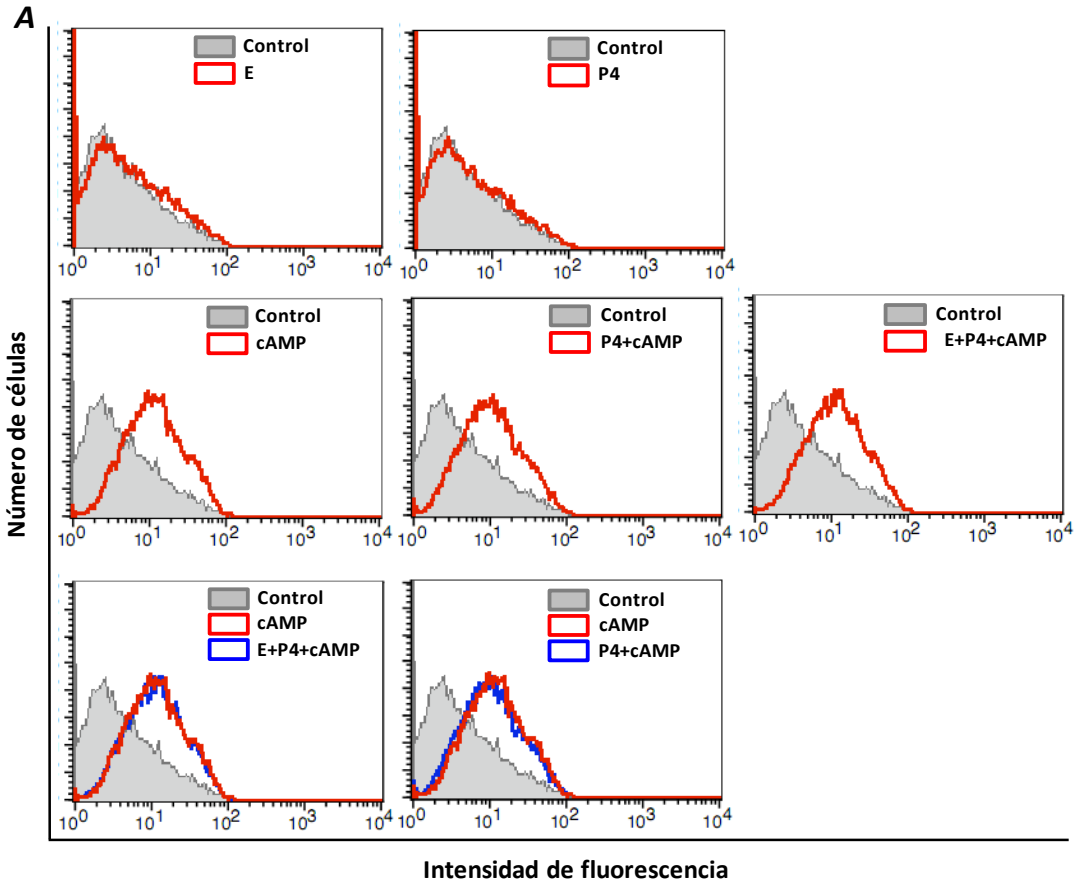


Figura 8. Inhibición de la proliferación de DSC y ESC decidualizadas. Las DSC (A) y ESC (B) fueron teñidas con CFDA-SE a tiempo cero, siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Las células fueron tratadas o no (control), durante 6 días con P4, E o cAMP, por separado, o combinando P4 y cAMP o E, P4 y cAMP. La proliferación celular se midió por citometría de flujo, determinando la intensidad de fluorescencia a día 6 de cultivo. La figura muestra un experimento representativo de los tres realizados con diferentes líneas celulares.

La disminución de la proliferación comenzó a observarse a los tres días de tratamiento (datos no mostrados) haciéndose más evidente cuando se cultivaron durante 6 días. Estos resultados demuestran que la parada o disminución de la proliferación es debida al cAMP.

2. EFECTOS DE LAS CÉLULAS DECIDUALES ESTROMALES Y CÉLULAS ENDOMETRIALES ESTROMALES SOBRE LA SUPERVIVENCIA Y PROLIFERACIÓN LINFOCITOS

2.1 Las células deciduales estromales mejoran la supervivencia de los linfocitos primarios

La decidua está integrada por células epiteliales, glandulares, DSC y una proporción inusualmente elevada de células inmunitarias (aproximadamente el 43-45%). Es conocido que DSC producen citoquinas, hormonas y otros productos biológicamente activos (Engert et al. 2007) que podrían mediar en la supervivencia de los linfocitos deciduales. Por ello, analizamos en primer lugar, el efecto que podrían tener las DSC sobre los linfocitos periféricos (PBL). Estos linfocitos fueron cultivados 6 días en ausencia de estímulo, para permitir que un porcentaje de ellos entrara en apoptosis. Tras este tiempo, PBL fueron mantenidos solos o co-cultivados con DSC a baja proporción (DSC/PBL, 1:2). Encontramos que la co-incubación de PBL con DSC durante 24 horas reduce significativamente el porcentaje de apoptosis de los linfocitos en cultivo (Figura 9A). Además, resultados similares de protección se encontraron cuando co-cultivamos linfocitos con DSC separados por cámara Transwell. Estos resultados descartan la posibilidad de que el efecto pueda ser debido a reacciones alógenas, y apuntan a que la protección sobre la apoptosis espontánea es

mediada por factores solubles, secretados por las DSC (Figura 9B). También confirmamos el efecto protector de DSC sobre la viabilidad de linfocitos deciduales, analizando el porcentaje de dichos linfocitos en apoptosis tras ser cultivados solos, co-cultivados con DSC en cámara Transwell o con sobrenadantes procedentes de DSC, durante 24 horas (Figura 9C).

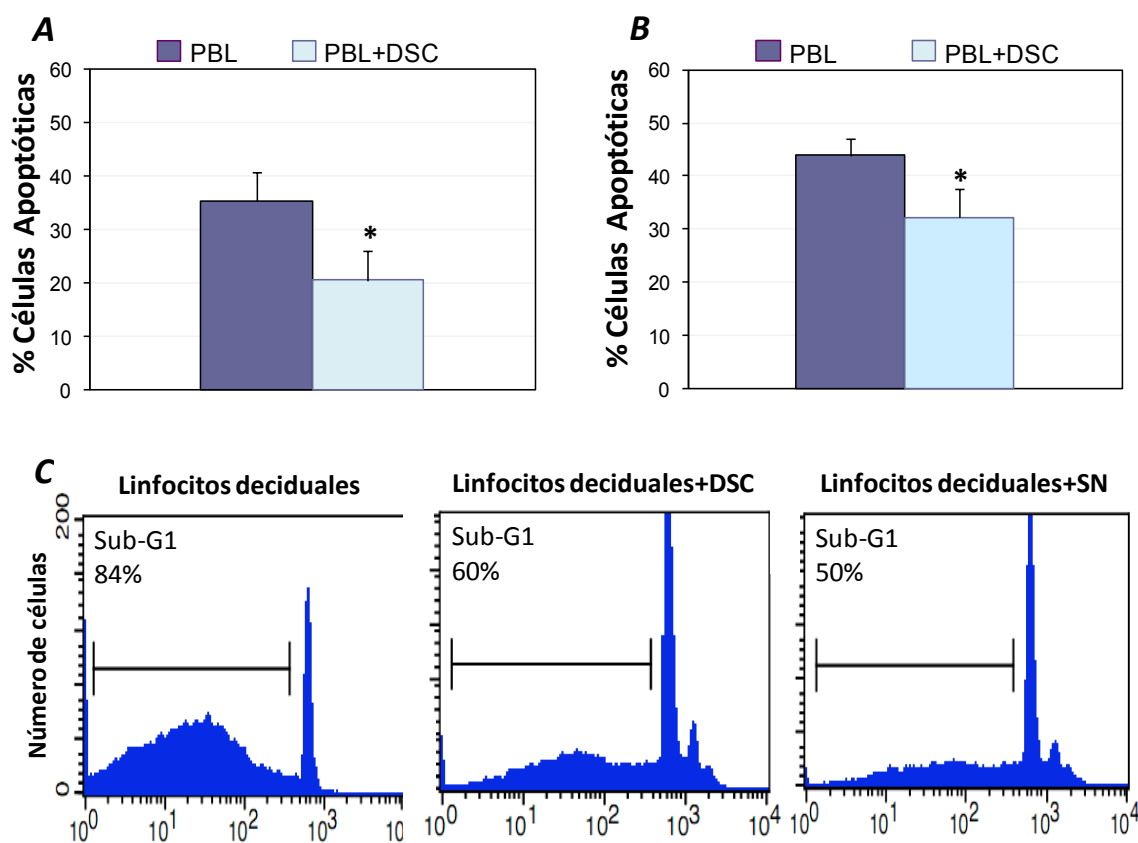


Figura 9. DSC protegen a los linfocitos primarios de la apoptosis espontánea. PBL fueron cultivados durante 6 días en ausencia de estímulo para permitir la apoptosis espontánea y tras este tiempo fueron cocultivados solos o con DSC en placas normales (A) o en cámaras Transwell (B), durante 24 horas. (C) Linfocitos deciduales fueron cultivados solos, co-incubados con DSC en cámara Transwell, o bien con sobrenadantes (SN) procedentes de DSC indiferenciadas durante 24 horas. El porcentaje de linfocitos apoptóticos fue determinado por citometría de flujo, analizando la fase Sub-G1 del ciclo celular. Las barras de error nos muestran la SD de tres experimentos independientes con diferentes líneas de DSC y linfocitos de diferentes donadores. La significación estadística se refiere a la apoptosis de linfocitos co-cultivados con DSC con respecto a los cultivados solos, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Las células T representan la población más abundante de linfocitos periféricos, mientras en el primer trimestre de embarazo las células NK constituyen

alrededor del 75% de leucocitos (Bulmer et al. 1991). Para analizar si el efecto de protección era más específico hacia una clase particular de linfocitos, purificamos los linfocitos NK y T procedentes de PBL y células NK provenientes de la decidua. Cada una de las poblaciones fue cultivada sola, o co-cultivada con DSC durante varios días. La protección se observó con todas las poblaciones, aunque fue más importante en células NK, tanto periféricas como deciduales, que en linfocitos T (Figura 10). Hay que señalar que los experimentos realizados con linfocitos NK deciduales purificados se llevaron a cabo co-cultivando DSC frescas y NK procedentes del mismo donante, y que los experimentos con linfocitos T y NK purificados de PBL se realizaron en cámara Transwell.

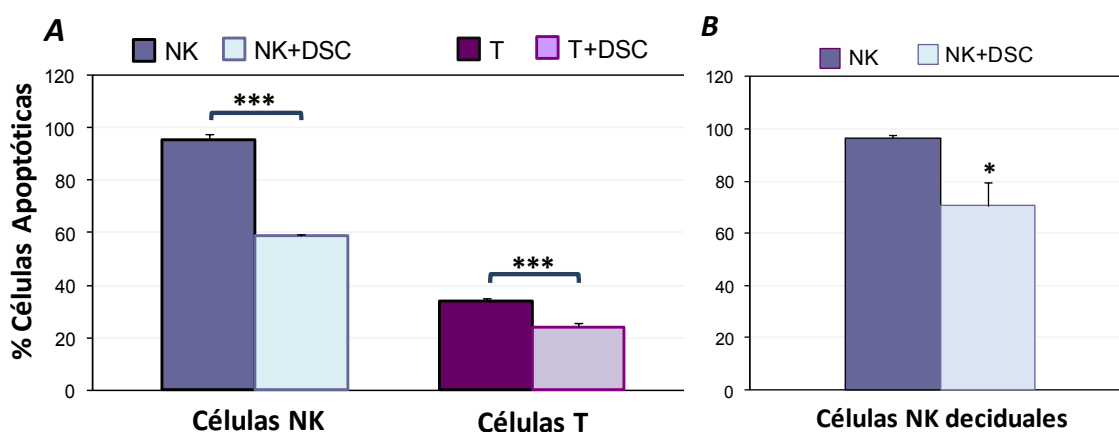


Figura 10. DSC protegen a poblaciones purificadas de linfocitos T y NK primarios de la apoptosis espontánea. (A) Linfocitos NK y T purificados de sangre periférica fueron incubados en presencia o ausencia de DSC en cámara Transwell durante 7 días. (B) Linfocitos NK aislados a partir de muestras de decidua, fueron incubados solos o con DSC frescas del mismo donador durante 4 días. El porcentaje de linfocitos apoptóticos fue determinado por citometría de flujo, analizando la fase Sub-G1 del ciclo celular. Las barras de error nos muestran la SD de tres experimentos independientes con diferentes líneas de DSC y linfocitos de diferentes donadores. La significación estadística se refiere a la apoptosis de linfocitos co-cultivados con DSC con respecto a los cultivados solos. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Para conocer si las células DSC decidualizadas, que es el estado de diferenciación en el cual se encuentran en la decidua debido a la influencia de P4 y otras hormonas presentes en el embarazo, también tenían un efecto protector sobre los linfocitos deciduales, incubamos dichos linfocitos con medio de cultivo (control) o con sobrenadantes procedentes de células DSC no decidualizadas y decidualizadas, durante 4 días. Utilizamos los sobrenadantes

procedentes de estas células debido a que, como hemos demostrado anteriormente, el efecto protector no es dependiente del contacto celular y de este modo evitamos la posibilidad de reacciones alogénicas. Como se puede observar en la figura 11, el cultivo con sobrenadantes de DSC decidualizadas proporcionó una reducción de la apoptosis espontánea en los linfocitos deciduales similar a la del cultivo con sobrenadantes de DSC no decidualizadas.

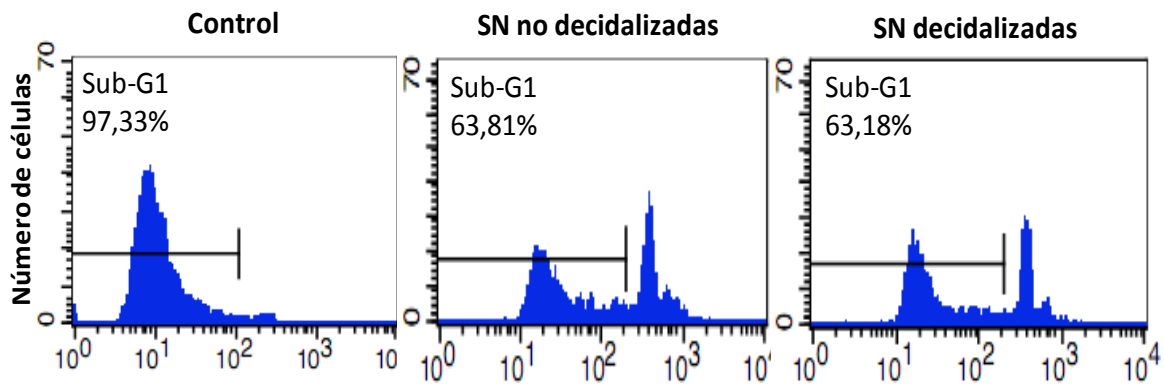


Figura 11. Sobrenadantes procedentes de DSC decidualizadas o no decidualizadas protegen a los linfocitos deciduales de la apoptosis espontánea. Linfocitos deciduales fueron cultivados durante 4 días en ausencia (control) o presencia de sobrenadantes (SN) procedentes de DSC no decidualizadas o decidualizadas. El porcentaje de células apoptóticas fue determinado por citometría de flujo mediante el análisis de la región sub-G1. La figura nos muestra un experimento representativo de dos realizados con sobrenadantes procedentes de diferentes líneas celulares y linfocitos de diferentes donadores.

2.2. Proliferación de linfocitos T y NK deciduales cultivados con células deciduales estromales

Con objeto de profundizar en el estudio de la relación entre linfocitos deciduales y DSC, analizamos el efecto en la proliferación de linfocitos al cultivarlos con DSC. Para medir la proliferación celular, los linfocitos NK y T deciduales purificados fueron marcados con la sonda fluorescente CFDA-SE a tiempo cero y se cultivaron en presencia o ausencia de DSC frescas del mismo donador durante 3 días. Como se observa en la figura 12, tanto los linfocitos NK como los T deciduales cultivados con DSC tuvieron una menor intensidad de

fluorescencia, y por tanto una mayor proliferación, que los linfocitos NK y T deciduales cultivados solos (control).

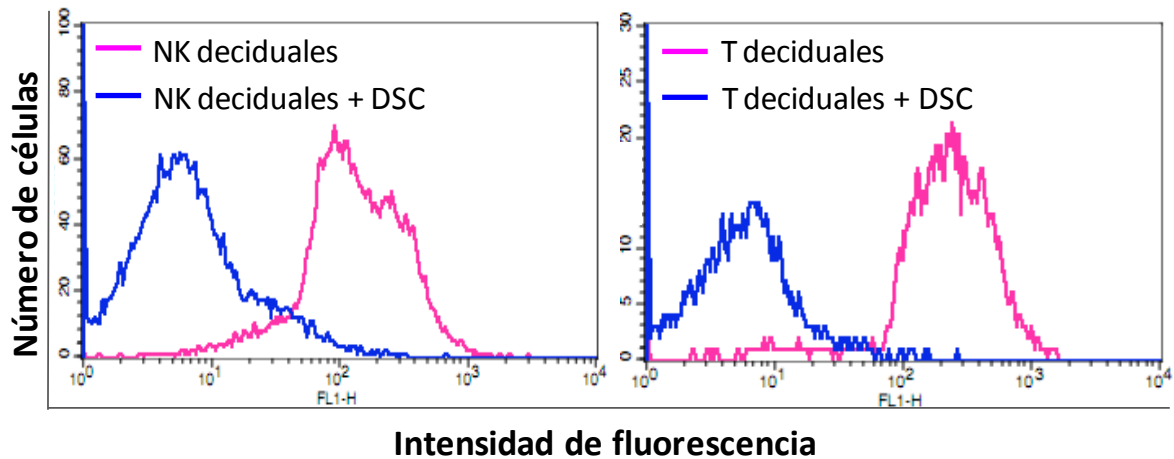


Figura 12. DSC producen un aumento en la proliferación de linfocitos T y NK deciduales. Ambos tipos de linfocitos purificados, fueron teñidos con CFDA-SE a tiempo cero, siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. A continuación, las células fueron cultivadas durante 3 días en ausencia o presencia de DSC frescas procedentes del mismo donador. La proliferación se midió determinando la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo. La figura muestra un experimento representativo de dos realizados con diferentes muestras de DSC y linfocitos.

2.3. Las células endometriales estromales favorecen la supervivencia de linfocitos T menstruales

Comprobada la capacidad de DSC para proteger de la apoptosis espontánea a los linfocitos periféricos y deciduales, decidimos estudiar si esta propiedad también la presentaban las ESC puesto que, como demostramos anteriormente, ambos tipos celulares son similares en muchas de las características estudiadas, como las relacionadas con su fenotipo antigénico y la parada o reducción de la proliferación en la decidualización, además de la capacidad para secretar PRL.

Para ello, co-cultivamos ESC con linfocitos T purificados procedentes de sangre menstrual, durante 4 días. Ambos tipos de células procedieron del mismo donante, para descartar posibles reacciones alogénicas. Las células ESC tuvieron

un efecto de protección sobre la apoptosis espontánea de linfocitos T menstruales, similar al anteriormente observado en DSC (Figura 13).

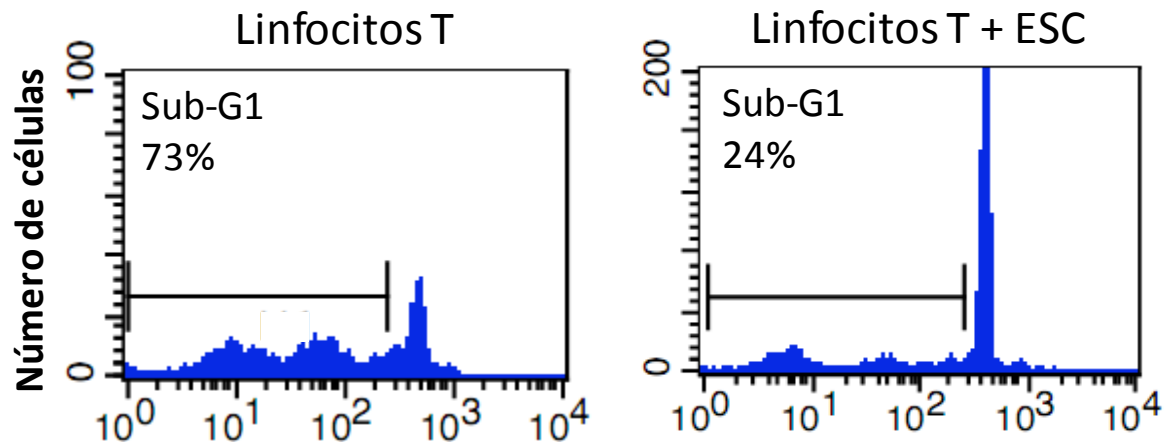


Figura 13. ESC protegen de la apoptosis espontánea a los linfocitos T. Linfocitos T procedentes de sangre menstrual fueron co-cultivados con ESC del mismo donante, durante 4 días, o fueron cultivados solos (control). El porcentaje de linfocitos apoptóticos fue determinado por citometría de flujo analizando la fase sub-G1 del ciclo celular. La figura muestra un experimento representativo de tres realizados con muestras de diferentes donantes.

2.4. Proliferación de linfocitos T menstruales cultivados con células endometriales estromales

Para continuar el estudio de la relación entre linfocitos y ESC, al igual que habíamos determinado con DSC, analizamos el efecto de ESC sobre la proliferación de linfocitos T procedentes de sangre menstrual del mismo donante para descartar la posibilidad de reacciones alogénicas. Los linfocitos T menstruales purificados fueron marcados con la sonda fluorescente CFDA-SE a tiempo cero, y se cultivaron en presencia o ausencia de ESC durante 3 días. Como se observa en la figura 14, los linfocitos T cultivados con ESC tuvieron una menor intensidad de fluorescencia y por tanto mayor proliferación que los linfocitos T cultivados solos (control).

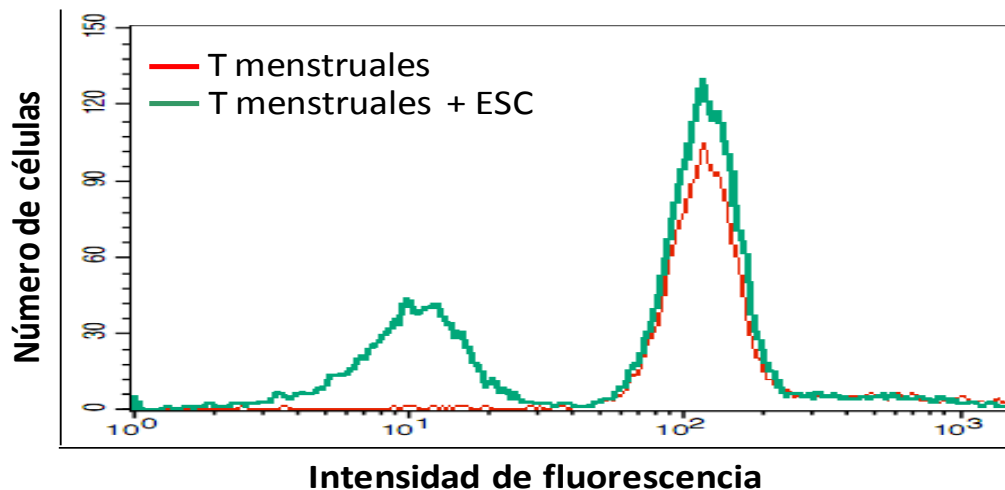


Figura 14. ESC producen un aumento en la proliferación de Linfocitos T menstruales. Linfocitos T purificados, fueron teñidos con CFDA-SE a tiempo cero, siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. A continuación, las células fueron cultivadas durante 3 días, en ausencia o presencia de ESC procedentes del mismo donador. La proliferación se midió determinando la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo. La figura muestra un experimento representativo de dos realizados con muestras de diferentes donantes.

2.5. Producción de IL-15 por células deciduales estromales y células endometriales estromales

La IL-15 es una citoquina con funciones similares a IL-2, como estimular la proliferación y activación de los linfocitos NK, aumentar su citotoxicidad e inducir la producción de citoquinas (Grabstein et al. 1994, Verma et al. 2000). A diferencia de la IL-2, IL-15 está presente en el endometrio y decidua normales, jugando un importante papel durante el embarazo y el ciclo menstrual (Okada et al. 2000) La IL-15 podría ser la responsable del incremento en la supervivencia y proliferación observados en los linfocitos co-cultivados con DSC o ESC Para determinar si esta citoquina era expresada por DSC y ESC y su posible regulación durante la decidualización, se estudió la capacidad de producir IL-15 en ambos tipos celulares y en diferentes condiciones de cultivo. Para ello, se cultivaron ESC y DSC durante 8 días en ausencia (control) o presencia de P4 y cAMP. Además, añadimos a este tratamiento E puesto que, como hemos demostrado anteriormente, la combinación de los tres factores aumentaba levemente la producción de PRL en las DSC.

Como se puede observar en la figura 15, las células DSC no decidualizadas secretaron bajos niveles de IL-15, a diferencia de las ESC, en las cuales no se observó ninguna producción. Ambos tipos celulares aumentaron la producción de IL-15 al decidualizarlas con P4 y cAMP, aunque niveles significativamente mayores fueron encontrados en DSC decidualizadas al compararlas con ESC decidualizadas. Además, cuando añadimos E al tratamiento, las DSC aumentó significativamente la producción de IL-15 con respecto al tratamiento con P4 y cAMP, mientras que las ESC mantuvieron el mismo nivel de secreción que el observado en ausencia de E.

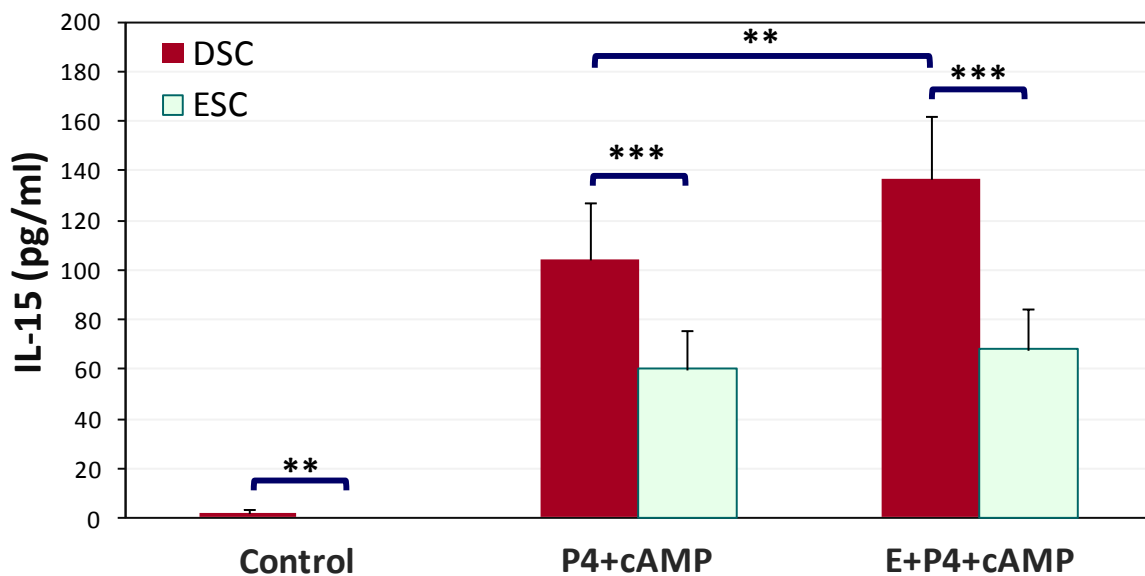


Figura 15. Producción de IL-15 por DSC y ESC. Ambos tipos de células fueron cultivadas en ausencia (control) o presencia de una combinación de P4 y cAMP o E, P4 y cAMP durante 8 días. La secreción de PRL se determinó mediante ELISA. Las barras de error corresponden a la SD de tres líneas independientes. La significación estadística se refiere a la comparación de DSC y ESC en iguales condiciones de cultivo, y a la comparación entre DSC con distintos tratamientos, ** $p < 0,01$ - $0,001$, *** $p < 0,001$.

3. INDUCCIÓN Y REGULACIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DECIDUALES ESTROMALES

3.1 Efecto sobre células deciduales estromales de diferentes agentes inductores de muerte celular por apoptosis

La decidua, cuya población más importante son las DSC, va disminuyendo su tamaño a medida que avanza el embarazo. La forma fisiológica de eliminación de células no funcionales es la muerte por apoptosis y, por esta razón, nos planteamos estudiar este fenómeno en las DSC. Comenzamos analizando su respuesta, de modo general, a diversos inductores de apoptosis. Para ello se incubaron las DSC en cultivo, durante 48 horas, con diferentes agentes inductores o reguladores de este proceso de muerte celular, como los compuestos PD 098059 (inhibidor de MEK), SP 699125 (inhibidor de JNK), SKF 86002 (inhibidor de p38MAPK), LY 294002 (inhibidor de PI3K), bisindolilmaleimida (inhibidor de PKC) y agonistas de ligandos de muerte como el anticuerpo anti-CD95, CH11. También analizamos el efecto de agentes genotóxicos, como doxorubicina y etopósido (inhibidores de la topoisomerasa II) y de nocodazol (inhibidor de la polimerización de microtúbulos), así como el de las drogas epigenéticas decitabine y zebularine, que inhiben a las DNA metiltransferasas, y ácido valproico, inhibidor de histona deacetilasas. Por último, analizamos el efecto de un inhibidor del proteosoma, bortezomib, y un inhibidor de la síntesis proteica, cicloheximida. Las concentraciones usadas de cada agente se eligieron en base a publicaciones previas y a su capacidad para sensibilizar a diferentes líneas tumorales. La apoptosis se determinó mediante citometría de flujo, analizando la fase sub-G1 del ciclo celular tras tinción con yoduro de propidio. Como se puede observar en la figura 16, las DSC fueron resistentes a todos los tratamientos estudiados, a excepción del bortezomib que provocó la inducción de apoptosis en aproximadamente un 15% de la población celular.

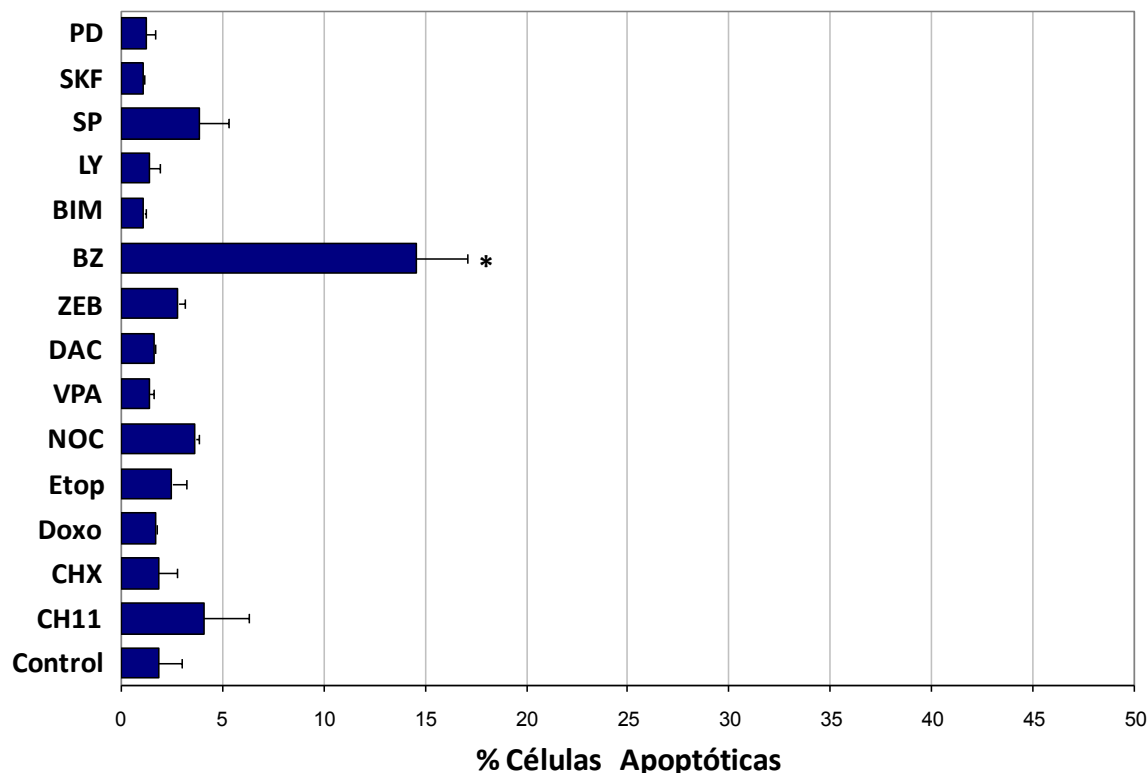


Figura 16. Apoptosis de DSC en respuesta al tratamiento con diferentes inductores. Células DSC fueron tratadas durante 48 horas con diferentes inductores de apoptosis: PD 098059 (50 μ M), SKF 86002 (10 μ M), SP 699125 (10 μ M), LY 294002 (10 μ M), bisindolilmaleimida (BIM) (6 μ M), bortezomid (BZ) (50 μ M), zebularine (ZEB) (100 μ M), decitabine (DAC) (5 μ M), ácido valproico (VPA) (1 mM), nocodazol (NOC) (400 ng/ml), etopósido (Etop) (10 μ M), doxorubicina (Doxo) (200 ng/ml), cicloheximida (CHX) (1 μ g/ml) y CH11 (100 ng/ml). La proporción de células en sub-G1 se determinó mediante citometría de flujo. Las barras de error corresponden a la SD de tres experimentos independientes, la significación estadística se refiere a las células tratadas con respecto al control sin tratamiento, * $p < 0,05$.

3.2. El proceso de decidualización induce apoptosis en células deciduales estromales

Una vez conocida la respuesta de DSC a diferentes inductores de apoptosis analizamos el efecto de la decidualización sobre la viabilidad de estas células. Para ello, DSC se mantuvieron en cultivo en presencia de P4 y cAMP durante un tiempo prolongado, 28 días. La apoptosis celular se determinó cada 7 días por citometría de flujo, analizando la fase sub-G1 del ciclo celular tras tinción con yoduro de propidio. Se pudo comprobar que las DSC iban muriendo

gradualmente por apoptosis, a medida que progresaba el tiempo de decidualización (Figura 17).

Para determinar si la muerte por apoptosis que habíamos detectado era debida a un efecto específico de la decidualización, o por el contrario se trataba de un efecto tóxico inespecífico de los agentes decidualizantes empleados, P4 y cAMP, analizamos el efecto de dichos agentes sobre otros modelos celulares. En concreto utilizamos una línea tumoral de cáncer de mama, SKBR3, y líneas celulares de FDC procedentes de cultivos primarios, células que, como se explicó en la introducción, tienen una estrecha relación con las DSC siendo capaces de producir PRL en presencia de P4 y cAMP aunque en cantidad mucho menor que la secretada por DSC. Estos dos tipos celulares se mantuvieron en cultivo en las mismas condiciones que las DSC.

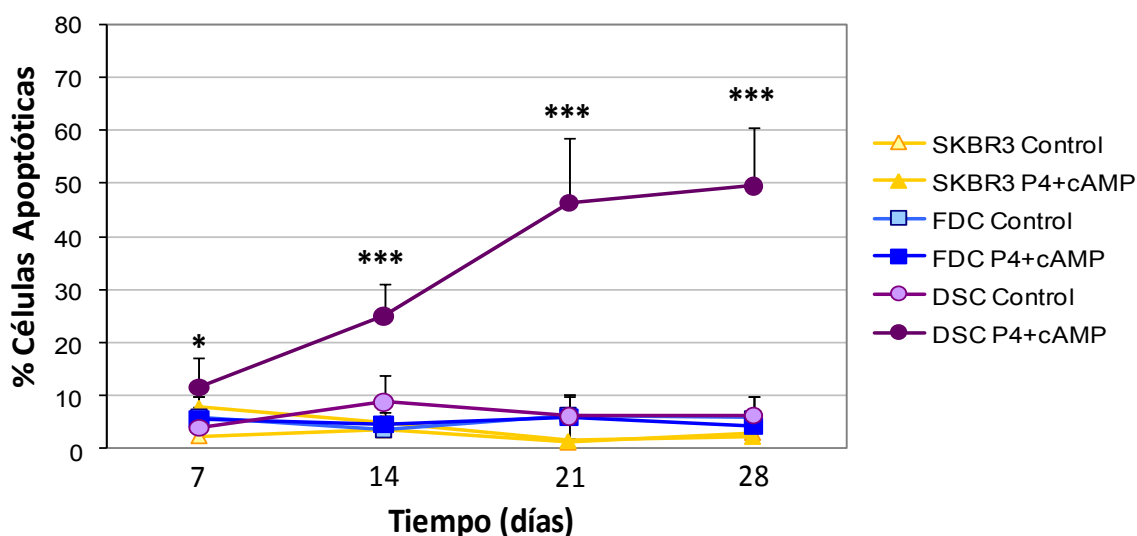


Figura 17. Efecto de la decidualización sobre la apoptosis de DSC, FDC y SKBR3. Células DSC, FDC y SKBR3 fueron tratadas con P4 y cAMP durante 28 días. La proporción de células apoptóticas en la fase sub-G1 del ciclo celular se determinó a los tiempos indicados mediante citometría de flujo. Las barras de error corresponden a la SD de tres experimentos independientes de diferentes líneas celulares, la significación estadística se refiere a las DSC decidualizadas con respecto a su control sin decidualizar a cada uno de los tiempos de determinación, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Como se puede observar en la figura 17, el tratamiento con P4 y cAMP no indujo apoptosis en FDC y SKBR3 a ninguno de los tiempos analizados, al contrario de lo que ocurría en DSC, indicando que la apoptosis podría ser un efecto específico, que acompaña al proceso de decidualización en DSC.

Con el objeto de estudiar qué factores usados en la decidualización de DSC podrían ser responsables de la inducción de la apoptosis observada, decidimos determinar la muerte celular inducida en estas células cuando se incuban solo con P4 o cAMP. Además, analizamos el efecto del E, solo y en combinación con P4 y cAMP. Por ello, las DSC fueron tratadas con P4, cAMP o E por separado, o con una combinación de P4 y cAMP o de E, P4 y cAMP durante 28 días. El análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo, realizado cada 7 días, demostró que ni P4 ni E por separado (Figura 18A) o en tratamiento simultáneo (datos no mostrados), eran capaces de inducir apoptosis en las células a ninguno de los tiempos en los cuales se determinó la muerte celular. Sin embargo, el cAMP por sí solo provocó apoptosis significativa a los 14, 21 y 28 días de tratamiento (Figura 18A). Además, la muerte celular fue aumentando gradualmente a medida que avanzaba el tiempo de cultivo, aunque este incremento solo fue estadísticamente significativo entre los 7 y 14 días de tratamiento (Figura 18B).

Como ya habíamos demostrado en el experimento anterior (Figura 18), cuando cultivamos las células en presencia de P4 y cAMP pudimos observar una inducción de apoptosis desde el día 7 de cultivo (Figura 18A) que fue incrementando significativamente con el tiempo de tratamiento hasta los 21 días de cultivo (Figura 18B). Sin embargo, a ninguno de los tiempos analizados encontramos que la apoptosis inducida por dicha combinación fuese significativamente más elevada que la inducida solo con cAMP, lo que sugiere que este factor es el responsable de la muerte por apoptosis de las DSC durante la decidualización, además de, como demostramos anteriormente, ser el responsable de la parada en la proliferación que observamos durante este proceso de diferenciación.

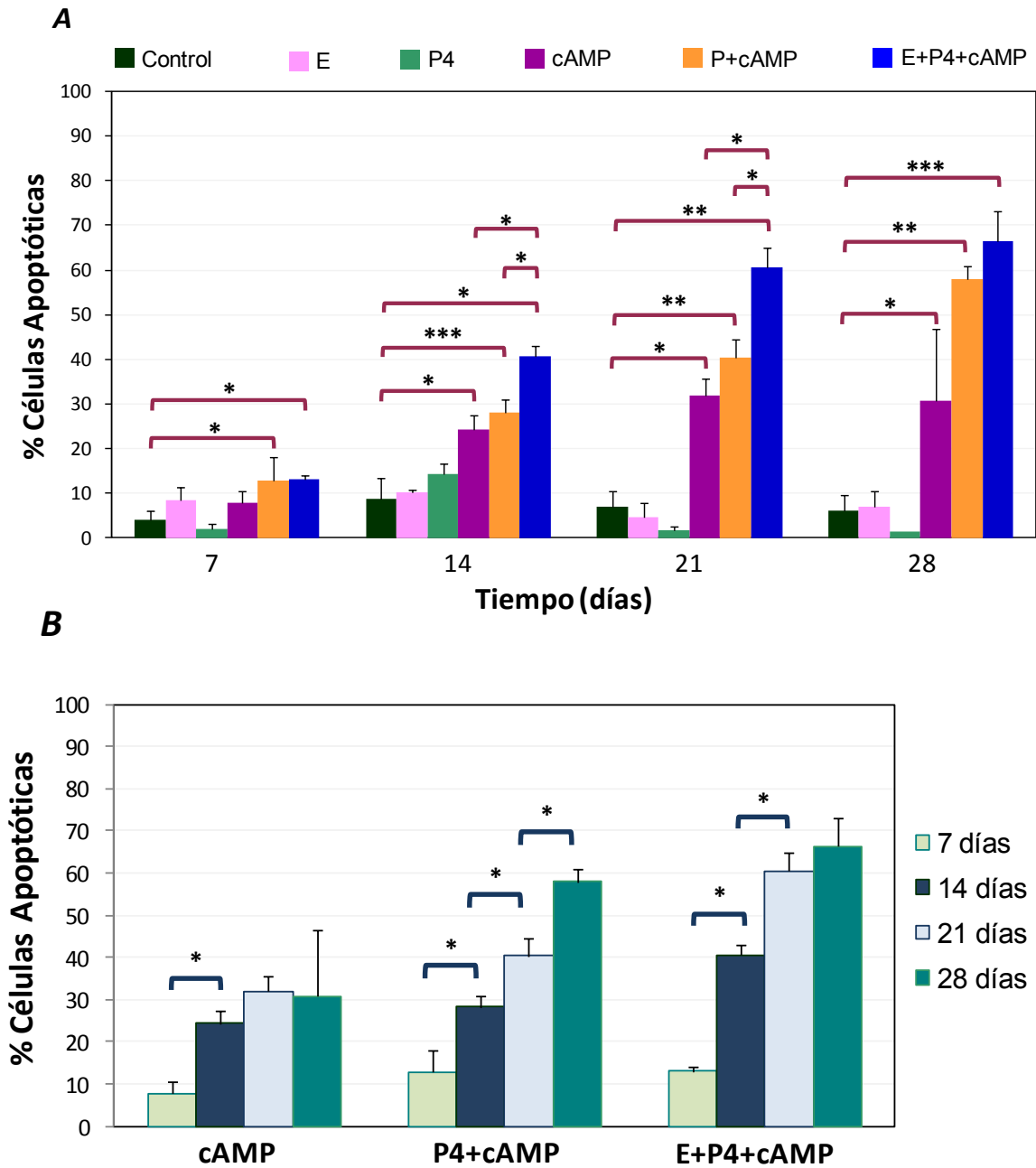


Figura 18. Apoptosis de DSC tratadas con factores que inducen decidualización. Células DSC fueron tratadas durante 28 días con P4, cAMP y E por separado, o de forma combinada. La proporción de células en sub-G1 se determinó mediante citometría de flujo, cada 7 días de tratamiento. En A se muestra la comparación estadística entre los diferentes tratamientos para cada tiempo de determinación. En B se representa la comparación estadística entre los diferentes tiempos de determinación para cada tratamiento. Las barras de error corresponden a la SD de tres experimentos independientes para diferentes líneas celulares, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Curiosamente, a pesar de que el E por sí solo no tiene ningún efecto, la inducción de apoptosis alcanzó niveles máximos en cada uno de los tiempos de determinación cuando deciduizamos las células combinando E, P4 y cAMP, produciéndose un incremento significativo con respecto al tratamiento con cAMP solo y con P4 y cAMP a los 14 y 21 días de cultivo (Figura 18A). Al igual que sucedió con P4 y cAMP, al añadir E al tratamiento la inducción de apoptosis fue aumentando significativamente con el tiempo de tratamiento hasta los 21 días de cultivo (Figura 18B).

3.3. Inducción de apoptosis en células endometriales estromales durante la deciduización

Como hemos descrito anteriormente, se encontraron similitudes entre DSC y ESC durante la diferenciación, especialmente en lo que se refiere a las variaciones en la morfología y la parada de proliferación. Del mismo modo que en objetivos anteriores comparamos las características morfológicas y fenotípicas de DSC y ESC o su efecto sobre linfocitos, quisimos también determinar y comparar la sensibilidad a la apoptosis que presentaban las ESC durante la deciduización, en relación con las DSC.

Para ello, las ESC fueron deciduizadas en las mismas condiciones que las DSC, con P4 y cAMP durante 28 días, determinando la muerte celular por apoptosis cada 7 días de tratamiento mediante citometría de flujo. Como se puede observar en la figura 19, la incubación con P4 y cAMP indujo apoptosis de forma significativa en las ESC a los 21 y 28 días de cultivo, pero no a tiempos más cortos, como sí ocurre en DSC. Además, los valores de inducción de apoptosis fueron significativamente mayores en DSC que en ESC a los días 21 y 28 lo que sugiere que la sensibilidad de estas últimas a la muerte celular durante la deciduización es mucho menor.

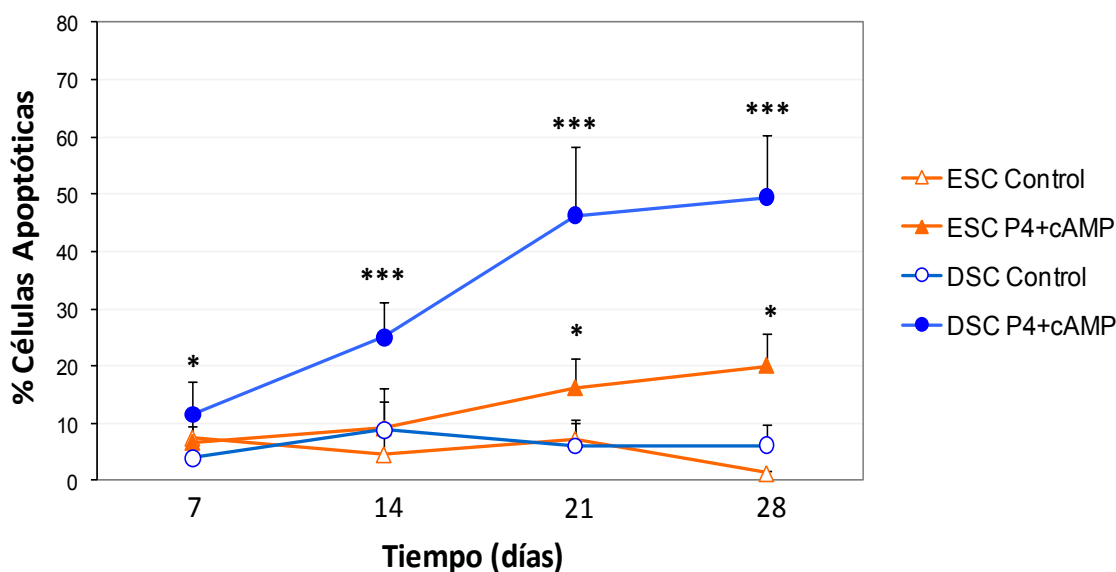


Figura 19. Efecto de la decidualización sobre la apoptosis de DSC y ESC. Células DSC y ESC fueron cultivadas en ausencia (control) o presencia de P4 y cAMP durante 28 días. La proporción de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo cada 7 días de tratamiento. Las barras de error corresponden a la SD de al menos tres experimentos independientes realizados con diferentes líneas celulares, la significación estadística se refiere a las DSC o ESC tratadas con respecto a su control sin tratar, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Además, se estudió el efecto del E sobre las ESC, al igual que se había determinado en DSC. Para ello cultivamos ESC con E solo, o bien combinado con P4 o con P4 y cAMP. Las células cultivadas en ausencia de cAMP, es decir, con E o con P4 y E, no presentaron un aumento de muerte celular con respecto al control (Figura 20), al igual que ocurría con las DSC (Figura 18). Sin embargo, la presencia de E junto con P4 y cAMP produjo un incremento importante de la muerte celular en ESC desde los 14 días de tratamiento, aunque solo estadísticamente significativo con respecto a las células control, sin tratamiento, a los días 21 y 28. Al comparar estos resultados con los obtenidos en ESC cultivadas solo con P4 y cAMP, se observó un incremento significativo en la inducción de apoptosis a los 21 días de cultivo derivado de la presencia de E (Figura 20).

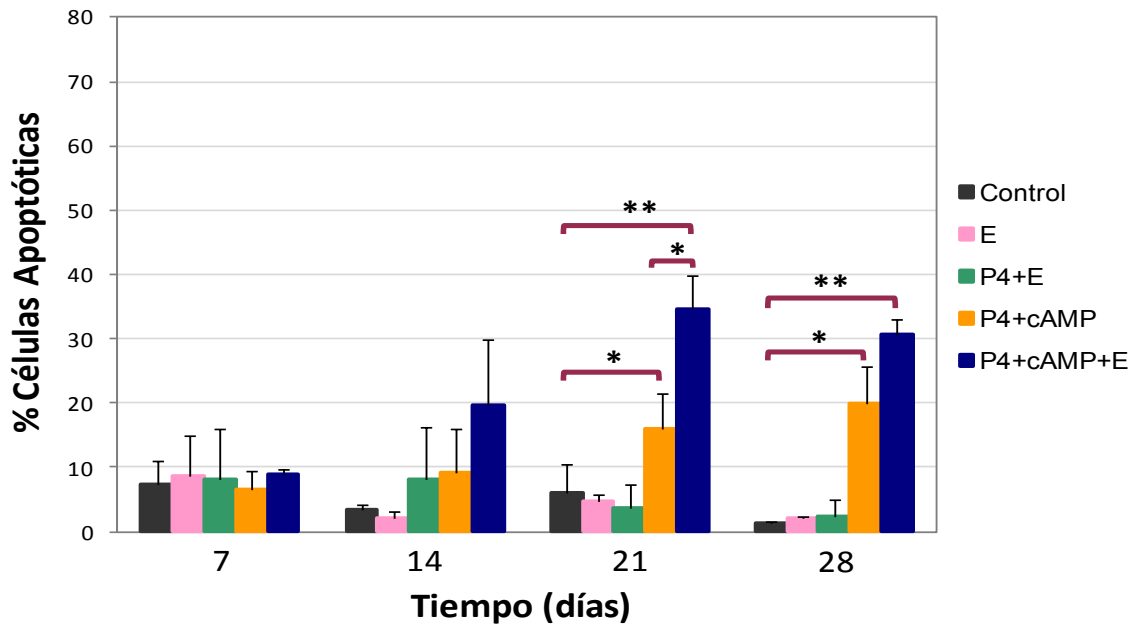


Figura 20. Apoptosis de ESC tratadas con factores que inducen decidualización. Células ESC fueron tratadas durante 28 días con E, P4 y E, P4 y cAMP o E, P4 y cAMP. La proporción de células en sub-G1 se determinó mediante citometría de flujo, cada 7 días de tratamiento. Las barras de error corresponden a la SD de tres experimentos independientes con diferentes líneas celulares, la significación estadística nos muestra la comparación entre los diferentes tratamientos para cada tiempo de determinación, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01-0,001$.

3.4. Estudio de la expresión y activación de factores implicados en la inducción de apoptosis en células deciduales estromales

A fin de comprender el mecanismo implicado en la muerte celular por apoptosis en DSC durante el proceso de decidualización, estudiamos la expresión y activación de caspasas y diferentes proteínas pro- y anti-apoptóticas en DSC y en DSC decidualizadas. Para ello, tratamos las DSC en cultivo con P4 y cAMP durante 28 días, determinando el nivel de expresión de dichas proteínas cada 7 días, mediante Western-blot.

3.4.1. Activación de caspasas

Para determinar que caspasas se activaban durante la decidualización de DSC y orientarnos de este modo sobre la posible ruta de inducción de apoptosis,

analizamos la expresión de estas proteínas, concretamente de las caspasas-3, -8 y -9.

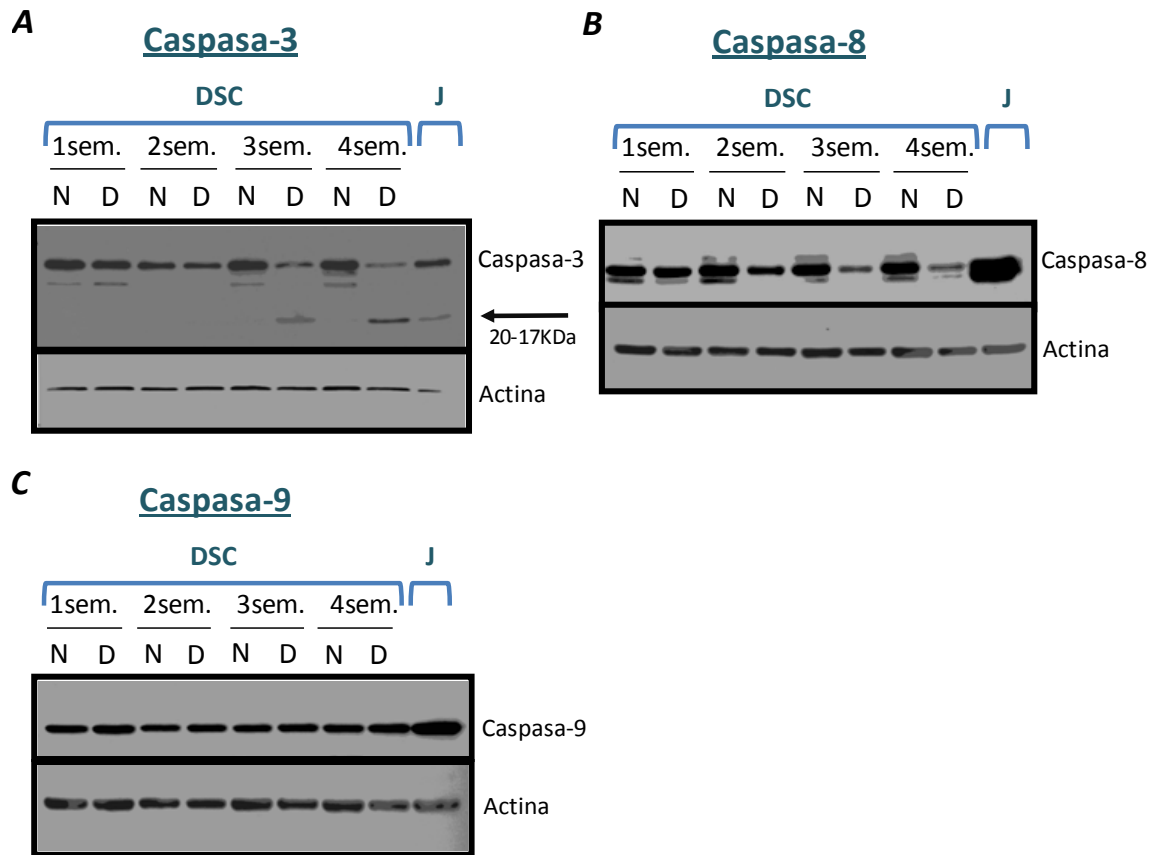


Figura 21. Determinación de caspasas-3, -8 y -9 en DSC. Células DSC fueron tratadas en presencia de P4 y cAMP (decidualizadas, D) o en ausencia (no decidualizadas, N) durante 28 días. Los niveles de expresión de las distintas caspasas se determinaron cada 7 días de tratamiento, mediante western-blot y utilizando los anticuerpos apropiados. Células Jurkat (J) se utilizaron como control de expresión de caspasas. La cantidad de proteína cargada en cada muestra se comparó determinando los niveles de β -actina. La figura nos muestra un experimento representativo de tres realizados con diferentes líneas celulares.

Como se puede observar en la figura 21A, el nivel de expresión de **caspasa-3** permaneció sin cambios en los primeros 14 días, tanto en células DSC controles (no decidualizadas) como en las tratadas con P4 y cAMP. Sin embargo, se produjo una disminución de la expresión en las células decidualizadas, con respecto a las controles, a los 21 y 28 días, pudiendo detectarse además la forma cortada y por tanto la activación de esta caspasa. Como control de la expresión de caspasas usamos células Jurkat (Figura 21).

Con respecto a la **caspasa-8**, la cual se activa en la ruta extrínseca de apoptosis, encontramos en las células decidualizadas una disminución, en comparación con los niveles de expresión de DSC indiferenciadas. Dicho detrimento se observó desde los 14 días hasta el final del tratamiento, y suponemos que se debe a la fragmentación y activación de la misma, aunque la forma cortada no fue detectada en las DSC decidualizadas (Figura 21B).

En cuanto a la **caspasa-9**, implicada en la ruta intrínseca de inducción de apoptosis, no se encontraron cambios en la proteína intacta, al comparar los niveles de expresión que presentaron las células tratadas y las DSC controles. Además, tampoco se detectó el corte de la caspasa-9 en ninguno de los tiempos de determinación (Figura 21C).

3.4.2. Proteínas anti-apoptóticas

Como proteínas que inhiben la apoptosis estudiamos los posibles cambios en los niveles de expresión de c-FLIP, XIAP y Bcl-x_L.

c-FLIP_L interfiere en la activación de las caspasas-8 y-10, inhibiendo así la apoptosis. Como se puede observar en la figura 22A, las células decidualizadas mostraron una pérdida de c-FLIP_L con respecto a sus respectivos controles. Esta disminución se observó desde la primera determinación, a los 7 días de tratamiento, hasta la última, a los 28 días.

Con respecto a **XIAP**, el cual lleva a cabo su función anti-apoptótica evitando la actividad de las caspasas -3, -7 y -9, al decidualizar las DSC pudimos observar una pérdida de esta proteína en comparación con los niveles de expresión en células indiferenciadas, al igual que ocurrió con c-FLIPL, aunque su detrimento se detectó a partir de los 14 días de tratamiento hasta el final del mismo (Figura 22B).

Por último, el estudio de **Bcl-x_L**, que inhibe la apoptosis gracias a su capacidad para formar heterodímeros con Bax y Bak, nos mostró una leve disminución de esta proteína en DSC diferenciadas a partir de los 7 días de tratamiento, aunque su cambio más notable se detectó a los 28 días de decidualización (Figura 22C).

Además estudiamos otras proteínas anti-apoptóticas, como **Bcl-2** y **ciAP-2**, aunque no detectamos su expresión ni en DSC controles ni en DSC decidualizadas.

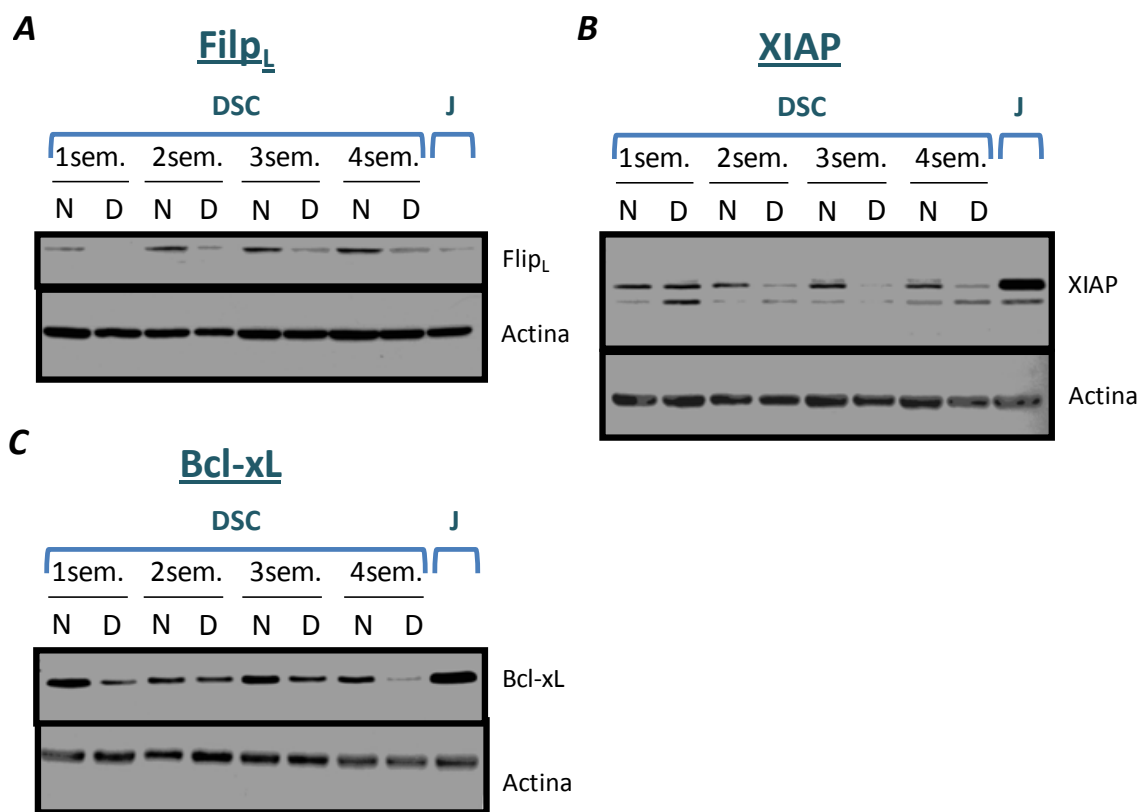


Figura 22. Determinación de proteínas anti-apoptóticas en DSC. Células DSC fueron decidualizadas con P4 y cAMP (D) o no tratadas (N) durante 28 días. Los niveles de expresión de las distintas proteínas indicadas se determinaron, mediante western-blot, cada 7 días de tratamiento. Células Jurkat (J) se utilizaron como control de expresión de dichas proteínas. La cantidad de proteína cargada en cada muestra se comparó determinando los niveles de β -actina. La figura nos muestra un experimento representativo de tres realizados con diferentes líneas celulares.

3.4.3. Proteínas pro-apoptóticas

Entre las proteínas que inducen apoptosis se determinaron los niveles de expresión tanto en DSC no decidualizadas como en DSC decidualizadas de Bim, Bid, Apaf-1 y Bax.

Al analizar **Bim**, proteína pro-apoptótica "BH3-only" de la familia de Bcl-2, encontramos que en DSC decidualizadas se producía un aumento de esta proteína con respecto a las células DSC no tratadas, en las cuales se detectó un nivel bajo de expresión. Como se observa en la Figura 23A, el incremento de Bim ocurrió desde la primera determinación, realizada a los 7 días de tratamiento, hasta la última, a los 28 días.

En el caso de **Bid**, también proteína "BH3-only", observamos una disminución en los niveles de expresión de esta proteína en DSC decidualizadas, al compararlas con las células no diferenciadas, en cada uno de los tiempos determinados (Figura 23B). Esta pérdida podría deberse a una regulación negativa de su expresión, pero también a que la proteína se esté cortando y activando, como consecuencia de la activación de caspasa-8, aunque no se detectó la forma fragmentada.

Los niveles de las otras dos proteínas pro-apoptóticas estudiadas, Bax y Apaf-1, que participan en la ruta intrínseca o mitocondrial, también disminuyeron en las células decidualizadas. En el caso de **Bax**, proteína implicada en la permeabilización de la membrana mitocondrial, la disminución en los niveles de expresión en DSC decidualizadas con respecto a las células no decidualizadas se observó a partir del día 21, (Figura 23C) mientras que en el de **Apaf-1**, uno de los componentes del apoptosoma, se apreció un ligero detrimento en células diferenciadas a los 14 días, que continuó a medida que avanzaba el tratamiento, haciéndose más evidente a los 21 y 28 días de cultivo (Figura 23D).

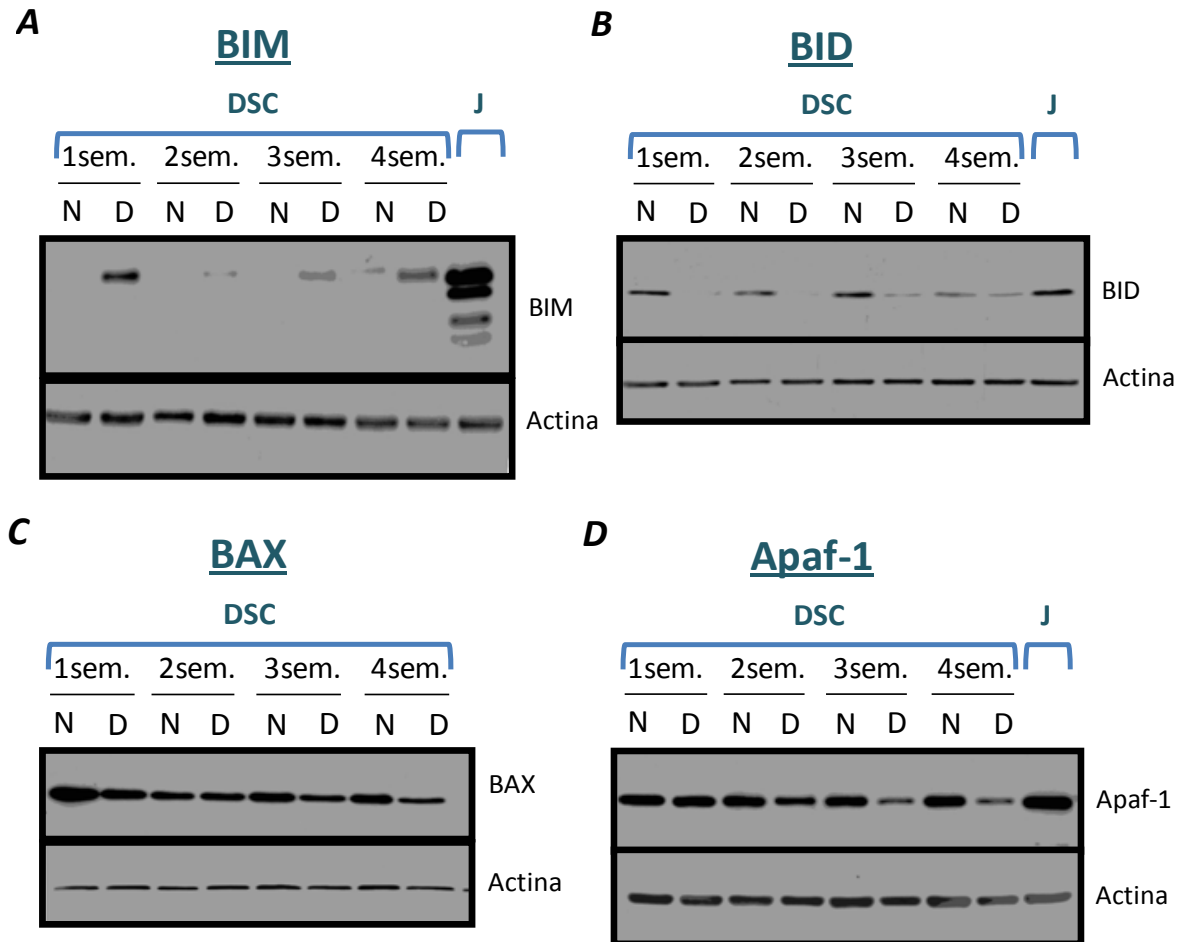


Figura 23. Determinación de proteínas pro-apoptóticas en DSC. Células DSC fueron decidualizadas con de P4 y cAMP (D) o no tratadas (N) durante 28 días. Los niveles de expresión de las distintas proteínas se determinaron cada 7 días de tratamiento mediante Western-blot. Células Jurkat (J) se utilizaron como control de expresión. La cantidad de proteína cargada en cada muestra, se comparó determinando los niveles de β -actina. La figura nos muestra un experimento representativo de Itres realizados con diferentes líneas celulares.

Además de los niveles de expresión de todas las proteínas pro-apoptóticas mencionadas, analizamos la activación de **Bak** mediante citometría de flujo, utilizando un anticuerpo específico que detecta la forma activada de la proteína. Las DSC se trataron con P4 y cAMP durante 14 días, y se determinó la activación de Bak a los 7 y 14 de tratamiento. Como se observa en la figura 24 no se produjeron variaciones en el porcentaje de expresión de BAK, ni por tanto en la activación de esta proteína en células decidualizadas, con respecto a las células indiferenciadas.

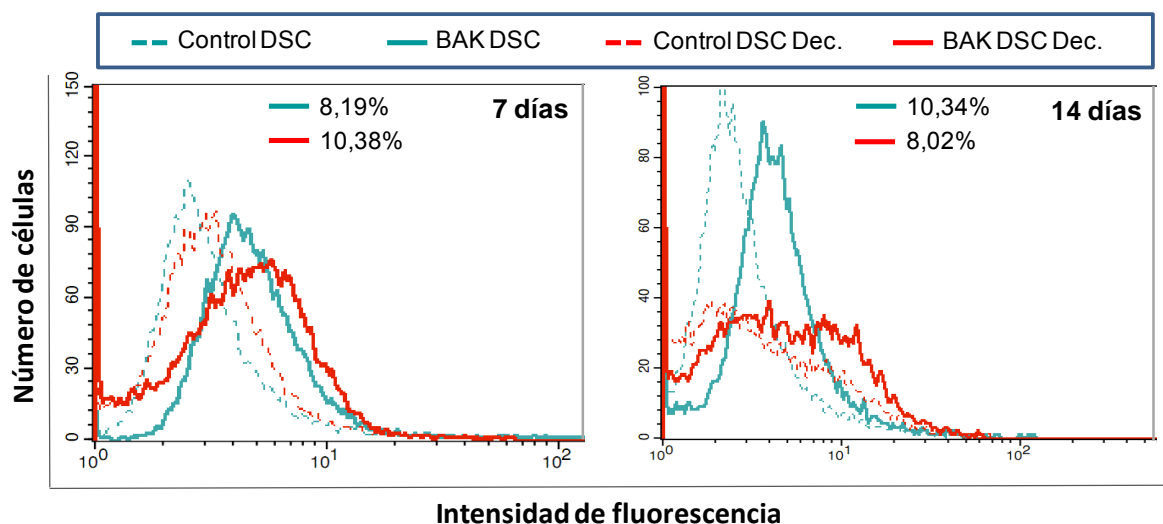


Figura 24. La decidualización de DSC no induce la activación de BAK. Células DSC fueron decidualizadas (DSC Dec.) con P4 y cAMP, durante 7 y 14 días, o no recibieron ningún tratamiento (DSC). La activación de Bak se determinó mediante citometría de flujo, siguiendo el protocolo descrito en el apartado de Materiales y Métodos. La intensidad de fluorescencia con el anticuerpo anti-Bak de células tratadas y sin tratar se analizó en cada caso con respecto al basal de fluorescencia del anticuerpo secundario (línea punteada, control). La figura nos muestra un experimento representativo de los tres que se realizaron con diferentes líneas celulares.

3.4.4. Expresión de genes implicados en la inducción de apoptosis

Para ampliar el estudio sobre los posibles genes relacionados con la apoptosis en células DSC decidualizadas y comprender mejor el mecanismo implicado en la inducción de apoptosis durante la decidualización, realizamos un array de PCR utilizando un Kit que permite determinar la expresión de 84 genes diferentes que están implicados en el proceso de muerte celular. Dicho array lo llevamos a cabo sobre células DSC tratadas con P4 y cAMP durante 18 días, en comparación con DSC no tratadas. Se eligió este tiempo de determinación ya que, como hemos demostrado anteriormente, entre los 14 y 21 días se producía el mayor incremento de apoptosis.

El resultado de la expresión de los genes analizados se representa en la tabla 1 y en la figura 25 en forma de barras. Este resultado es la media de dos experimentos independientes. De los 84 genes que se analizaron, encontramos un incremento en la expresión en ABL1, BAG1, Bcl-2, BCL2A1, BCL2L11 (Bim),

BIRC3 (cIAP-2), caspasa-5, CD40, CFLAR (cFILP), GADD45A, NOL3 (ARC), TNFRSF10A (DR4), TNFRSF11B (osteoprotegerina, OPG), TNFRSF25 (APO-3), TNFSF10 (TRAIL) y TRADD, en respuesta al tratamiento con P4 y cAMP. También observamos una disminución en la expresión de Apaf-1, BCL10, BCLAF1, caspasa-1, caspasa-3, HRK (Harakiri), LTBR, PYCARD (ASC), TNFRSF21 (DR6) y TP53. Los cambios en la expresión de estos genes, tanto incrementos como detrimentos, fueron de más de dos veces con respecto a la expresión del gen en las células control.

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

GEN	ND		D		D/ND	P
	MEDIA C _t	SD	MEDIA C _t	SD		
ABL1	27,90	0,00	24,92	0,01	6,68	0,0086
AKT1	26,91	0,00	26,42	0,70	1,18	0,4313
APAF1	26,90	0,00	27,91	0,01	-2,39	0,0402
BAD	29,42	0,70	28,43	0,71	1,68	0,3073
BAG1	31,90	0,01	30,40	0,71	2,38	0,0382
BAG3	25,40	0,71	25,40	0,70	-1,18	0,7091
BAG4	27,92	0,01	27,91	0,00	-1,18	0,4443
BAK1	28,90	0,00	29,41	0,71	-1,69	0,0950
BAX	24,90	0,01	25,40	0,71	-1,68	0,0963
BCL10	26,90	0,00	27,90	0,01	-2,38	0,0388
BCL2	33,41	0,70	28,41	6,36	26,98	0,4240
BCL2A1	33,95	1,49	31,41	0,71	4,89	0,1674
BCL2L1 (BclxL)	27,90	0,00	27,90	1,42	-1,19	0,7744
BCL2L10	32,41	0,72	32,40	0,70	-1,18	0,7120
BCL2L11 (Bim)	30,93	0,03	26,94	0,00	13,42	0,0044
BCL2L2	28,90	0,00	27,89	0,00	1,69	0,0934
BCLAF1	27,90	0,01	28,91	0,00	-2,38	0,0380
BFAR	26,90	0,00	26,91	0,01	-1,19	0,4014
BID	28,90	0,02	29,40	0,71	-1,67	0,0988
BIK	35,00	0,00	35,00	0,00	-1,19	0,4276
NAIP	28,91	0,00	28,90	0,00	-1,18	0,4341
BIRC2	26,37	0,76	26,90	0,01	-1,72	0,3239
BIRC3 (cIAP-2)	32,95	2,89	31,40	0,71	2,47	0,6105
XIAP	27,91	0,02	27,41	0,71	1,19	0,4209
BIRC6	27,93	0,02	28,44	0,73	-1,69	0,1039

GEN	ND		D		D/ND	P
	MEDIA C _t	SD	MEDIA C _t	SD		
BIRC8	35,00	0,00	35,00	0,00	-1,19	0,4276
BNIP1	29,92	0,01	29,40	0,71	1,20	0,4001
BNIP2	25,93	0,00	25,94	0,03	-1,19	0,4526
BNIP3	25,91	0,00	24,92	0,00	1,67	0,0966
BNIP3L	24,91	0,00	24,41	0,71	1,19	0,7716
BRAF	31,93	0,01	31,42	0,71	1,20	0,4073
NOD1	32,41	0,71	32,40	0,70	-1,19	0,7072
CARD6	30,91	0,02	29,92	0,00	1,67	0,0979
CARD8	32,40	0,71	32,41	0,71	-1,19	0,7025
CASP1	25,91	0,02	26,92	0,00	-2,38	0,0376
CASP10	32,39	0,70	32,39	0,70	-1,18	0,7029
CASP14	35,00	0,00	35,00	0,00	-1,19	0,4276
CASP2	28,91	0,00	29,41	0,71	-1,68	0,0961
CASP3	26,92	0,01	28,41	0,71	-3,34	0,0206
CASP4	26,91	0,00	26,90	0,00	-1,19	0,4310
CASP5	34,95	0,07	31,90	0,00	6,97	0,0083
CASP6	27,93	0,01	29,43	0,72	-3,37	0,0207
CASP7	28,90	0,00	28,40	0,70	1,19	0,4078
CASP8	33,92	0,01	33,92	0,01	-1,19	0,4314
CASP9	29,39	0,71	28,40	0,70	1,68	0,3143
CD40	33,40	2,11	30,91	1,42	4,74	0,3130
CD40LG	35,00	0,00	35,00	0,00	-1,19	0,4276
CFLAR (cFlip)	27,90	0,01	26,41	0,71	2,37	0,0388
CIDEA	35,00	0,00	35,00	0,00	-1,19	0,4276
CIDEB	30,93	0,02	31,44	0,71	-1,69	0,0957
CRADD	27,90	0,01	26,91	0,01	1,68	0,0924
DAPK1	32,40	0,71	32,91	2,81	-1,70	0,7151
DFFA	28,90	0,01	28,91	0,00	-1,19	0,4204
FADD	28,90	0,00	27,90	0,02	1,68	0,0880
FAS	24,93	0,01	25,43	0,71	-1,68	0,0996
FASLG	35,00	0,00	35,00	0,00	-1,19	0,4276
GADD45A	29,92	0,00	27,93	0,02	3,35	0,0181
HRK	28,39	0,71	32,90	0,00	-27,10	0,0133
IGF1R	26,41	0,71	25,91	0,01	1,19	0,6970
LTA	35,00	0,00	35,00	0,00	-1,19	0,4276
LTBR	24,93	0,02	26,94	4,25	-4,78	0,4985
MCL1	23,91	0,00	23,91	0,01	-1,19	0,4236
NOL3 (ARC)	27,91	0,01	26,42	0,71	2,37	0,0380
PYCARD (ASC)	26,41	0,71	27,91	0,00	-3,37	0,0915
RIPK2	27,40	0,70	26,90	0,01	1,19	0,6929
TNF	34,96	0,06	35,00	0,00	-1,22	0,3748
TNFRSF10A (DR4)	31,91	0,00	29,41	0,71	4,77	0,0125
TNFRSF10B	25,91	0,00	25,41	0,71	1,19	0,4201

GEN	ND		D		D/ND	P
	MEDIA C _t	SD	MEDIA C _t	SD		
TNFRSF11B (OPG)	26,40	0,71	20,91	0,00	38,00	0,0116
TNFRSF1A	32,93	0,00	31,92	1,40	1,70	0,4096
TNFRSF21 (DR6)	25,41	0,69	26,91	0,01	-3,35	0,0879
TNFRSF25 (APO-3)	33,90	0,00	32,41	0,72	2,37	0,0405
CD27	34,40	0,71	34,45	0,78	-1,23	0,6680
TNFRSF9	34,95	0,07	34,95	0,07	-1,19	0,3540
TNFSF10 (TRAIL)	34,91	0,00	29,91	0,01	26,94	0,0029
CD70	35,00	0,00	35,00	0,00	-1,19	0,4276
TNFSF8	35,00	0,00	35,00	0,00	-1,19	0,4276
TP53	26,40	0,71	27,90	0,00	-3,36	0,0913
TP53BP2	28,90	0,01	28,91	0,00	-1,19	0,4255
TP73	35,00	0,00	35,00	0,00	-1,19	0,4276
TRADD	28,40	0,71	26,91	0,01	2,38	0,1580
TRAF2	29,40	0,69	29,40	0,71	-1,18	0,7076
TRAF3	27,41	0,71	27,41	0,71	-1,19	0,7027
TRAF4	25,91	0,01	26,41	0,71	-1,68	0,0971

Los valores mostrados en las cuatro primeras columnas corresponden a la media de Ct y la desviación estándar (SD) de las dos líneas analizadas, tanto de células no decidualizadas (ND) como de decidualizadas con P4 y cAMP durante 18 días (D). La columna D/ND representa la relación entre la expresión de los genes en DSC decidualizadas (D) y no decidualizadas (ND), calculada mediante la fórmula $2^{-\Delta C_t}$, y la columna P la significación estadística de dicha relación. . En gris claro se marcan aquellos genes para los que la relación D/ND es >2 pero no es estadísticamente significativa. En gris oscuro se resaltan los genes cuya variación en la expresión es >2 presentando significación estadística ($p < 0,05$).

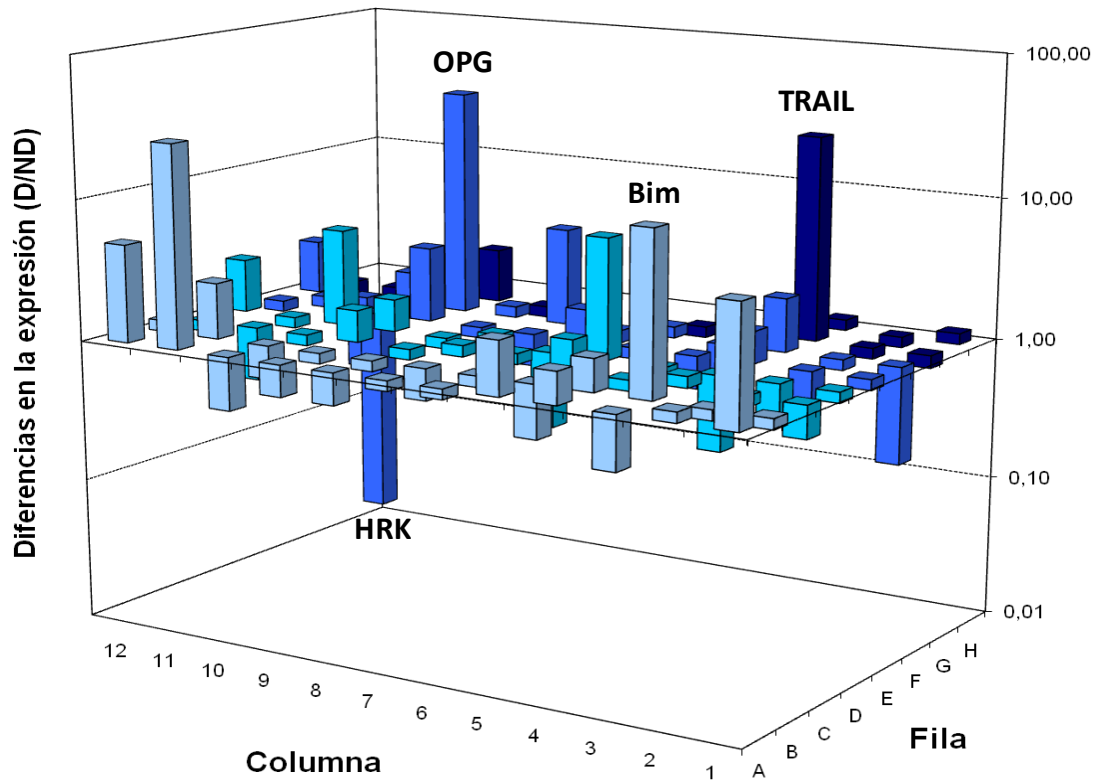


Figura 25. Array de genes en DSC en respuesta a la decidualización. La figura muestra una representación gráfica de los valores mostrados en la tabla 1. Los resultados, expresados como la relación entre la expresión de los genes en las células tratadas (D) y en las células control (ND) se representan en forma de barras. Se indican los genes cuyas variaciones son más destacables.

3.5. Efecto sobre células deciduales estromales decidualizadas de diferentes agentes inductores de apoptosis

Del mismo modo que estudiamos la sensibilidad a la apoptosis que presentan las DSC no decidualizadas frente a diferentes inductores de apoptosis e inhibidores de las rutas de MAPKs, decidimos estudiar la respuesta de las DSC decidualizadas a estos mismos tratamientos dado que, como demostramos anteriormente, están sufriendo apoptosis a medida que aumenta el tiempo de decidualización y se están produciendo cambios en los niveles de expresión de sus proteínas pro- y anti-apoptóticas, lo que podría modificar su sensibilidad a la muerte celular inducida por dichos estímulos. Con este fin, las DSC fueron diferenciadas previamente con P4 y cAMP, durante 18 días. A continuación, se

trataron otras 48 horas solamente con medio de decidualización (control) o adicionando además los agentes anteriormente mencionados.

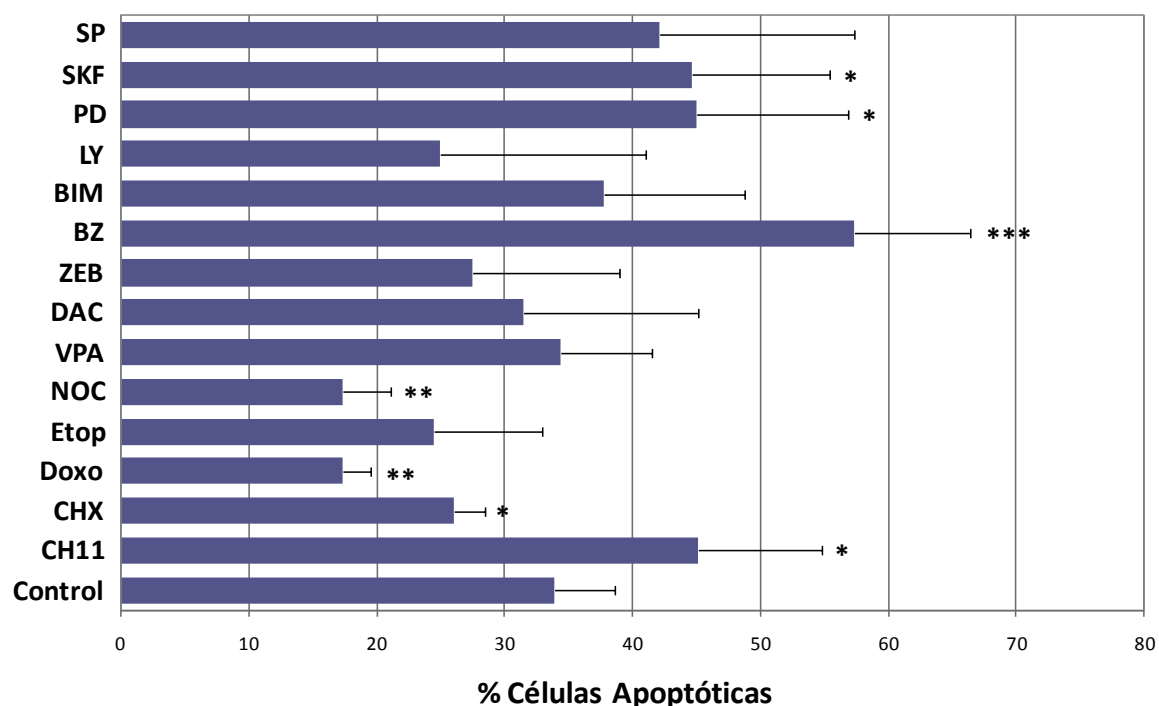


Figura 26. Apoptosis de DSC decidualizadas en respuesta al tratamiento con diferentes agentes inductores. Células DSC fueron tratadas durante 18 días con P4 y cAMP. Tras este tiempo se incubaron de nuevo durante 48 horas con P4 y cAMP en ausencia (control) o en presencia de diferentes inductores de apoptosis: PD 098059 (50 μ M), SKF 86002 (10 μ M), SP 699125 (10 μ M), LY 294002 (10 μ M), bisindolilmaleimida (BIM) (6 μ M), bortezomid (BZ) (50 nM), zebularine (ZEB) (100 μ M), decitabine (DAC) (5 μ M), ácido valproico (VPA) (1 mM), nocodazol (NOC) (400 ng/ml), etopósido (Etop) (10 μ M), doxorubicina (Doxo) (200 ng/ml), cicloheximida (CHX) (1 μ g/ml) y CH11 (100 ng/ml). La proporción de células en sub-G1 se determinó mediante citometría de flujo. Las barras de error corresponden a la SD de al menos tres experimentos independientes con diferentes líneas celulares. La significación estadística se refiere a cada tratamiento con respecto al control de células decidualizadas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01-0,001$, *** $p < 0,001$.

Como se puede observar en la figura 26, al igual las que DSC no diferenciadas (Figura 16), las células decidualizadas fueron susceptibles al tratamiento con bortezomid, inhibidor del proteosoma. Además, se observó un incremento significativo en la proporción de células en apoptosis tras el tratamiento con el anticuerpo anti-CD95, CH11, y con algunos inhibidores de MAPKs, en concreto con el PD 098059 (inhibidor de MEK) y el SKF 86002 (inhibidor de p38MAPK). Sin embargo, observamos una disminución de la apoptosis con respecto al control

al tratar las DSC decidualizadas con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica. Detectamos también una reducción significativa del porcentaje de células en apoptosis tras el tratamiento con doxorrubicina, agente intercalante que inhibe la acción de la topoisomerasa II y detiene de este modo el proceso de replicación. Valores similares en la inhibición de apoptosis se observaron con el inhibidor de la polimerización de microtúbulos, nocodazol. Los demás inductores de apoptosis estudiados no tuvieron ningún efecto sobre la apoptosis basal de las células decidualizadas.

3.5.1. Expresión de CD95 (Fas) en DSC

Con objeto de determinar si las diferencias encontradas en la sensibilidad al anticuerpo agonista CH11 entre las células decidualizadas y no decidualizadas se debían a diferencias en los niveles de expresión del receptor CD95, analizamos la expresión de dicho receptor en células no diferenciadas y en DSC decidualizadas durante 20 días.

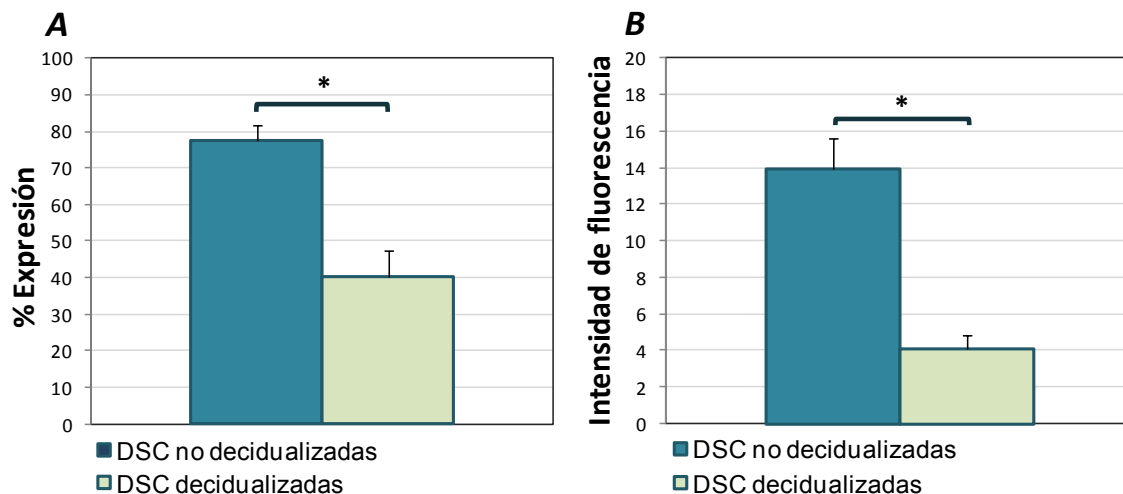


Figura 27. Expresión de CD95 en DSC y DSC decidualizadas. DSC fueron cultivadas solas (no decidualizadas) o en presencia de P4 y cAMP (decidualizadas) durante 20 días. La expresión de CD95 se determinó por citometría de flujo. Se muestran los datos de porcentaje de expresión (A) y de intensidad de fluorescencia (B). Las barras de error corresponden a la SD de tres experimentos independientes con diferentes líneas celulares. La significación estadística se refiere a las células tratadas con respecto al control, *p<0,05.

Como se puede observar en la figura 27, las células no decidualizadas presentaron una expresión superior al 75% de CD95, que se vio reducida de forma muy significativa tanto en porcentaje como en intensidad cuando las células fueron decidualizadas. Paralelamente, las células fueron tratadas con CH11 durante 4 días, para demostrar que las células decidualizadas, pero no las indiferenciadas, se estaban muriendo por apoptosis (datos no mostrados).

3.6. Inducción de apoptosis por sobrenadantes de cultivo de células deciduals estromales decidualizadas

Para profundizar en la causa de la inducción de apoptosis nos planteamos si las DSC, al decidualizarse, secretaban algún factor al medio que fuera responsable o pudiera contribuir a la apoptosis de dichas células durante este proceso de diferenciación.

A fin de comprobar esta hipótesis, se recogió el sobrenadante procedente de células DSC decidualizadas con P4 y cAMP durante 18 días, tiempo en el cual las células ya han entrado en apoptosis. El sobrenadante se incubó durante 4 días con células no decidualizadas. A continuación, se determinó el porcentaje de células apoptóticas por citometría de flujo. Como se puede observar en la figura 28, encontramos alrededor de un 30% de células no decidualizadas apoptóticas en el cultivo con sobrenadantes. Para comprobar que la muerte celular no se debía al remanente de P4 y cAMP que pudieran contener los sobrenadantes, tratamos DSC no decidualizadas con dichos factores durante 4 días, observando que no inducían apoptosis (datos no mostrados). Por otro lado, para descartar que la apoptosis pudiera ser debida a un agotamiento de los factores de crecimiento en el sobrenadante, al proceder de un cultivo de 4 días de DSC en proceso de decidualización, tomamos como células controles DSC no decidualizadas incubadas con sobrenadantes procedentes del cultivo de 4 días de DSC no decidualizadas, los cuales habrían tenido un similar consumo de factores de crecimiento o incluso superior puesto que, como demostramos anteriormente, las células al decidualizarse presentaron una parada o

disminución de la proliferación, siendo el crecimiento mayor en las células indiferenciadas (Figura 8). Como demuestra la figura 28, las células controles no presentaron apoptosis, lo que sugiere que algún factor secretado por las células DSC decidualizadas debe ser el responsable o al menos contribuir a la apoptosis observada en la diferenciación.

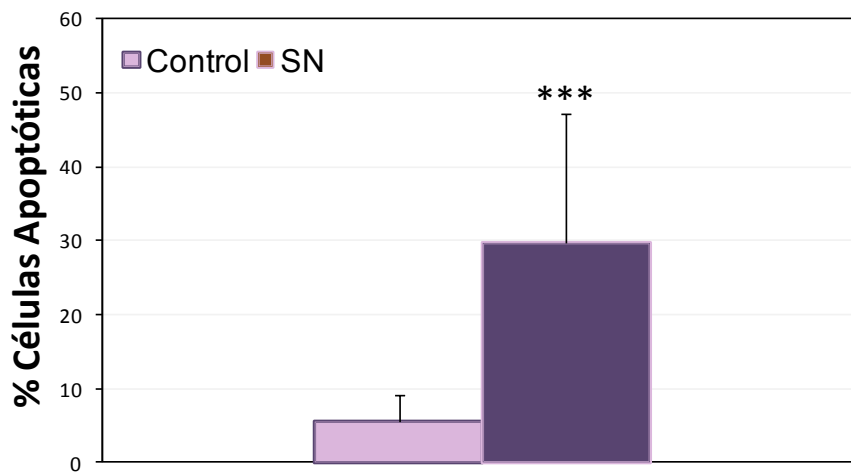


Figura 28. Apoptosis de DSC indiferenciadas cultivadas con sobrenadantes procedentes de DSC decidualizadas. DSC no decidualizadas fueron cultivadas con sobrenadantes procedentes de cultivo de 4 días de células indiferenciadas (control) o sobrenadantes procedentes de cultivo de 4 días de células decidualizadas con P4 y cAMP durante 18 días (SN). Tras 4 días de cultivo con dichos sobrenadantes se determinó la apoptosis de las células no decidualizadas por citometría de flujo midiendo la fase sub-G1 del ciclo celular. Las barras de error corresponden a la SD de seis experimentos independientes con diferentes líneas celulares, la significación estadística se refiere a las DSC tratadas con respecto a su control, *** $p < 0,001$.

Con la finalidad de conocer si la apoptosis observada en las DSC no decidualizadas incubadas con sobrenadantes procedentes de DSC decidualizadas, era un fenómeno específico de DSC o por el contrario dichos sobrenadantes pueden inducir apoptosis en otras células, se trataron varios tipos celulares en iguales condiciones que las DSC y se determinó la apoptosis a los 4 días de cultivo. En concreto, se utilizaron líneas celulares de cultivos primarios ESC y FDC, dada su similitud con DSC.

Al igual que se ha descrito anteriormente, las DSC se decidualizaron durante 18 días. A continuación, se recogió el sobrenadante y se cultivó con ESC, FDC y DSC.

Como controles, se incubaron las mismas células con sobrenadantes procedentes de DSC no decidualizadas. La muerte celular se determinó a los 4 días de cultivo por citometría de flujo y comprobamos que estos sobrenadantes indujeron apoptosis de forma muy similar en los tres tipos celulares estudiados, (Figura 29).

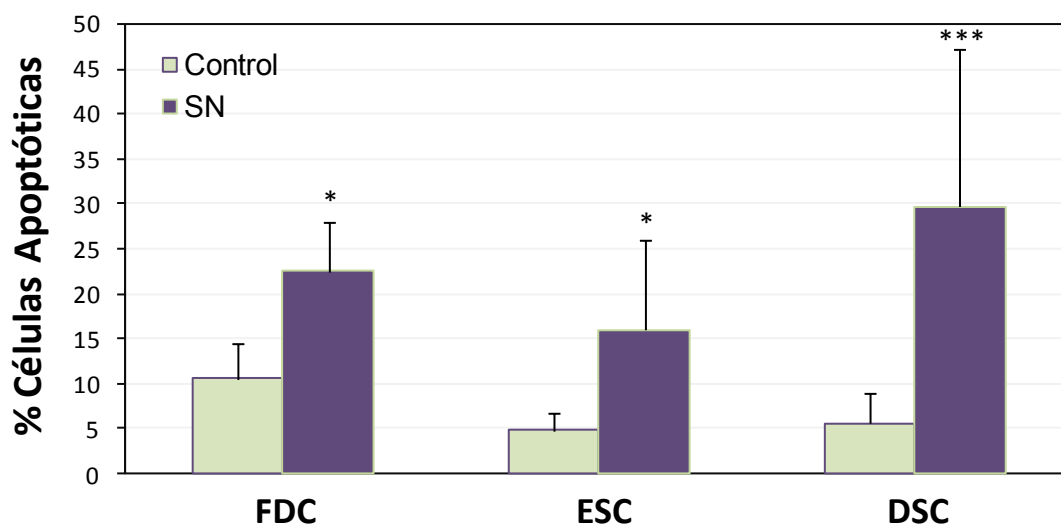


Figura 29. Apoptosis de FDC, ESC y DSC indiferenciadas cultivadas con sobrenadantes procedentes de DSC decidualizadas. Las células FDC, ESC y DSC indiferenciadas, fueron cultivadas con sobrenadantes procedentes de células DSC no decidualizadas (control) o sobrenadantes procedentes de células decidualizadas con P4 y cAMP durante 18 días (SN). A los 4 días de cultivo con dichos sobrenadantes, se determinó la apoptosis por citometría flujo, midiendo la fase sub-G1 del ciclo celular. Las barras de error corresponden a la SD de al menos tres experimentos independientes realizados con diferentes líneas celulares. La significación estadística se determinó para cada tipo celular con respecto a su control, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

3.6.1. Estudio del efecto de la prolactina en la inducción de apoptosis durante la decidualización

Como acabamos de demostrar, los sobrenadantes procedentes de DSC decidualizadas son capaces de inducir apoptosis sobre las células indiferenciadas. Dado que uno de los principales factores producidos por las DSC al diferenciarse es la PRL, nos planteamos analizar la implicación de la misma en la muerte celular inducida durante la diferenciación.

Nuestros resultados anteriores demostraban que el cAMP es el factor de diferenciación principal responsable de la inducción de apoptosis en DSC decidualizadas. Por ello, en primer lugar, estudiamos la capacidad de este factor para inducir la secreción de PRL. Las células fueron cultivadas con P4 o cAMP por separado, o con una combinación de ambos, durante 28 días. Además, se estudió el posible efecto del E en la producción de PRL puesto que, como ya hemos demostrado, combinado con P4 y cAMP aumentaba la apoptosis en DSC. El sobrenadante procedente del cultivo de DSC en las diferentes condiciones de incubación fue recogido cada 7 días hasta el final del tratamiento, para la determinación por ELISA de la PRL secretada en cada caso.

La secreción de PRL fue muy baja cuando las células fueron tratadas con E o con P4, observándose solo un aumento significativo a los 21 y 28 días de cultivo (Figura 30A). Sin embargo, aumentó considerablemente al cultivarlas con cAMP (Figura 30B). Esta producción se incrementó aún más cuando se combinó P4 y cAMP, y se alcanzaron los niveles más elevados cuando además se añadió E (Figura 30B), aunque el incremento en este caso, con respecto a la secreción inducida por P4 y cAMP, no fue estadísticamente significativo. La producción de PRL fue incrementando con el tiempo de cultivo en todos los casos, aunque solo encontramos valores significativos de incremento de PRL con respecto al tiempo en el cultivo con P4 y cAMP entre los 7 y 14 días. En general, el perfil de producción de PRL en respuesta a los diferentes factores de diferenciación, solos o combinados, es muy similar al de inducción de apoptosis por dichos factores (Figura 18), lo que sugiere un posible papel para la PRL en este proceso de muerte celular.

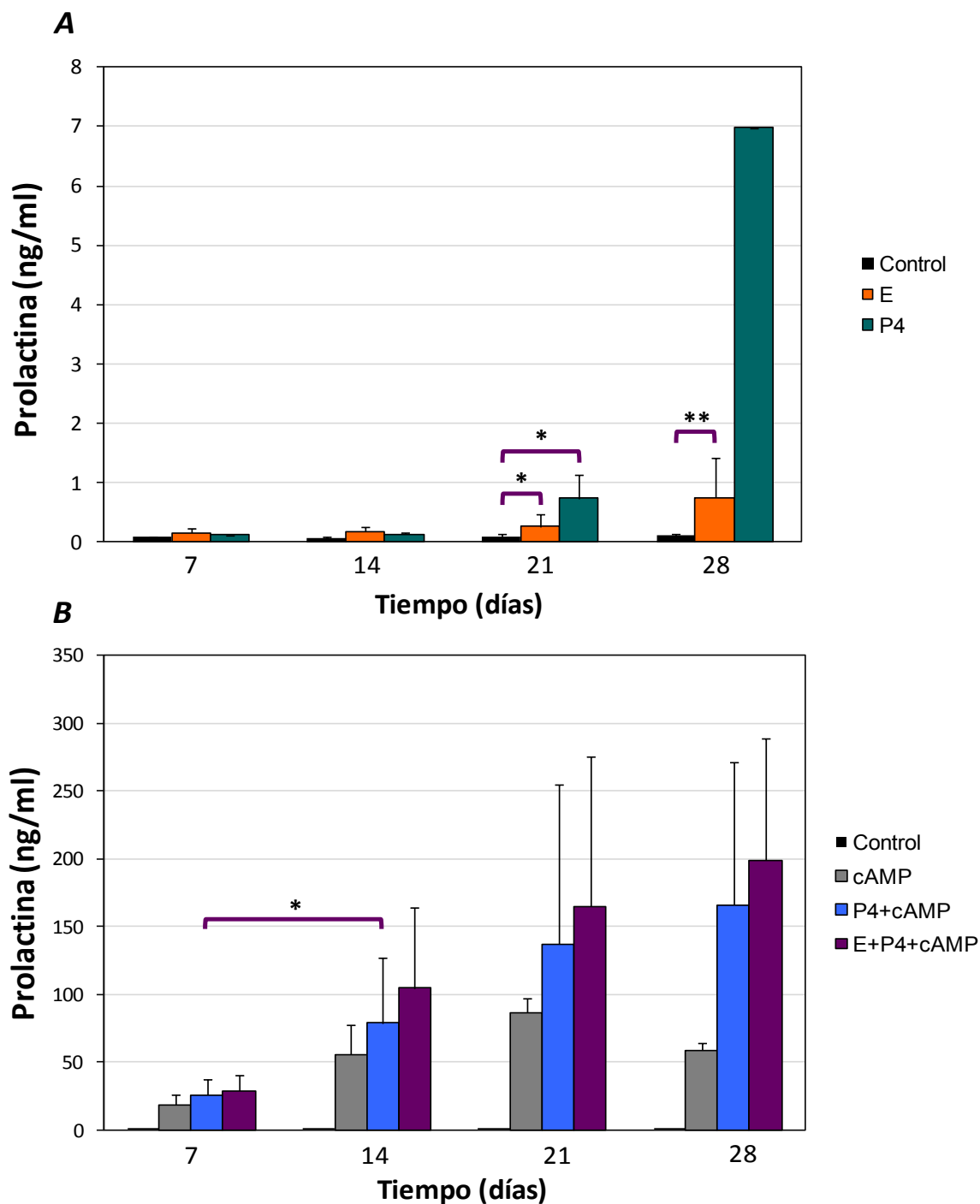


Figura 30. Producción de PRL por DSC tratadas con diferentes factores de decidualización. Las células fueron cultivadas solas (control) o en presencia de E, P4 y cAMP, solos o combinados. (A) Producción de PRL en presencia de E o P4 en una escala de 0 a 8. (B) Secreción de PRL por DSC tratadas con cAMP solo o combinado con P4 o con E y P4, en una escala de 0 a 350. Las determinaciones de PRL se realizaron cada 7 días mediante ELISA. Las barras de error corresponden a la SD de al menos 3 experimentos independientes realizados con diferentes líneas celulares, la significación estadística se refiere a diferentes tratamientos con respecto al control para un mismo tiempo de determinación (A), o para el mismo tratamiento a diferentes tiempos de determinación (B), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01-0,001$.

Para comprobar esta hipótesis incubamos las DSC no decidualizadas durante 4 días con sobrenadantes procedentes de células decidualizadas 18 días, adicionando un anticuerpo que bloquea la actividad del receptor de PRL. Como se observa en la figura 31, estas DSC incubadas con sobrenadante en presencia del bloqueante (bPRLR+SN) presentaron un porcentaje significativo de células apoptóticas, en comparación con el control de células incubadas únicamente con el bloqueante (bPRLR). Sin embargo, dicho porcentaje fue considerablemente menor que el encontrado en la población de DSC cultivadas únicamente con el sobrenadante (SN).

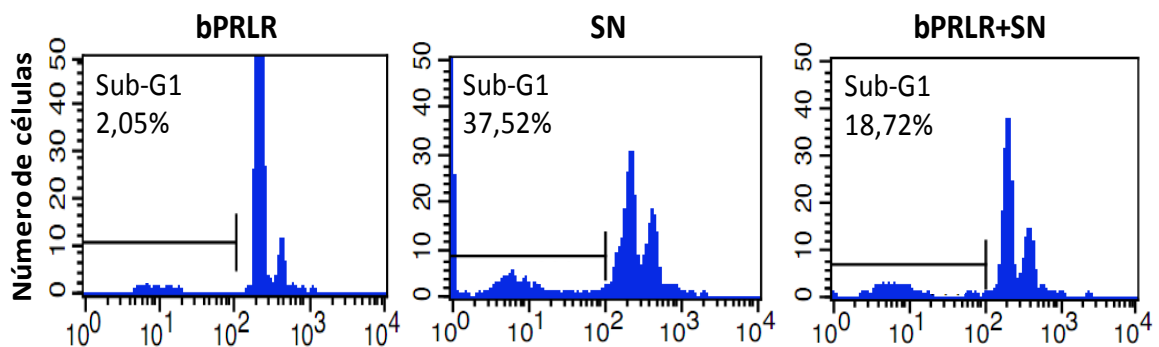


Figura 31. El bloqueo de los receptores de PRL reduce la apoptosis en DSC. Las células no decidualizadas fueron cultivadas con sobrenadantes (SN) procedentes de células decidualizadas con P4 y cAMP durante 18 días, en presencia o no de un bloqueante de los receptores de PRL (bPRLR). Como control se incubaron células solo con el bloqueante. A los 4 días de cultivo en dichas condiciones, se determinó la apoptosis de las células no decidualizadas por citometría flujo midiendo la fase sub-G1 del ciclo celular. La figura muestra los datos de un experimento representativo de los tres que se realizaron con diferentes líneas celulares y distintos sobrenadantes.

Estos resultados sugerían que la PRL podría estar induciendo apoptosis sobre DSC no decidualizadas. Por ello, decidimos tratar dichas células con PRL. Se eligió la concentración de 200 ng/ml por ser una cantidad ligeramente superior a la producida por las DSC durante la decidualización. Las DSC indiferenciadas se incubaron con PRL durante 4 días, y se determinó la muerte celular que presentaron en respuesta a dicho tratamiento. Como se puede observar en la figura 32A, la PRL, por sí sola, no produjo apoptosis en DSC no decidualizadas.

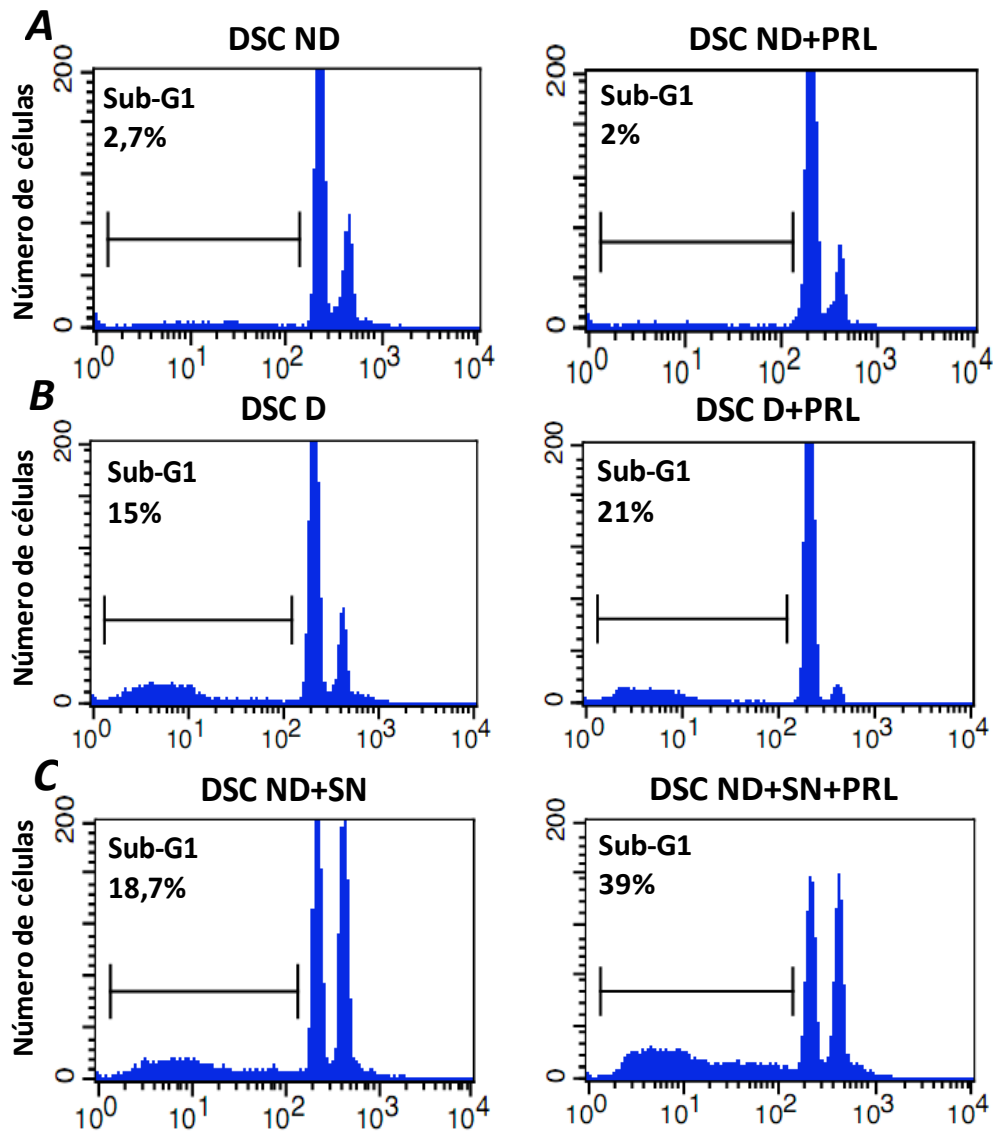


Figura 32. Efecto de la PRL en DSC. DSC no decidualizadas (DSC ND) fueron incubadas durante 4 días en ausencia (izquierda) o presencia de con PRL (200 ng/ml) (derecha) durante 4 días (A). DSC decidualizadas durante 16 días (DSC D), se incubaron en ausencia (izquierda) o en presencia de PRL (derecha) durante otros 4 días (B). DSC no decidualizadas se cultivaron durante 4 días con sobrenadantes (SN) procedentes de DSC decidualizadas durante 16 días y en ausencia (izquierda) o presencia de PRL (derecha).

Para comprender el posible papel de la PRL en la inducción de apoptosis repetimos el ensayo anterior, esta vez añadiendo PRL durante 4 días al medio de cultivo de DSC decidualizadas. De este modo se observó un leve aumento en la apoptosis, lo que sugiere que la PRL podría contribuir a la inducción de apoptosis que se observa en la decidualización, aunque no es suficiente para iniciar este proceso de muerte (Figura 32B).

Para confirmar estos resultados, incubamos las células indiferenciadas con PRL y el sobrenadante procedente de DSC decidualizadas durante 16 días que, como demostramos anteriormente, inducía apoptosis sobre DSC indiferenciadas. Como se puede observar en la figura 32C, los sobrenadantes indujeron apoptosis en células indiferenciadas y el porcentaje de células apoptóticas fue superior cuando incubamos al mismo tiempo con sobrenadante y PRL.

3.6.2. Inducción de apoptosis en células deciduales estromales no decidualizadas por diferentes factores presentes en la decidua

Puesto que los sobrenadantes de cultivo de DSC decidualizadas inducían apoptosis sobre las DSC y la PRL parecía no ser el único factor responsable de la muerte celular, continuamos el estudio analizando la posible implicación de otros factores. Se ha comprobado que las ESC al decidualizarse aumentan la expresión de IL-6, IL-10 y TRAIL (Popovici et al. 2000). Además se ha observado que tanto en endometrio durante la fase secretora del ciclo menstrual, como en la decidua, está aumentada la expresión de IL-15 y que ésta puede ser producida por DSC y ESC decidualizadas (Okada et al. 2000, Verma et al. 2000). Dada la similitud de ESC con DSC pensamos que las DSC decidualizadas podrían producir los mismos factores.

Por ello, estudiamos el efecto sobre las células no decidualizadas de IL-6, IL10, IL-15 y TRAIL, que puede ser producido por las células decidualizadas y contribuir a la apoptosis inducida por los sobrenadantes.

Además, estudiamos otros factores que no son producidos por ESC ni por DSC, pero que están presentes en la decidua y por tanto podrían inducir apoptosis en DSC *in vivo*. Por este motivo tratamos las células con la hormona hCG, cuyos niveles están aumentados en el embarazo y es producida por el blastocito, (Lopata and Oliva 1993). Además, como hemos comentado anteriormente, la población linfocitaria más abundante de la decidua son las dNK, por ello tratamos las DSC con dos citoquinas con función citotóxica que son producidas

por dichas células: TNF- α e IFN- γ . También estudiamos la IL-2 ya que, a pesar de que se encuentra en cantidad muy baja o no está presente en la decidua en condiciones normales (Jokhi et al. 1994, King et al. 1995), su aumento se ha relacionado con aborto espontáneo (Raghupathy 1997) y además comparte características estructurales y funcionales con la IL-15. Por todo ello, nos interesó conocer su comportamiento frente a la inducción de apoptosis en DSC.

Por tanto, DSC no decidualizadas fueron incubadas con IL-2, IL-6, IL-10, IL-15, TRAIL, hCG, TNF- α , IFN- γ , o con una combinación de TNF- α e IFN- γ , durante 4 días.

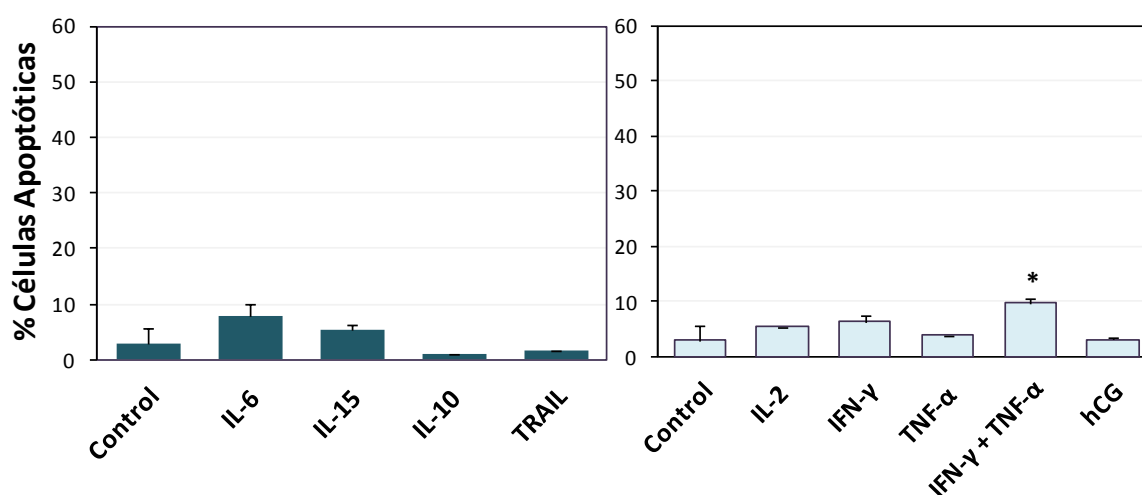


Figura 33. Apoptosis en DSC indiferenciadas en respuesta a diferentes factores de la decidua. Células DSC fueron tratadas durante 4 días con diferentes factores que pueden producir las DSC decidualizadas como IL-6 (2 μ g/ml), IL-10 (10 ng/ml), IL-15 (20 ng/ml) y TRAIL (250 ng/ml) (izquierda) o con factores que pueden estar presentes en la decidua como IL-2 (100UI/ml), hCG (500 UI/ml), IFN- γ (50 ng/ml) y TNF- α (25 ng/ml) (derecha). La proporción de células en sub-G1 se determinó mediante citometría de flujo. Las barras de error corresponden a la SD de tres experimentos independientes realizados con diferentes líneas celulares. La significación estadística se refiere a cada tratamiento con respecto a las células no tratadas, * $p < 0,05$.

Como se puede observar en la figura 33, ninguno de los factores estudiados indujo apoptosis en células indiferenciadas, a excepción de la combinación de TNF- α e IFN- γ , que produjo un leve incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de células en apoptosis.

Se ha descrito que IFN- γ y TNF- α sensibilizan a ESC a la apoptosis mediada por CD95, debido a que producen un aumento en la expresión de este receptor (Fluhr et al. 2007). Para comprobar si esto también ocurría en DSC, y habiendo demostrado previamente que las DSC indiferenciadas son resistentes a la apoptosis mediada por el anticuerpo anti-CD95 CH11 (Figura 16), tratamos las células durante 24 horas con IFN- γ y TNF- α . Tras este tiempo incubamos otras 24 horas con CH11 a diferentes concentraciones y se determinó la apoptosis. Como ya habíamos demostrado previamente, el tratamiento con IFN- γ y TNF- α produjo una leve inducción de apoptosis, mientras que el CH11, por sí solo, no tuvo efecto sobre las DSC (Figura 34). Curiosamente, de cuatro líneas analizadas, el tratamiento con IFN- γ y TNF- α sensibilizó a la apoptosis inducida por CH11 en dos de las líneas, observándose un mayor porcentaje de células apoptóticas conforme aumentamos la concentración de CH11 (Figura 34A). Sin embargo, en las otras dos líneas estudiadas no encontramos sensibilización a la apoptosis mediada por CH11 (Figura 34B).

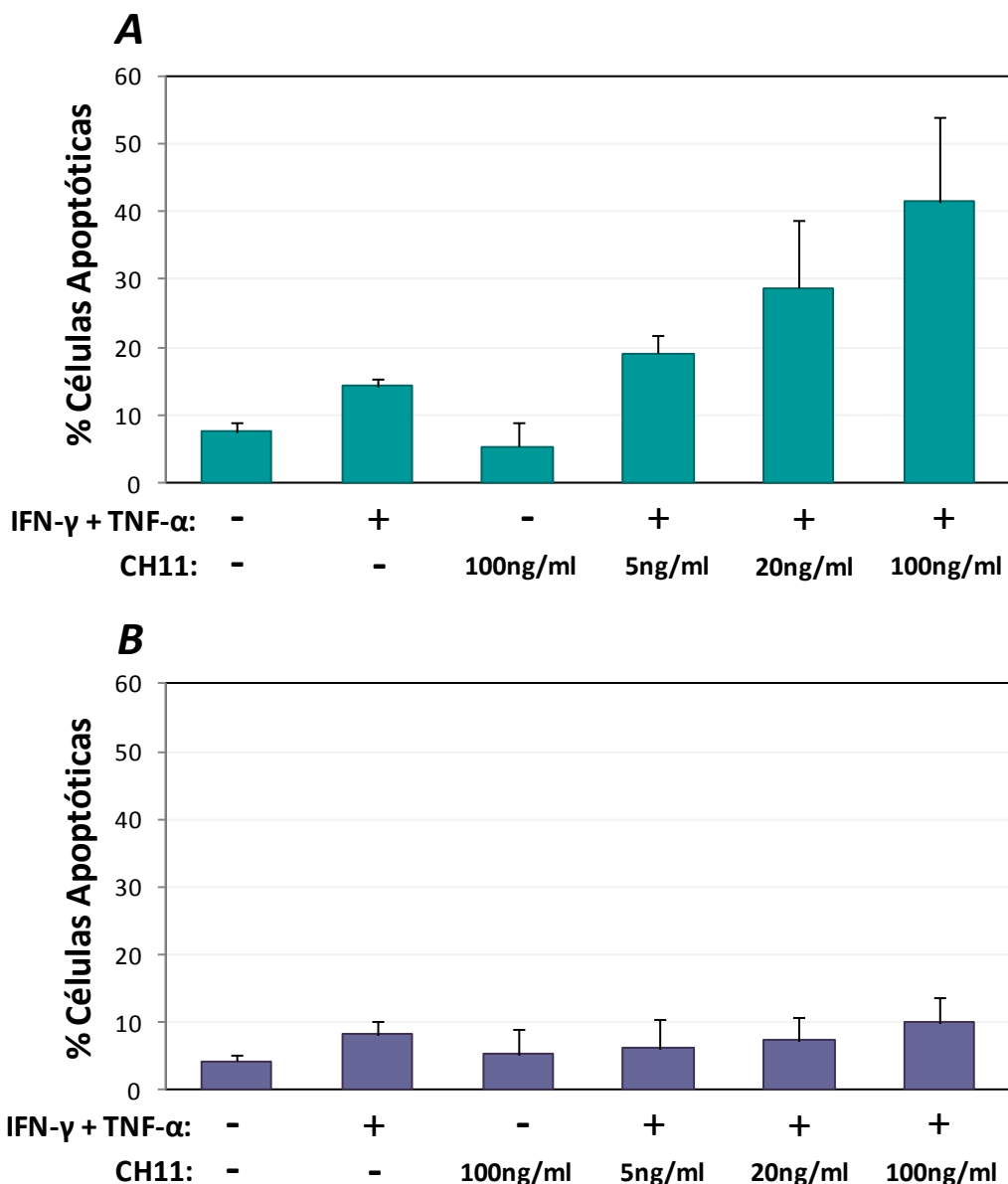


Figura 34. Sensibilización de DSC por IFN- γ y TNF- α a la apoptosis inducida por CH11. DSC fueron incubadas con IFN- γ (50 ng/ml) y TNF- α (25 ng/ml) durante 24 horas y a continuación se incubaron en ausencia o presencia de CH11 a las concentraciones indicadas otras 24 horas. Tras este tiempo se determinó la apoptosis mediante citometría de flujo analizando la fase sub-G1 del ciclo celular. (A) Representa la media de dos experimentos en los cuales IFN- γ y TNF- α sensibilizaron a las DSC a la inducción de apoptosis por CH11. (B) Representa la media de dos experimentos en los cuales no se observó sensibilización.

3.7. Efecto de la decidualización sobre células deciduales estromales recién obtenidas

Con el fin de estudiar las DSC en un contexto más próximo a las condiciones fisiológicas, decidimos analizar las células inmediatamente tras su obtención, sin mantenerlas previamente en cultivo. Los resultados obtenidos los comparamos con los anteriormente descritos en líneas de DSC procedentes de cultivos celulares. Concretamente, nos centramos en el estudio de la producción de PRL y la muerte celular por apoptosis que presentaban las células frescas durante la decidualización.

3.7.1. Producción de prolactina por células deciduales estromales frescas

Para determinar el nivel de decidualización que presentan las DSC tras su obtención, las células recién obtenidas se cultivaron durante una noche y se determinó la producción de PRL, considerando dicha medida como día cero de tratamiento. Tras esta determinación, las células se cultivaron en presencia y ausencia de P4 y cAMP, y se midió la PRL producida a los 4 y 7 días de cultivo. Como se puede observar en la figura 35, las células DSC recién obtenidas, a diferencia de las líneas celulares de DSC establecidas mediante cultivo, fueron capaces de producir PRL a tiempo cero y a medida que aumentaba el tiempo de incubación, en ausencia de tratamiento, la capacidad de secreción de PRL fue disminuyendo aunque seguimos detectando una cierta producción hasta el día 7 de cultivo. No obstante, las células DSC frescas tratadas con P4 y cAMP durante 7 días, no solo produjeron PRL sino que la secretaron en niveles superiores a los producidos por las DSC decidualizadas procedentes de líneas de cultivo.

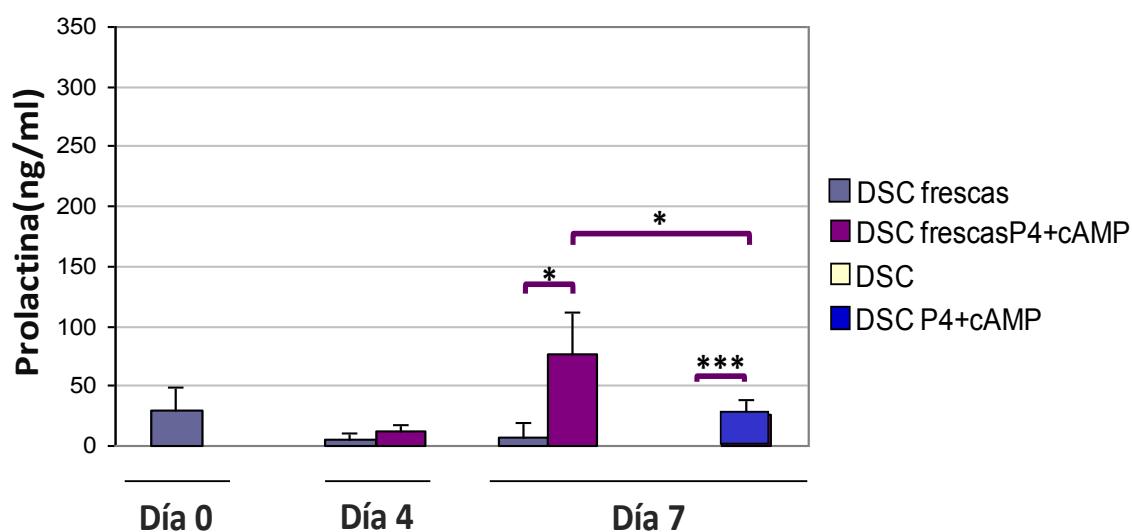


Figura 35. Producción de PRL por DSC frescas. DSC recién obtenidas se incubaron en presencia o en ausencia de P4 y cAMP durante 7 días. La cantidad de PRL producida se determinó mediante ELISA a día 0 de cultivo (tras adhesión al frasco de cultivo durante una noche) y a los días 4 y 7 de cultivo. Como control, se analizó la producción de PRL por parte de líneas de DSC establecidas en cultivo, tratadas durante 7 días en las mismas condiciones. Las barras de error corresponden a la SD de tres experimentos independientes realizados con diferentes líneas celulares, la significación estadística se refiere a las DSC (frescas o líneas establecidas) tratadas respecto a sus correspondientes controles sin tratar; también analizamos estadísticamente las células deciduales frescas con respecto a las procedentes de líneas de cultivo, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

A la vista de los resultados obtenidos prolongamos el tiempo de cultivo de las DSC frescas y se estudió la producción de PRL que presentan al decidualizarse a tiempos superiores. Para ello, se cultivaron con P4 y cAMP durante 17 días y se midió la producción de PRL a los 4, 7, 10, 14 y 17 días de tratamiento. Como se observa en la figura 36, las células incrementaron la producción de PRL hasta el día 10 de cultivo, tiempo tras el cual, la secreción disminuyó y tendió a estabilizarse hasta la última determinación que se realizó a día 17 de tratamiento.

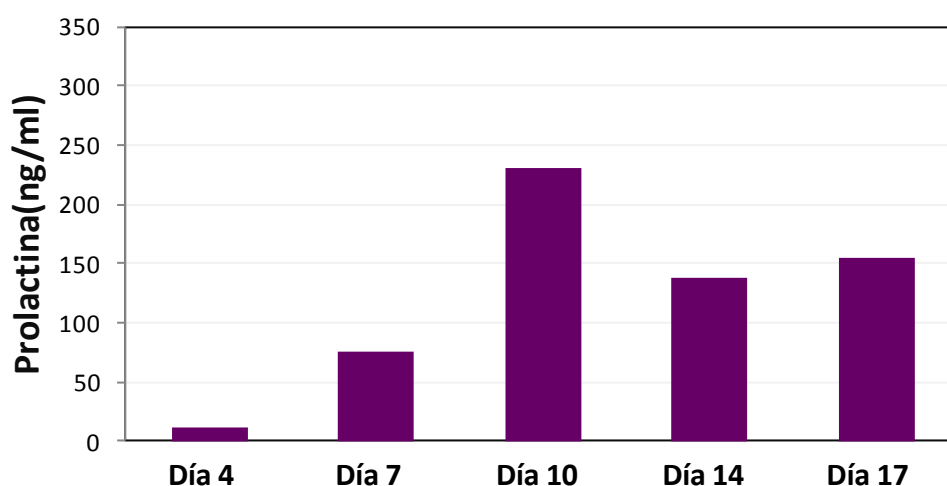
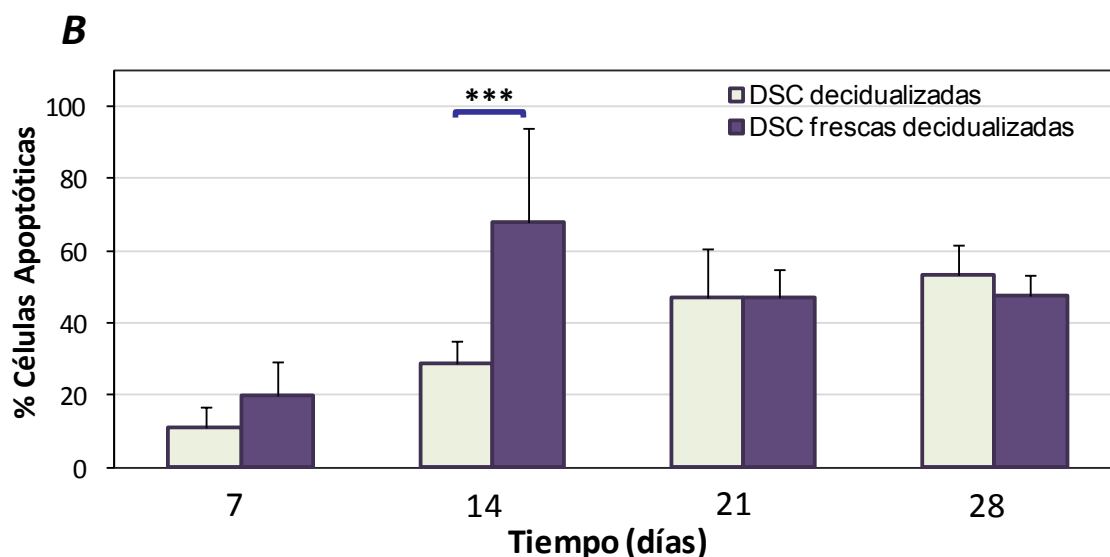
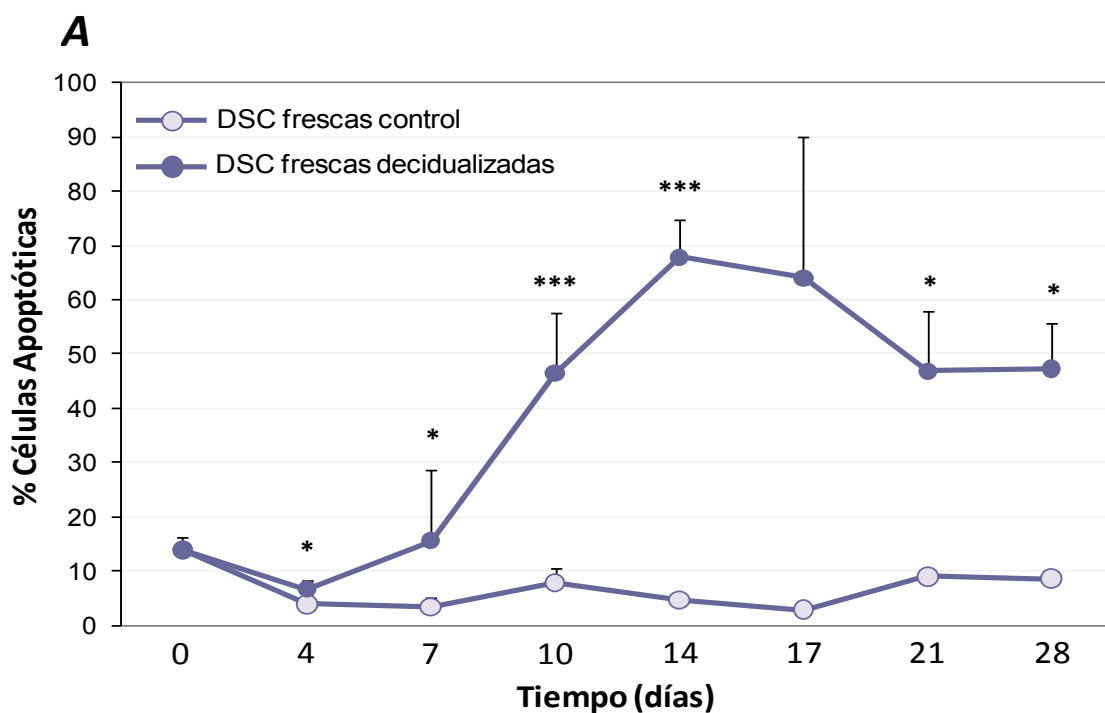


Figura 36. Producción de PRL por DSC frescas a tiempo largos de tratamiento. DSC recién obtenidas se incubaron en presencia o en ausencia de P4 y cAMP durante 17 días. La cantidad de PRL producida se determinó mediante ELISA a los días 4, 7, 10, 14 y 17 de tratamiento.

3.7.2. Apoptosis en células deciduals estromales recién obtenidas

Para estudiar el comportamiento de las células frescas en relación con la inducción de apoptosis en cultivo, determinamos por citometría de flujo el porcentaje de DSC frescas en apoptosis tras incubación en presencia o no de P4 y cAMP, a los días 0, 4, 7, 10, 14, 17, 21 y 28 de cultivo. Como se puede observar en la figura 37A, el porcentaje de células frescas decidualizadas en apoptosis fue estadísticamente significativo desde la primera determinación a los 4 días de tratamiento y se incrementó de forma progresiva hasta aproximadamente el día 14, momento a partir del cual empezamos a observar una reducción en dicho porcentaje. Si comparamos la apoptosis de DSC frescas con la de DSC procedentes de líneas de cultivo, podemos observar como las células recién obtenidas resultaron más susceptibles a la apoptosis en los primeros 14 días de tratamiento, disminuyendo tras este tiempo la muerte celular hasta alcanzar niveles similares a los de las líneas de cultivo (Figura 37B). En base a estos resultados, decidimos aumentar el tiempo de cultivo para estudiar el comportamiento de las líneas establecidas de DSC a un tiempo más prolongado. Así, tratamos las líneas de DSC con P4 y cAMP durante 49 días determinando la apoptosis cada 7 días. Como se muestra en la figura 37C, al aumentar el tiempo

de decidualización se produjo una disminución de la apoptosis a partir del día 28 de tratamiento, observándose una cierta estabilización del porcentaje de células en apoptosis en las dos últimas semanas de incubación. Estos resultados son similares a los obtenidos con DSC frescas, aunque éstas muestran una cinética de muerte más rápida que la de las líneas celulares de DSC.



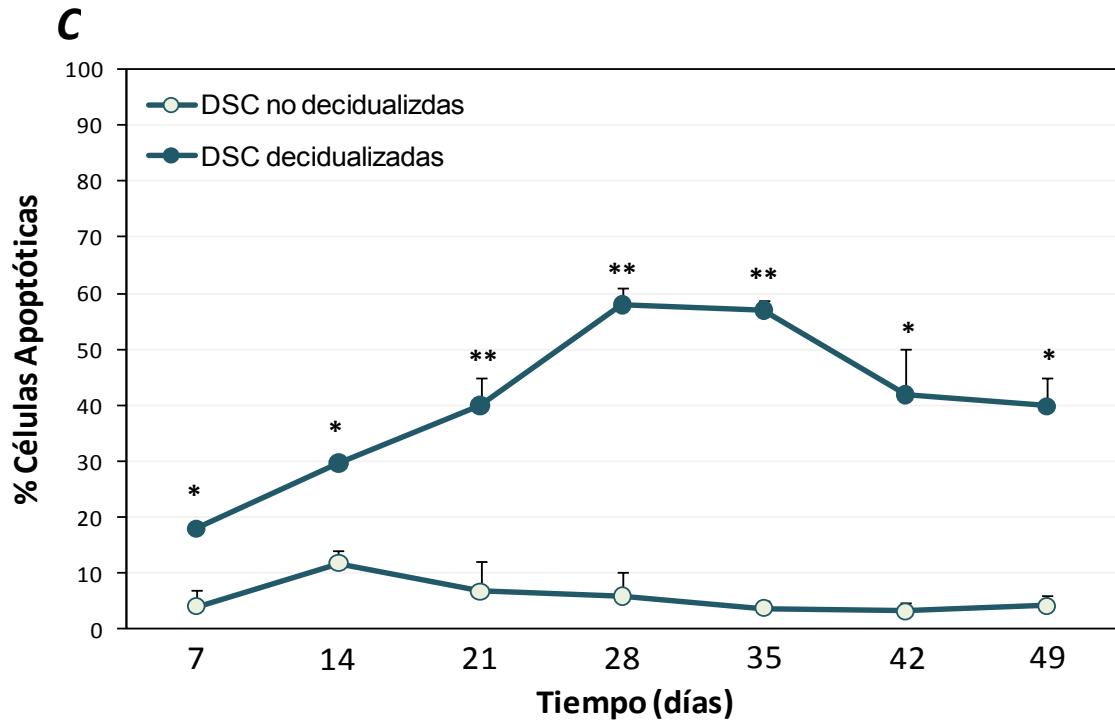


Figura 37. Apoptosis de DSC frescas tratadas con factores que inducen decidualización. (A) DSC recién obtenidas se incubaron durante los tiempos indicados en ausencia (control) o presencia de P4 y cAMP (decidualizadas) durante 28 días. El porcentaje de células apoptóticas se determinó a los tiempos indicados mediante el análisis del pico sub-G1 del ciclo celular por citometría de flujo. (B) Se analizó de forma simultánea el porcentaje de células en apoptosis en líneas de DSC cultivadas en las mismas condiciones. (C) Se decidualizaron líneas de DSC en cultivo con P4 y cAMP hasta 49 días, determinando el porcentaje de células apoptóticas cada 7 días. Las barras de error corresponden a la SD de tres experimentos independientes. La significación estadística en A y C, se refiere al análisis en cada punto de determinación de las células tratadas con P4 y cAMP respecto a su control, en B se muestra la significación de las células DSC decidualizadas procedentes de líneas respecto a las DSC decidualizadas frescas. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

DISCUSIÓN

La decidualización de las DSC en la decidua, es un proceso fundamental para el éxito del embarazo, se considera esencial para la implantación del blastocisto. Comienza a producirse en la fase secretora del ciclo menstrual con la decidualización de ESC, y si el embarazo se produce, las ESC continúan diferenciándose hacia DSC decidualizadas.

Dada la importancia de la diferenciación de las DSC en el embarazo, en nuestro trabajo, hemos estudiado las características de este proceso usando como modelo líneas de DSC. Uno de los elementos básicos que determinamos son los niveles de PRL, ya que su presencia se considera como un marcador de decidualización. El cultivo de DSC con E, P4, o cAMP por separado o con una combinación de estos factores, indicó que el cAMP es el principal responsable de la decidualización puesto que fue el único factor capaz de inducir la producción de PRL por si mismo, mientras que el cultivo con P4 o E, indujeron niveles muy bajos de PRL. Aunque los tratamientos con P4 y cAMP o E, P4 y cAMP aumentaron la capacidad de producción PRL por las DSC, en comparación con el efecto del cAMP solo, el incremento no fue estadísticamente significativo (Figura 30). El cAMP es utilizado *in vitro* en la decidualización, porque en la decidualización *in vivo*, las concentraciones de este factor se elevan en las DSC como consecuencia de la acción de distintas hormonas presentes en el endometrio y/o decidua, como la RLX, CRH, PGE₂ y hCG. cAMP refleja, por tanto, el efecto de todas estas hormonas.

La decidualización de DSC con P4 y cAMP aumentó significativamente la secreción de PRL con el tiempo de cultivo hasta el día 14 y a partir de este momento, aunque las células siguieron aumentando la producción de PRL, el incremento fue menos intenso que en los primeros 14 días (Figura 30).

Al cultivar DSC frescas (recién obtenidas), se observó que los controles cultivados en ausencia de factores de decidualización secretaban PRL, aunque esta capacidad fue disminuyendo progresivamente (Figura 35). En el caso de las células cultivadas con los factores decidualizantes, P4 y cAMP, incrementaron la

secreción de PRL a niveles superiores a los de las líneas celulares, pero fue disminuyendo esta capacidad a medida que avanzaba el tiempo de decidualización (Figura 35 y 36). Estos resultados se explican por la presencia probable de DSC decidualizadas en la preparación de DSC frescas, capaces de producir PRL en ausencia de factores decidualizantes, pero que pierden esta propiedad o mueren con el tiempo. Si estas DSC frescas se cultivan con P4 y cAMP, las DSC frescas decidualizadas probablemente contribuyen a la precoz y elevada producción de PRL en el día 7. La muerte de DSC frescas decidualizadas podría explicar la caída en la producción de PRL detectada en el día 14.

El E es una hormona que está elevada en la fase proliferativa del ciclo menstrual, importante para la regeneración y remodelado del endometrio. Se ha descrito que el E podría ser responsable de la regeneración de las células endometriales al estimular la proliferación de las células progenitoras, debido a sus efectos mitogénicos (Razandi et al. 2003).

En nuestro trabajo hemos estudiado el efecto del E, P4 y cAMP sobre la proliferación en las DSC, observando que P4 o E por sí solos no tenían ningún efecto sobre la proliferación, mientras que los tratamientos que llevaban cAMP pararon la proliferación de las DSC (Figura 8 A), por lo que el cAMP, además de ser el principal responsable de inducir la producción PRL, produce una parada de la proliferación en estas células. El cAMP tuvo los mismos efectos en la proliferación de ESC (Figura 8B).

Puesto que las DSC proceden de las ESC y ambas células son el mismo tipo celular en dos situaciones funcionales diferentes, hemos comparado ambos tipos celulares. Tanto DSC como ESC presentaron una morfología alargada, similar a fibroblastos. En nuestro trabajo hemos demostrado que ambos tipos celulares presentaron un fenotipo semejante, con una expresión cercana al 100% de CD10, CD73 y CD29, marcadores de células mesenquimales (Figura 1). Estos resultados han sido confirmados en trabajos llevados a cabo por otros grupos de investigación, en los cuales las DSC se obtuvieron de decidua de

primer trimestre de embarazo y las ESC procedieron de endometrio o sangre menstrual. Ambos tipos celulares tuvieron un fenotipo equivalente al encontrado en nuestras células (Dimitrov et al. 2008, Dimitrov et al. 2010, Meng et al. 2007).

Sin embargo, encontramos diferencias entre DSC y ESC en la decidualización. En el estudio del fenotipo antigénico que presentaron las células al decidualizarse, se observó que las DSC diferenciadas disminuyeron la expresión de CD29, CD54 y BAFF (Figura 3), mientras que en las ESC solo se produjo una leve disminución de CD29 (Figura 6), integrina ($\beta 1$ integrina) implicada en adhesión celular, al igual que CD54/ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1). La disminución de estas dos moléculas podría contribuir a que estas células al decidualizarse pierdan adhesión celular y se vuelvan redondeadas.

Además del cambio de fenotipo, hay que destacar la producción de PRL por parte de las ESC. Aunque estas células también se decidualizaron, como demuestra su capacidad para secretar PRL, su producción fue mucho menor que la producida por DSC, en las mismas condiciones de tratamiento y tiempo de decidualización (Figura 7). Además, ambos tipos celulares secretaron IL-15 al tratarlas con P4 y cAMP o E, P4 y cAMP aunque, una vez más, la secreción fue mayor por parte de las DSC, y, mientras que el E aumentó la secreción de IL-15 en las DSC, no tuvo el mismo efecto en ESC, ya que la producción en presencia o ausencia de E fue similar (Figura 15). Por otra parte, observamos que la decidualización de estas células iba acompañada de un incremento en la apoptosis pero, al comparar este fenómeno en DSC y ESC, encontramos que las ESC mostraban menor sensibilidad a la inducción de apoptosis que las DSC (Figura 19). Todo ello apoya que las ESC son menos sensibles a la decidualización que las DSC. Aunque ambos tipos celulares están relacionados, las diferencias que hemos observado en la decidualización podrían residir en que las DSC han estado previamente *in vivo*, en un ambiente hormonal y de citoquinas entre 10 y 14 semanas; mientras que las ESC han estado menos de 4 semanas. Los cambios hormonales que se producen en el embarazo y que

afectan por tanto a las DSC, podrían modular la capacidad de estas células para decidualizarse.

Tanto DSC como ESC están en contacto con linfocitos en los tejidos y se cree que estas células participan en la regulación de las funciones inmunológicas de los mismos, especialmente de las células NK que son la clase mayoritaria de linfocitos en el endometrio y en la decidua. El número de linfocitos NK uterinos va aumentando progresivamente durante el ciclo menstrual, sobre todo en la fase secretora. Este incremento es más evidente durante el primer trimestre de embarazo, llegando a alcanzar los linfocitos dNK el 70% del total de la población linfocitaria. Las funciones de dNK están reguladas por hormonas, citoquinas y componentes celulares (Yagel 2009).

Nuestros resultados han demostrado que las DSC protegen de la apoptosis espontánea a linfocitos NK y T procedentes de sangre periférica y a dNK (Figura 10) y que dicha protección no es dependiente del contacto celular. También observamos que el co-cultivo de DSC con dNK y T deciduales inducía un incremento en la proliferación (Figura 12). Al co-cultivar ESC con linfocitos T procedentes de sangre menstrual se encontraron resultados similares, tanto en la protección frente a la apoptosis como en la inducción de proliferación (Figura 13 y 14).

Estos resultados indican que ESC y DSC deben secretar factores solubles, involucrados en la regulación de la apoptosis espontánea de linfocitos y en la proliferación. Se ha demostrado que las DSC y ESC producen citoquinas y otras moléculas biológicamente activas que podrían mediar en la supervivencia de linfocitos (Engert et al. 2007, Popovici et al. 2000). Entre todos los factores producidos por estas células, la IL-15 podría ser un posible candidato.

Se ha descrito que la IL-15 estimula la proliferación de linfocitos NK, así como su capacidad para producir citoquinas (Carson et al. 1994, Verma et al. 2000). La IL-15 está presente en el endometrio y en la decidua, y es producida por DSC y ESC

(Okada et al. 2000, Popovici et al. 2000, Verma et al. 2000). Esta citoquina aumenta durante el ciclo menstrual; los niveles mayores de mRNA de IL-15 se detectan en mitad de la fase secretora, (Okada et al. 2000) coincidiendo con el aumento de linfocitos NK que se observa en esta fase. Nuestros resultados han demostrado que las ESC y DSC producen IL-15 con la decidualización (Figura 15), su producción por estas células *in vivo* podría ser la causa de la proliferación observada de linfocitos NK durante la fase secretora del ciclo menstrual y en la decidua en el embarazo. Sin embargo, las DSC sin decidualizar producen niveles de IL-15 mucho menores que las decidualizadas, y las ESC indiferenciadas no secretan IL-15. Puesto que ambas, DSC y ESC no decidualizadas, también protegen a los linfocitos de la apoptosis espontánea e inducen proliferación, otros factores solubles deben estar implicados en dichos fenómenos, no siendo la IL-15 el único responsable.

Por otra parte, hemos comprobado que los sobrenadantes procedentes de DSC decidualizadas inducían apoptosis en las propias DSC y en otras células relacionadas como las ESC y FDC (Figura 29), a pesar de que este sobrenadante protege de la apoptosis espontánea a los linfocitos deciduales (Figura 11). Este efecto protector puede deberse a la elevada cantidad de factores anti-apoptóticos, como la IL-15, presentes en los sobrenadantes de las DSC decidualizadas, que podrían compensar el efecto de los factores pro-apoptóticos que contienen los sobrenadantes. Otra posibilidad, a investigar, es que los linfocitos carezcan de receptores para los factores pro-apoptóticos.

El endometrio humano es una capa celular muy dinámica que es sometida mensualmente a un remodelado y renovación del tejido. La apoptosis juega un papel esencial, ayudando a mantener la homeostasis celular durante el ciclo menstrual. Este proceso de muerte celular ha sido detectado en el endometrio de mujeres no embarazadas, durante la decidualización que empieza a producirse en la fase secretora del ciclo menstrual, así como en la menstruación. La apoptosis también está presente en la formación de la decidua, ya que la constitución de este tejido implica no solo proliferación y

diferenciación de DSC sino también una extensa regresión y reorganización del tejido decidual que va acompañada de muerte por apoptosis (Gu et al. 1994).

Así, la apoptosis juega un papel fundamental regulando el remodelado de la decidua durante procesos tan primordiales como la implantación, la controlada invasión del trofoblasto y la decidualización. A pesar de la importancia de la apoptosis decidual para el éxito del embarazo, su causa no es aún conocida, la regresión del tejido decidual ocurre de igual modo con la implantación del blastocisto o con estímulos artificiales que impliquen decidualización del útero de ratón, lo que sugiere que las señales de muerte celular podrían ser un mecanismo regulado por las hormonas maternas que puedan proceder incluso de la misma decidua (Welsh 1993), ya que este tejido expresa un gran número de hormonas y citoquinas que podrían ser candidatos responsables de la muerte celular.

Los resultados obtenidos de decidualización de DSC nos muestran como las células, a medida que van diferenciándose, van muriendo progresivamente por apoptosis conforme avanza el tiempo de decidualización (Figura 18). El cAMP parece ser el principal responsable en la apoptosis detectada, ya que su presencia indujo apoptosis sobre DSC, mientras que ni P4 ni E por separado fueron capaces de inducir muerte celular, lo que sugiere que una posible causa de la apoptosis observada en la decidua durante el embarazo podría ser la propia diferenciación de las DSC por la P4 y otras hormonas que elevan las concentraciones de cAMP, como la RLX, CRH, PGE₂ y hCG cuya fuente es principalmente materna, aunque también podrían proceder del trofoblasto, como en el caso de hCG.

Curiosamente, al añadir E al tratamiento con P4 y cAMP aumentó la muerte celular con respecto a la inducción de apoptosis por el cAMP. Se ha descrito que el E aumenta la expresión de PR (Bulun et al. 2010). En la endometriosis, patología asociada con una menor sensibilidad de las células a la apoptosis, se sabe que la expresión de PR es menor (Attia et al. 2000, Bulun et al. 2010), por

lo que el incremento de apoptosis observado en nuestras células al tratarlas con E, podría ser debido a la regulación de los PR. De hecho, nosotros hemos observado el aumento en la expresión de PR en respuesta a la decidualización con P4 y cAMP. Sin embargo, otros autores han descrito que la decidualización requiere una disminución de los niveles de PR (Brosens et al. 1999).

La apoptosis observada iba aumentando hasta alcanzar el mayor porcentaje de muerte celular alrededor del día 28 de tratamiento, tiempo tras el cual se estabilizaba en las líneas de DSC o incluso disminuía, lo que sugiere que en nuestras líneas, con el tiempo, aparecen DSC resistentes a la apoptosis. Resultados similares fueron obtenidos cuando decidualizamos las DSC frescas, aunque el pico de apoptosis fue más precoz, de modo que la apoptosis fue incrementando hasta los 14 días de tratamiento y a partir de este tiempo disminuyó y se estabilizó (Figura 37). Esta precocidad en la apoptosis de DSC frescas fue probablemente debida a la presencia de células ya decidualizadas en los cultivos de células frescas, pero tanto en líneas DSC como en cultivos de DSC frescas nuestros resultados demuestran una relación entre el proceso de decidualización y la apoptosis.

Otros grupos de investigación han publicado que en el embarazo el porcentaje de DSC que expresa mRNA para PRL aumenta progresivamente desde 9,8%, en el embarazo temprano, hasta 57,8% en el embarazo a término, lo que nos lleva a pensar que a lo largo de la gestación una subpoblación de células DSC indiferenciadas persiste en la decidua hasta el final del embarazo (Christian et al. 2002). Algo equivalente podría ocurrir en nuestras líneas celulares, en nuestros cultivos celulares existirían diferentes poblaciones de DSC en diferentes estados de diferenciación, incluida una población más indiferenciada y tal vez más susceptible a la apoptosis, puesto que, como hemos demostrado, las células DSC no decidualizadas son sensibles al sobrenadante de cultivo de las decidualizadas (Figura 28). Las células que permanecen sin sufrir apoptosis a tiempos largos de cultivo serían entonces las más diferenciadas, o por el contrario, células que a lo largo del proceso de decidualización se hacen

resistentes a la inducción de muerte celular independientemente de su estadio de diferenciación. Sería interesante llevar a cabo nuevos experimentos de inducción de apoptosis y producción de PRL a tiempos más largos para corroborar estas hipótesis.

Para conocer la vía de inducción de apoptosis que podría estar activándose en la decidualización de DSC, se analizaron diversas proteínas pro- y anti-apoptóticas que intervienen tanto en la ruta extrínseca como intrínseca de apoptosis, así como la activación de caspasas. Observamos una disminución de proteínas anti-apoptóticas como Bclx_L, cFlip y XIAP en células DSC decidualizadas (Figura 22), lo que podría explicar que en estas células se estuviera induciendo apoptosis. Sin embargo, en el ensayo de PCR-array no encontramos regulación de los genes Bclx_L y XIAP, y encontramos un incremento de cFLIP (Tabla 1), lo que nos podría indicar que las reducciones observadas a nivel de proteína pudieran ser debidas a que éstas se estuvieran cortando, degradando o sufriendo algún tipo de regulación postraduccional. En cuanto a las proteínas pro-apoptóticas estudiadas, encontramos un aumento en la expresión de Bim (Figura 23 A), desde la primera determinación a los 7 días de tratamiento, regulación que fue confirmada por el ensayo de PCR-array lo que nos puede indicar que es una proteína importante para la inducción de apoptosis observada en DSC decidualizadas. Además, otros autores han descrito que esta proteína aumenta su expresión en ESC cuando se tratan con P4 y cAMP, aunque en sus resultados observan una mayor apoptosis e incremento de Bim cuando cultivan las células con P4 y cAMP durante 3 días y a continuación retiran la P4 durante 24 horas (Labied et al. 2006). Apaf-1 fue otra proteína pro-apoptótica para la cual se observó, en este caso, una disminución en la expresión en DSC decidualizadas, tanto a nivel de proteína como en el ensayo de PCR-array (Figura 23, Tabla 1). Las otras proteínas pro-apoptóticas estudiadas, Bax y Bid presentaron una disminución de su expresión a nivel de proteína (Figura 23), pero no se correlacionó con una regulación a nivel de mRNA sugiriendo, como en el caso de las anti-apoptóticas antes mencionadas, posibles procesamientos de la proteína o cambios postraduccionales.

Uno de los genes pro-apoptóticos cuya expresión disminuyó muy significativamente a nivel de mRNA en las células decidualizadas, aunque no se determinó a nivel de proteína, fue HRK (Tabla 1). EL gen HRK codifica la proteína Harakiri o PD5 que pertenece a la familia de Bcl-2. Es un miembro de los denominados “solo-BH3” y se ha descrito que induce apoptosis interaccionando con miembros anti-apoptóticos como Bcl-2 y Bcl_{x_L}, facilitando así la activación mitocondrial. La disminución de proteínas pro-apoptóticas en células decidualizadas que se encuentran en apoptosis, que en un principio podría resultar contradictorio, podría ser explicada si tenemos en cuenta que en las líneas celulares que tenemos en cultivo parecen co-existir diferentes poblaciones de células con distinta sensibilidad a la decidualización y también a la apoptosis. Como hemos comentado anteriormente, las células que permanecen en el cultivo a lo largo del tiempo, que podrían ser la más diferenciadas, serían más resistentes a la muerte celular debido a una menor expresión de proteínas pro-apoptóticas.

En cuanto al análisis de las caspasas implicadas en la muerte celular, se observó la activación de la caspasa-3, puesto que se detectó una disminución en los niveles de la forma intacta inactiva, al mismo tiempo que la aparición del fragmento correspondiente a la caspasa-3 activada (Figura 21). Curiosamente, en el estudio de la expresión génica encontramos también una disminución en los niveles de mRNA de caspasa-3 (Tabla 1). En lo que se refiere a la caspasa-9, no encontramos cambios en la expresión ni a nivel de proteína ni de mRNA. Sin embargo, aunque no hubo regulación a nivel de mRNA, se observó una disminución de la caspasa-8 intacta a nivel de proteína (Figura 21, Tabla 1), lo que podría indicar que se estuviera cortando y el fragmento se hubiera degradado, ya que en el diseño de nuestros experimentos hemos detectado las proteínas cada 7 días de tratamiento y en el transcurso de este tiempo se pueden perder por degradación los productos de activación de las caspasas. La disminución de la caspasa-8 y de cFlip, junto con la activación caspasa-3, sugiere que en el mecanismo de apoptosis podría estar implicada la vía extrínseca aunque, por otro lado, el aumento de la expresión de Bim sugiere la activación

de la vía intrínseca de apoptosis. En realidad, ambas vías podrían estar implicadas en la inducción de apoptosis ya que una proteína que conecta dichas vías es Bid y nosotros hemos observado un detrimento de Bid en DSC decidualizadas que podría deberse a que esta proteína se ha cortado generando así su forma truncada activa. Sin embargo, es necesario un estudio más profundo para concluir sobre el mecanismo de muerte celular que presentan las DSC decidualizadas.

En nuestro trabajo hemos observado como los sobrenadantes que producen las DSC decidualizadas son capaces de inducir apoptosis sobre DSC, ESC y FDC indiferenciadas (Figura 29), lo que indica que factores secretados en la decidualización de DSC podrían ser los responsables de la inducción de apoptosis. La decidualización de ESC y DSC implica un cambio en el patrón de enzimas intracelulares, factores de crecimiento, citoquinas y sus receptores e inducción de moduladores de apoptosis y factores de transcripción específicos de la decidualización (Engert et al. 2007, Popovici et al. 2000). En nuestro estudio nos hemos centrado en el posible efecto apoptótico que podrían tener FasL, IL-6, IL-10, IL-15, TNF- α , IFN- γ , TRAIL y PRL.

El sistema Fas/FasL representa una de las principales vías para la inducción de apoptosis (Nagata 1994). La expresión de estas moléculas ha sido demostrada en el endometrio humano, receptor y ligando están presentes a lo largo del ciclo menstrual (Yamashita et al. 1999). Fas es expresado por ESC humanas y FasL es secretado por el embrión en la interfase materno-fetal. Este sistema es uno de los principales efectores en células T citotóxicas y NK y parece que juega un importante papel en el mantenimiento del privilegio inmunitario en la interfase materno-fetal.

Las DSC indiferenciadas fueron muy resistentes a diferentes inductores de apoptosis, entre ellos el anticuerpo agonista anti-Fas, CH11 (Figura 16). A pesar de la función clásica de inducir apoptosis del sistema Fas/FasL, recientemente se ha demostrado que FasL puede inducir la producción de citoquinas en ESC

indiferenciadas y decidualizadas (Fluhr et al. 2011), por lo que el papel de Fas/FasL en las células DSC podría ser modular el ambiente endometrial y decidual, favoreciendo la implantación de embrión. Sin embargo, en nuestros resultados encontramos que las células DSC decidualizadas fueron sensibles a la apoptosis por CH11 (Figura 26). Estos resultados son contrarios a otros previamente publicados en los cuales, las ESC resultaron resistentes a FasL independientemente de su estado de diferenciación (Fluhr et al. 2007). Las diferencias observadas pueden radicar en que sus experimentos se realizaron con ESC que, como hemos demostrado, parecen más resistentes a la decidualización y apoptosis. Además, las ESC se trataron con P4 y E durante 9 días, a diferencia de nuestros experimentos, en los cuales las DSC se decidualizaron con P4 y cAMP durante 18 días y, como hemos demostrado, el cAMP ejerce un papel fundamental durante el proceso de decidualización (Fluhr et al. 2007). La diferente sensibilidad a la apoptosis inducida por CH11 que presentan las DSC no decidualizadas y decidualizadas podría deberse a la disminución en la expresión de cFLIP en las DSC diferenciadas. cFLIP es una proteína anti-apoptótica inhibidora de la activación de caspasa-8 por lo que la alta expresión de esta proteína en las células no decidualizadas puede ser responsable de la resistencia a la apoptosis al impedir la activación de la vía extrínseca implicada en la inducción de muerte celular por CH11.

Al estudiar los receptores para Fas, encontramos que las células indiferenciadas expresaban altos niveles del receptor en su superficie, sin embargo las DSC decidualizadas presentaron una disminución en la expresión de este receptor (Figura 27), lo que podría responder a un mecanismo de autorregulación, para contrarrestar la posible inducción de apoptosis debida a FasL. Sin embargo, en el estudio de PCR-array no se encontró una regulación de Fas por lo que la disminución observada a nivel de proteína podría ser debida a que el receptor se estuviera internalizando en endosomas al unirse a su ligando. Por otra parte, resultados previos de nuestro grupo demostraron que sólo un 40% de las líneas de DSC expresan FasL y en la mayor parte de ellas la expresión es muy baja (de alrededor de un 10%) (Blanco et al. 2009). En el ensayo de PCR-array no hemos

detectado variaciones en la expresión de FasL, encontrando una Ct muy elevada de alrededor de 37, lo que nos podría indicar que DSC decidualizadas tampoco producen FasL. Sin embargo, otros grupos de investigación han publicado que ESC no solo expresan Fas y FasL, sino que aumenta la expresión de FasL al tratarlas con P4 y E (Selam et al. 2001), por lo que sería interesante analizar este ligando a nivel de proteína y en un número más elevado de muestras de DSC decidualizadas para confirmar nuestros resultados.

En el estudio sobre la posible inducción de apoptosis por las citoquinas producidas por DSC, como IL-6, IL-15 e IL-10, no se observó ningún efecto (Figura 33). Cabe destacar el efecto apoptótico de TNF- α e IFN- γ sobre DSC indiferenciadas. Estas citoquinas son producidas por dNK, la clase más abundante de linfocitos en la decidua. Además hemos comprobado que, al menos en la mitad de las líneas estudiadas, la combinación de dichas citoquinas sensibiliza a la apoptosis mediada por CH11 (Figura 34), por lo que dNK podrían contribuir a la apoptosis observada en la decidua. La diferencia encontrada en la sensibilidad a la apoptosis de las distintas líneas puede deberse a la variabilidad entre líneas de DSC, ya que son células procedentes de cultivos primarios, y su distinta sensibilidad a CH11 podría deberse a diferencias de expresión de cFLIP.

Otro posible candidato de inducir apoptosis en DSC podría ser TRAIL o APO-2L, ligando de muerte miembro de la superfamilia de TNF que induce apoptosis uniéndose a sus receptores de muerte, TRAIL-R1 (DR4) y TRAIL-R2 (DR5). El papel del sistema TRAIL/TRAIL-R en el embarazo no ha sido todavía totalmente esclarecido, se sabe que puede inducir muerte celular en linfocitos activados y por tanto contribuir a establecer un privilegio inmunológico durante el embarazo (Nagata 1997, Van Parijs and Abbas 1998). Por ello TRAIL, al igual que FasL, secretado por el trofoblasto, protegería a este del ataque inmunológico (Bai et al. 2009). Además se ha descrito que TRAIL puede ser expresado por el trofoblasto y al igual que FasL puede tener un papel no apoptótico sobre ESC, ya que puede regular diferentes citoquinas secretadas por ESC modulando el microambiente en la interfase materno-fetal (Fluhr et al. 2009). Nuestros

resultados de PCR-array nos muestran una regulación de TRAIL, de manera que aumenta en las DSC decidualizadas (Tabla 1), lo que nos sugirió que TRAIL liberado al sobrenadante podría contribuir a la inducción de apoptosis en dichas células y en las células indiferenciadas. Sin embargo, cuando las DSC se cultivaron en presencia de TRAIL, no observamos inducción de apoptosis sobre DSC indiferenciadas (Figura 33). Nuestros datos se corresponden con los de otros autores que tampoco han visto inducción de apoptosis con TRAIL en ESC (Fluhr et al. 2009). Por otro lado, se han detectado en el ensayo de PCR-array altos niveles de OPG, la cual se ha descrito como un factor de supervivencia en varios tipos celulares (Holen et al. 2002, Malyankar et al. 2000, Shipman and Croucher 2003). La OPG es un receptor soluble de TRAIL que antagoniza el efecto apoptótico de este ligando, al bloquear su unión a los receptores de muerte. Por tanto, los elevados niveles de OPG en las DSC indiferenciadas y decidualizadas podrían explicar el mecanismo por el cual dichas células serían resistentes a TRAIL liberado al sobrenadante. Además, se ha observado que en la endometriosis, patología asociada a una pérdida en la sensibilidad a la apoptosis de las células endometriales, la expresión de OPG está aumentada (Harada et al. 2004). También se han observado cantidades elevadas de OPG en las membranas gestacionales, lo que podría proteger a las células contra los efectos apoptóticos de TRAIL (Lonergan et al. 2003).

En mayor detalle hemos analizado el posible efecto apoptótico de la PRL. Esta hormona es considerada una hormona multifuncional ya que tiene funciones reproductivas, metabólicas y también puede estar implicada en tumorigénesis (Ben-Jonathan et al. 2008). La PRL se eleva durante el embarazo, tanto en el suero materno como en la circulación fetal. Una fuente importante de producción de PRL en el embarazo es la decidua, de hecho es la principal proteína sintetizada y secretada durante la decidualización de las DSC y su expresión es detectable en el endometrio desde la fase secretora del ciclo menstrual, persistiendo en la implantación hasta el final del embarazo. La PRL que produce la decidua se acumula en el fluido amniótico, alcanzando el máximo nivel (4000-5000ng/ml) entre la semana 16 y 22 de gestación, y

reduciéndose progresivamente hasta el final del embarazo (Ben-Jonathan et al. 2008). A pesar de la presencia de PRL en el embarazo, se conoce poco sobre sus funciones en la decidua. Parece que la PRL puede regular la invasión del trofoblasto ya que se ha visto que el sincitiotrofoblasto expresa receptores para PRL y que ésta puede tener efectos mitogénicos sobre él (Jabbour and Critchley 2001). Además de facilitar la adhesión, invasión y crecimiento del trofoblasto, regula la angiogénesis, modula la supervivencia de linfocitos NK, inhibe la contractilidad del miometrio y previene el rechazo del feto (Ben-Jonathan et al. 2008). En relación con estas funciones, es posible que la PRL secretada por las DSC decidualizadas esté implicada en el efecto protector o de supervivencia que ejercen los sobrenadantes procedentes de dichas células sobre los linfocitos deciduales. Aunque, por supuesto, otros factores producidos en general por DSC, de forma independiente de su estado de diferenciación, deben estar implicados en dicho efecto puesto que también lo ejercen las DSC indiferenciadas.

Aunque a la PRL se le atribuyan funciones proliferativas sobre distintas células, también se ha relacionado con inducción de apoptosis en algunos modelos. Se ha descrito que la PRL induce apoptosis en la línea celular humana LNCaP de adenocarcinoma de próstata que responde a andrógenos (Giuffrida et al. 2010). También induce apoptosis en el cuerpo lúteo de ratas, apoptosis que se incrementa aún más al añadir P4 (Gaytan et al. 2000). Además, se ha comprobado que la PRL fosforilada induce apoptosis en células endoteliales (Ueda et al. 2006).

De forma general, el patrón de producción de PRL en las líneas celulares de DSC decidualizadas se puede co-relacionar con el incremento de apoptosis. Como hemos demostrado, el tratamiento con P4 y cAMP induce un incremento en la producción de PRL a medida que avanza el tiempo de cultivo, siendo estadísticamente significativo dicho aumento entre los 7 y 14 días (Figura 30) lo que coincide con el incremento significativo de la apoptosis inducida en estas mismas células, aunque en este caso el aumento con el tiempo de cultivo fue

significativo hasta los 21 días de tratamiento (Figura 18). Además, se detectó un leve aumento en los niveles de PRL al añadir E al tratamiento de decidualización con P4 y cAMP, que de nuevo coincidió con un aumento estadísticamente significativo de apoptosis hasta los 21 días de decidualización. Por otra parte, los resultados de producción de PRL de DSC frescas, recién obtenidas, nos indican que éstas producen PRL en respuesta a la decidualización con una cinética más rápida que las líneas celulares establecidas (Figuras 30, 35 y 36), y también fueron más susceptibles a la inducción de apoptosis en los primeros días de tratamiento con P4 y cAMP (Figura 37), es decir, que también en DSC frescas se observó una correlación entre los tiempos de mayor producción de PRL y mayor inducción de muerte celular.

Esta relación entre el aumento de PRL y la apoptosis detectada, junto con el hecho de que los sobrenadantes de las células decidualizadas, que contenían PRL, indujeran apoptosis en células no decidualizadas, nos llevaron a plantear si la PRL pudiera tener algún papel relevante en la inducción de apoptosis que se produce durante la decidualización. Además, cuando se decidualizaron las ESC presentaron una menor producción de PRL (Figura 7), que también se correlacionó con una menor inducción de apoptosis (Figura 19). A pesar de estos indicios, la PRL por sí sola no fue suficiente para inducir apoptosis sobre DSC indiferenciadas (Figura 32A). Sin embargo, el hecho de que la muerte celular inducida por los sobrenadantes de DSC decidualizadas disminuya, aunque no se inhiba completamente, al bloquear los receptores de PRL, y que se produzca un aumento de la apoptosis al añadir PRL a células decidualizadas, así como a DSC indiferenciadas incubadas con los sobrenadantes de DSC decidualizadas (Figuras 31 y 32), sugiere que la PRL podría estar contribuyendo a la apoptosis observada en las DSC durante la decidualización, aunque no es suficiente para iniciar por sí sola este proceso de muerte celular. Por tanto, debe haber otros factores secretados por las DSC decidualizadas al sobrenadante que podrían contribuir a la inducción de apoptosis.

En general, los factores anteriormente comentados que son producidos, o podrían serlo, por las DSC decidualizadas, como IL-6, IL-15, IL-10, FasL, TRAIL y PRL, podrían liberarse al sobrenadante y estar contribuyendo a la apoptosis en la decidualización de las DSC, además de ser los responsables de la muerte celular inducida por los sobrenadantes de DSC decidualizadas sobre DSC, ESC o FDC indiferenciadas. Sin embargo, hemos visto que el tratamiento con dichos factores por separado no induce apoptosis en células DSC indiferenciadas, por lo que nosotros especulamos que son diversos factores producidos por DSC decidualizadas y acumulados en el medio, los responsables de la muerte celular inducida sobre ellas mismas o sobre otras células indiferenciadas.

CONCLUSIONS

1. ESC and DSC are phenotypic and functionally equivalent, although ESC are less sensitive to the effects of decidualization.
2. ESC and DSC protects lymphocytes from spontaneous apoptosis by the secretion of soluble factors.
3. In DSC, decidualization regulates the antigenic phenotype, inhibits cell proliferation and induces apoptosis. cAMP is a key factor in the two latter changes.
4. Decidualization changes the balance between pro- and anti-apoptotic proteins.
5. The factors responsible for the apoptosis are soluble factors, prolactin among them, that are secreted by decidualized DSC.

BIBLIOGRAFÍA

Abadia-Molina A.C., Ruiz C., Montes M.J., King A., Loke Y.W. and Olivares E.G. Immune phenotype and cytotoxic activity of lymphocytes from human term decidua against trophoblast. *Journal of reproductive immunology* (1996) 31, 109-123.

Aluvihare V.R., Kallikourdis M. and Betz A.G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature immunology* (2004) 5, 266-271.

Attia G.R., Zeitoun K., Edwards D., Johns A., Carr B.R. and Bulun S.E. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* (2000) 85, 2897-2902.

Baban B., Chandler P., McCool D., Marshall B., Munn D.H. and Mellor A.L. Indoleamine 2, 3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. *Journal of reproductive immunology* (2004) 61, 67-77.

Bai X., Williams J.L., Greenwood S.L., Baker P.N., Aplin J.D. and Crocker I.P. A placental protective role for trophoblast-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Placenta* (2009) 30, 855-860.

Banner D.W., D'Arcy A., Janes W., Gentz R., Schoenfeld H.J., Broger C., Loetscher H. and Lesslauer W. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* (1993) 73, 431-445.

Bartsch O., Bartlick B. and Ivell R. Relaxin signalling links tyrosine phosphorylation to phosphodiesterase and adenylyl cyclase activity. *Molecular human reproduction* (2001) 7, 799-809.

Bell S. Decidualization and relevance to menstruation. *Contraception and Mechanisms of Endometrial Bleeding*. C.D'Arcangues, IS Fraser, JR Newton & V.Odlind, Eds (1990) 188.

Ben-Jonathan N., LaPensee C.R. and LaPensee E.W. What can we learn from rodents about prolactin in humans?. *Endocrine reviews* (2008) 29, 1-41.

Bertin J., Armstrong R.C., Otilie S., Martin D.A., Wang Y., Banks S., Wang G.H., Senkevich T.G., Alnemri E.S., Moss B. *et al.* Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1997) 94, 1172-1176.

Blanco O., Leno-Duran E., Morales J.C., Olivares E.G. and Ruiz-Ruiz C. Human decidual stromal cells protect lymphocytes from apoptosis. *Placenta* (2009) 30, 677-685.

Boatright K.M., Renatus M., Scott F.L., Sperandio S., Shin H., Pedersen I.M., Ricci J.E., Edris W.A., Sutherlin D.P., Green D.R. *et al.* A unified model for apical caspase activation. *Molecular cell* (2003) 11, 529-541.

Boonyaratanakornkit V., Scott M.P., Ribon V., Sherman L., Anderson S.M., Maller J.L., Miller W.T. and Edwards D.P. Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Molecular cell* (2001) 8, 269-280.

Boyson J.E., Aktan I., Barkhuff D.A. and Chant A. NKT cells at the maternal-fetal interface. *Immunological investigations* (2008) 37, 565-582.

Boyson J.E., Rybalov B., Koopman L.A., Exley M., Balk S.P., Racke F.K., Schatz F., Masch R., Wilson S.B. and Strominger J.L. CD1d and invariant NKT cells at the human maternal-fetal interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2002) 99, 13741-13746.

Bratton S.B., Walker G., Srinivasula S.M., Sun X.M., Butterworth M., Alnemri E.S. and Cohen G.M. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *The EMBO journal* (2001) 20, 998-1009.

Brosens J.J. and Gellersen B. Death or survival--progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma. *Journal of Molecular Endocrinology* (2006) 36, 389-398.

Brosens J.J., Hayashi N. and White J.O. Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology* (1999) 140, 4809-4820.

Bulmer J.N., Morrison L., Longfellow M., Ritson A. and Pace D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Human reproduction (Oxford, England)* (1991) 6, 791-798.

Bulun S.E., Cheng Y.H., Pavone M.E., Xue Q., Attar E., Trukhacheva E., Tokunaga H., Utsunomiya H., Yin P., Luo X. *et al.* Estrogen receptor-beta, estrogen receptor-alpha, and progesterone resistance in endometriosis. *Seminars in reproductive medicine* (2010) 28, 36-43.

Carson W.E., Giri J.G., Lindemann M.J., Linett M.L., Ahdieh M., Paxton R., Anderson D., Eisenmann J., Grabstein K. and Caligiuri M.A. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *The Journal of experimental medicine* (1994) 180, 1395-1403.

Cato A.C., Nestl A. and Mink S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* (2002) 2002, re9.

Chan R.W., Schwab K.E. and Gargett C.E. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biology of reproduction* (2004) 70, 1738-1750.

Christian M., Mak I., White J.O. and Brosens J.J. Mechanisms of decidualization. *Reproductive biomedicine online* (2002) 4 Suppl 3, 24-30.

Cooper M.A., Fehniger T.A. and Caligiuri M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in immunology* (2001) 22, 633-640.

Cory S. and Adams J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews.Cancer* (2002) 2, 647-656.

Dai D., Moulton B.C. and Ogle T.F. Regression of the decidualized mesometrium and decidual cell apoptosis are associated with a shift in expression of Bcl2 family members. *Biology of reproduction* (2000) 63, 188-195.

Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S. and Reed J.C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* (1997) 388, 300-304.

Di Blasio A.M., Pecori Giralaldi F., Vigano P., Petraglia F., Vignali M. and Cavagnini F. Expression of corticotropin-releasing hormone and its R1 receptor in human endometrial stromal cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* (1997) 82, 1594-1597.

Dimitriadis E., Robb L. and Salamonsen L.A. Interleukin 11 advances progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Molecular human reproduction* (2002) 8, 636-643.

Dimitriadis E., Salamonsen L.A. and Robb L. Expression of interleukin-11 during the human menstrual cycle: coincidence with stromal cell decidualization and relationship to leukaemia inhibitory factor and prolactin. *Molecular human reproduction* (2000) 6, 907-914.

Dimitriadis E., Stoikos C., Baca M., Fairlie W.D., McCoubrie J.E. and Salamonsen L.A. Relaxin and prostaglandin E(2) regulate interleukin 11 during human

endometrial stromal cell decidualization. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* (2005a) 90, 3458-3465.

Dimitriadis E., White C.A., Jones R.L. and Salamonsen L.A. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Human reproduction update* (2005b) 11, 613-630.

Dimitrov R., Kyurkchiev D., Timeva T., Yunakova M., Stamenova M., Shterev A. and Kyurkchiev S. First-trimester human decidua contains a population of mesenchymal stem cells. *Fertility and sterility* (2010) 93, 210-219.

Dimitrov R., Timeva T., Kyurkchiev D., Stamenova M., Shterev A., Kostova P., Zlatkov V., Kehayov I. and Kyurkchiev S. Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium. *Reproduction (Cambridge, England)* (2008) 135, 551-558.

Du C., Fang M., Li Y., Li L. and Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* (2000) 102, 33-42.

Dunn C.L., Kelly R.W. and Critchley H.O. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reproductive biomedicine online* (2003) 7, 151-161.

Engert S., Rieger L., Kapp M., Becker J.C., Dietl J. and Kämmerer U. Profiling chemokines, cytokines and growth factors in human early pregnancy decidua by protein array. *American Journal of Reproductive Immunology* (2007) 58, 129-137.

Fluhr H., Krenzer S., Stein G.M., Stork B., Deperschmidt M., Wallwiener D., Wesselborg S., Zygmunt M. and Licht P. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha sensitize primarily resistant human endometrial stromal cells to Fas-mediated apoptosis. *Journal of cell science* (2007) 120, 4126-4133.

Fluhr H., Sauter G., Steinmuller F., Licht P. and Zygmunt M. Nonapoptotic effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand on interleukin-6, leukemia inhibitory factor, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein 1 vary between undifferentiated and decidualized human endometrial stromal cells. *Fertility and sterility* (2009) 92, 1420-1423.

Fluhr H., Wenig H., Spratte J., Heidrich S., Ehrhardt J. and Zygmunt M. Non-apoptotic Fas-induced regulation of cytokines in undifferentiated and decidualized human endometrial stromal cells depends on caspase-activity. *Molecular human reproduction* (2011) 17, 127-134.

Gambel P., Rossant J., Hunziker R.D. and Wegmann T.G. Origin of decidual cells in murine pregnancy and pseudopregnancy. *Transplantation* (1985) 39, 443-445.

Garcia-Pacheco J.M., Oliver C., Kimatrai M., Blanco F.J. and Olivares E.G. Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related to bone marrow stromal precursors. *Molecular human reproduction* (2001) 7, 1151-1157.

Gardner L. and Moffett A. Dendritic cells in the human decidua. *Biology of reproduction* (2003) 69, 1438-1446.

Gargett C.E. Review article: stem cells in human reproduction. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* (2007) 14, 405-424.

Gargett C.E., Schwab K.E., Zillwood R.M., Nguyen H.P. and Wu D. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biology of reproduction* (2009) 80, 1136-1145.

Gaytan F., Morales C., Bellido C., Aguilar R., Millan Y., Martin De Las Mulas J. and Sanchez-Criado J.E. Progesterone on an oestrogen background enhances prolactin-induced apoptosis in regressing corpora lutea in the cyclic rat: possible involvement of luteal endothelial cell progesterone receptors. *The Journal of endocrinology* (2000) 165, 715-724.

Gellersen B., Brosens I.A. and Brosens J.J. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Thieme e Journals* (2007) 25, 445-453.

Gellersen B. and Brosens J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *The Journal of endocrinology* (2003) 178, 357-372.

Giuffrida D., Perdichizzi A., Giuffrida M.C., La Vignera S., D'Agata R., Vicari E. and Calogero A.E. Does prolactin induce apoptosis? Evidences in a prostate cancer in vitro model. *Journal of endocrinological investigation* (2010) 33, 313-317.

Gomez-Lopez N., Guilbert L.J. and Olson D.M. Invasion of the leukocytes into the fetal-maternal interface during pregnancy. *Journal of leukocyte biology* (2010) 88, 625-633.

Gong J., Traganos F. and Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Analytical Biochemistry* (1994) 218, 314-319.

Goodell M.A., Brose K., Paradis G., Conner A.S. and Mulligan R.C. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *The Journal of experimental medicine* (1996) 183, 1797-1806.

Grabstein K.H., Eisenman J., Shanebeck K., Rauch C., Srinivasan S., Fung V., Beers C., Richardson J., Schoenborn M.A. and Ahdieh M. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science (New York, N.Y.)* (1994) 264, 965-968.

Gruss H.J. and Dower S.K. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* (1995) 85, 3378-3404.

Gu Y., Jow G.M., Moulton B.C., Lee C., Sensibar J.A., Park-Sarge O.K., Chen T.J. and Gibori G. Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization. *Endocrinology* (1994) 135, 1272-1279.

Guleria I., Khosroshahi A., Ansari M.J., Habicht A., Azuma M., Yagita H., Noelle R.J., Coyle A., Mellor A.L., Houry S.J. *et al.* A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *The Journal of experimental medicine* (2005) 202, 231-237.

Han S.W., Lei Z.M. and Rao C.V. Homologous down-regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors by increasing the degradation of receptor transcripts in human uterine endometrial stromal cells. *Biology of reproduction* (1997) 57, 158-164.

Hanna J., Goldman-Wohl D., Hamani Y., Avraham I., Greenfield C., Natanson-Yaron S., Prus D., Cohen-Daniel L., Arnon T.I., Manaster I. *et al.* Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature medicine* (2006) 12, 1065-1074.

Harada M., Osuga Y., Hirata T., Hirota Y., Koga K., Yoshino O., Morimoto C., Fujiwara T., Momoeda M., Yano T. *et al.* Concentration of osteoprotegerin (OPG) in peritoneal fluid is increased in women with endometriosis. *Human reproduction (Oxford, England)* (2004) 19, 2188-2191.

Hill J.A., Polgar K. and Anderson D.J. T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *JAMA : the journal of the American Medical Association* (1995) 273, 1933-1936.

Holen I., Croucher P.I., Hamdy F.C. and Eaton C.L. Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer research* (2002) 62, 1619-1623.

Hori S. and Sakaguchi S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes and Infection* (2004) 6, 745-751.

Hsu S.Y., Nakabayashi K., Nishi S., Kumagai J., Kudo M., Sherwood O.D. and Hsueh A.J. Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science (New York, N.Y.)* (2002) 295, 671-674.

Hunt J.S., Vassmer D., Ferguson T.A. and Miller L. Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. *The Journal of Immunology* (1997) 158, 4122-4128.

Hunt J.S., Petroff M.G., McIntire R.H. and Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* (2005) 19, 681-693.

Jabbour H.N. and Critchley H. Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy. *Reproduction* (2001) 121, 197-205.

Jokhi P.P., King A., Sharkey A.M., Smith S.K. and Loke Y.W. Screening for cytokine messenger ribonucleic acids in purified human decidual lymphocyte populations by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* (1994) 153, 4427-4435.

Joswig A., Gabriel H.D., Kibschull M. and Winterhager E. Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. *Reprod Biol Endocrinol* (2003) 1, 44-52.

Kammerer U., Eggert A.O., Kapp M., McLellan A.D., Geijtenbeek T.B.H., Dietl J., Van Kooyk Y. and Kampgen E. Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *American Journal of Pathology* (2003) 162, 887.

Kammerer U., Schoppet M., McLellan A.D., Kapp M., Huppertz H.I., Kampgen E. and Dietl J. Human decidua contains potent immunostimulatory CD83 dendritic cells. *American Journal of Pathology* (2000) 157, 159-169.

Kastner P., Krust A., Turcotte B., Stropp U., Tora L., Gronemeyer H. and Chambon P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *The EMBO journal* (1990) 9, 1603-1614.

Kato K., Yoshimoto M., Kato K., Adachi S., Yamayoshi A., Arima T., Asanoma K., Kyo S., Nakahata T. and Wake N. Characterization of side-population cells in human normal endometrium. *Human Reproduction* (2007) 22, 1214-1223.

Kearns M. and Lala P.K. Bone marrow origin of decidual cell precursors in the pseudopregnant mouse uterus. *The Journal of experimental medicine* (1982) 155, 1537-1554.

Kerr J.F., Wyllie A.H. and Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* (1972) 26, 239-257.

Keskin D.B., Allan D.S.J., Rybalov B., Andzelm M.M., Stern J.N.H., Kopcow H.D., Koopman L.A. and Strominger J.L. TGF β promotes conversion of CD16 peripheral blood NK cells into CD16⁻ NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2007) 104, 3378-3383.

Kimatrai M., Blanco O., Muñoz-Fernandez R., Tirado I., Martin F., Abadia-Molina A.C. and Olivares E.G. Contractile activity of human decidual stromal cells. II. Effect of interleukin-10. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* (2005) 90, 6126-6130.

Kimatrai M., Oliver C., Abadia-Molina A.C., Garcia-Pacheco J.M. and Olivares E.G. Contractile activity of human decidual stromal cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* (2003) 88, 844-849.

King A., Jokhi P.P., Smith S.K., Sharkey A.M. and Loke Y.W. Screening for cytokine mRNA in human villous and extravillous trophoblasts using the reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Cytokine* (1995) 7, 364-371.

Kischkel F.C., Lawrence D.A., Chuntharapai A., Schow P., Kim K.J. and Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* (2000) 12, 611-620.

Kyurkchiev S., Shterev A. and Dimitrov R. Assessment of presence and characteristics of multipotent stromal cells in human endometrium and decidua. *Reproductive biomedicine online* (2010) 20, 305-313.

Labied S., Kajihara T., Madureira P.A., Fusi L., Jones M.C., Higham J.M., Varshochi R., Francis J.M., Zoumpoulidou G. and Essafi A. Progestins regulate the expression and activity of the forkhead transcription factor FOXO1 in differentiating human endometrium. *Molecular Endocrinology* (2006) 20, 35-44.

LeMaoult J., Krawice-Radanne I., Dausset J. and Carosella E.D. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2004) 101, 7064-7069.

Li H., Zhu H., Xu C. and Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* (1998) 94, 491-501.

Li L.Y., Luo X. and Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* (2001) 412, 95-99.

Li T.C., Iqbal T., Anstie B., Gillham J., Amer S., Wood K. and Laird S. An analysis of the pattern of pregnancy loss in women with recurrent miscarriage. *Fertility and sterility* (2002) 78, 1100-1106.

Lonergan M., Aponso D., Marvin K.W., Helliwell R.J., Sato T.A., Mitchell M.D., Chaiwaropongsa T., Romero R. and Keelan J.A. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TRAIL receptors, and the soluble receptor osteoprotegerin in human gestational membranes and amniotic fluid during pregnancy and labor at term and preterm. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* (2003) 88, 3835-3844.

Lopata A. and Oliva K. Chorionic gonadotrophin secretion by human blastocysts. *Human reproduction (Oxford, England)* (1993) 8, 932-938.

Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C. and Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* (1998) 94, 481-490.

Lutter M., Perkins G.A. and Wang X. The pro-apoptotic Bcl-2 family member tBid localizes to mitochondrial contact sites. *BMC cell biology* (2001) 2, 22.

Lysiak J.J. and Lala P.K. In situ localization and characterization of bone marrow-derived cells in the decidua of normal murine pregnancy. *Biology of reproduction* (1992) 47, 603-613.

Makrigiannakis A., Karamouti M., Drakakis P., Loutradis D. and Antsaklis A. Fetomaternal immunotolerance. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)* (2008) 60, 482-496.

Malyankar U.M., Scatena M., Suchland K.L., Yun T.J., Clark E.A. and Giachelli C.M. Osteoprotegerin is an alpha v beta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* (2000) 275, 20959-20962.

Mattson M.P. and Kroemer G. Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends in molecular medicine* (2003) 9, 196-205.

Mehats C., Andersen C.B., Filopanti M., Jin S.L. and Conti M. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* (2002) 13, 29-35.

Mellor A.L. and Munn D.H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature reviews.Immunology* (2004) 4, 762-774.

Meng X., Ichim T.E., Zhong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K.W. *et al.* Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *Journal of translational medicine* (2007) 5, 57.

Milne S.A., Perchick G.B., Boddy S.C. and Jabbour H.N. Expression, localization, and signaling of PGE(2) and EP2/EP4 receptors in human nonpregnant endometrium across the menstrual cycle. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* (2001) 86, 4453-4459.

Miyazaki S., Tsuda H., Sakai M., Hori S., Sasaki Y., Futatani T., Miyawaki T. and Saito S. Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. *Journal of leukocyte biology* (2003) 74, 514-522.

Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nature reviews.Immunology* (2002) 2, 656-663.

Montes M.J., Aleman P., Garcia-Tortosa C., Borja C., Ruiz C. and Garcia-Olivares E. Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with hematopoietic cells. *Journal of reproductive immunology* (1996) 30, 53-66.

Mulac-Jericevic B. and Conneely O.M. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction (Cambridge, England)* (2004) 128, 139-146.

Munn D.H., Zhou M., Attwood J.T., Bondarev I., Conway S.J., Marshall B., Brown C. and Mellor A.L. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science (New York, N.Y.)* (1998) 281, 1191-1193.

Muñoz-Fernandez R., Blanco F.J., Frecha C., Martin F., Kimatrai M., Abadia-Molina A.C., Garcia-Pacheco J.M. and Olivares E.G. Follicular dendritic cells are related to bone marrow stromal cell progenitors and to myofibroblasts. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* (2006) 177, 280-289.

Muñoz-Fernandez R., Prados A., Leno-Durán E., Blanquez A., Ortiz-Ferrón G and Olivares E.G. Human decidual stromal cells secrete CXCL13, express B cell-activating factor (BAFF) and rescue B lymphocytes from apoptosis: distinctive characteristics of follicular dendritic cells. *Sometido*.

Murphy S.P., Tayade C., Ashkar A.A., Hatta K., Zhang J. and Croy B.A. Interferon gamma in successful pregnancies. *Biology of reproduction* (2009) 80, 848-859.

Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* (1997) 88, 355-365.

Nagata S. Apoptosis regulated by a death factor and its receptor: Fas ligand and Fas. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* (1994) 345, 281-287.

Okada S., Okada H., Sanzumi M., Nakajima T., Yasuda K. and Kanzaki H. Expression of interleukin-15 in human endometrium and decidua. *Molecular human reproduction* (2000) 6, 75-80.

Oksenberg J.R., Mor-Yosef S., Persitz E., Schenker Y., Mozes E. and Brautbar C. Antigen-presenting cells in human decidual tissue. *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology : AJRIM* (1986) 11, 82-88.

Olivares E.G., Montes M.J., Oliver C., Galindo J.A. and Ruiz C. Cultured human decidual stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. *Biology of reproduction* (1997) 57, 609-615.

Olivares E.G., Muñoz R., Tejerizo G., Montes M.J., Gomez-Molina F. and Abadia-Molina A.C. Decidual lymphocytes of human spontaneous abortions induce apoptosis but not necrosis in JEG-3 extravillous trophoblast cells. *Biology of reproduction* (2002) 67, 1211-1217.

Oliver C., Montes M.J., Galindo J.A., Ruiz C. and Olivares E.G. Human decidual stromal cells express alpha-smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Human reproduction (Oxford, England)* (1999) 14, 1599-1605.

Ottillie S., Diaz J.L., Horne W., Chang J., Wang Y., Wilson G., Chang S., Weeks S., Fritz L.C. and Oltersdorf T. Dimerization properties of human BAD. Identification of a BH-3 domain and analysis of its binding to mutant BCL-2 and BCL-XL proteins. *The Journal of biological chemistry* (1997) 272, 30866-30872.

Park C.S., Yoon S.O., Armitage R.J. and Choi Y.S. Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* (2004) 173, 6676-6683.

Petroff M.G., Kharatyan E., Torry D.S. and Holets L. The immunomodulatory proteins B7-DC, B7-H2, and B7-H3 are differentially expressed across gestation in the human placenta. *The American journal of pathology* (2005) 167, 465-473.

Petroff M.G. and Perchellet A. B7 family molecules as regulators of the maternal immune system in pregnancy. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)* (2010) 63, 506-519.

Piccinni M.P., Scaletti C., Maggi E. and Romagnani S. Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy. *Journal of neuroimmunology* (2000) 109, 30-33.

Piccinni M.P., Scaletti C., Vultaggio A., Maggi E. and Romagnani S. Defective production of LIF, M-CSF and Th2-type cytokines by T cells at fetomaternal interface is associated with pregnancy loss. *Journal of reproductive immunology* (2001) 52, 35-43.

Polgar B., Kispal G., Lachmann M., Paar G., Nagy E., Csere P., Miko E., Szereday L., Varga P. and Szekeres-Bartho J. Molecular cloning and immunologic characterization of a novel cDNA coding for progesterone-induced blocking factor. *The Journal of Immunology* (2003) 171, 5956-5963.

Popovici R.M., Kao L.C. and Giudice L.C. Discovery of new inducible genes in in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology* (2000) 141, 3510-3513.

Qian J., Niu J., Li M., Chiao P.J. and Tsao M.S. In vitro modeling of human pancreatic duct epithelial cell transformation defines gene expression changes induced by K-ras oncogenic activation in pancreatic carcinogenesis. *Cancer research* (2005) 65, 5045-5053.

Qiu Q., Yang M., Tsang B.K. and Gruslin A. Fas ligand expression by maternal decidual cells is negatively correlated with the abundance of leukocytes present at the maternal-fetal interface. *Journal of reproductive immunology* (2005) 65, 121-132.

Raghupathy R. Th 1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology today* (1997) 18, 478-482.

Ramathal C.Y., Bagchi I.C., Taylor R.N. and Bagchi M.K. Endometrial decidualization: of mice and men. *Seminars in reproductive medicine* (2010) 28, 17-26.

Razandi M., Pedram A., Park S.T. and Levin E.R. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *The Journal of biological chemistry* (2003) 278, 2701-2712.

Robb L., Li R., Hartley L., Nandurkar H.H., Koentgen F. and Begley C.G. Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation. *Nature medicine* (1998) 4, 303-308.

Ruiz C., Montes M.J., Abadia-Molina A.C. and Olivares E.G. Phagocytosis by fresh and cultured human decidual stromal cells: opposite effects of interleukin-1 alpha and progesterone. *Journal of reproductive immunology* (1997) 33, 15-26.

Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *Journal of reproductive immunology* (2000) 47, 87-103.

Saito S., Tsukaguchi N., Hasegawa T., Michimata T., Tsuda H. and Narita N. Distribution of Th1, Th2, and Th0 and the Th1/Th2 cell ratios in human peripheral and endometrial T cells. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)* (1999) 42, 240-245.

Salamonsen L.A., Dimitriadis E. and Robb L. Cytokines in implantation. *Seminars in reproductive medicine* (2000) 18, 299-310.

Salvesen G.S. and Dixit V.M. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1999) 96, 10964-10967.

Sasaki Y., Sakai M., Miyazaki S., Higuma S., Shiozaki A. and Saito S. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Molecular human reproduction* (2004) 10, 347-353.

Scaffidi C., Medema J.P., Krammer P.H. and Peter M.E. FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *The Journal of biological chemistry* (1997) 272, 26953-26958.

Schwab K.E. and Gargett C.E. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Human reproduction (Oxford, England)* (2007) 22, 2903-2911.

Selam B., Kayisli U.A., Mulayim N. and Arici A. Regulation of Fas ligand expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *Biology of reproduction* (2001) 65, 979-985.

Shiozaki E.N. and Shi Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends in biochemical sciences* (2004) 29, 486-494.

Shipman C.M. and Croucher P.I. Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer research* (2003) 63, 912-916.

Simmons P.J. and Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* (1991) 78, 55-62.

Sindram-Trujillo A.P., Scherjon S.A., van Hulst-van Miert P.P., van Schip J.J., Kanhai H.H., Roelen D.L. and Claas F.H. Differential distribution of NK cells in decidua basalis compared with decidua parietalis after uncomplicated human term pregnancy. *Human immunology* (2003) 64, 921-929.

Sprick M.R., Weigand M.A., Rieser E., Rauch C.T., Juo P., Blenis J., Krammer P.H. and Walczak H. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* (2000) 12, 599-609.

Sudo S., Kumagai J., Nishi S., Layfield S., Ferraro T., Bathgate R.A. and Hsueh A.J. H3 relaxin is a specific ligand for LGR7 and activates the receptor by interacting with both the ectodomain and the exoloop 2. *The Journal of biological chemistry* (2003) 278, 7855-7862.

Szekeres-Bartho J., Autran B., Debre P., Andreu G., Denver L. and Chaouat G. Immunoregulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction. *Cellular immunology* (1989) 122, 281-294.

Szekeres-Bartho J., Barakonyi A., Par G., Polgar B., Palkovics T. and Szereday L. Progesterone as an immunomodulatory molecule. *International immunopharmacology* (2001) 1, 1037-1048.

Thornberry N.A. and Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science (New York, N.Y.)* (1998) 281, 1312-1316.

Tilburgs T., Roelen D.L., van der Mast B.J., de Groot-Swings G.M., Kleijburg C., Scherjon S.A. and Claas F.H. Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4 CD25bright regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy. *The Journal of Immunology* (2008) 180, 5737-5745.

Tilburgs T., Scherjon S.A. and Claas F.H. Major histocompatibility complex (MHC)-mediated immune regulation of decidual leukocytes at the fetal-maternal interface. *Journal of reproductive immunology* (2010) 85, 58-62.

Tirado-Gonzalez I., Muñoz-Fernandez R., Blanco O., Leno-Duran E., Abadia-Molina A.C. and Olivares E.G. Reduced proportion of decidual DC-SIGN+ cells in human spontaneous abortion. *Placenta* (2010) 31, 1019-1022.

Ueda E.K., Lo H.L., Bartolini P. and Walker A.M. S179D prolactin primarily uses the extrinsic pathway and mitogen-activated protein kinase signaling to induce apoptosis in human endothelial cells. *Endocrinology* (2006) 147, 4627-4637.

Vacca P., Vitale C., Montaldo E., Conte R., Cantoni C., Fulcheri E., Darretta V., Moretta L. and Mingari M.C. CD34 hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2011) 108, 2402-2407.

Van Gurp M., Festjens N., Van Loo G., Saelens X. and Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death* 1. *Biochemical and biophysical research communications* (2003) 304, 487-497.

Van Parijs L. and Abbas A.K. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science (New York, N.Y.)* (1998) 280, 243-248.

Verma S., Hiby S.E., Loke Y.W. and King A. Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. *Biology of reproduction* (2000) 62, 959-968.

Vigano P., Somigliana E., Mangioni S., Vignali M., Vignali M. and Di Blasio A.M. Expression of interleukin-10 and its receptor is up-regulated in early pregnant versus cycling human endometrium. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* (2002) 87, 5730-5736.

Wang T.H., Wang H.S. and Soong Y.K. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* (2000) 88, 2619-2628.

Wegmann T.G., Lin H., Guilbert L. and Mosmann T.R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?. *Immunology today* (1993) 14, 353-356.

Wei M.C., Lindsten T., Mootha V.K., Weiler S., Gross A., Ashiya M., Thompson C.B. and Korsmeyer S.J. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes & development* (2000) 14, 2060-2071.

Welsh A.O. Uterine cell death during implantation and early placentation. *Microscopy research and technique* (1993) 25, 223-245.

Wilczynski J.R. Th1/Th2 cytokines balance--yin and yang of reproductive immunology. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* (2005) 122, 136-143.

Wira C.R. and Rossoll R.M. Oestradiol regulation of antigen presentation by uterine stromal cells: role of transforming growth factor-beta production by epithelial cells in mediating antigen-presenting cell function. *Immunology* (2003) 109, 398-406.

Wright C.W. and Duckett C.S. Reawakening the cellular death program in neoplasia through the therapeutic blockade of IAP function. *The Journal of clinical investigation* (2005) 115, 2673-2678.

Wyllie A.H., Kerr J.F. and Currie A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology* (1980) 68, 251-306.

Yagel S. The developmental role of natural killer cells at the fetal-maternal interface. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2009) 201, 344-350.

Yamashita H., Otsuki Y., Matsumoto K., Ueki K. and Ueki M. Fas ligand, Fas antigen and Bcl-2 expression in human endometrium during the menstrual cycle. *Molecular human reproduction* (1999) 5, 358-364.

Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Cai J., Peng T.I., Jones D.P. and Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* (1997) 275, 1129-1132.

Yang Y.L. and Li X.M. The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell research* (2000) 10, 169-177.

Yui J., Garcia-Lloret M., Wegmann T.G. and Guilbert L.J. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* (1994) 15, 819-835.

Zhang X.D., Franco A.V., Nguyen T., Gray C.P. and Hersey P. Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* (2000) 164, 3961-3970.

Zong W.X., Lindsten T., Ross A.J., MacGregor G.R. and Thompson C.B. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes & development* (2001) 15, 1481-1486.

PUBLICACIONES



Human Decidual Stromal Cells Protect Lymphocytes from Apoptosis

O. Blanco^{a,1}, E. Leno-Durán^{a,1}, J.C. Morales^a, E.G. Olivares^{a,b}, C. Ruiz-Ruiz^{a,*}

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

^b Hospital Universitario "San Cecilio", 18012 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 27 May 2009

Keywords:

Human
Stromal cells
Lymphocytes
Apoptosis
Reproductive immunology

ABSTRACT

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

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

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

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

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

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

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

¹ O. Blanco and E. Leno-Durán contributed equally to this work.

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

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

2. Materials and methods

2.1. Decidual stromal cell isolation and culture

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

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

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

2.2. Lymphocytes isolation and culture

For the extraction of decidual lymphocytes, decidual fragments from samples obtained as described above were finely minced in a small volume of RPMI 1640 and then pushed through a 53-microm sieve (Gallenkamp, Loughborough, UK). The resultant cell suspension was washed with RPMI and centrifuged on Ficoll-Paque at room temperature for 20 min at 600g. The cells were collected from the interface, washed and suspended in complete culture medium (RPMI 1640, 10% FCS, 100 U/ml penicillin, and 50 g/ml gentamicin), and incubated for 2 h at 37 °C in an atmosphere of 5% CO_2 to allow adherent cells to attach to the plastic. The supernatant containing decidual lymphocytes was then collected, purity was confirmed by flow cytometry (>90% CD45⁺) and the cells were washed and incubated as indicated.

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

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

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

2.3. Tumor cell lines

The Jurkat human leukemic T cell line and the SKBR3 human breast carcinoma cell line were maintained in culture in RPMI 1640 medium with 10% FCS, L-glutamine, penicillin and streptomycin at 37 °C in a humidified 5% CO_2 , 95% air incubator.

2.4. Reagents and antibodies

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

2.5. Flow cytometry analysis of surface and intracellular molecules

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

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

2.6. Detection of apoptotic cells

Hypodiploid apoptotic cells were detected by flow cytometry according to published procedures [28]. Briefly, cells were washed with PBS, fixed in cold 70% ethanol, and then stained with propidium iodide during treatment with RNase. Quantitative analysis of sub-G₁ cells was carried out in a FACScan cytometer.

To analyze nuclear morphology, cells were permeabilized with 0.5% Tween 20 in citric acid solution before staining the nuclei with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in a solution containing Na_2HPO_4 for 5 min at 37 °C, and were examined by fluorescence microscopy.

2.7. Co-culture experiments

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

2.8. Statistical analysis

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

3. Results

3.1. Expression of death receptors and ligands on DSC lines

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

3.2. Function of death receptors and ligands in DSC lines

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.5. DSC improve survival of primary lymphocytes

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

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

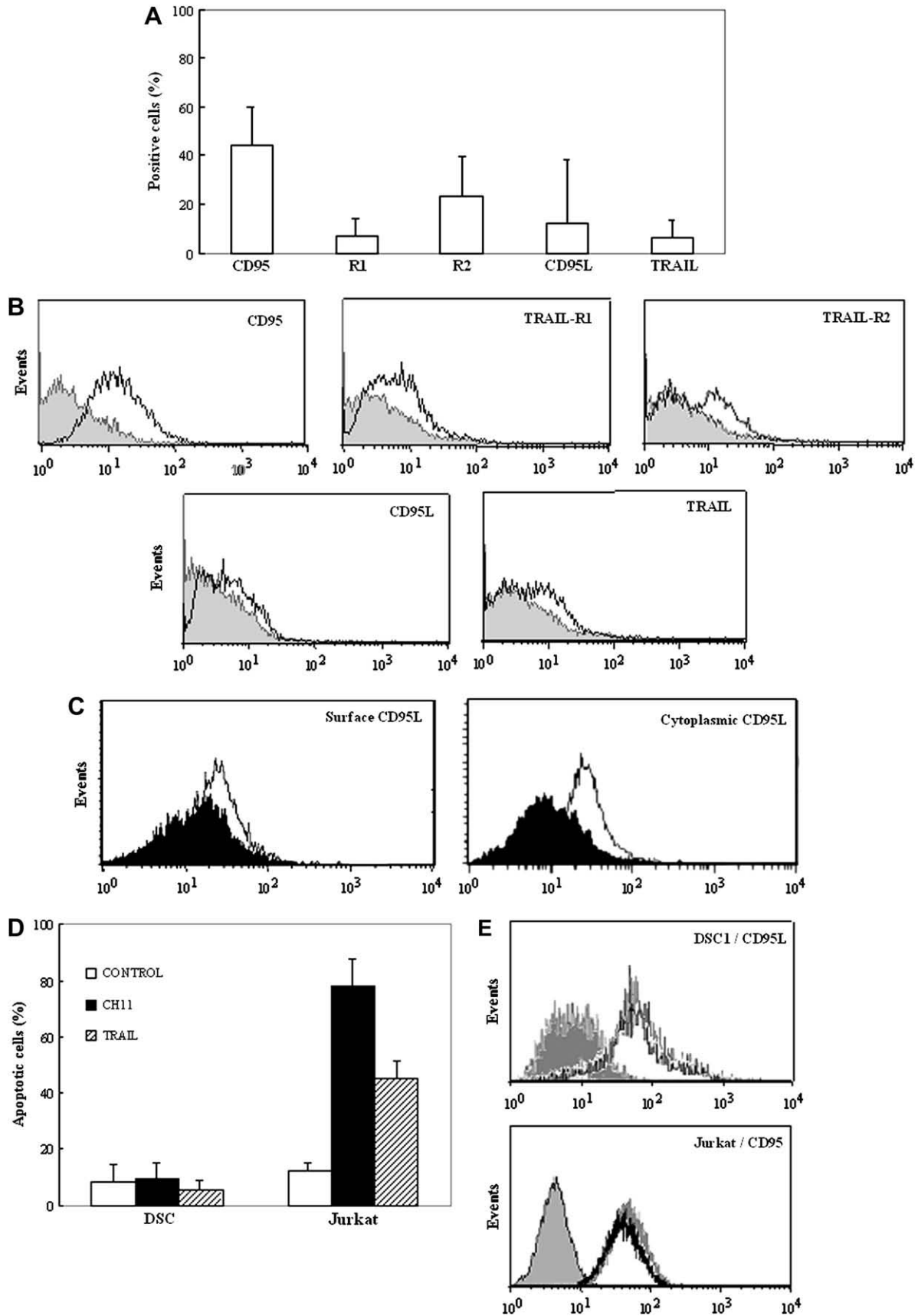


Table 1
Effect of CD95L⁺ DSC lines on Jurkat cells.

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

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

^b 13.5% TRAIL-positive cells.

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

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

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

4. Discussion

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

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

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

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

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

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

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

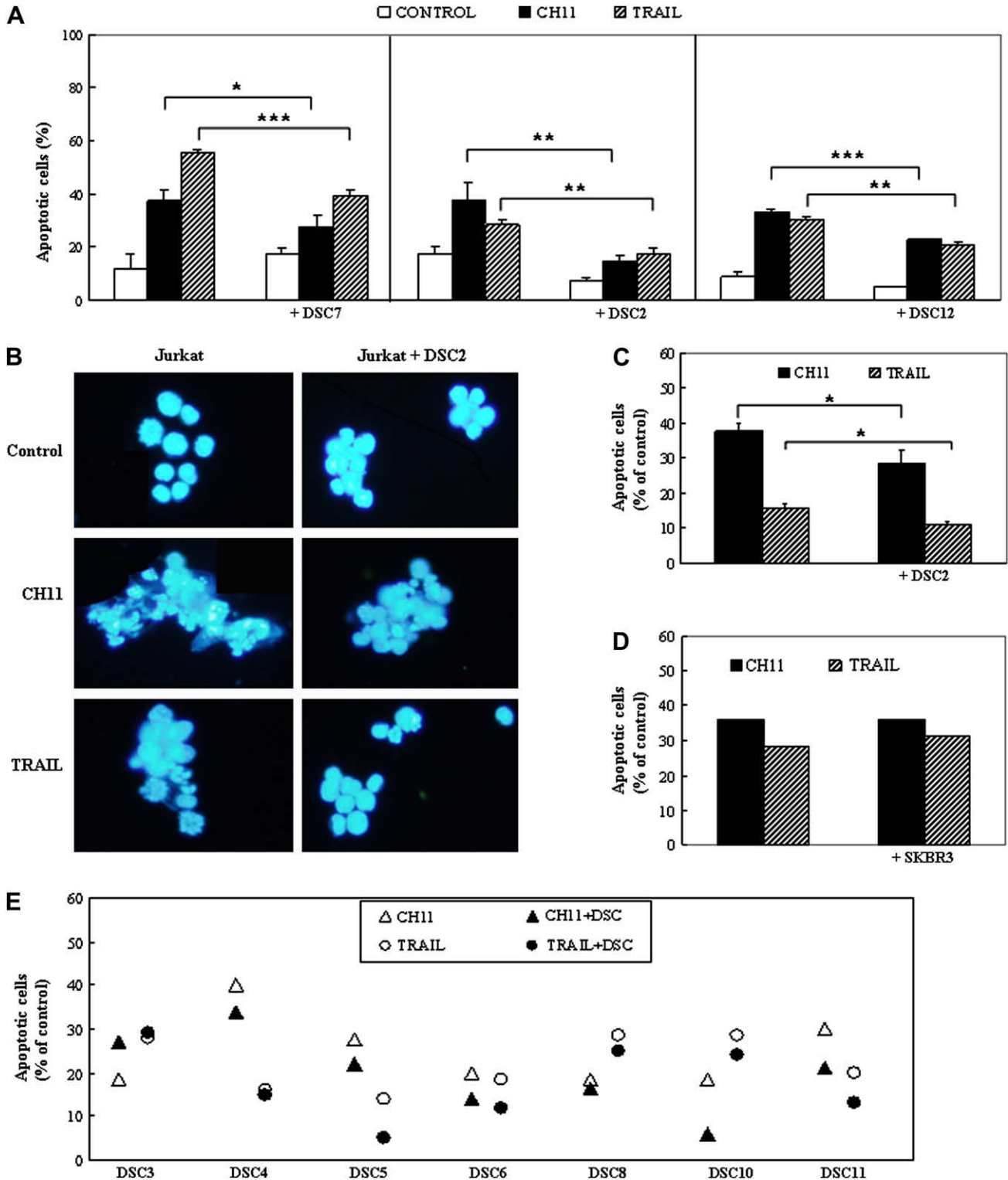


Fig. 2. Co-incubation with DSC reduces death receptor-mediated apoptosis in Jurkat cells. A) Jurkat cells incubated alone or co-incubated with different DSC lines, were treated without or with 2 ng/ml CH11 or 100 ng/ml TRAIL for 24 h. B–E) Jurkat cells were pretreated with 5 ng/ml CH11 or 200 ng/ml recombinant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

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

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

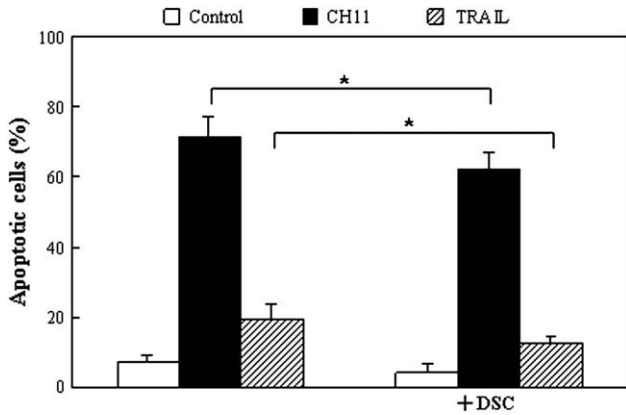


Fig. 3. Fresh DSC reduce death receptor-mediated apoptosis in Jurkat cells. Jurkat cells were pretreated for 30 min with 5 ng/ml CH11 or 200 ng/ml recombinant TRAIL. Cells were then washed and incubated in the presence or in the absence of fresh DSC for 24 h. Sub-G1 apoptotic cells were detected by flow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

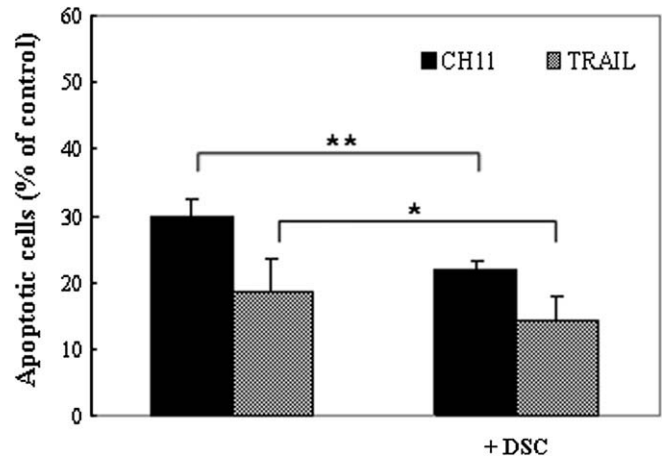


Fig. 4. Protective effect of DSC in the absence of cell contact. Jurkat cells were pretreated for 30 min with 5 ng/ml CH11 or 200 ng/ml TRAIL. After pretreatment and washing they were incubated alone or with DSC cultured on Transwell plates for 24 h. The percentage of apoptotic Jurkat cells was then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

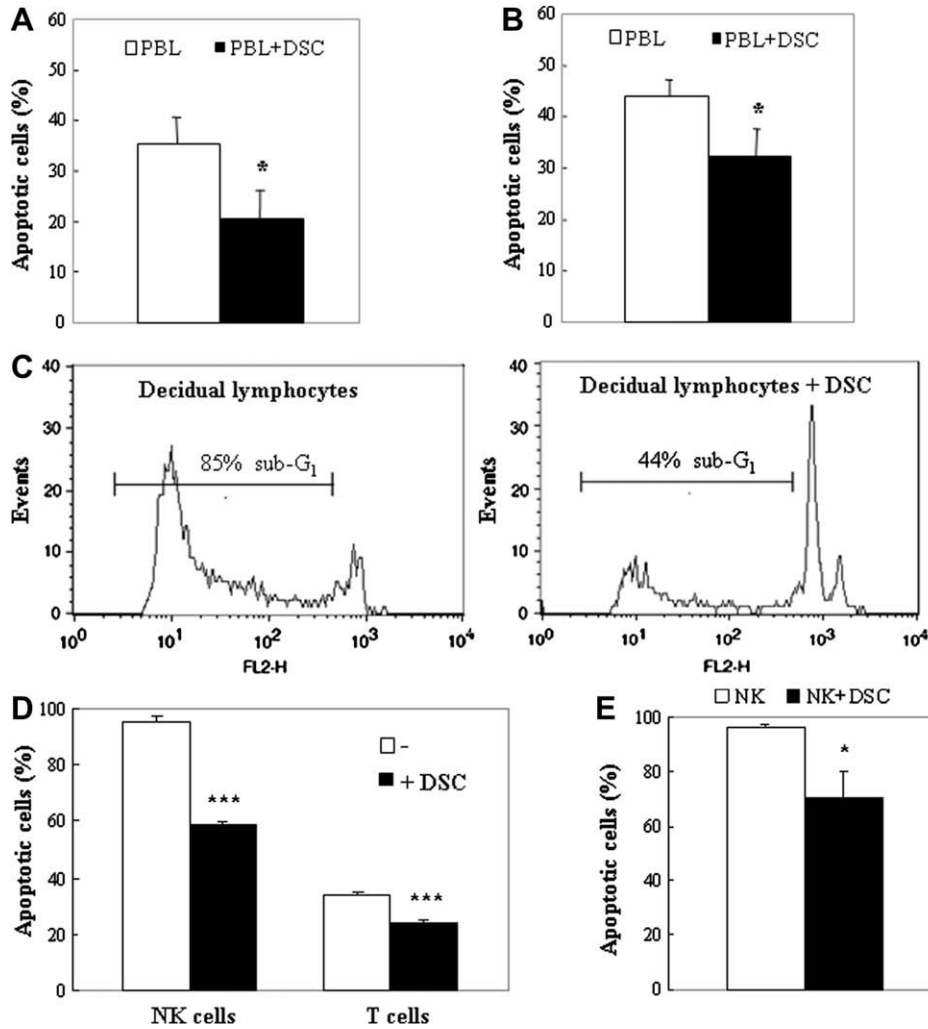


Fig. 5. Co-incubation with DSC protects primary lymphocytes from spontaneous apoptosis. Peripheral blood lymphocytes were cultured for 6 days in the absence of stimuli to allow spontaneous apoptosis, and then they were incubated alone or co-incubated with DSC in normal (A) or Transwell plates (B) for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

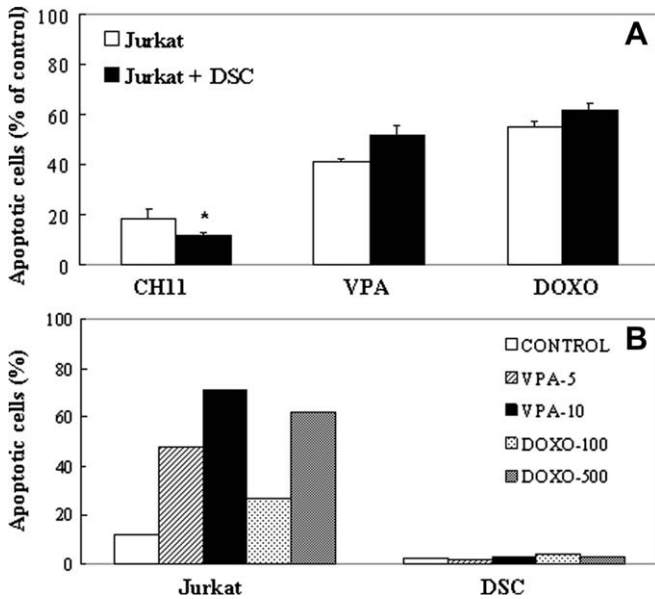


Fig. 6. Effect of DSC on the induction of apoptosis in Jurkat cells by chemotherapeutic drugs. A) Jurkat cells incubated alone or with DSC were treated with 5 mM valproic acid (VPA) or 250 ng/ml doxorubicin (DOXO) for 24 h. As a control for the protective effect of DSC, Jurkat cells were pretreated with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

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

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

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

Acknowledgments

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

References

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

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



Orphan Receptor Kinase ROR2 is Expressed in the Mouse Uterus

K. Hatta^a, Z. Chen^b, A.L. Carter^b, E. Leno-Durán^{b,c}, J. Zhang^b, C. Ruiz-Ruiz^c, E.G. Olivares^d, R.J. MacLeod^{e,f}, B.A. Croy^{b,*}

^a Department of Microbiology and Immunology, 18 Stuart Street, Queen's University, Kingston, ON K7L 3N6, Canada

^b Anatomy and Cell Biology, 18 Stuart Street, Queen's University, Kingston, ON K7L 3N6, Canada

^c Unidad de Inmunología, IBIMER, Universidad de Granada, Centro de Investigación Biomédica, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain

^d Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología, Universidad de Granada, Centro de Investigación Biomédica, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain

^e Department of Physiology, 18 Stuart Street, Queen's University, Kingston, Ontario, K7L 3N6, Canada

^f Gastrointestinal Disease Research Unit, Department of Medicine, Kingston General Hospital, Kingston, Ontario K7L 3N6, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 20 January 2010

Keywords:

Decidua
Estrous cycle
Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2
Uterine natural killer cell
WNT signaling

ABSTRACT

Objective: Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family, member 5A (WNT5A), is expressed in mouse decidua and is thought to play an important role in decidualization. We examined expression of the receptor for WNT5A, receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (ROR2), in the uteri of cycling and pregnant mice.

Study design: Reverse transcription (RT)-PCR and immunohistochemistry were performed.

Results: RT-PCR revealed that transcripts for *Ror2*, *Wnt3a*, *Wnt5a* and inhibitor of WNT signaling, Dickkopf homolog 1 (*Dkk1*), were present in the pregnant uterus. Immunohistochemistry revealed that in the virgin uterus, ROR2 is expressed in stromal cells and on the basal side of uterine gland and endometrial epithelial cells. During pregnancy, both the luminal and basal side of uterine gland epithelial cells expressed ROR2, stromal cell expression of ROR2 became more frequent and ROR2 expressing uterine Natural Killer (NK) cells and cells lining the maternal vascular space emerged. Immunofluorescence imaging and flow cytometry revealed that although uterine NK cells expressed ROR2, NK cells of the spleen were ROR2 negative.

Conclusion: The expression of ROR2 by endometrial epithelial cells may suggest WNT signaling has roles in uterine epithelial cell polarity or implantation. Expression of ROR2 by uterine NK cells may suggest WNT signaling regulates uterine NK cell functions such as angiogenesis and regulation of trophoblast migration. In summary, our results show that ROR2 expression by maternal uterine cells is influenced by pregnancy.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (ROR2) is a type 1 transmembrane protein expressed during embryonic development. Important in chondrocyte formation, ROR2 plays a role in cartilage and growth plate development [1]. Individuals with mutations in ROR2 display brachydactyly B (aplasia/hypoplasia of phalanges) [2] and Robinow syndrome [3], a syndrome characterized by a malformation of the limbs, face, head and genitalia [4]. ROR2 interacts with melanoma antigen family D, 1 (MAGED1) [5],

wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family, member 5A (WNT5A) [6] and frizzled homolog 2 (FZD2) [7]. Initially, it was reported that ROR2 participates in Wingless (WNT) signaling through the non-canonical beta-catenin (CTNNB1) independent pathway [8]; however, recent work has shown that ROR2 is also capable of canonical (CTNNB1 dependant) signaling [7].

Most of the literature concerning ROR2 addresses its interactions with WNT5A that occur during development. Recently however, ROR2 functions in other contexts have been described, such as its role in gut epithelial cell regeneration. In murine small intestine, ROR2 has been localized to epithelial cells with expression along the crypt-villus axis [9]. *In vitro* studies demonstrated that activation of the extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) on subepithelial myofibroblasts stimulated the synthesis and secretion of WNT5A [9]. A paracrine interaction was then revealed between myofibroblast WNT5A and epithelial ROR2, by showing

* Corresponding author. Department of Anatomy and Cell Biology, Room 924, Botterell Hall, 18 Stuart Street, Queen's University, Kingston, ON K7L 3N6, Canada. Tel.: +1 613 533 2859; fax: +1 613 533 2566.

E-mail address: croya@queensu.ca (B.A. Croy).

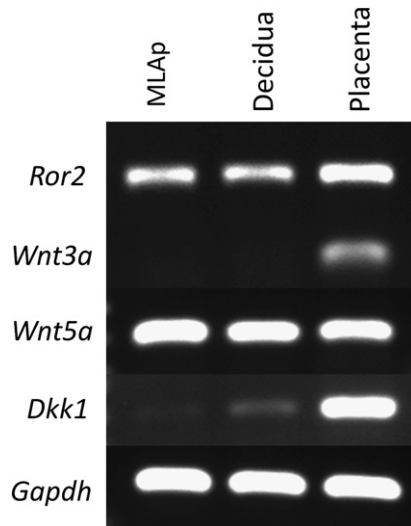


Fig. 1. Expression of *Ror2*, *Wnt3a*, *Wnt5a* and *Dkk1* transcripts in the pregnant mouse uterus. Complementary DNA from gd10 MLAp, decidua and placenta was amplified for WNT-related genes.

that WNT5A stimulation of ROR2 increased the caudal homeo-domain factor CDX2 protein expression and stimulation of sucrase–isomaltase promoter activity. WNT5A has also been shown to stimulate ROR2 on adenomatous polyposis coli (*APC*)-truncated colon cancer cells to inhibit defective CTNNB1 signaling by increasing E-type ubiquitin ligases [10]. This suggests in the normal adult intestine ROR2 can signal non-canonically.

ROR2 signaling appears dependent on the cell type and tissue it is expressed in (Li et al., 2008). Cell proliferation occurs in many adult tissues; however, the process of decidualization, the expansion of endometrial stromal cells in the uterus under the influences of progesterone and other signals, is one of the most critical because it is essential for blastocyst implantation and pregnancy in primates and rodents [11]. In humans, decidualization is initiated during the late secretory phase of the menstrual cycle to create a lush uterine wall receptive for implantation of the embryo [12–14]. If implantation occurs, decidualization continues. If implantation does not occur, the decidualizing uterine endometrium regresses and is shed as menstrual fluid. In rodents, primary decidualization is initiated anti-mesometrially in response to blastocyst implantation. This is followed by a secondary wave of decidualization that proceeds mesometrially to form the decidua basalis [15].

WNT-related and calcium regulating molecules are expressed in the decidualizing uterus. In pregnant mice, stanniocalcin-1 (STC1), a calcium regulator, is expressed by mesometrial stromal cells [16], suggesting calcium may play a role in decidualization. In the rat uterus, extracellular CaSR is hormonally regulated and expressed by decidualizing stromal cells [17]. The canonical WNT signaling molecule CTNNB1 [18] and inhibitor of WNT signaling, Dickkopf homologue 1 (DKK1), are expressed in the human endometrium [19]. The latter promotes trophoblast invasion in mice [20] and is regulated positively by progesterone in human endometrial stromal cells [21]. In mice, *Wnt5a* is expressed in the decidua [22], however expression of its receptor, ROR2, has not been addressed.

The goal of this investigation was to evaluate the expression of ROR2 in the virgin and pregnant mouse uterus and to identify the cell populations expressing this receptor. Given the expression of *Wnt5a* in the decidua, we hypothesized that its receptor, ROR2, would also be present. By identifying the cell populations expressing ROR2, functions for WNT signaling in uterine biology can be postulated and advance our understanding of decidualization and pregnancy.

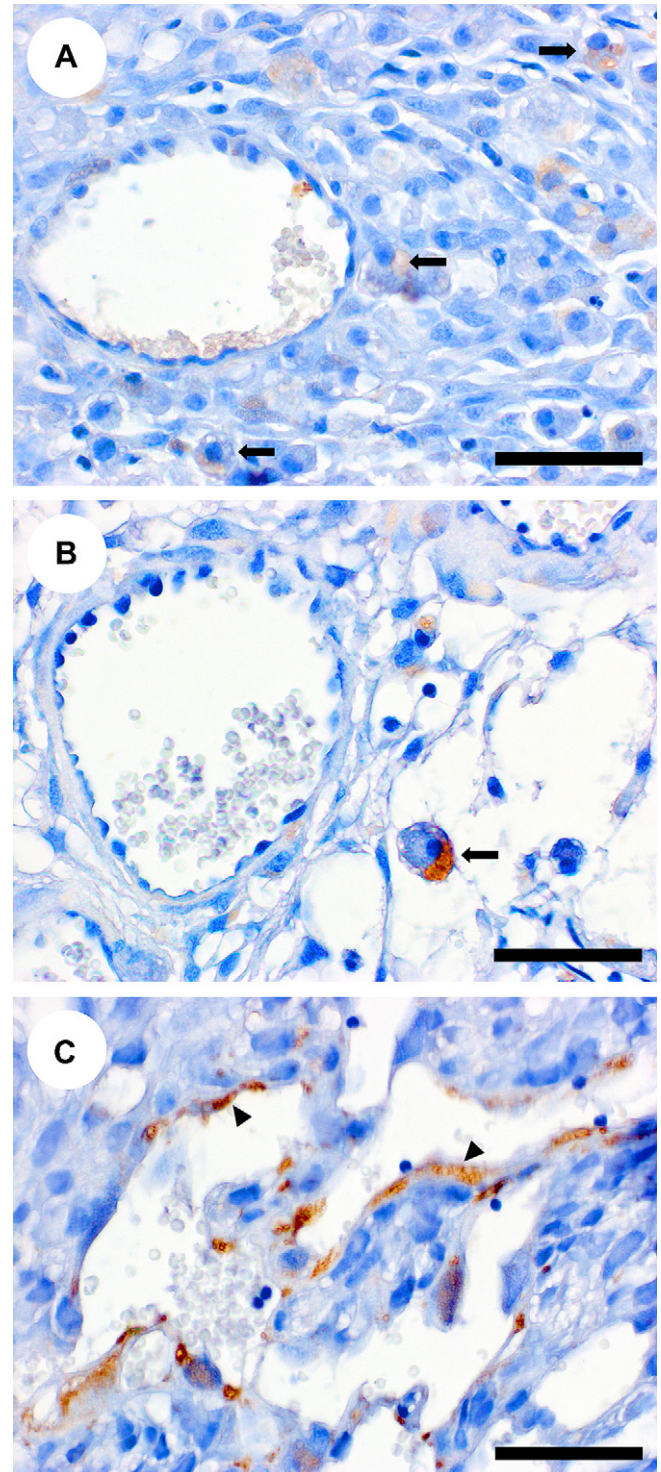


Fig. 2. Gestation day 10 mouse uterus was stained for ROR2 using immunohistochemistry. Peroxidase–DAB detection localized ROR2 expression to uterine NK-like cells (arrows) in the MLAp (A) and decidua (B). Placental labyrinth cells expected but not confirmed to be trophoblast cells (arrowheads) lining the maternal circulation (C) were also positive. Size bar = 50 μ m.

2. Materials and methods

2.1. Mice and tissue collection

C57BL6/J mice aged 6–8 weeks were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and were housed under conventional conditions and used under protocols fully approved by the Queen's University Animal Care Committee. Tissue

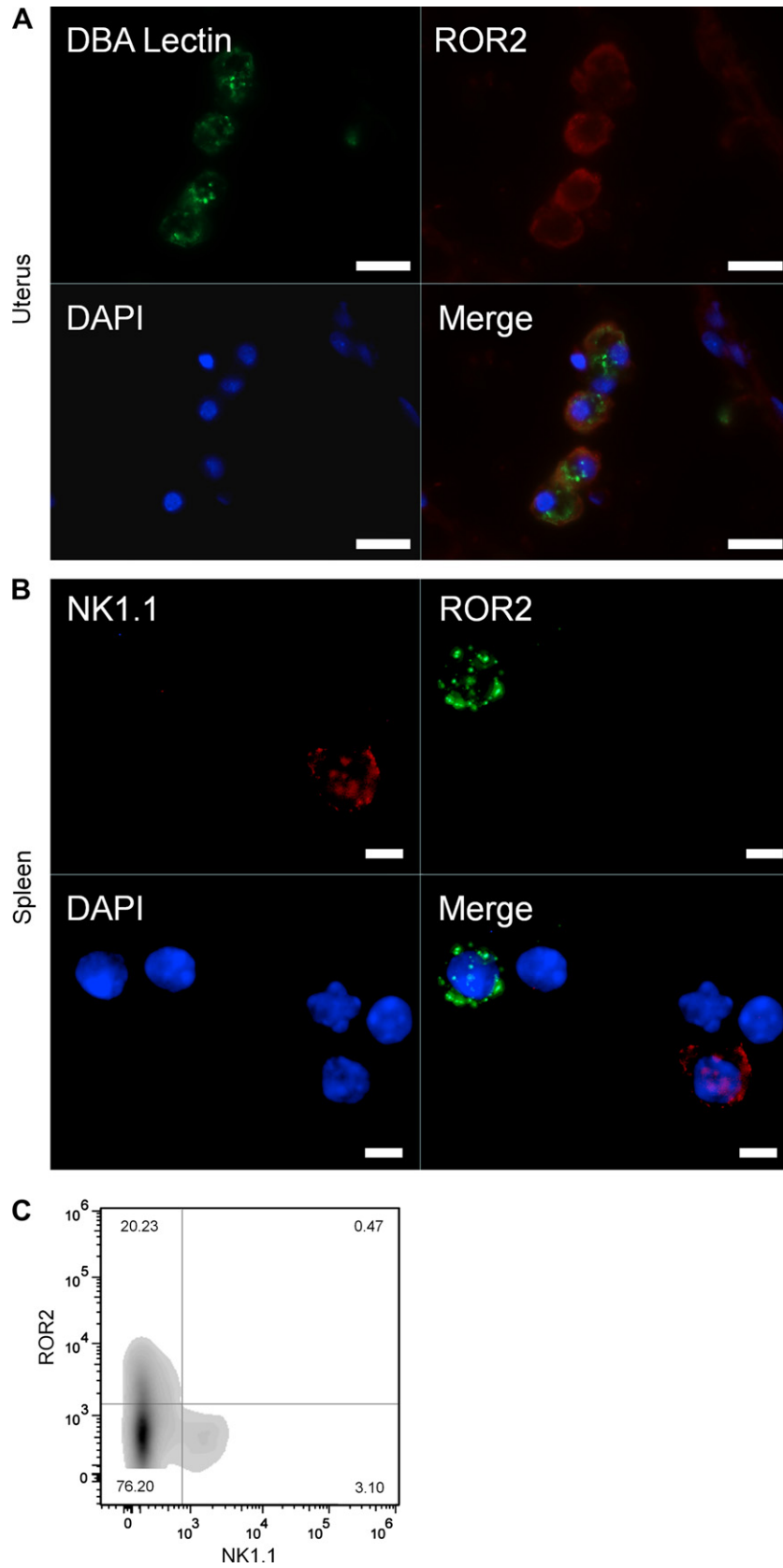


Fig. 3. Fluorescent immuno-detection reveals uterine NK cells express ROR2 while splenic NK cells do not. No differences were observed between spleens collected from virgin and pregnant animals. Shown here are virgin splenocytes. Using immunohistochemistry, gd10 implantation sites were stained for ROR2 expression and uterine NK cells (using DBA lectin) and counterstained using DAPI. Co-localization of these markers revealed uterine NK cells express ROR2 (A; bar = 20 μ m). To ask if splenic NK cells also expressed ROR2, immunohistochemistry (B; bar = 5 μ m) and flow cytometry (C) was done using a peripheral NK cell marker, NK1.1, on splenocytes. Splenic NK1.1 + cells were negative for ROR2.

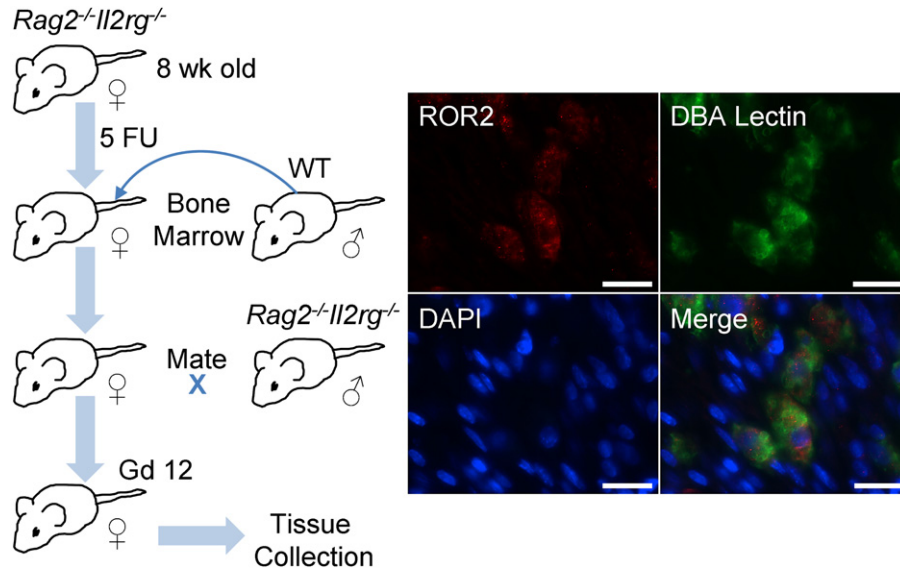


Fig. 4. ROR2 expressing uterine NK cells are absent in *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice, but appear after engraftment of WT bone marrow. *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice, genetically deficient in T, B and NK cells, also lack ROR2 expressing uterine NK cells. Adult mice conditioned with chemotherapeutic agent, 5-Fluorouracil (5FU), receive bone marrow intravenously 48 h later. These mice are then set up for pregnancy and their uteri become populated with ROR2 expressing uterine NK cells. The absence of these cells in pregnancies of knock-out mice (not shown) is further support that uterine NK cells express ROR2. Immunohistochemistry shows gd12 decidua basalis. Size bar = 20 μ m.

was collected from virgin ($n = 15$), gestation day (gd) 6 ($n = 9$), gd10 ($n = 18$) and gd12 ($n = 9$) mice. For tissues from virgin females, the estrous cycle stage was determined by visual examination of the vulva, microscopic examination of vaginal smears and histological characterization of the uterine glands, stroma and epithelium [23–25]. For gestational tissues, estrous females were paired with males and examined the following morning for a copulation plug. The day of plug detection was designated gestation day (gd)0. Uteri were used for RNA isolation, flow cytometry or immunohistochemistry. Spleens were collected from virgin mice and prepared for immunofluorescent wet-mount studies or flow cytometry.

Additionally, 8 week old female *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* knock-out mice ($n = 3$) genetically devoid of T, B and NK cells were used. These mice were treated with 5-fluorouracil (5FU; 150 mg/kg intraperitoneally) to eliminate progenitor cells. 48 h after 5FU, the mice were given bone marrow intravenously from an adult syngeneic male wild type (WT) donor ($n = 3$). The bone marrow recipient female mice were subsequently mated by a male *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mouse and implantation sites were collected and used for immunohistochemistry on gd12. Bone marrow was prepared by flushing femurs and tibias. Red blood cell lysis was performed under hypotonic conditions (NH_4Cl 0.15 M, KHCO_3 10 mM, EDTA 0.1 mM) and 2×10^7 viable white cells were used for injection.

2.2. PCR detection of *Ror2*, *Wnt3a*, *Wnt5a* and *Dkk1* transcript

Primers for *Ror2* (forward 5'TCCTTCTGCCACTCTCTT3', reverse 5'TTGTAGCA CTGGTGGTAGCG3'; size = 266 bp) were designed using Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). Primers for *Wnt3a*, *Wnt5a* and *Dkk1* were designed by others [20,26,27]. As an internal control, *Gapdh* targeting primers were also used (forward 5'GCTCGGTGTAACGGATTGGC3', reverse 5'GTGGGGT CTCGCTCTGGAAGA3'; size = 234 bp).

Gestation day 10 implantation sites were dissected and the MLAp, decidua basalis and placenta were collected aseptically. Total RNA was extracted using an RNeasy Mini Kit (Qiagen; Mississauga, ON, Canada). Complementary DNA was synthesized from 1.5 μ g total RNA using SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System (Invitrogen; Burlington, ON, Canada). PCR was performed to amplify the cDNA using the Qiagen Taq DNA polymerase PCR kit under the following conditions: 94 °C for 3 min (1 cycle); 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 30 s (32 cycles); and 72 °C for 10 min (1 cycle). PCR products were separated on a 1.0% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. PCR product bands were confirmed by sequencing.

2.3. Immunohistochemistry

Tissue was fixed using 4% paraformaldehyde (pH 7.4, 4 °C, 16 h) and processed and embedded into paraffin blocks. Paraffin blocks were sectioned at 7 μ m and mounted onto charged glass slides, baked dry, de-waxed using xylene and rehydrated in graded ethanol concentrations. For peroxidase-based detection, slides were treated with 3% hydrogen peroxide for 30 min to quench endogenous peroxidase activity before being washed and blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) for 30 min at room temperature. The sections were incubated with rabbit-anti-ROR2

antibody (1:200, Cell Signaling; Boston, MA, USA) overnight at 4 °C followed by biotinylated goat-anti-rabbit secondary antibody for 2 h at room temperature (1:200, DAKO; Mississauga, ON, Canada), ExtrAvidin Peroxidase for 30 min at room temperature (1:50, Sigma; Oakville, ON, Canada) and diaminobenzidine for detection (Liquid DAB + Substrate, DAKO; Mississauga, ON, Canada). Slides were counterstained in Harris' hematoxylin for 10 s, dehydrated, mounted and coverslipped. For fluorescence based detection, hydrogen peroxide pre-treatment was omitted. The rabbit-anti-ROR2 primary antibody was followed with fluorescent Alexa 594 goat-anti-rabbit antibody (1:200, Molecular Probes; Burlington, ON, Canada) for 2 h at room temperature. Sections were then incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) lectin (1:200, Sigma; Oakville, ON, Canada) for 2 h at room temperature to detect uterine NK cells. To quench autofluorescence, slides were incubated with 20 mM L-lysine (Sigma; Oakville, ON, Canada) for 30 min at room temperature before being coverslipped with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) added mounting media (DAPI Gold with Anti-Fade Agent, Molecular Probes; Burlington, ON, Canada).

2.4. Wet-mount immunofluorescence

Spleens were cut into pieces and sieved through a wire mesh to achieve single cell suspensions. Red blood cell lysis was performed using hemolytic conditions and the white cell enriched splenocytes were used for analysis. Cell suspensions were blocked using 20% bovine serum, then stained using PE conjugated anti-NK1.1 antibody (1:100, BD Pharmingen; Mississauga, ON, Canada) and rabbit-anti-Ror2 antibody (1:100) for 1 hr, followed with Alexa 488 goat-anti-rabbit antibody (1:100, Molecular Probes; Burlington, ON, Canada) for 30 min and DAPI added mounting media. Negative, isotype and single stained controls were also prepared. Slides were imaged under fluorescence using Axiovision computer software (Zeiss; Toronto, ON, Canada).

2.5. Flow cytometry

Splenocyte cell suspensions were prepared as described above. Cells were fixed using 4% paraformaldehyde for 20 min before fluorescent labeling was performed as described above. Flow cytometry was performed using a Cytomics FC 500 cytometer (Becton Dickinson; Mississauga, ON, Canada) and results were analyzed using FlowJo software (Tree Star; Ashland, OR, USA).

3. Results

3.1. *Ror2*, *Wnt3a*, *Wnt5a* and *Dkk1* transcripts are expressed in the pregnant mouse uterus

Using reverse transcription (RT) PCR, we first asked if *Ror2*, *Wnt3a*, *Wnt5a* and *Dkk1* transcripts were expressed at mid pregnancy (Fig. 1). Gestation day (gd)10 C57BL6 mouse implantation

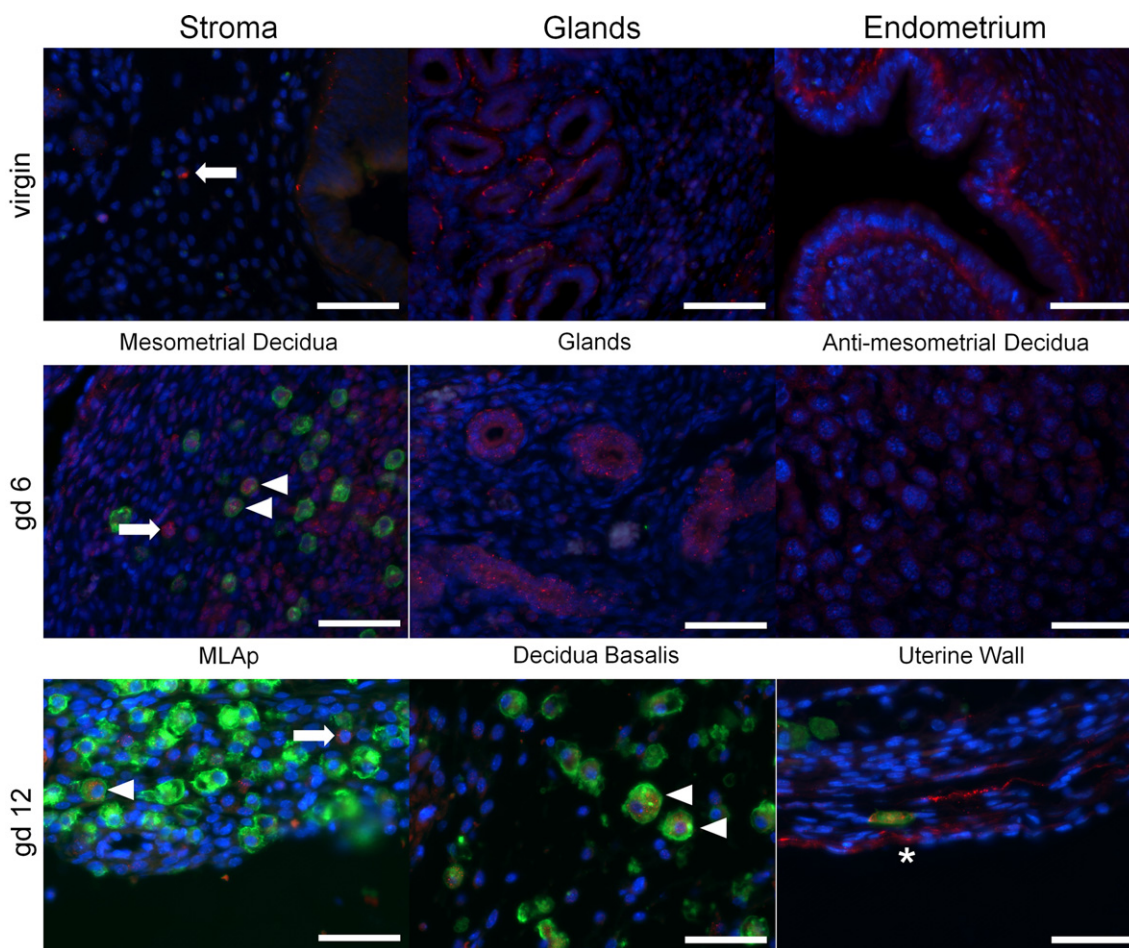


Fig. 5. Time-course fluorescent immunohistochemistry staining of the uterus. Virgin, gd6 and 12 uteri were stained for ROR2 (red). DBA lectin staining (green) was used to localize uterine NK cells and DAPI (blue) nuclear counterstaining was performed. In the virgin stroma, ROR2 expressing cells are rare (arrow). ROR2 expression was observed on the basal side of uterine gland and endometrial epithelial cells. Gestation day 6 mesometrial stroma showed positive ROR2 staining in both stromal cells (arrow) and uterine NK cells (arrowhead). At gd6, compared to the mesometrial stroma, the anti-mesometrial stroma appeared weaker in ROR2 expression. Uterine glands at gd6 expressed ROR2 on both the luminal and basal side. In gd12 implantation sites, MLAp area stromal cells (arrow) and uterine NK cells (arrowhead) expressed ROR2. Gestation day 12 uterine NK cells in the decidua also expressed ROR2. The uterine wall was also ROR2 positive. Size bar = 50 μ m.

sites dissected as the mesometrial lymphoid aggregate of pregnancy (MLAp), decidua basalis and placenta were homogenized and RNA was extracted. RT-PCR revealed transcripts for *Ror2*, *Wnt5a* and *Dkk1* were expressed in all tissue types. *Wnt3a* was not detectable in the maternal MLAp or decidua, however it was detected in fetal placental tissue. We proceeded to confirm that ROR2 protein was expressed in these tissues. Using peroxidase based immunohistochemistry, we determined that in gd10 implantation sites ROR2 expression was localized to cells that appeared to be uterine Natural Killer (NK) cells and to placental labyrinthine cells lining the maternal vascular space as recognized by nucleated red blood cells (Fig. 2). Trophoblast giant cells were occasionally positive (not shown).

3.2. Uterine NK cells express ROR2 but splenic NK cells do not

To confirm that uterine NK cells expressed ROR2, a uterine NK cell specific marker, *D. biflorus* agglutinin (DBA) lectin, was used. Co-localization of fluorescently tagged DBA lectin positive and ROR2 expressing cells showed that uterine NK cells did indeed express ROR2 (Fig. 3A). We asked if NK cells found in lymphoid organs were ROR2 positive using splenic NK cells. Co-localization of NK1.1 and ROR2 by immunofluorescent staining and by flow

cytometry showed that splenic NK1.1 positive cells were ROR2 negative (Fig. 3B, C).

For further confirmation that uterine NK cells expressed ROR2, female *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice genetically devoid of T, B and NK cells were used. Gestation day 12 implantation sites of these mice lacked ROR2 positive DBA lectin staining uterine NK cells (not shown). However, when mice were engrafted with syngeneic, wild type (WT), bone marrow intravenously and subsequently mated by a male *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mouse, gd12 implantation sites were populated with ROR2 expressing DBA lectin + uterine NK cells (Fig. 4).

3.3. ROR2 is expressed in the virgin and pregnant uterus by multiple cell types

To ask if any additional cell populations expressed ROR2, fluorescent immunohistochemistry was performed on virgin, gd6 and gd12 uteri (Fig. 5). In virgin mice, the basal side of the uterine epithelium was positive for ROR2. Uterine stromal cells were rarely positive for ROR2 in virgin uterus, but were frequently positive for ROR2 at gd6 in the mesometrial decidua. Weaker ROR2 staining was found in the anti-mesometrial decidua. In the virgin uterus, uterine gland epithelial cells were positive for ROR2 on the basal side; however at gd6, they were ROR2 positive on both the basal and luminal sides. Gestation day 6 uterine NK cells expressed ROR2.

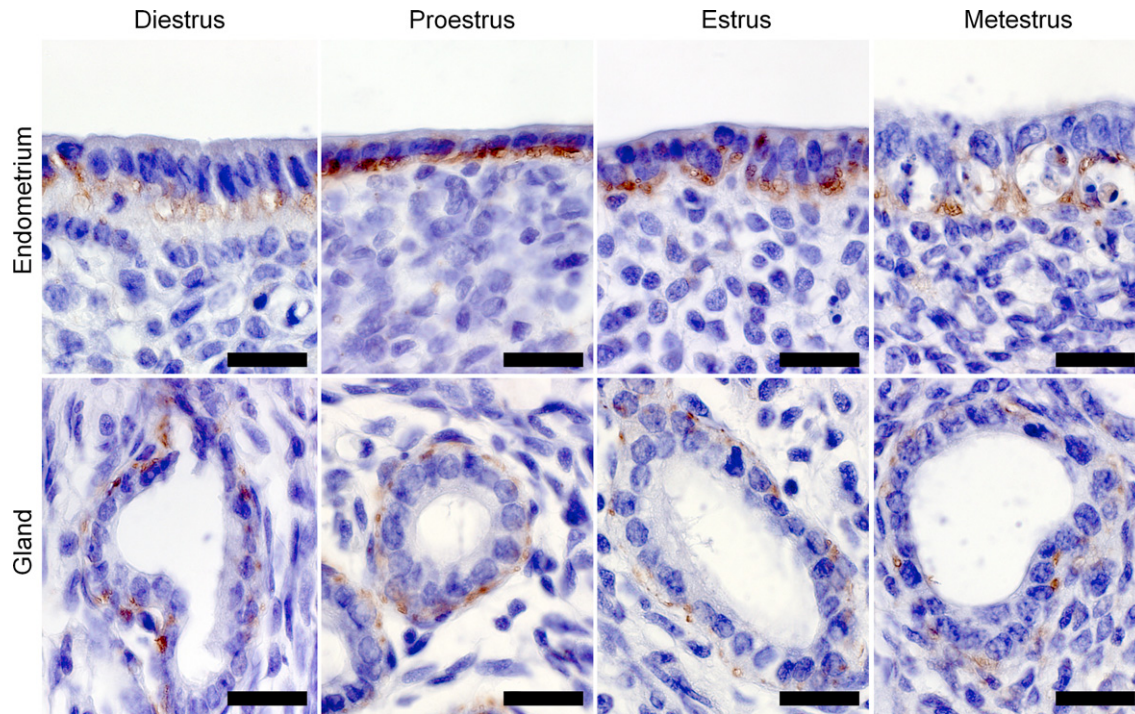


Fig. 6. Peroxidase ROR2 immunohistochemistry of virgin mouse uteri. Expression of ROR2 was localized to the basal side of endometrial and uterine gland epithelial cells throughout the estrous cycle. Size bar = 20 μ m.

At gd12, uterine NK cells in both the MLAp and decidua basalis expressed ROR2. The myometrium was also positive for ROR2.

3.4. ROR2 expression is maintained in the estrous cycle

The expression of ROR2 in the virgin uterus over the course of the estrous cycle was examined using peroxidase based immunohistochemistry (Fig. 6). ROR2 expression appeared to be dynamic and maintained on the basal side of uterine gland and endometrial epithelial cells throughout the estrous cycle.

4. Discussion

In this investigation, we report several novel observations on the expression of ROR2. We document ROR2 expression in the uterus: on uterine stromal cells, gland and endometrial epithelial cells, uterine NK cells, labyrinth cells lining the maternal vascular space and the myometrium. ROR2 expression is maintained throughout the estrous cycle of virgin mice, however during pregnancy the ROR2 positive endometrium at implantation sites is replaced by ROR2 expressing uterine NK cells and labyrinth cells lining the maternal vascular space that are expected but not confirmed to be trophoblast cells. In this way, the expression of ROR2 by maternal uterine cells changes in response to pregnancy. This investigation is also the first to ask if ROR2 is expressed in immune cells. Although DBA lectin + uterine NK cells expressed ROR2, NK1.1 + cells of the spleen were negative.

The function of ROR2 expression on the basal side of uterine endometrial epithelial cells is yet to be determined; however there are several postulates. One possibility is that ROR2 plays a role in cell polarization. Non-canonical WNT signaling via van Gogh like 2 (VANGL2) regulates cell polarity in the uterine epithelium during embryonic development [28]. Perhaps ROR2-mediated, non-canonical, WNT signaling is maintained on the basal side of the uterine endometrium to preserve cell polarity as the epithelium forms, dies and regenerates. *In silico* analysis of ROR2 using ExPASy

[29] generated an instability index of 53.24, which classifies the protein as unstable with an estimated half-life of 1 h. Considering this, the interpretation would be that it is not the case that the protein is transcribed early and maintained, rather, ROR2 expression is dynamic, possibly as a consequence of WNT signaling events that occur continuously.

Functionally, uterine NK cells play important roles in angiogenesis, vascular remodeling and regulation of trophoblast invasion [30–32]. It has been reported WNT5A is involved in regulation of angiogenesis [33], trophoblast migration [34] and in endothelial cell proliferation [35,36] and migration [35]. These activities seen in WNT5A activated cells fit well with our observation that uterine NK cell express ROR2, a receptor for WNT5A. Furthermore, the observation that splenic NK cells do not express ROR2 suggests that ROR2-related WNT signaling is responsible for uterine NK cell functions that phenotypically distinguish this lineage from peripheral NK cells. During embryonic development, cell migration within the cleft palate is directed by a WNT5A gradient along the anteroposterior axis via ROR2 signaling [6]. Whether WNT5A directs movement of ROR2 expressing uterine NK cells in the decidua is yet to be determined. Although we detected the presence of *Wnt5a* in the MLAp and decidua, we were unable to detect *Wnt3a* in these tissues. Since uterine NK cells are abundant in these tissues but rare in placenta [37], we postulate that non-canonical, CTNNB1-independent, WNT cell signaling is more likely to be occurring within uterine NK cells.

In conclusion, we report the presence of a new WNT signaling protein in the uterus; ROR2. Others have shown that the uterus is equipped for canonical WNT signaling, however in our present study we show that a major player in non-canonical WNT signal transduction, ROR2, is present on the endometrial and uterine gland epithelium, uterine NK and stromal cells, labyrinthine cells of the placenta lining the maternal circulation and myometrium. However, the signal(s) which direct and determine how and where non-canonical WNT signaling occurs in the uterus is yet to be determined. Further investigation on the functional consequence of

the presence of this receptor on many different cell types of the uterus merits further investigation.

Conflict of interests

None of the authors have conflicts of interest regarding the reported data.

Acknowledgments

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (BAC) and the Canada Research Chairs Program (BAC, RJM).

References

- [1] DeChiara TM, Kimble RB, Poueymirou WT, Rojas J, Masiakowski P, Valenzuela DM, et al. Ror2, encoding a receptor-like tyrosine kinase, is required for cartilage and growth plate development. *Nature Genetics* 2000;24:271–4.
- [2] Oldridge M, Fortuna M, Maringa M, Propping P, Mansour S, Pollitt C, et al. Dominant mutations in ROR2, encoding an orphan receptor tyrosine kinase, cause brachydactyly type B. *Nature Genetics* 2000;24:275–8.
- [3] van Bokhoven H, Celli J, Kayserili H, van Beusekom E, Balci S, Brussel W, et al. Mutation of the gene encoding the ROR2 tyrosine kinase causes autosomal recessive Robinow syndrome. *Nature Genetics* 2000;25:423–6.
- [4] Patton MA, Afzal AR. Robinow syndrome. *Journal of Medical Genetics* 2002;39:305–10.
- [5] Matsuda T, Suzuki H, Oishi I, Kani S, Kuroda Y, Komori T, et al. The receptor tyrosine kinase ROR2 associates with the melanoma-associated antigen (MAGE) family protein dlxin-1 and regulates its intracellular distribution. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:29057–64.
- [6] He F, Xiong W, Yu X, Espinoza-Lewis R, Liu C, Gu S, et al. Wnt5a regulates directional cell migration and cell proliferation via Ror2-mediated non-canonical pathway in mammalian palate development. *Development* 2008;135:3871–9.
- [7] Li C, Chen H, Hu L, Xing Y, Sasaki T, Villosis M, et al. Ror2 modulates the canonical Wnt signaling in lung epithelial cells through cooperation with Fzd2. *BMC Molecular Biology* 2008;9:11.
- [8] Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara B, et al. The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* 2003;8:645–54.
- [9] Pacheco II, MacLeod RJ. CaSR stimulates secretion of Wnt5a from colonic myofibroblasts to stimulate CDX2 and sucrase-isomaltase using Ror2 on intestinal epithelia. *AJP – Gastrointestinal and Liver Physiology* 2008;295:G748–59.
- [10] MacLeod RJ, Hayes M, Pacheco I. Wnt5a secretion stimulated by the extracellular calcium-sensing receptor inhibits defective Wnt signaling in colon cancer cells. *AJP – Gastrointestinal and Liver Physiology* 2007;293:G403–11.
- [11] Glasser SR, Aplin JD, Giudice LC, Tabibzadeh S. The endometrium. London: Taylor & Francis; 2002.
- [12] Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, et al. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 2002;143:2119–38.
- [13] Quenby S, Nik H, Innes B, Lash G, Turner M, Drury J, et al. Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure. *Human Reproduction* 2009;24:45–54.
- [14] Torry DS, Leavenworth J, Chang M, Maheshwari V, Groesch K, Ball ER, et al. Angiogenesis in implantation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2007;24:303–15.
- [15] Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003.
- [16] Stasko SE, DiMattia GE, Wagner GF. Dynamic changes in stanniocalcin gene expression in the mouse uterus during early implantation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2001;174:145–9.
- [17] Xiao LJ, Yuan JX, Li YC, Wang R, Hu ZY, Liu YX. Extracellular Ca²⁺-sensing receptor expression and hormonal regulation in rat uterus during the peri-implantation period. *Reproduction* 2005;129:779–88.
- [18] Chen Q, Zhang Y, Lu J, Wang Q, Wang S, Cao Y, et al. Embryo-uterine cross-talk during implantation: the role of Wnt signaling. *Molecular Human Reproduction* 2009;15:215–21.
- [19] Tulac S, Nayak NR, Kao LC, van Waes M, Huang J, Lobo S, et al. Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 2003;88:3860–6.
- [20] Peng S, Li J, Miao C, Jia L, Hu Z, Zhao P, et al. Dickkopf-1 secreted by decidual cells promotes trophoblast cell invasion during murine placentation. *Reproduction* 2008;135:367–75.
- [21] Tulac S, Overgaard MT, Hamilton AE, Jumbel NL, Suchanek E, Giudice LC. Dickkopf-1, an inhibitor of Wnt signaling, is regulated by progesterone in human endometrial stromal cells. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 2006;91:1453–61.
- [22] Hayashi K, Erikson DW, Tilford SA, Bany BM, Maclean II JA, Rucker III EB, et al. Wnt genes in the mouse uterus: potential regulation of implantation. *Biology of Reproduction* 2009;80:989–1000.
- [23] Allen E. The oestrous cycle in the mouse. *American Journal of Anatomy* 1922;30:297–371.
- [24] Jablonka-Shariff A, Ravi S, Beltsos AN, Murphy LL, Olson LM. Abnormal estrous cyclicity after disruption of endothelial and inducible nitric oxide synthase in mice. *Biology of Reproduction* 1999;61:171–7.
- [25] Nothnick WB. Disruption of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene results in altered reproductive cyclicity and uterine morphology in reproductive-age female mice. *Biology of Reproduction* 2000;63:905–12.
- [26] Song HH, Shi W, Xiang YY, Filmus J. The loss of glypican-3 induces alterations in Wnt signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280:2116–25.
- [27] Marikawa Y, Tamashiro DA, Fujita TC, Alarcon VB. Aggregated P19 mouse embryonal carcinoma cells as a simple in vitro model to study the molecular regulations of mesoderm formation and axial elongation morphogenesis. *Genesis* 2009;47:93–106.
- [28] vandenBerg AL, Sasso DA. Non-canonical Wnt signaling regulates cell polarity in female reproductive tract development via van Gogh-like 2. *Development* 2009;136:1559–70.
- [29] Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research* 2003;31:3784–8.
- [30] Croy BA, van den Heuvel MJ, Borzychowski AM, Tayade C. Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunological Reviews* 2006;214:161–85.
- [31] Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nature Reviews Immunology* 2002;2:656–63.
- [32] Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature Medicine* 2006;12:1065–74.
- [33] Huang CI, Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Kontani K, Yokomise H, et al. Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor—an expression in non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2005;23:8765–73.
- [34] Hayashi K, Burghardt RC, Bazer FW, Spencer TE. WNTs in the ovine uterus: potential regulation of periimplantation ovine conceptus development. *Endocrinology* 2007;148:3496–506.
- [35] Cheng CW, Yeh JC, Fan TP, Smith SK, Charnock-Jones DS. Wnt5a-mediated non-canonical Wnt signalling regulates human endothelial cell proliferation and migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008;365:285–90.
- [36] Masckauchan TN, Agalliu D, Vorontchikhina M, Ahn A, Parmalee NL, Li CM, et al. Wnt5a signaling induces proliferation and survival of endothelial cells in vitro and expression of MMP-1 and Tie-2. *Molecular Biology of the Cell* 2006;17:5163–72.
- [37] Paffaro VA, Bizinotto MC, Joazeiro PP, Yamada AT. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. *Placenta* 2003;24:479–88.

Uterine NK Cells, Spiral Artery Modification and the Regulation of Blood Pressure During Mouse Pregnancy

Suzanne D. Burke¹, Valerie F. Barrette¹, Jonathan Gravel¹, Alexandra L. I. Carter¹, Kota Hatta², Jianhong Zhang¹, Zhilin Chen¹, Ester Leno-Durán¹, Juares Bianco¹, Sean Leonard³, Coral Murrant³, Michael A. Adams⁴, B. Anne Croy¹

¹Department of Anatomy and Cell Biology, Queen's University, Kingston, ON, Canada;

²Department of Microbiology and Immunology, Queen's University, Kingston, ON, Canada;

³Department of Human Health and Nutritional Science, University of Guelph, Guelph, ON, Canada;

⁴Department of Pharmacology and Toxicology, Queen's University, Kingston, ON, Canada

Keywords

Implantation site, intravital microscopy, placenta, radiotelemetry, uNK cell

Correspondence

Anne Croy, Department of Anatomy and Cell Biology, Queen's University, Room 915, Botterell Hall, 18 Stuart Street, Kingston, ON, Canada K7L 3N6. E-mail: croya@queensu.ca

Invited review for 30th Anniversary Issue of the American Society for Reproductive Immunology.

Submitted January 14, 2010;
accepted January 19, 2010.

Citation

Burke SD, Barrette VF, Gravel J, Carter ALI, Hatta K, Zhang J, Chen Z, Leno-Durán E, Bianco J, Leonard S, Murrant C, Adams MA, Anne Croy B. Uterine NK cells, spiral artery modification and the regulation of blood pressure during mouse pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 472–481

doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00818.x

Introduction

Mammalian gestational success is a dynamic, exquisitely coordinated process involving systemic and local changes in the maternal neuroendocrine, reproductive, cardiovascular and immune systems. The mothers' roles during pregnancy are provision of an optimal environment for implantation and of adequate nutrition for the conceptuses' changing

Reproductive success in mammals involves coordinated changes in the immune and cardiovascular as well as in the neuroendocrine and reproductive systems. This review addresses studies that identify potential links for NK cells and T cells with the local and systemic cardiovascular adaptations of pregnancy. The studies reviewed have utilized immunohistochemistry and *in vivo* analyses of vascular parameters by ultrasound, chronic monitoring of hemodynamics via radiotelemetric recording and intravital microscopy. At the uterine level, functional subsets of uterine natural killer cells were identified. These included subsets expressing molecules important for vasoregulation, in addition to those previously identified for angiogenesis. Spiral arteries showed conducted responses that could account for conceptus control of vasoactivity and mouse gestational blood pressure 5-phase pattern. Vascular immunology is an emerging transdisciplinary field, critical for both reproductive immunology and cardiovascular disease.

demands until parturition, including removal of waste products. Maintenance of maternal cardiovascular homeostasis is critical during the interval of gestation. Studies of cardiovascular disease have defined roles for both adaptive and innate immunity in onset and progression of pathology. Indeed, immune-modulating therapies are being assessed for their clinical value in arrest of cardiovascular disease progression. Studies that address potential links

between the immune system and maternal cardiovascular adaptations of normal pregnancy are the focus of this review, particularly as instructive to our understanding of uterine natural killer (uNK) cell-based functions in pregnancy and in maternal vascular remodeling.

Uterine natural killer cells

uNK cells are a transient, differentiated population of NK lymphocytes, defined by both location and specialized functions as being distinct from circulating NK cells. uNK cells have been especially well studied in women and in mice.¹⁻³ uNK cells differentiate within implantation sites during endometrial decidualization. This has been linked with the onset of interleukin (Il)-15 synthesis by endometrial stromal cells.⁴⁻⁷ In mice, uNK cells appear post-implantation while in humans their appearance is pre-implantation and begins during the late secretory phase of each menstrual cycle. In both humans and mice, uNK cells have angiogenic functions⁸⁻¹¹ and the cell population declines from mid pregnancy.^{10,12} uNK cells secrete vascular endothelial growth factor, placental growth factor and other angiogenic molecules.⁸⁻¹¹ Co-transplantation of human CD56^{bright} uNK cells and choriocarcinoma cells subcutaneously into immune deficient nude mice showed that human uNK cells promote more vessel formation and trophoblast invasion than CD56^{bright} cells from peripheral blood of the same woman. In mice, absence of uNK cells results in the failure of spiral

arterial (SA) modification between gestation day (gd)9-10. A similar function has been more difficult to address in human implantation sites because of the more extensive invasion of these vessels by fetal trophoblastic cells.¹³ However, a number of reports are appearing confirming that as in mice,¹⁴ changes in human SA occur in advance of the presence of intravascular trophoblast in that region.^{2,15} Studies from mice suggest that it is the secretion of interferon gamma (Ifng) by uNK cells that provides the signaling to transiently change SA from constricted, muscular, vasoactive arterioles into dilated, thin-walled vein-like structures. Because of the absence of a similar arterial change in women with pre-eclampsia, who clinically have hypertension and renal protein excretion as their presenting pathologies, it is widely held that SA modification within the uterus is essential for maintenance of normal blood pressure (i.e. mean arterial pressure; MAP) during pregnancy. This thinking logically leads to the question of whether uNK cells contribute to regulation of MAP.¹⁶⁻¹⁸

The principal regulator of hemodynamic function is the renal renin-angiotensin-aldosterone-system (RAS; Fig. 1). RAS molecules work in concert with the nervous system, specialized baro- and chemoreceptors within the vasculature and endocrine mediators to rapidly detect changes in electrolytes, blood pressure or blood volume. They directly or indirectly return the cardiovascular system to homeostasis by inducing vasoconstriction, vasodilation, retention or excretion of water and/or release of vasoactive compounds (angiotensin II, aldoste-

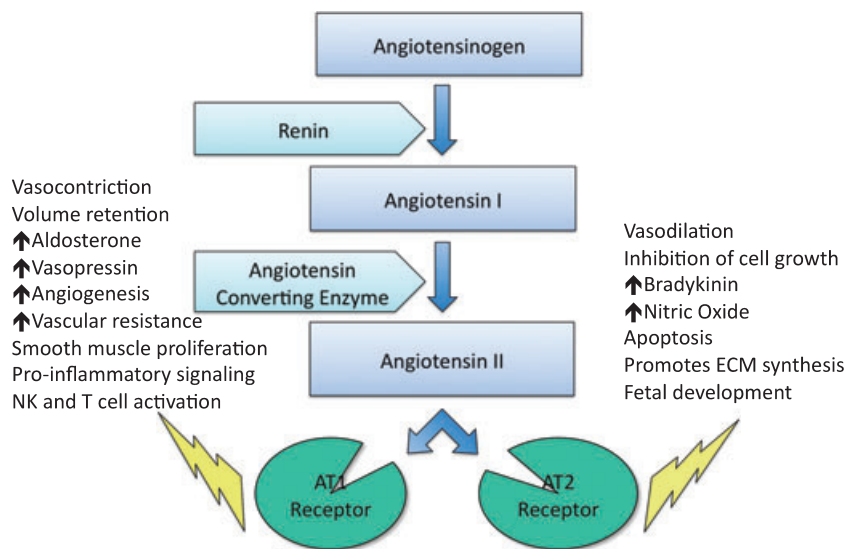


Fig. 1 Diagram of Renin-Angiotensin System, illustrating major functions of angiotensin II upon interaction with the AT1 and AT2 receptors.

rone). While cardiovascular homeostasis is maintained during pregnancy, the normal regulatory mechanisms are altered. Because of significant blood volume expansion, there is activation of RAS; however, the vasculature becomes insensitive to RAS products. The cause of this insensitivity is unknown, but it may contribute to the transient fall in MAP during early gestation, as the RAS is a potent vasoconstrictor.

Human NK cells and T cells from blood were recently shown to respond to Ang II by proliferating, shifting cytokine production toward IFN γ production and migration.¹⁹ Further study showed that NK cells (defined as CD56+) and T cells (defined as CD3+) expressed not only the key receptors for Ang II (AT1 and AT2), but all RAS components (renin, renin receptor, angiotensinogen, angiotensinogen converting enzyme).

Expression and *in vivo* function of T cell-based RAS has been shown in mice. Not only was expression of RAS confirmed but mice genetically deficient in T and B cells themselves (Rag-1 null) or transplanted by marrow from donors deleted in AT1 had, like pregnant women, blunted responses to Ang II infusion.²⁰ We asked whether mouse uNK cells express AT1 and AT2 (Hatta, MSc Thesis, 2009, Queen's University). Using immunohistochemistry on samples from C57BL/6 mice, we found that at gd6, ~10% of uNK cells were AT1 reactive and ~20% AT2 reactive. By mid-gestation, these values were ~20 and 40% respectively. Atrial natriuretic peptide, a molecule that inhibits renin and aldosterone production and counteracts Ang II-induced effects was not found in uNK cells at gd8 but was expressed by all uNK cells studied at gd10, once SA modification had occurred. These data indicate that mouse uNK cells may have vasoactive functions in addition to the functions for the promotion and regulation of angiogenesis.

The data on expression of AT1 and AT2 as well as other markers by mouse uNK cells strongly suggest uNK cells are functionally heterogeneous and should now be classified by as functionally distinct subsets. Mouse uNK cells are commonly recognized histologically by one of two stains, periodic acid Schiff's (PAS) reagent that reacts with glycoproteins in the cytoplasmic granules of uNK cells or *Dolichos biflorus* (DBA) lectin that recognizes terminal N-acetylgalactosamine expressed by the cell membrane as well as by the cytoplasmic granules of uNK cells.^{21,22} Cells combining both DBA lectin reactive surfaces and

cytoplasmic granules are not found outside of the uterus in virgin mice or mice pregnant between gd 0.5–7.5,²³ indicating that there is no peripheral source for mature mouse uNK cells. PAS and DBA lectin stains are not fully coincident but only two uNK cell subpopulations can be defined in normal pregnant mice by dual staining for these markers, PAS+DBA⁻ or PAS+DBA⁺.²⁴ Only the latter cell phenotype develops at implantation sites in pan-lymphocyte deficient mice of genotype *Rag2*^{-/-}/*Il2rg*^{-/-} (formerly *Rag2*^{-/-}/ γ c^{-/-}) grafted by normal bone marrow at either gd6 (Zhang and Croy, unpublished data) or at gd12.5. Thus, uNK cells with the phenotype PAS+DBA⁺, which are ~50% of the uNK cells at gd6 and >80% or more by mid-gestation (gd10 and 12) are thought to represent cells differentiated from uterine homed precursors while PAS+DBA⁻ cells may arise from *in situ* progenitors. A number of angiogenic functions differ between these two uNK cell subsets. The PAS+DBA⁻ cell subset appears to be regulatory and encompasses Ifn γ and Il-22 producing cells (Chen, Zhang, Colucci, Croy, MS in preparation).

Spiral arteries in pregnant mice

The histological appearance of SA in pregnant normal mice is typical of arteries for at least 8 days. Rapid changes are found between gd9 and 10. The resulting arteries have reduced muscular coats and greater lumen areas. EFNB2 and EPHB4 are typical molecules used to discriminate between arterial and venous vessels. When we applied antibodies against these molecular markers to normal mouse implantation sites, SA observed at gd6.5 and 8.5 were EFNB2+EPHB4⁻, the phenotype expected for arteries. At gd10.5 however, mixed expression of these molecules was seen even in single vessel cross-sections, and by gd12.5 the vessels had strong EPHB4⁺ (venous) expression. It was of considerable interest that uNK cells expressed both markers. At gd6.5, uNK cells were EFNB2+EPHB4⁻ but, from gd8.5, had EPHB4⁺ expression, which was strong at gd10.5–12.5. Indeed, at gd10.5, both vascular phenotyping markers were more strongly expressed by uNK cells than by blood vessels. The functional significance for uNK cells of this expression remains undefined. In alymphoid mice of genotype *Rag2*^{-/-}/*Il2rg*^{-/-} that do not experience gestational SA modification, SA remained EFNB2+EPHB4⁻ from gd6.5 to 12.5, suggesting retention of arterial func-

tion and myometrium became unusual with very strong expression of EFNB2 and for EPHB4.²⁵

Clinical literature suggests that absence of SA modification is associated with vasospasm in pregnancy and with placental and possibly fetal hypoxia.^{26–28} The retention of arterial phenotype by SA in alymphoid mice led us to examine spiral and various upstream arteries across pregnancy of normal and *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice by ultrasound using an RMV704 40 MHz probe (Vero770; VisualSonics, Toronto, ON, Canada). There were no detectable differences in blood velocity, pulsatility or resistance (Fig. 2). This is inconsistent with our measured, histological differences in SA at gd12 that provided a calculated structural resistance indicating there would be a 40% increased resistance in SA in alymphoid mice.¹⁸ Further, we infused mated, normal and *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice on BALB/c backgrounds with Hypoxia Probe™-1 to evaluate conceptus and maternal tissue hypoxia at killing. Unexpectedly, when a full time course of study (gd6–18) was reviewed, there were no significant differences in reactivity with the probe between normal or *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} placentas or fetal tissues (Leno-

Duran et al., submitted). This suggests that retention of arterial phenotype does not limit perfusion of implantation sites through mid- to late-gestation. It is of considerable interest that relative hypoxia was found in only one of five maternal tissues studied: the kidney (Fig. 3). This relative hypoxia was seen in the normal, but not in *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice. We postulate that, in comparison to controls, *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice will have increased blood flow in the uterine and renal vessels to compensate for the lack of SA remodeling. Analyses of our serial ultrasound data to address this question is ongoing and it will be correlated with the systemic hemodynamic data we have obtained using radiotelemetry.

Systemic effects of the immune system on maternal hemodynamics

Radiotelemetry is an extremely powerful research tool for continuous hemodynamic monitoring of animals using surgically implanted probes with inter-arterial solid-state catheters. This technology has been miniaturized for mice but its cost, comparative to less-accurate measurement of MAP, is high. David

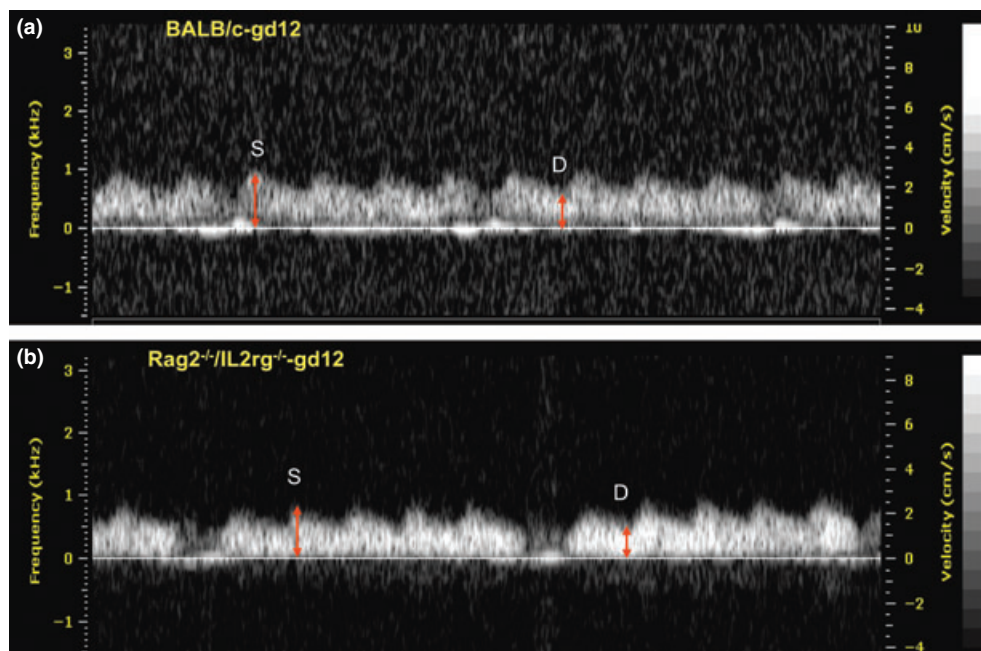


Fig. 2 Doppler waveforms of spiral arteries of normal (upper panel) or alymphoid *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} (low panel) mice at mid-gestation (gd12). Peak systolic velocity (S) and end-diastolic velocity (D) are indicated. Hemodynamics of spiral arteries are equivocal between normal and alymphoid mice when examining blood velocity, resistance index (RI) and pulsatility index (PI), or vascular pattern. Ultrasound imaging was performed with Vevo 770 (Visual Sonic, Toronto, ON, Canada) equipped with a 40-MHz probe.

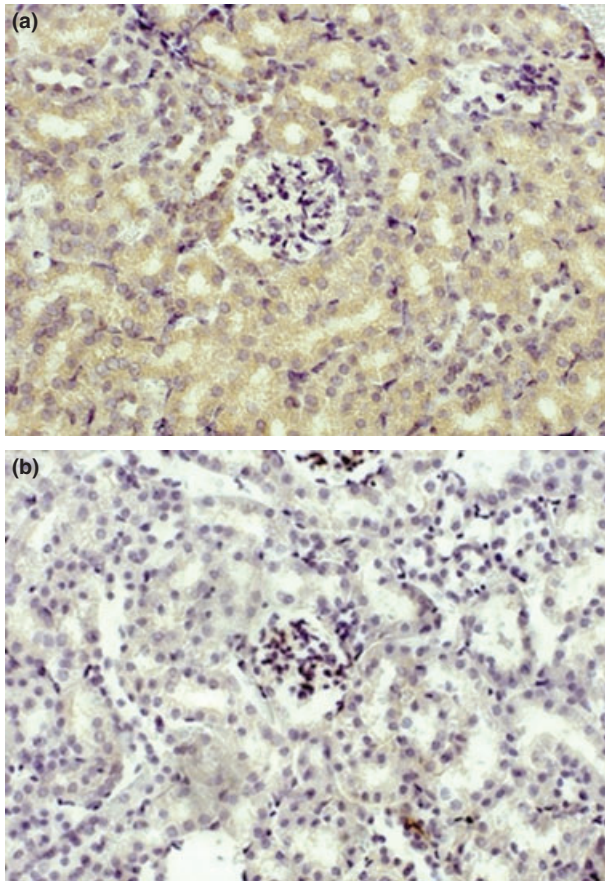


Fig. 3 Immunohistochemical staining of kidney from gestation day 12 mice injected with Hydroxy-Probe™. (a) Immune competent BALB/c mouse and (b) alymphoid *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mouse. Images taken at 400× times magnification.

Merrill and Davisson et al. pioneered use of this method in pregnant mice.²⁹ Radiotelemetric recording identified BPH/5 mice as developing late gestational hypertension. In comparison to controls, pregnant BPH/5 mice had equivalent uNK cell numbers but poor SA remodeling.¹⁷ Their placentas were significantly smaller at mid-gestation (i.e. placental insufficiency) but normalized by term. Despite their unusual late placental growth, BPH/5 fetuses were growth restricted throughout gestation and litters were smaller than in controls because of mid- and late-gestation resorptions.

We have undertaken conception to term radiotelemetric analysis of the hemodynamic changes of mouse pregnancy for normal (C57BL/6, BALB/c and outbred CD-1) and *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} females. Our study (Burke et al.) differs from most published

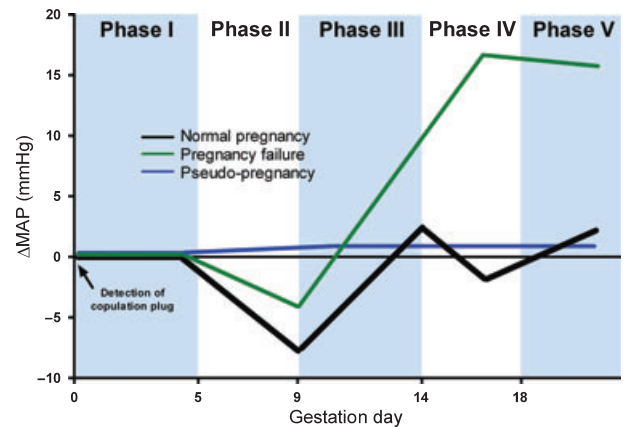


Fig. 4 Mean arterial pressure patterns of mice during normal gestation, pseudopregnancy and pregnancy failure.

studies, which have focused on mid-pregnancy or post-implantation and beyond using radiotelemetry or measured MAP daily or less frequently over the study time course. For normal mice with SA modification and minimal fetal loss, a five-phase pattern of MAP was found that coincided with defined stages of placental development or growth (Fig. 4). During pre-implantation development, Δ MAP was stable but heart rate increased, which is consistent with blood volume expansion and was supported by small gains in body weight. After implantation, MAP declined to a nadir at gd9. This time point is significant as it is the time when SA begins to remodel and when fusion of the allantois is completed in mice, initiating placental blood flow. Following the mouse gd9 nadir, MAP rises until gd12, where, depending on strain, MAP becomes variable but hovers about its pre-pregnancy baseline level. This pattern mimics the hemodynamic changes observed in pregnant women with a first trimester drop in MAP and a second trimester rise.³⁰ Surprisingly, despite absent SA remodeling, gestational hemodynamics were similar in *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice and there was no evidence of hypertension compared with BALB/c control pregnancies. Placental weights were collected from mid-gestation to term and were equivalent until gd14, then diverged with peripartum *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} placentas being larger. These data are most simply interpreted as fetal and/or placental signals regulating the patterns of change in maternal MAP.

This interpretation is supported by hemodynamic profiles from hormonally pseudopregnant females who mated (i.e. confirmed copulation plugs) but

failed to gain weight and had no palpable fetuses at gd12. These females had stable MAP between mating and post-mating day 12 when their study was terminated and they were confirmed to be non-pregnant (Fig. 4). This excludes ovarian hormones as the regulators of the pattern of change in early gestational MAP.

A further indication that conceptus-based signals might exclusively regulate maternal, gestational MAP came from two *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* dams that were unusual because they delivered small litters of predominately dead pups. From mid-gestation, their MAP profiles deviated because of the rapid onset hypertension.

Because *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* lack both NK cells and T cells, it is not possible to state from our study whether NK cells or T cells have roles in regulation of MAP. It can only be concluded that in the absence of both of these lymphocyte subsets, a normal gestational pattern of MAP is maintained. To examine the role of T cells, (we have not addressed B cells because Guzik et al. showed by adoptive transfer that B cells were ineffective modulators of vascular responses to Ang II infusion²⁰) gestational radiotelemetric studies have been completed in some syngeneically mated T and B cell deficient *Rag2^{-/-}* and in NOD.CB17-*Prkdc^{scid}* (NOD.*scid*) females. A pattern similar to that shown in Fig. 4 was observed for *Rag2^{-/-}*, indicating that loss of T cells with maintenance of NK cells and SA modification does not modulate the normal pattern of MAP in mice. This is in contrast to a challenge with Ang II in non-pregnant mice in which MAP responses were statistically blunted. Thus, pregnancy may mask the importance of T cell regulatory contributions. In contrast, gestational MAP in NOD.*scid* had a unique pattern that was unusually stable with little variability beyond pre-pregnancy baseline MAP. It should be noted that because of background strain, NOD.*scid* mice lack normal NK cell function in addition to their T cell deficiency. Gestational telemetric study of the newly described E4BP4 mice that lack NK cells but are T cell sufficient may resolve this question.³¹

It seems difficult to conceive how an early conceptus could regulate its mother's MAP, and we are addressing the alternate hypothesis that endometrial decidualization is the regulatory process, using radiotelemetric study of pseudopregnant mice with induced deciduomata.³² However, one method for regulation of upstream vessels by downstream cells is known as reverse conductance. Conducted

responses are vasomotor signals initiated at discrete locations and transmitted along the vascular wall to coordinate vasomotor responses at sites distant from the site of local stimulation (for review see Schmidt et al., 2008).³³ They are often considered a means by which tissues can induce changes in blood flow to match metabolic demand via signaling to the upstream (against the flow of blood) feed vasculature. The vasoactive signals travel through gap junctions between adjacent endothelial cells, vascular smooth muscle cells and/or myo-endothelial junctions. While research has favored the investigation of upstream conducted responses because of their importance in regulating blood flow into the tissue,³⁴⁻⁴³ evidence indicates that vascular signals are conducted in both upstream and downstream directions.^{34, 35, 40, 44, 45} The fetus may take advantage of this inherent machinery to induce upstream maternal vasomotor responses in accordance to its own developmental needs. The heavy invasion of fetal tissues in rodents and humans places fetal cells in very close proximity to the maternal vasculature, including intramural positions and replacement of maternal vascular endothelial cells with fetal trophoblast. Therefore, all necessary components for fetal regulation of maternal blood flow via upstream conducted responses are present. To address whether the endometrial vasculature was capable of transmitting conducted responses, we performed preliminary work using an intravital microscopy technique developed in our lab.⁴⁶ Briefly, the technique allows visualization of the intact, blood-perfused endometrial vasculature of an anesthetized gd12 mouse. We locally pipetted 10^{-4} M phenylephrine (PHE) onto the mesenteric vessel (baseline diameter = $61.4 \pm 3.6 \mu\text{m}$) feeding the implantation site and then measured resultant vessel diameters in the downstream vasculature (>1000 μm from local site) (Fig. 5a). A dye tracer (FITC) was added to the micropipette contents to help ensure that the drug did not flow over the downstream sites of interest. Indeed, our data indicate that signals are conducted downstream along the endometrial vasculature and that the signal strength eventually diminishes as the vasculature bifurcates into daughter vessels. While the uterine and arcuate arteries (baseline diameters = $71.0 \pm 5.3 \mu\text{m}$ and $68.9 \pm 8.7 \mu\text{m}$, respectively) showed similar vasoconstrictions as measured locally in the mesenteric feed (Fig. 5b,c), constrictions decreased in magnitude in the more distal radial (baseline diameter = $71.7 \pm 7.1 \mu\text{m}$), spiral

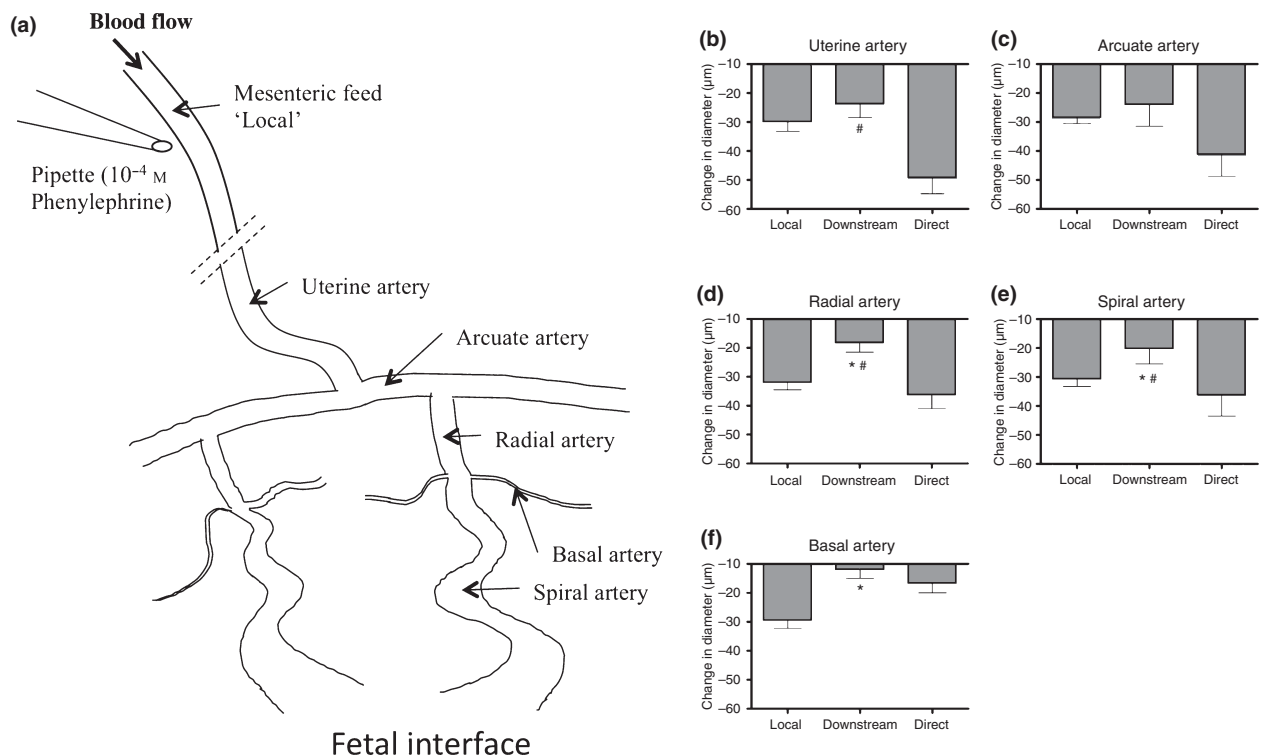


Fig. 5 The endometrial vasculature is capable of conducting vasoactive signals along the vascular wall. (a) Schematic representation of the endometrial vascular sites of interest. Indicated are the site of drug application (mesenteric artery), and the endometrial vasculature located $>1000 \mu\text{m}$ downstream. (b–f) Changes in vessel diameters at the site of drug application (Local), the induced change in vessel diameter at the branch order of interest (Downstream) as well as the change in vessel diameter induced by direct application of 10^{-4}M PHE to the downstream site (Direct). *Indicates significantly different compared to 'Local', # indicates significantly different compared to 'Direct', both at $P < 0.05$.

(baseline diameter = $98.6 \pm 8.8 \mu\text{m}$) and basal (baseline diameter = $39.8 \pm 5.4 \mu\text{m}$) arteries (Fig. 5d–f). These trends were mirrored when vessel diameters were normalized to their branch order maximum diameters. Additionally, we directly exposed each level of the endometrial vasculature to 10^{-4}M PHE to determine their capacity to constrict to direct application of the drug for comparison to the conducted response capacity (Fig. 5b–f). These data show that the endometrial vasculature is capable of transmitting conducted responses. Given that conducted responses can be bi-directional, our data indicate that the machinery is in place for the fetus to directly regulate maternal blood flow without relying on hormonal delivery of signals via the systemic circulation. Therefore, it is entirely plausible that the fetus can mediate maternal blood flow by initiating conducted responses at the maternal–fetal interface that travel in a retrograde manner to effect hemodynamic changes in the maternal feed vessels.

Summary/Conclusions

This review summarizes recent work from our laboratory initiated to explore the relationships between lymphocytes and early gestational changes in the cardiovascular system. We find this an exciting and important emerging area with significant clinical relevance. We have only very preliminary insights into these potential relationships, but have shown that NK cells from lymphoid organs do not show the dynamic changes in or in some cases even the expression of the vascularly related molecules that we have addressed. These studies challenge long-established ideas concerning outcomes from incomplete SA modification and they indicate that pregnancy is a state that alters the immunoregulatory effects of T cells, particularly Th17 cells, on MAP that have been reported in mice.⁴⁷ It is important that cross disciplinary studies continue to develop in reproductive immunology because formal demonstration of immunological involvement in cardiovas-

cular hemodynamics provides new approaches for therapeutic interventions such as inhibitors to block specific cytokine signaling pathways through selective inhibition of tyrosine kinases or other signaling.⁴⁸ The incidence of pre-eclampsia remains stable at ~3–5% of all human pregnancies, making hypertensive disease important to pregnancy. Understanding and developing *in vivo* models that will effectively address the importance of relationships of lymphocytes in cardiovascular responsiveness will also have the potential to be important for men and women who are not pregnant.

Acknowledgment

These studies have been supported by awards from the Natural Sciences and Engineering Council Canada, the Canadian Institutes of Health Research, the Canada Research Chairs Program, the Canadian Foundation for Innovation. Contributing research trainees have been supported by CIHR (SDB), NSERC (AC), Programa de Formación del Profesorado Universitario (ELD), Queen's University (KH), and by CAPES and CNQp (JB).

Declaration of contributions

BAC, MAA and CM designed and supervised these studies and contributed to writing of the manuscript. SDB contributed to writing of the manuscript and provided Fig. 1. SDB, VFB and JG conducted and analyzed the radiotelemetric studies and provided Fig. 4. AC, KH and JZ conducted the immunohistochemical studies. KH, ELD and JB conducted the hypoxia probe studies and provided Fig. 3. JZ conducted the ultrasound.

References

- Moffett A, Loke C: Implantation, embryo-maternal interactions, immunology and modulation of the uterine environment – a workshop report. *Placenta* 2006; 27(Suppl A):S54–S55.
- Bulmer JN, Lash GE: Human uterine natural killer cells: a reappraisal. *Mol Immunol* 2005; 42:511–521.
- Croy BA, van den Heuvel MJ, Borzychowski AM, Tayade C: Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunol Rev* 2006; 214:161–185.
- Ye W, Zheng LM, Young JD, Liu CC: The involvement of interleukin (IL)-15 in regulating the differentiation of granulated metrial gland cells in mouse pregnant uterus. *J Exp Med* 1996; 184:2405–2410.
- 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; 62:959–968.
- Barber EM, Pollard JW: The uterine NK cell population requires IL-15 but these cells are not required for pregnancy nor the resolution of a *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 2003; 171:37–46.
- Ashkar AA, Black GP, Wei Q, He H, Liang L, Head JR, Croy BA: Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. *J Immunol* 2003; 171:2937–2944.
- Kalkunte SS, Mselle TF, Norris WE, Wira CR, Sentman CL, Sharma S: Vascular endothelial growth factor C facilitates immune tolerance and endovascular activity of human uterine NK cells at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 2009; 182:4085–4092.
- Li XF, Charnock-Jones DS, Zhang E, Hiby S, Malik S, Day K, Licence D, Bowen JM, Gardner L, King A, Loke YW, Smith SK: Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1823–1834.
- Lash GE, Schiessl B, Kirkley M, Innes BA, Cooper A, Searle RF, Robson SC, Bulmer JN: Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *J Leukoc Biol* 2006; 80:572–580.
- Tayade C, Hilchie D, He H, Fang Y, Moons L, Carmeliet P, Foster RA, Croy BA: Genetic deletion of placenta growth factor in mice alters uterine NK cells. *J Immunol* 2007; 178:4267–4275.
- Delgado SR, McBey BA, Yamashiro S, Fujita J, Kiso Y, Croy BA: Accounting for the peripartum loss of granulated metrial gland cells, a natural killer cell population, from the pregnant mouse uterus. *J Leukoc Biol* 1996; 59:262–269.
- Pijnenborg R, Vercruyse L, Hanssens M: The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 2006; 27:939–958.
- Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC: Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol* 2002; 250:358–373.
- Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, Harris LK, Jones RL: Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *Am J Pathol* 2009; 174:1959–1971.

- 16 Moore HC, Cserhati I, Wilson K: The duration of the fall of blood pressure following the induction of deciduomata and the administration of progesterone in steroid hypertensive rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1970; 63:242–252.
- 17 Dokras A, Hoffmann DS, Eastvold JS, Kienzle MF, Gruman LM, Kirby PA, Weiss RM, Davisson RL: Severe fetoplacental abnormalities precede the onset of hypertension and proteinuria in a mouse model of preeclampsia. *Biol Reprod* 2006; 75:899–907.
- 18 Burke SD, Barrette VF, Bianco J, Thorne JG, Yamada AT, Pang SC, Adams MA, Croy BA: Spiral arterial remodeling is not essential for normal blood pressure regulation in pregnant mice. *Hypertension* 2010; 55:729–737.
- 19 Jurewicz M, McDermott DH, Sechler JM, Tinckam K, Takakura A, Carpenter CB, Milford E, Abdi R: Human T and natural killer cells possess a functional renin-angiotensin system: further mechanisms of angiotensin II-induced inflammation. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:1093–1102.
- 20 Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, Goronzy J, Weyand C, Harrison DG: Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med* 2007; 204:2449–2460.
- 21 Peel S: Granulated metrial gland cells. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1989; 115:1–112.
- 22 Paffaro VA Jr, Bizinotto MC, Joazeiro PP, Yamada AT: Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. *Placenta* 2003; 24:479–488.
- 23 Bianco J, Stephenson K, Yamada AT, Croy BA: Time-course analyses addressing the acquisition of DBA lectin reactivity in mouse lymphoid organs and uterus during the first week of pregnancy. *Placenta* 2008; 29:1009–1015.
- 24 Zhang JH, Yamada AT, Croy BA: DBA-lectin reactivity defines natural killer cells that have homed to mouse decidua. *Placenta* 2009; 30:968–973.
- 25 Zhang J, Dong H, Wang B, Zhu S, Croy BA: Dynamic changes occur in patterns of endometrial EFN2/EPHB4 expression during the period of spiral arterial modification in mice. *Biol Reprod* 2008; 79:450–458.
- 26 Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JC: Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta* 2009; 30:473–482.
- 27 Lyall F, Young A, Boswell F, Kingdom JC, Greer IA: Placental expression of vascular endothelial growth factor in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction does not support placental hypoxia at delivery. *Placenta* 1997; 18:269–276.
- 28 Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA: Pathophysiology of preeclampsia: linking placental ischemia/hypoxia with microvascular dysfunction. *Microcirculation* 2002; 9:147–160.
- 29 Butz GM, Davisson RL: Long-term telemetric measurement of cardiovascular parameters in awake mice: a physiological genomics tool. *Physiol Genomics* 2001; 5:89–97.
- 30 Chapman AB, Abraham WT, Zamudio S, Coffin C, Merouani A, Young D, Johnson A, Osorio F, Goldberg C, Moore LG, Dahms T, Schrier RW: Temporal relationships between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy. *Kidney Int* 1998; 54:2056–2063.
- 31 Gascoyne DM, Long E, Veiga-Fernandes H, de Boer J, Williams O, Seddon B, Coles M, Kioussis D, Brady HJ: The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. *Nat Immunol* 2009; 10:1118–1124.
- 32 Herington JL, Underwood T, McConaha M, Bany BM: Paracrine signals from the mouse conceptus are not required for the normal progression of decidualization. *Endocrinology* 2009; 150:4404–4413.
- 33 Schmidt VJ, Wolfle SE, Boettcher M, de Wit C: Gap junctions synchronize vascular tone within the microcirculation. *Pharmacol Rep* 2008; 60:68–74.
- 34 Duling BR, Berne RM: Propagated vasodilation in the microcirculation of the hamster cheek pouch. *Circ Res* 1970; 26:163–170.
- 35 Segal SS, Duling BR: Flow control among microvessels coordinated by intercellular conduction. *Science* 1986; 234:868–870.
- 36 Delashaw JB, Duling BR: Heterogeneity in conducted arteriolar vasomotor response is agonist dependent. *Am J Physiol* 1991; 260:H1276–H1282.
- 37 Xia J, Duling BR: Electromechanical coupling and the conducted vasomotor response. *Am J Physiol* 1995; 269:H2022–H2030.
- 38 Beach JM, McGahren ED, Xia J, Duling BR: Radiometric measurement of endothelial depolarization in arterioles with a potential-sensitive dye. *Am J Physiol* 1996; 270:H2216–H2227.
- 39 Doyle MP, Duling BR: Acetylcholine induces conducted vasodilation by nitric oxide-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol* 1997; 272:H1364–H1371.
- 40 Beach JM, McGahren ED, Duling BR: Capillaries and arterioles are electrically coupled in hamster cheek pouch. *Am J Physiol* 1998; 275:H1489–H1496.

- 41 Dora KA, Xia J, Duling BR: Endothelial cell signaling during conducted vasomotor responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285:H119–H126.
- 42 Wolfle SE, Schmidt VJ, Hoepfl B, Gebert A, Alcolea S, Gros D, de Wit C: Connexin45 cannot replace the function of connexin40 in conducting endothelium-dependent dilations along arterioles. *Circ Res* 2007; 101:1292–1299.
- 43 Murrant CL, Sarelius IH: Local and remote arteriolar dilations initiated by skeletal muscle contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279:H2285–H2294.
- 44 Segal SS, Damon DN, Duling BR: Propagation of vasomotor responses coordinates arteriolar resistances. *Am J Physiol* 1989; 256:H832–H837.
- 45 Tallini YN, Brekke JF, Shui B, Doran R, Hwang SM, Nakai J, Salama G, Segal SS, Kotlikoff MI: Propagated endothelial Ca²⁺ waves and arteriolar dilation in vivo: measurements in Cx40BAC GCaMP2 transgenic mice. *Circ Res* 2007; 101:1300–1309.
- 46 Leonard S, Murrant C, Tayade C, van den Heuvel M, Watering R, Croy BA: Mechanisms regulating immune cell contributions to spiral artery modification – facts and hypotheses – a review. *Placenta* 2006; 27(Suppl A):S40–S46.
- 47 Madhur MS, Lob HE, McCann LA, Iwakura Y, Blinder Y, Guzik TJ, Harrison DG: Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension* 2010; 55:500–507.
- 48 Ghoreschi K, Laurence A, O’Shea JJ: Selectivity and therapeutic inhibition of kinases: to be or not to be? *Nat Immunol* 2009; 10:356–360.



Fetal–Placental Hypoxia Does Not Result from Failure of Spiral Arterial Modification in Mice

E. Leno-Durán^{a,b,1}, K. Hatta^{c,1}, J. Bianco^{a,d,1}, Á.T. Yamada^d, C. Ruiz-Ruiz^b, E.G. Olivares^e, B.A. Croy^{a,*}

^a Department of Anatomy and Cell Biology, Queen's University, Kingston, Ontario, K7L 3N6, Canada

^b Unidad de Inmunología, IBIMER, Universidad de Granada, Centro de Investigación Biomédica, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain

^c Department of Microbiology and Immunology, Queen's University, Kingston, Ontario, K7L 3N6, Canada

^d Departamento de Histología e Embriología, Instituto de Biología, Universidade Estadual de Campinas, Cx. Postal 6109, Campinas, SP, Brazil

^e Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología, Universidad de Granada, Centro de Investigación Biomédica, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 1 June 2010

Keywords:

Immune deficient mice
Kidney
Pregnancy
Pregnancy complications
Tissue perfusion

ABSTRACT

Objectives: To determine if fetal–placental hypoxia is a primary outcome of defective spiral artery remodeling.

Study design: Pregnancies in *Rag2*^{−/−}*Il2rg*^{−/−} double knock-out mice, which fail to undergo normal physiological spiral arterial remodeling, were compared to syngeneic BALB/c control pregnancies. Mice at gestation day (gd)6, 8, 10, 12 and 18 were infused with Hypoxyprobe™-1 before euthanasia to enable detection of cellular hypoxia by immunohistochemistry.

Results: In implantation sites of both phenotypes, trophoblast cells were reactive to Hypoxyprobe™-1. No major differences were observed between the phenotypes in decidua or placenta at any gd or in gd18 fetal brain, lung, heart, liver or intestine or in maternal heart, brain, liver or spleen. Maternal kidneys from BALB/c were significantly hypoxic to *Rag2*^{−/−}*Il2rg*^{−/−} kidneys.

Conclusions: In mice, lack of pregnancy-associated spiral artery remodeling does not impair oxygen delivery to the conceptus, challenging the concept that deficient spiral arterial remodeling leads to fetal hypoxia in human gestational complications such as preeclampsia and fetal growth restriction. The isolated hypoxic response of normal kidney has revealed that renal lymphocytes may have unique, tissue-specific regulatory actions on vasoconstriction that are pregnancy independent.

Crown Copyright © 2010 Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Spiral arteries branch off the uterine artery and feed the premenstrual and progesterational endometrium. During normal pregnancy, spiral arteries undergo a process called “spiral artery modification”. “Remodification”, also referred to as “remodeling”, is the process of vascular smooth muscle thinning. This process is thought to have effects on uteroplacental perfusion. Incomplete physiological remodeling of endometrial spiral arteries is a histological feature frequently seen in human pregnancies complicated by intrauterine growth restriction and/or preeclampsia [1–4]. The incomplete remodeling is thought to lead not only to placental/trophoblast hypoxia and associated metabolic changes, but also to

fetal oxygen deprivation and metabolic alteration. In humans, onset of maternal arterial flow from the spiral arteries into the intervillous space occurs between weeks 8 and 12 of gestation and causes a transient period of oxidative stress in syncytiotrophoblast [5]. Cause–effect relationships between the extent of spiral arterial modification and implantation site oxygenation are not completely understood because women who conceive at high altitude, that is, in a chronic hypoxic environment, also have reduced spiral arterial remodeling, suggesting a vascular response rather than a vascular etiology for the incomplete physiological change [6]. Studies at high altitude are mimicked in the laboratory when human or mouse trophoblastic cell lines [7] or tissue explants [8] are cultured under steady state or reversible low oxygen conditions and when pregnant mice are housed under low ambient O₂. *In vivo* studies challenging pregnant mice with low ambient O₂ and measuring changes in placental gene expression by microarray have been reported [9]. However, there have been no studies addressing placental and fetal oxygenation in pregnancies with impairment in spiral arterial modification.

* Corresponding author. Department of Anatomy and Cell Biology, Room 924, Botterell Hall, 18 Stuart Street, Queen's University, Kingston, Ontario, K7L 3N6, Canada. Tel.: +1 613 533 2859; fax: +1 613 533 2566.

E-mail address: croya@queensu.ca (B.A. Croy).

¹ Authors contributed equally.

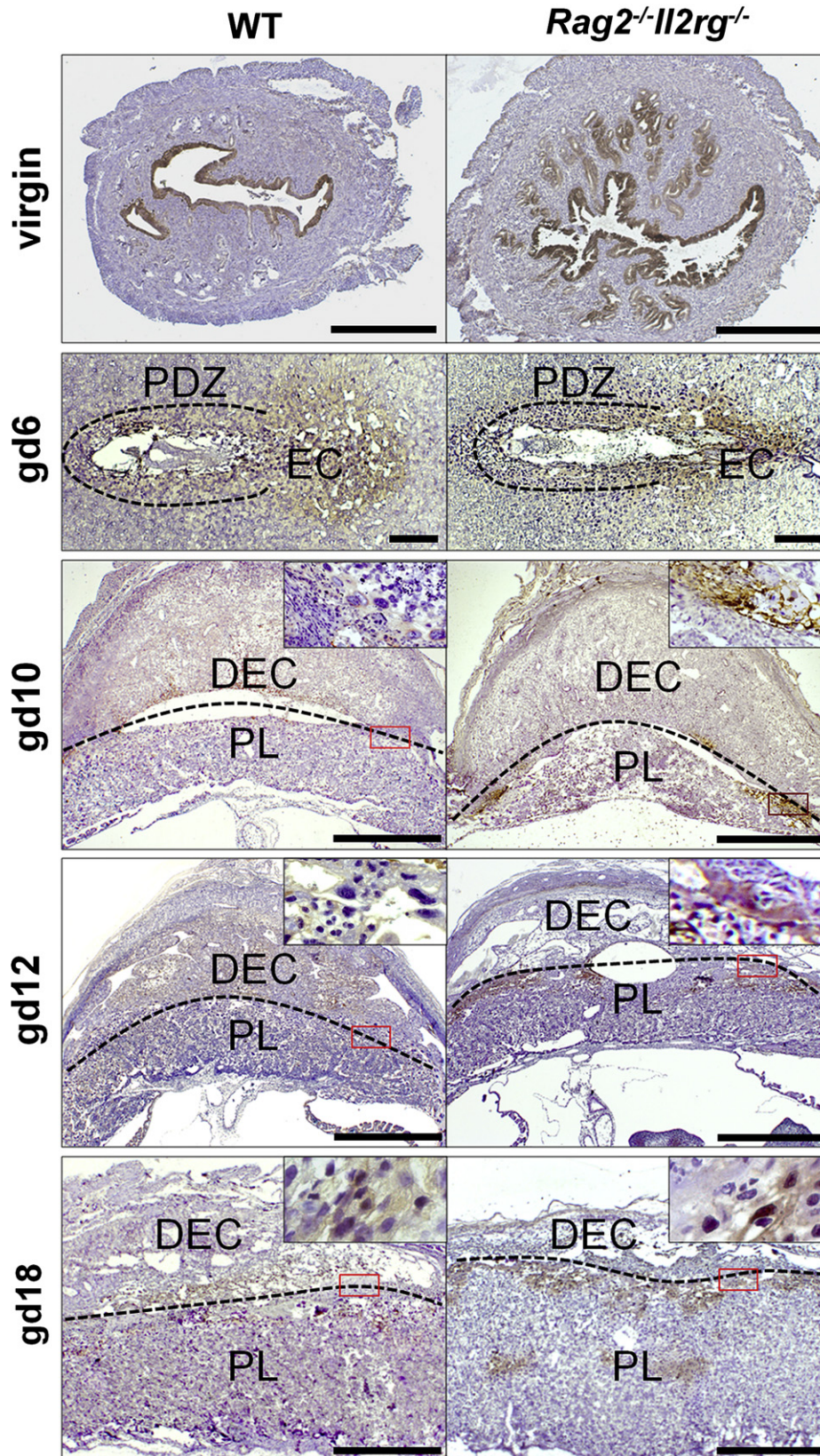


Fig. 1. Uteri from virgin and pregnant wild type (WT) and *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice who had received intravenous Hypoxyprobe™-1 an hour before euthanasia were stained using DAB detection (brown) for hypoxia. Spiral artery modification occurs in WT pregnancies but not in *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* pregnancies. No major, widespread tissue differences in the detection of adducts of the probe were found between the genotypes. In the virgin uterus, staining was found in the endometrial epithelium and glands. Post implantation, staining was observed in the primary decidual zone and ectoplacental cone. At later stages staining was found in the placenta. DEC, decidua; EC, ectoplacental cone; PDZ, primary decidual zone; PL, placenta. Virgin (bar = 1000 μ m); gestation day (gd)6 (bar = 200 μ m); gd10, 12 and 18 (bar = 1000 μ m).

In mice, maternal spiral arteries are not modified at gestation day (gd)8.5 but are well modified by gd10.5 and appear from immunohistological studies to be fully modified by gd12.5 by their acquired strong expression of the venous marker EphB4. Mouse gestation is ~19–20 days [10] and the placental circulation opens between gd9 and 10, when the allantois fuses to the chorion and fetal vessels develop within the placental labyrinth. Mouse spiral arterial modification appears to be depended upon uterine natural killer (uNK) cells rather than upon fetal trophoblasts as is the case in humans [11]. Thus, alymphoid mice of genotype *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} and other mice deficient in NK cells, do not undergo spiral arterial modification during pregnancy [10,12,13]. These mouse strains are fertile, do not experience significant gestational complications and pups show no sign of growth restriction [14]. Pregnant *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice on either BALB/c or C57Bl/6J backgrounds, housed under normal barrier husbandry conditions, do not display problems such as congestive heart failure and death reported in gd11–13 CD-1 fetuses in mothers' with ambient O₂ levels reduced from 21% to 8% [15].

To address the question of whether implantation site oxygenation is reduced in pregnancies that fail to undergo gestation-associated, physiological spiral artery modification, pimonidazole hydrochloride staining was used to compare *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} and +/+ (WT) tissues from BALB/c background mice on gd6, 10, 12 and 18. Respectively, these times represent early post implantation prior to spiral arterial modification, early and completed spiral arterial modification and peripartum when cumulative effects of potentially-reduced third trimester metabolism might be found. This approach also allowed us to assess if the early mouse implantation site is a hypoxic environment, as found in human implantation sites [16] and to determine if placental hypoxia might precede or be coincident with fetal hypoxia.

2. Materials and methods

2.1. Animals and histological procedures

Use of animals was approved by the Queen's University Animal Care Committee. Control WT and *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} double knock-out mice on a BALB/c background were used. *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice are devoid of T, B and NK cells. WT females were mated by WT males. *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} females were mated by *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} males. The morning of the copulation plug was designated gd0. Mice pregnant at gd6, 8, 10, 12 and 18 (*n* = 2 for each gd for each genotype) were injected with 100 μ L (45 mg/kg) of pimonidazole hydrochloride (HypoxyprobeTM-1, HPI Inc.; Burlington, MA, USA) via tail vein injection and sacrificed 60 min later by cervical dislocation. Healthy implantation sites were collected (*n* = 3 per pregnancy) as well as maternal heart, liver, kidney, spleen and brain. Specimens were fixed with 4% paraformaldehyde for 16 h. Similar inoculation of the probe and organ collection were undertaken in 2 virgin females of each genotype, not selected for stage of estrus. Standard procedures were used for automated processing into paraffin blocks. Sections were cut at 6 μ m and collected on glass slides for immunohistochemistry.

2.2. Immunohistochemistry

Briefly, after tissue deparaffinization and rehydration, endogenous peroxidases were inactivated with 6% H₂O₂ for 15 min. Antigen retrieval was subsequently performed using 0.01% pronase (type XIV, Sigma; Oakville, ON, Canada) for 40 min at 40 °C. Sections were then washed and blocked (serum-free protein block, DAKO; Mississauga, ON, Canada) for 30 min at room temperature. Tissue sections were incubated with primary antibody (1:100, HypoxyprobeTM-1 MAb1, HPI Inc.; Burlington, MA, USA) overnight at 4 °C, washed, and incubated with secondary antibody (1:500, HRP conjugated rabbit anti-mouse IgG, AnaSpec, Inc.; Fremont, CA, USA) for 2 h at room temperature, washed, and developed using diaminobenzidine (DAB) (Liquid DAB+ substrate, DAKO; Mississauga, ON, Canada). Slides were counter-stained using Harris' hematoxylin for 10 s, dehydrated, cleared and sealed with Permunt (Fisher; Ottawa, ON, Canada). To reduce variability, gd matched samples were simultaneously stained.

For fluorescence detection studies, slides were triple stained. H₂O₂ treatment was omitted. After incubation with HypoxyprobeTM-1 MAb1 primary antibody, slides were washed and incubated with biotinylated goat-anti-mouse IgG (1:200, Jackson Laboratories; Bar Harbor, ME, USA) for 2 h at room temperature, washed and incubated with fluorescently labeled Alexa488-Extravidin (1:200, Invitrogen;

Burlington, ON, Canada) for 1 h. Sections were washed and further targeted for cytokeratin using rabbit anti-cytokeratin (1:250, DAKO; Mississauga, ON, Canada) overnight at 4 °C. This was followed with fluorescently labeled Alexa594 goat-anti-rabbit IgG secondary antibody (1:200, Invitrogen; Burlington, ON, Canada) for 2 h at room temperature. Slides were washed and incubated for 20 min in 20 mM L-lysine (Sigma; Oakville, ON, Canada) to quench autofluorescence and mounted with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) supplemented mounting media (DAPI Gold with Anti-Fade Agent, Invitrogen; Burlington, ON, Canada).

Slides were imaged using a Zeiss AxioCam microscope system with Axiovision computer software (Zeiss; Toronto, ON, Canada) for both DAB developed and fluorescent slides.

3. Results

Virgin uteri of both WT and *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice had similar HypoxyprobeTM-1 reactivity; staining was very strong in the uterine endometrial epithelium and weak in glandular epithelial cells (Fig. 1). HypoxyprobeTM-1 also detected hypoxic cells in the decidua-placental unit between gd6 and 18 (Fig. 1; gd8 not shown). Major, large-scale differences in HypoxyprobeTM-1 staining between the two genotypes were not observed. At gd6, the primary decidual zone, the stroma surrounding the ectoplacental cone and uterine lumen epithelium were reactive with HypoxyprobeTM-1 in both genotypes. At gd8, residual uterine lumen epithelium and lateral stroma were reactive in both genotypes. At gd10, cells with the morphologic appearance of trophoblast giant cells were highly reactive with HypoxyprobeTM-1 in *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice compared to WT. This was also observed at gd12; however giant cells from gd12 *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} pregnancies were less reactive than similar cells at gd10. At gd18, both genotypes had HypoxyprobeTM-1 reactivity along the maternal-placental interface in large cells presumed to be trophoblast giant cells. A second set of slides was fluorescently triple stained for cytokeratin expression to confirm that these large HypoxyprobeTM-1 reactive cells were in fact

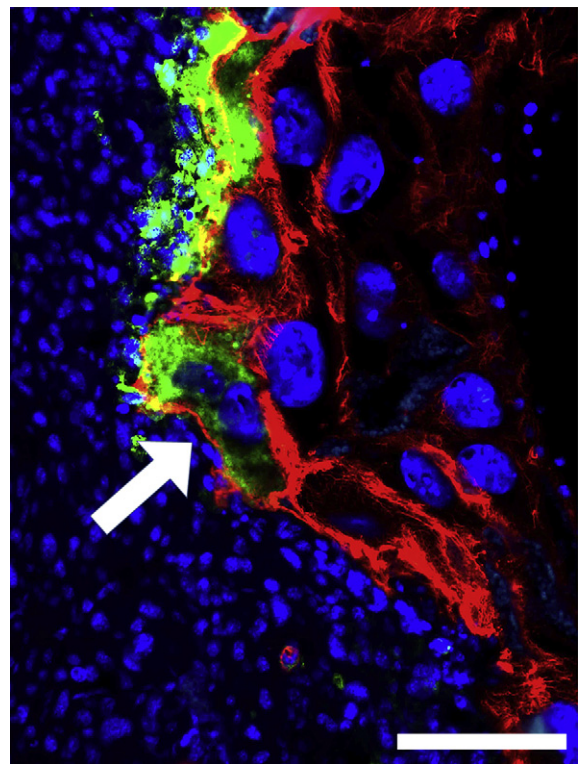


Fig. 2. Fluorescence immunohistochemistry confirmation of hypoxia in trophoblast. Trophoblasts (red, cytokeratin; blue, nuclei) are hypoxic (green) throughout gestation. Shown here is a gd10 *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} giant cell (arrow) bordering the decidua (left). Bar = 100 μ m.

trophoblast. Co-localization of Hypoxyprobe™-1, cytokeratin and DAPI was found, revealing the cells to be trophoblast giant cells (Fig. 2).

Fetal tissues of each genotype were studied carefully at gd18 when they could be clearly identified. At earlier times non-placental conceptus tissue was only generally assessed. At no time was a major difference found between genotypes in Hypoxyprobe™-1 reactivity in the embryonic or fetal tissues (Fig. 3). For both genotypes, fetal lung was negative, whereas heart, liver and

intestine were reactive with Hypoxyprobe™-1; fetal brain and kidney were distinctly but more weakly reactive.

To establish whether the differences in spiral arterial modification might be associated with changes in tissue perfusion and oxygenation in other sites, maternal peripheral tissues were examined from the Hypoxyprobe™-1 infused mice. Very weak reactivity was found in the brain, heart and liver of both WT and *Rag2*⁻¹*Il2rg*⁻¹ mice, while the stroma of spleens was positive in both groups of mice. Renal tubules of WT mice were significantly hypoxic compared to *Rag2*⁻¹*Il2rg*⁻¹ renal tubules, which were weakly reactive (Fig. 4). The maternal staining patterns were not altered by pregnancy.

4. Discussion

The principle finding of this study is that deficiency in spiral arterial modification does not lead to placental or to fetal hypoxia in mice. The strength of this study is in employing a mouse model to manipulate a variable that is ethically not possible in human pregnancies. Our principle finding challenges the widely held belief that in humans deficient spiral artery remodeling leads to fetal hypoxia in cases such as preeclampsia and fetal growth restriction [17–19]. Our experimental design suggests that a direct cause–effect relationship between deficient spiral artery remodeling and fetal hypoxia does not exist (Fig. 5). Given the established reports that these two observations co-exist in preeclampsia and fetal growth restriction [17–22], we propose that other factors, such as immune imbalances [23–25], are responsible for their coincidence.

The interface between maternal and fetal tissue (such as the primary decidua zone at gd6 and axis between the decidua and placenta at gd18 in both genotypes; or interface-to-be in the case of the virgin endometrial epithelium) was the predominant hypoxic area we observed in implantation sites. This may fit well with our understanding of cytotrophoblast behavior. Others have discussed the paradoxical observation that human cytotrophoblasts proliferate under hypoxic conditions, but take on an invasive phenotype in oxygen rich environments [26,27]. This may appear as a contradiction, since both invasion and proliferation of cytotrophoblasts are important for proper placentation. Lowering O₂ to 2% results in a marked increase in cytotrophoblast incorporation of thymidine and 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) [26]. However, at this concentration of O₂, cytotrophoblasts fail to invade extracellular matrix substrate [26]. Low O₂ conditions decrease invasiveness; both 10–12 week and 16–20 week human cytotrophoblasts cultured under 2% O₂ show dramatically lower levels of invasiveness through coated transwells [26]. We expect that the *ex vivo* observations of cytotrophoblasts proliferating under hypoxic conditions [26] are a biological process that occur at the fetal–maternal interface and that invaded decidual cytotrophoblasts do not proliferate. Rather, decidual cytotrophoblasts have acquired the invasive phenotype found under oxygen rich conditions [26]. Our results suggest the heterogeneity of O₂ metabolism in the placenta should be considered when addressing functions of the trophoblast. Regarding our minor observation that at gd10 and 12 the decidual–placental interface stained darker for hypoxia in *Rag2*⁻¹*Il2rg*⁻¹ mice, these differences may potentially regulate trophoblast function, as described above; however it may be of little relevance to fetal health since fetuses of *Rag2*⁻¹*Il2rg*⁻¹ pregnancies are not more hypoxic than their WT control.

Finally, we report that in the adult kidney, pimonidazole reactivity, a marker of hypoxia, was detected in renal tubules of non-manipulated, normoxic mice; a finding consistent with previous reports that have studied both male and female rodents [28–32]. The WT adult kidney incorporated more pimonidazole adducts compared to the *Rag2*⁻¹*Il2rg*⁻¹ adult kidney and this observation

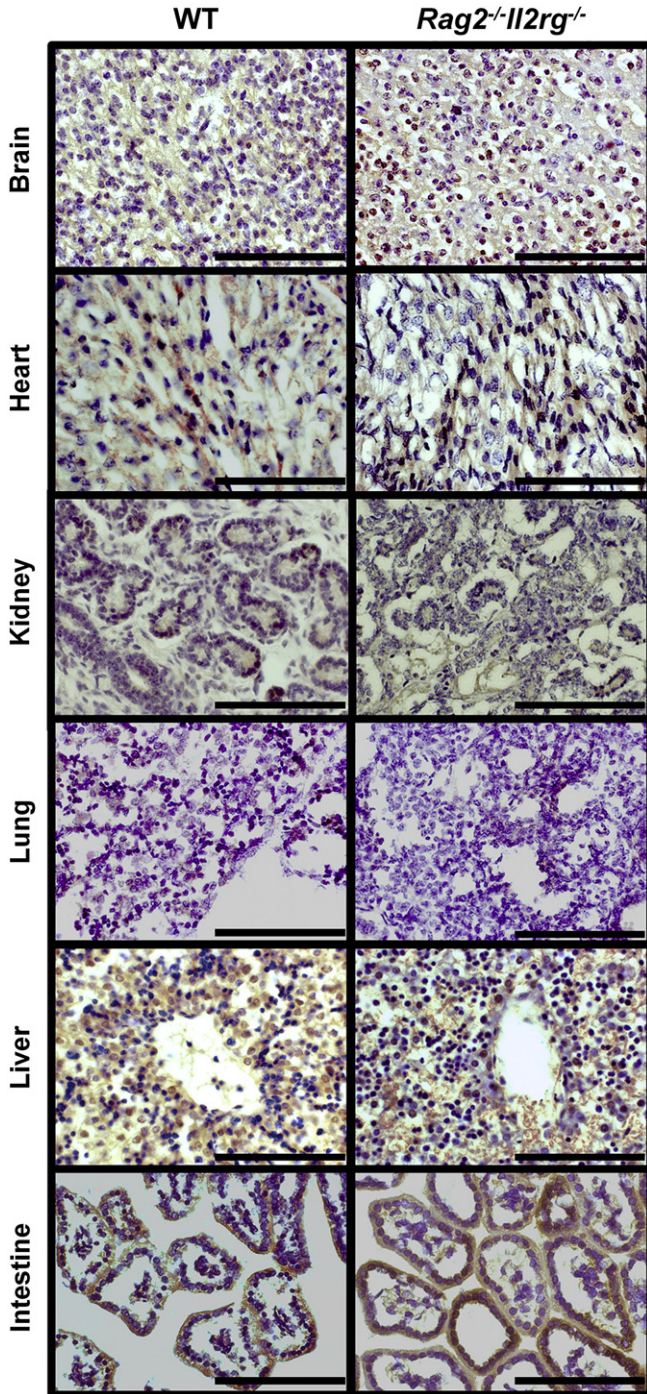


Fig. 3. Gestation day (gd)18 fetal tissues were stained for hypoxia using immunohistochemistry. DAB detection (brown) revealed no differences between spiral artery modified (wild type; WT) and unmodified pregnancies (*Rag2*⁻¹*Il2rg*⁻¹). Weak, diffuse staining was observed in the brain, heart, kidney, liver and intestine. Bar = 100 μm.

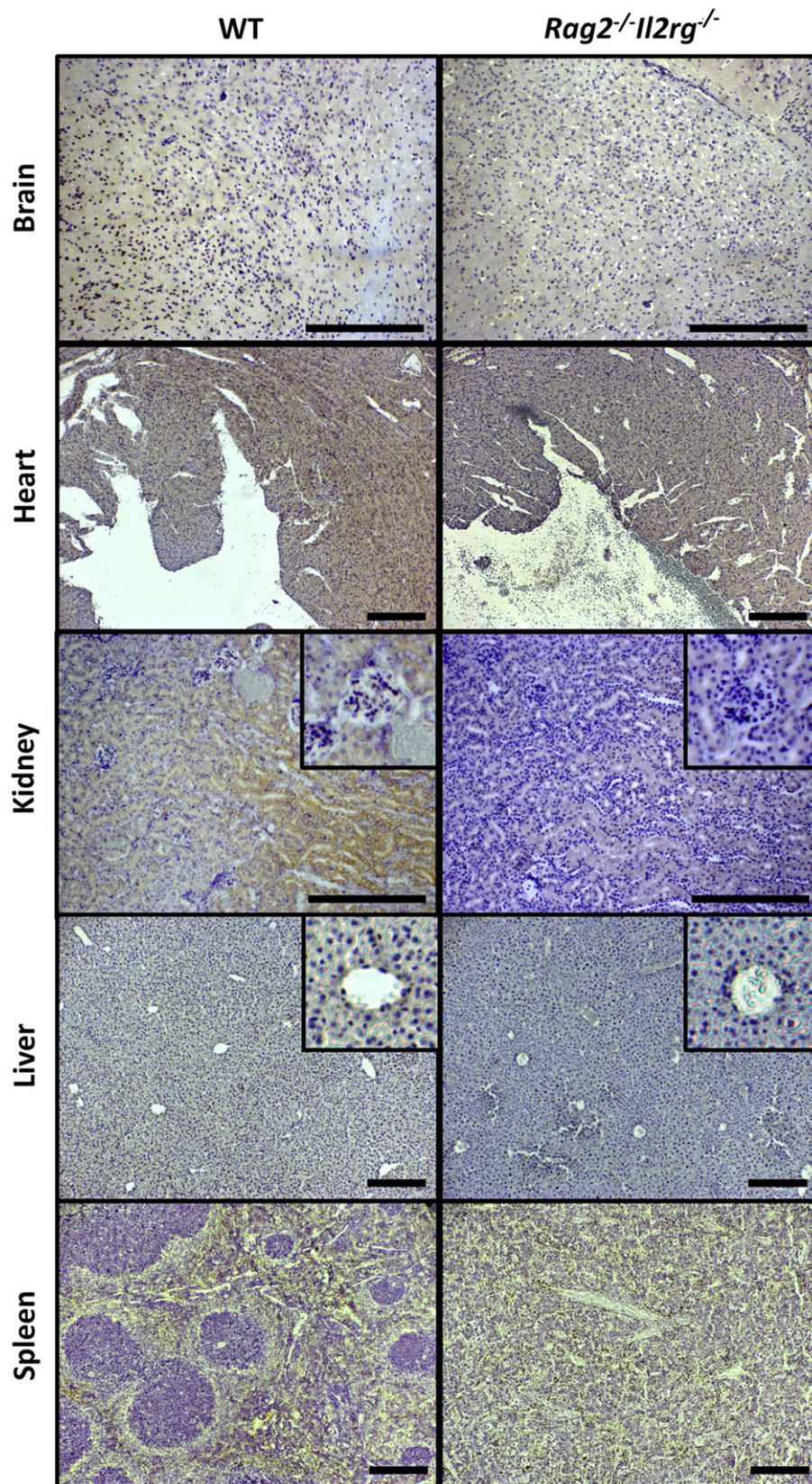


Fig. 4. Maternal organs were stained for pimonidazole reactivity (brown). Other than greater staining in the maternal kidney in WT, no significant differences in reactivity were seen between the genotypes. The absence of lymphoid follicles in the *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} spleen accounts for the morphological differences between the splenic samples. Bar = 200 μ m.

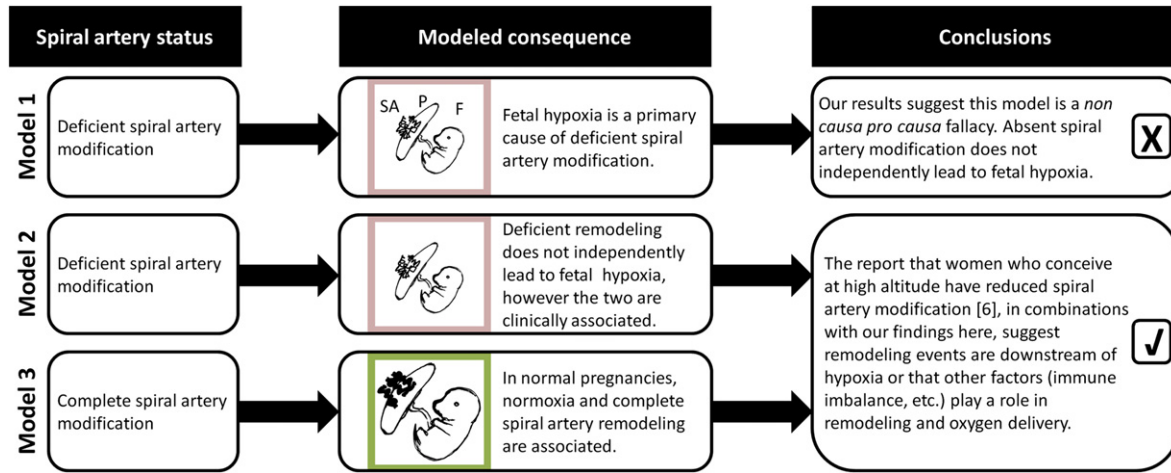


Fig. 5. Fetal hypoxia is not a primary outcome from failure of spiral arterial modification in mice. F, fetus; P, placenta; SA, spiral artery.

was independent of pregnancy. This novel observation suggests lymphocytes contribute to the maintenance of lower oxygen homeostasis in the normal kidney, as *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice are genetically deficient in T, B and NK cells. We hypothesize that the isolated hypoxic response of normal kidney has revealed unique, tissue-specific regulatory actions of intra-renal lymphocytes on vasoconstriction that are pregnancy independent. The kidney is home of unconventional, tissue-resident lymphocytes. Ascon et al. have shown that normal, adult mouse kidneys contain activated and CD3⁺CD4⁻CD8⁻ double-negative T cells with a unique TCR repertoire [33]. Whether these subsets of lymphocytes are responsible for our observation requires further research. T and NK lymphocytes are equipped components of the renin angiotensin system [34–37] and may potentially act to reduce perfusion and limit oxygen in the normal kidney.

In conclusion, our study suggests that deficient spiral artery modification and fetal–placental hypoxia are observations that co-exist in human pregnancy through a complex relationship and that the former does not directly cause the latter.

Acknowledgments

We thank Dr. Jianhong Zhang, Valérie F. Barrette, and the animal care staff of Queen's University for their dedicated care of our immune deficient mice. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Canada Research Chairs Program to BAC; Programa de Formación del Profesorado Universitario to ELD; Queen's Graduate Award to KH; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq) to JB.

References

- Macara L, Kingdom JCP, Kaufmann P, Kohlen G, Hair J, More IAR, et al. Structural analysis of placental terminal villi from growth-restricted pregnancies with abnormal umbilical artery Doppler waveforms. *Placenta* 1996;17:37–48.
- Conrad KP, Benyo DF. Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1997;37:240–9.
- Caniggia I, Winter JL, Adriana and Luisa Castellucci award lecture 2001. Hypoxia inducible factor-1: oxygen regulation of trophoblast differentiation in normal and pre-eclamptic pregnancies – a review. *Placenta* 2002;23:S47–57.
- Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JC. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta* 2009;30:473–82.
- Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress: a possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 2000;157:2111–22.
- Tissot van Patot M, Grilli A, Chapman P, Broad E, Tyson W, Heller DS, et al. Remodelling of uteroplacental arteries is decreased in high altitude placentae. *Placenta* 2003;24:326–35.
- Koklanaris N, Nwachukwu JC, Huang SJ, Guller S, Karpisheva K, Garabedian M, et al. First-trimester trophoblast cell model gene response to hypoxia. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:687–93.
- Seeho SKM, Park JH, Rowe J, Morris JM, Gallery EDM. Villous explant culture using early gestation tissue from ongoing pregnancies with known normal outcomes: the effect of oxygen on trophoblast outgrowth and migration. *Hum Reprod* 2008;23:1170–9.
- Gheorghie CP, Mohan S, Oberg KC, Longo LD. Gene expression patterns in the hypoxic murine placenta: a role in epigenesis? *Reprod Sci* 2007;14:223–33.
- Zhang J, Dong H, Wang B, Zhu S, Croy BA. Dynamic changes occur in patterns of endometrial EFNB2/EPHB4 expression during the period of spiral arterial modification in mice. *Biol Reprod* 2008;79:450–8.
- Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Morris M, Pfarrer C, et al. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol* 2002;250:358–73.
- Ashkar AA, di Santo JP, Croy BA. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med* 2000;192:259–70.
- Monk JM, Leonard S, McBey BA, Croy BA. Induction of murine spiral artery modification by recombinant human interferon-gamma. *Placenta* 2005;26:835–8.
- Burke SD, Barrette VF, Bianco J, Thorne JG, Yamada AT, Pang SC, et al. Spiral arterial remodeling is not essential for normal blood pressure regulation in pregnant mice. *Hypertension* 2010;55:729–37.
- Ream M, Ray AM, Chandra R, Chikaraishi DM. Early fetal hypoxia leads to growth restriction and myocardial thinning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:R583–95.
- Jauniaux E, Poston L, Burton GJ. Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update* 2006;12:747–55.
- Parham P. NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy. *J Exp Med* 2004;200:951–5.
- Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005;308:1592–4.
- Lyall F. Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy – a review. *Placenta* 2005;26:S31–6.
- Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005;365:785–99.
- Pijnenborg R, Vercausse L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 2006;27:939–58.
- Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* 2001;357:53–6.
- Trupin LS, Simon LP, Eskenazi B. Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas. *Epidemiology* 1996;7:240–4.
- Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, et al. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 2004;200:957–65.
- Moffett A, Hiby SE. How does the maternal immune system contribute to the development of pre-eclampsia? *Placenta* 2007;28:S51–6.
- Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, Polliotti BM, Fisher SJ. Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models

- the placental defects that occur in preeclampsia. *J Clin Invest* 1996;97:540–50.
- [27] Genbacev O, Krtolica A, Kaelin W, Fisher SJ. Human cytotrophoblast expression of the von Hippel–Lindau protein is downregulated during uterine invasion in situ and upregulated by hypoxia in vitro. *Dev Biol* 2001;233:526–36.
- [28] Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, Ohse T, Miyata T, Inagi R, et al. Evidence of tubular hypoxia in the early phase in the remnant kidney model. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1277–88.
- [29] Samoszuk MK, Walter J, Mechetner E. Improved immunohistochemical method for detecting hypoxia gradients in mouse tissues and tumors. *J Histochem Cytochem* 2004;52:837–9.
- [30] Basile DP, Donohoe DL, Roethe K, Mattson DL. Chronic renal hypoxia after acute ischemic injury: effects of L-arginine on hypoxia and secondary damage. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284:F338–48.
- [31] Oh C, Dong Y, Harman C, Mighty HE, Kopelman J, Thompson LP. Chronic hypoxia differentially increases glutathione content and [gamma]-glutamyl cysteine synthetase expression in fetal guinea pig organs. *Early Hum Dev* 2008;84:121–7.
- [32] Suga SI, Phillips MI, Ray PE, Raleigh JA, Vio CP, Kim YG, et al. Hypokalemia induces renal injury and alterations in vasoactive mediators that favor salt sensitivity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;281:F620–9.
- [33] Ascon DB, Ascon M, Satpute S, Lopez-Briones S, Racusen L, Colvin RB, et al. Normal mouse kidneys contain activated and CD3+CD4–CD8– double-negative T lymphocytes with a distinct TCR repertoire. *J Leukoc Biol* 2008;84:1400–9.
- [34] Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med* 2007;204:2449–60.
- [35] Jurewicz M, McDermott DH, Sechler JM, Tinckam K, Takakura A, Carpenter CB, et al. Human T and natural killer cells possess a functional renin-angiotensin system: further mechanisms of angiotensin II-induced inflammation. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1093–102.
- [36] Harrison DG, Guzik TJ, Goronzy J, Weyand C. Is hypertension an immunologic disease? *Curr Cardiol Rep* 2008;10:464–9.
- [37] Hoch NE, Guzik TJ, Chen W, Deans T, Maalouf SA, Gratzke P, et al. Regulation of T-cell function by endogenously produced angiotensin II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;296:R208–16.



Short Communication

Reduced proportion of decidual DC-SIGN⁺ cells in human spontaneous abortionI. Tirado-González^a, R. Muñoz-Fernández^a, O. Blanco^a, E. Leno-Durán^{a,b}, A.C. Abadía-Molina^{a,b}, E.G. Olivares^{a,b,c,*}^a Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, 18100 Armilla, Granada, Spain^b Departamento de Bioquímica, Biología Molecular 3 e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, 18012 Granada, Spain^c Hospital Universitario San Cecilio, 18012 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 14 September 2010

Keywords:

Abortion
Decidua
DC-SIGN
Dendritic cells
Pregnancy

ABSTRACT

Recent studies showed that some functions of decidual dendritic cells appear to be essential for pregnancy. In humans, decidual dendritic cells are identifiable by their expression of DC-SIGN. We compared the subpopulations of human decidual DC-SIGN⁺ cells from first-trimester normal pregnancies and spontaneous abortions by flow cytometry. In normal decidua, DC-SIGN⁺ cells expressed antigens associated with immature myeloid dendritic cells. In samples from spontaneous abortions, we detected decidual DC-SIGN⁺ cells with an antigen phenotype equivalent to that of DC-SIGN⁺ cells from normal pregnancies, but at a significantly lower proportion ($P < 0.01$). Our results support the hypothesis that dendritic cells play a role in normal or pathological human pregnancy outcomes.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Recent studies showed that decidual dendritic cells (DC) perform different functions that are crucial for pregnancy [1,2]. Several groups have found immature myeloid DC in normal decidua of humans and mice [3,4]. In human decidua, these cells are identifiable by their expression of DC-SIGN (CD209) [4]. Although most abortions occur because of chromosomal abnormalities in the embryo, it has been widely documented in mice and humans that sporadic and recurrent spontaneous abortion (and also normal pregnancy) are mediated by the immune system [5–12]. Because DC is responsible for the control of immune responses [13], these cells may be involved in the normal or pathological outcome of pregnancy [14]. To determine whether DC play a role in spontaneous abortion, we studied the different subpopulations of DC in human decidua of spontaneous abortions and compared them with the subpopulations in normal pregnancies.

2. Materials and methods

2.1. Tissues

Samples from first-trimester spontaneous abortions (6–11 weeks, $n = 35$) were collected at the Departamento de Obstetricia y Ginecología of the Hospital Universitario San Cecilio in Granada (Spain). All patients with spontaneous abortion

were evaluated with ultrasonography when they presented with vaginal bleeding. Specimens from elective terminations of pregnancy (6–11 weeks, $n = 60$) were obtained from the Clínica El Sur in Málaga and Ginegranada in Granada (Spain). All patients were aged 20–30 years. Women receiving any medication or having recurrent miscarriage, infectious, autoimmune, or other systemic or local diseases were excluded. None of the abortions was pharmacologically induced. Decidual tissue was obtained by suction curettage; in spontaneous abortion, curettage was carried out within 24 h after diagnosis. None of the samples showed any evidence of necrosis or acute inflammation. All women provided informed consent, and this study was approved by the clinical research ethics committee of the Hospital Universitario de San Cecilio in Granada.

2.2. Extraction of decidual leukocytes

The method of extraction has been described elsewhere [8]. Briefly, samples from the decidua of spontaneous abortions or elective terminations of pregnancy were thoroughly washed in PBS. Decidual fragments were finely minced in a small volume of RPMI 1640 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) and then pushed through a 53- μm sieve (Gallenkamp, Loughborough, UK). The resulting cell suspension was washed with RPMI and layered on an equivalent volume of Lymphoprep (Flow Laboratories, Hertsfordshire, UK) at room temperature, and centrifuged for 20 min at 600 g. The cells were collected from the interface, suspended in RPMI, washed, and then suspended in complete culture medium (RPMI 1640, 10% fetal calf serum (FCS), 100 U/mL penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicin). The supernatant containing decidual leukocytes was collected, and the cells were washed and suspended in PBS for further analysis. Cell viability was determined microscopically by trypan blue exclusion. Only samples with more than 90% viable leukocytes were used.

2.3. Flow cytometry analysis

Decidual leukocytes were suspended in PBS at 10^6 cells/mL. For direct staining, 100 μL of the cell suspension was incubated with 10 μL of the appropriate monoclonal antibody (mAb) for 30 min at 4 °C in the dark. Cells were washed, suspended in 0.5 mL PBS, and immediately analyzed in a flow cytometer (Ortho-Cyturon, Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ, USA). To identify dead cells we incubated decidual

* Corresponding author. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular 3 e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, 18012 Granada, Spain. Tel.: +34 958 241000x20008; fax: +34 958 249015.

E-mail address: engarcia@ugr.es (E.G. Olivares).

cells with propidium iodide (Sigma–Aldrich). The percentage of cells that were antibody-positive was calculated with reference to the appropriate isotype control. Decidual cells were stained with the appropriate mAb labeled with FITC or phycoerythrin, or with their corresponding control isotype. The following mAbs against surface proteins were used: CD11c, CD14, CD15, CD25, CD40, CD45, CD56, CD80, CD86, Fas, and HLA-DR (all purchased from Caltag, San Francisco, CA, USA), CD83 and CD123 (BD Biosciences, Denderstraat, Erembodegem, Belgium), and DC-SIGN (R&D Systems, Minneapolis, USA). The mAb against ILT2 (HP-F1) was kindly provided by Dr. López-Botet (Universitat Pompeu-Fabra, Barcelona, Spain). For flow cytometric analysis we used the electronic gate in which most DC-SIGN+ cells were detected (DC-SIGN gate) (Fig. 1 A).

3. Results and discussion

We found that decidual DC-SIGN+ cells from elective terminations of pregnancy (normal decidua) exhibited a phenotype compatible with immature myeloid DC (Fig. 1 A, Table 1). These cells expressed CD11c (a myeloid DC marker), but showed little or no expression of CD123 (a plasmacytoid DC marker) or CD83 (a mature myeloid DC marker). Most DC-SIGN+ cells were Fas+ and ILT2+. Dendritic cell differentiation antigens such as CD25, CD40, CD80 and CD86 were also intensely expressed, whereas HLA-DR and CD14 were only weakly detected, suggesting that DC-SIGN+ cells included cell populations in different stages of maturation. Other authors, however, have suggested that decidual DC-SIGN+ cells are macrophages on the basis of their morphology and co-expression of CD14 [15]. Myeloid DC and macrophages are difficult to distinguish clearly, since they share functions and the expression of many antigens; moreover, these two cell types are able to interconvert [16].

As reported earlier [17,18], DC-SIGN is also expressed by macrophages, and maturation from monocyte to macrophage involves an increase in CD14 expression and a decrease in DC-SIGN+ expression, whereas maturation to myeloid DC is associated with upregulation of DC-SIGN and downregulation of CD14.

Double-labeling of decidual cells with anti-DC-SIGN and anti-CD14 antibodies revealed the existence of subpopulations that may represent different stages of maturation from monocyte to DC or to macrophage (Fig. 1 A). Together with DC-SIGN+ cells, we also found CD14+ DC-SIGN– macrophages, CD56+ NK cells, which formed complexes with DC-SIGN+ cells (Table 1) [4], and CD15+ DC-SIGN– polymorphonuclear leukocytes (PMN) in the DC-SIGN gate (Fig. 1 A, Table 1). Nevertheless, in this study (not shown) and in previous ones [8], most CD56+ NK cells were detected in the lymphocyte gate. The presence of PMN did not imply inflammatory infiltration, since an equivalent proportion was detected in all normal deciduas analyzed (Table 1). Furthermore, normal human deciduas contain a small proportion of PMN [19], which in our study were concentrated in the DC-SIGN gate (Fig. 1 A, Table 1). This proportion, however, represented a much smaller proportion of the total population of decidual cells (Fig. 1 A).

Although most abortions occur because of chromosomal abnormalities in the embryo, both recurrent and sporadic spontaneous abortions are associated with immune responses [5,6,8,10]. Nevertheless, in abortion decidua, as in normal decidua, we found a low expression of CD83 (Fig. 1 B, Table 1), an antigen that is associated to mature DC [20]. DC-SIGN+ cells showed an antigenic phenotype equivalent to that of normal decidua (Table 1). The proportion of DC-SIGN+ cells in spontaneous abortion decidua was, however, significantly smaller than in normal decidua. This difference was especially clear for the DC-SIGN+ CD14–, DC-SIGN+ Fas+ and DC-SIGN+ ILT2+ subpopulations (Table 1). The proportion of CD56+ NK cells located in the DC-SIGN gate was also significantly lower in spontaneous abortion decidua, whereas the population of CD15+ PMN did not vary significantly, which confirmed the absence of inflammation in these samples. Although most DC-SIGN+ cell populations analyzed by double-labeling were smaller in spontaneous abortion decidua than in samples from elective

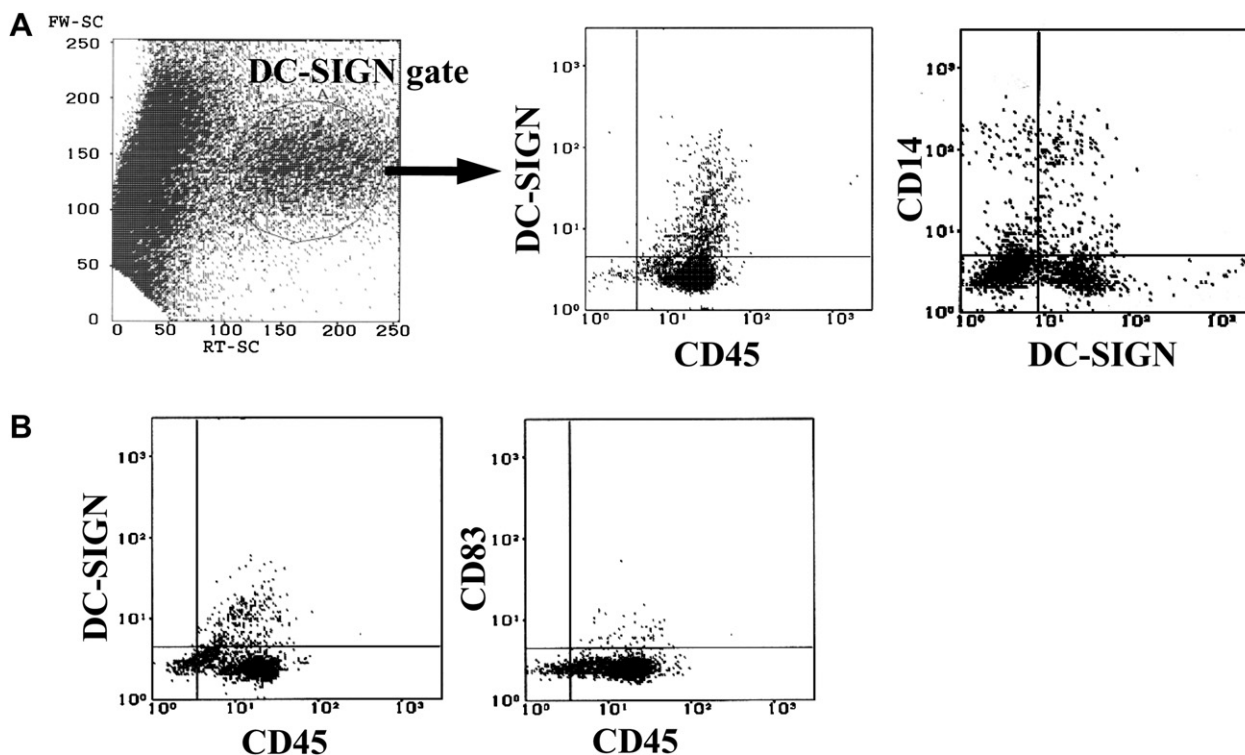


Fig. 1. A) Decidual DC-SIGN+ cells from elective termination of pregnancy. Flow cytometry electronic gate in which most DC-SIGN+ cells were detected (DC-SIGN gate). Double-labeling with anti-CD45, anti-CD14 and anti-DC-SIGN mAb. B) Flow cytometric analysis of DC-SIGN+ cells of decidua from spontaneous abortion. Presence of low numbers of CD83+ cells.

Table 1

Comparison of percentages of different subpopulations of decidual DC-SIGN⁺ cells and other decidual subpopulations between elective termination of pregnancy and spontaneous abortion. Double-labeling flow cytometric analysis was done in the gate in which most DC-SIGN⁺ cells were detected (DC-SIGN gate, Fig. 1 A). Results are shown as means \pm SD.

Decidual cells	Elective termination of pregnancy (%) (n = 60)	Spontaneous abortion (%) (n = 35)	P
<i>DC-SIGN⁺ cells</i>			
DC-SIGN ⁺ /Control isotype (2nd antibody)	28.3 \pm 18.4	13.9 \pm 9.6	0.01
DC-SIGN ⁺ /CD11c ⁺	17.4 \pm 10.2	9.0 \pm 7.1	0.049
DC-SIGN ⁺ /CD14 ⁺	4.1 \pm 2.1	9.5 \pm 5.7	0.021
DC-SIGN ⁺ /CD14 [−]	25.1 \pm 20.5	2.6 \pm 3.0	0.003
DC-SIGN ⁺ /CD15 ⁺	6.1 \pm 4.7	9.1 \pm 4.4	0.521
DC-SIGN ⁺ /CD25 ⁺	23.5 \pm 13.8	10.2 \pm 8.9	0.0004
DC-SIGN ⁺ /CD40 ⁺	22.9 \pm 11.3	9.7 \pm 7.8	0.006
DC-SIGN ⁺ /CD56 ⁺	11.4 \pm 13.4	1.0 \pm 0.4	0.617
DC-SIGN ⁺ /CD80 ⁺	23.2 \pm 17.4	12.3 \pm 9.4	0.244
DC-SIGN ⁺ /CD86 ⁺	19.3 \pm 13.4	12.6 \pm 10.0	0.418
DC-SIGN ⁺ /CD123 ⁺	5.2 \pm 4.7	3.6 \pm 2.3	0.673
DC-SIGN ⁺ /HLA-DR ⁺	2.0 \pm 1.1	4.5 \pm 2.7	0.031
DC-SIGN ⁺ /Fas ⁺	32.0 \pm 14.4	4.5 \pm 2.4	0.002
DC-SIGN ⁺ /ILT2 ⁺	31.6 \pm 17.2	6.2 \pm 5.6	0.001
<i>Other subpopulations</i>			
CD45 ⁺ /CD83 ⁺	1.3 \pm 1.2	1.4 \pm 0.9	0.859
CD14 ⁺ /DC-SIGN [−]	3.5 \pm 3.9	7.6 \pm 4.4	0.05
CD15 ⁺ /DC-SIGN [−]	68.9 \pm 15.5	72.1 \pm 6.2	0.757
CD45 ⁺ /CD56 ⁺	35.9 \pm 14.1	19.8 \pm 8.3	0.025

terminations of pregnancy (Table 1), DC-SIGN⁺ CD14⁺ cells and DC-SIGN⁺ DR⁺ cells were exceptions. The proportions of these populations were slightly but significant higher in spontaneous abortion samples. In fact, most DC-SIGN⁺ cells were CD14⁺ in spontaneous abortion samples, whereas most DC-SIGN⁺ cells were CD14[−] in decidua from elective terminations of pregnancy (Table 1). Another subpopulation that was significantly larger in spontaneous abortion decidua was DC-SIGN[−] CD14⁺ cells. The CD14⁺ subpopulations may represent cells of the monocyte-macrophage differentiation pathway and the most immature DC (Fig. 1 A, Table 1) [17,18]. We did not observe significant differences between embryonic and anembryonic pregnancies in the DC-SIGN⁺ cell populations of spontaneous abortion deciduas (not shown), suggesting that the presence or absence of an embryo do not influence the proportion of DC-SIGN⁺ cells in the decidua. Nevertheless, chromosomal abnormalities of the fetus, which are responsible for a significant proportion of spontaneous abortions, have also an influence on the decidual immune populations [21]. The effect of the fetal karyotype on the DC-SIGN⁺ subpopulations was, however, not evaluated in our work.

Because our results are given as percentages, we cannot assert that they correspond to variations in the absolute numbers of these cells. Attempts to study quantitative differences in DC-SIGN⁺ cells between normal and spontaneous abortion decidua in tissue sections by immunochemical methods were inconclusive, as these cells are not distributed uniformly in deciduas [4] (and our own unpublished results). Nevertheless, variations in the proportions of the other cells detected in the DC-SIGN gate (e.g., DC-SIGN[−] CD15⁺ neutrophils, DC-SIGN[−] CD14⁺ macrophages and CD56⁺ dNK cells) were not associated with the differences in DC-SIGN⁺ cell proportions (Table 1).

In conclusion, our results document, though they do not explain, alterations in the balance of DC-SIGN⁺ cell populations in spontaneous abortion decidua. Further maturation of decidual DC into fully mature myeloid DC in the local lymph nodes would induce a Th1 response, which would in turn trigger spontaneous abortion

[5,8,10]. The emigration of decidual DC from the decidua to the local lymph nodes, where they mature further and trigger activation of abortifacient Th1 cells in spontaneous abortion [20,22], may explain the lower proportion of decidual DC-SIGN⁺ cells in samples from spontaneous abortions. To test this hypothesis, DC would need to be studied in local lymph nodes, which in humans is not possible because of ethical considerations. Our hypothesis should therefore be tested in animal models such as the mouse.

Acknowledgements

We thank Dr. Sandra Blois for comments on the manuscript and K. Shashok for improving use of English in the manuscript. The mAb against ILT2 (HP-F1) was kindly provided by Dr. López-Botet (Universitat Pompeu-Fabra, Barcelona, Spain). This work was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2006-05689) and the Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad (PS09/00339) of Spain, and the Servicio Andaluz de Salud (grants SAS PFI 3/02 and TCMR 0010/2006) of the Regional Government of Andalucía.

References

- [1] Laskarin G, Kammerer U, Rukavina D, Thomson AW, Fernandez N, Blois SM. Antigen-presenting cells and materno-fetal tolerance: an emerging role for dendritic cells. *Am J Reprod Immunol* 2007;58(3):255–67.
- [2] Plaks V, Birnberg T, Berkutzi T, Sela S, BenYashar A, Kalchenko V, et al. Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. *J Clin Invest* 2008;118(12):3954–65.
- [3] Blois SM, Alba Soto CD, Tometten M, Klapp BF, Margni RA, Arck PC. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. *Biol Reprod* 2004;70(4):1018–23.
- [4] Kammerer U, Eggert AO, Kapp M, McLellan AD, Geijtenbeek TB, Dietl J, et al. Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *Am J Pathol* 2003;162(3):887–96.
- [5] Marzi M, Vigano A, Trabattini D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1996;106(1):127–33.
- [6] Minas V, Jeschke U, Kalantaridou SN, Richter DU, Reimer T, Mylonas I, et al. Abortion is associated with increased expression of FasL in decidual leukocytes and apoptosis of extravillous trophoblasts: a role for CRH and urocortin. *Mol Hum Reprod* 2007;13(9):663–73.
- [7] Nakashima A, Shiozaki A, Myojo S, Ito M, Tatematsu M, Sakai M, et al. Granulysin produced by uterine natural killer cells induces apoptosis of extravillous trophoblasts in spontaneous abortion. *Am J Pathol* 2008;173(3):653–64.
- [8] Olivares EG, Munoz R, Tejerizo G, Montes MJ, Gomez-Molina F, Abadia-Molina AC. Decidual lymphocytes of human spontaneous abortions induce apoptosis but not necrosis in JEG-3 extravillous trophoblast cells. *Biol Reprod* 2002;67(4):1211–7.
- [9] Plevyak M, Hanna N, Mayer S, Murphy S, Pinar H, Fast L, et al. Deficiency of decidual IL-10 in first trimester missed abortion: a lack of correlation with the decidual immune cell profile. *Am J Reprod Immunol* 2002;47(4):242–50.
- [10] Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M, Farhat R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2000;15(3):713–8.
- [11] Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. Decidual and peripheral blood CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod* 2004;10(5):347–53.
- [12] Vassiliadou N, Searle RF, Bulmer JN. Elevated expression of activation molecules by decidual lymphocytes in women suffering spontaneous early pregnancy loss. *Hum Reprod* 1999;14(5):1194–200.
- [13] Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 2000;1(3):199–205.
- [14] Blois SM, Kammerer U, Alba Soto C, Tometten MC, Shaikly V, Barrientos G, et al. Dendritic cells: key to fetal tolerance? *Biol Reprod* 2007;77(4):590–8.
- [15] Soilleux EJ, Morris LS, Lee B, Pohlmann S, Trowsdale J, Doms RW, et al. Placental expression of DC-SIGN may mediate intrauterine vertical transmission of HIV. *J Pathol* 2001;195(5):586–92.
- [16] Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* 1998;160(9):4587–95.

- [17] Le Naour F, Hohenkirk L, Grolleau A, Misek DE, Lescure P, Geiger JD, et al. Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics. *J Biol Chem* 2001;276(21):17920–31.
- [18] Lehtonen A, Ahlfors H, Veckman V, Miettinen M, Lahesmaa R, Julkunen I. Gene expression profiling during differentiation of human monocytes to macrophages or dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2007;82(3):710–20.
- [19] Critchley HO, Kelly RW, Lea RG, Drudy TA, Jones RL, Baird DT. Sex steroid regulation of leukocyte traffic in human decidua. *Hum Reprod* 1996;11(10):2257–62.
- [20] Kammerer U, Schoppet M, McLellan AD, Kapp M, Huppertz HI, Kampgen E, et al. Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells. *Am J Pathol* 2000;157(1):159–69.
- [21] Quack KC, Vassiliadou N, Pudney J, Anderson DJ, Hill JA. Leukocyte activation in the decidua of chromosomally normal and abnormal fetuses from women with recurrent abortion. *Hum Reprod* 2001;16(5):949–55.
- [22] Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999;283(5405):1183–6.



Human umbilical cord stromal stem cell express CD10 and exert contractile properties

V.A. Farias^{a,3}, J.L. Linares-Fernández^{a,2,3,*}, J.L. Peñalver^{a,b}, J.A. Payá Colmenero^{a,c}, G.O. Ferrón^{a,d}, E.L. Duran^{a,e}, R.M. Fernández^{a,e}, E.G. Olivares^{a,e}, F. O'Valle^{a,f}, A. Puertas^g, F.J. Oliver^h, J.M. Ruiz de Almodóvar^{a,i,1,*}

^a Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Spain

^b Unidad de Radiología Experimental, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Spain

^c Unidad de Microscopía, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Spain

^d Unidad de Citometría, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Spain

^e Unidad de Inmunología, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Spain

^f Departamento de Anatomía Patológica, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Spain

^g Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain

^h Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada, Spain

ⁱ Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 4 November 2010

Keywords:

Mesenchymal stem cell
Hypoxia
Umbilical cord
Differentiation
Myofibroblast
Electron microscopy

ABSTRACT

Background: It has been demonstrated that human umbilical cord stromal stem cells (UCSSCs) are bio-equivalent to bone marrow mesenchymal stem cells. However, little is known about their tissue origin or *in vivo* functions, and data on their expansion properties are limited due to early senescence in the culture methods described to date.

Methods: UC sections and cultured UCSSCs were analyzed with a panel of 12 antibodies. UCSSCs were grown in low-FCS containing medium at 5% or 21% oxygen and were assayed for their clonogenic properties, karyotype stability, expression of specific cellular markers, and multi-lineage potential. UCSSC contractile properties were evaluated by using collagen gel contraction assays under cytokine stimulus. **Results:** Immunohistochemistry studies showed that the UCSSCs were derived from the Wharton's jelly and not from the vascular smooth muscle sheath of the blood vessels. UCSSC growth properties were increased in a 5% oxygen atmosphere in comparison to normoxic culture conditions. In both culture conditions, UCSSCs were CD14-, CD34-, and CD45-negative while expressing high levels of CD73, CD90 and CD105 and maintaining their differentiation potentialities. UCSSCs expressed alpha smooth muscle actin and behaved as functional myofibroblasts when cellular contraction was challenged with appropriate stimuli.

Conclusions: UCSSCs are mesenchymal stem cells that reside in the perivascular area of Wharton's jelly and are phenotypically and functionally related to myofibroblasts.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) have been isolated from umbilical cord (UC) blood [1,2], umbilical vein subendothelium [3], and Wharton's jelly, while efforts have been made to distinguish

between perivascular [4,5] and intervascular [6,7] areas of Wharton's jelly.

Human umbilical cord stromal stem cells (UCSSCs) are emerging as an interesting alternative to bone marrow-derived MSCs because: i) UCSSCs are obtained by non-invasive means; ii) they meet International Society of Cellular Therapy criteria [8]; iii) they have been successfully differentiated to adipocytes [6], chondrocytes [9], cardiomyocytes [10], skeletal myoblasts [7], and bone [6], hepatocyte-like [11,12], endothelial [13], and neuronal [6] cells; and, importantly, iv) they are not recognized by HLA mismatch lymphocytes and they mitigate alloreactivity in mixed lymphocyte cultures, suggesting that human UCSSCs will be tolerated in allogeneic transplantation [14–16].

* Corresponding authors. Centro de Investigación Biomédica, Avenida del Conocimiento s/n, 18 100 Armilla, Granada, Spain. Fax: +34 958 81 91 32.

E-mail addresses: joseluislinares@ugr.es (J.L. Linares-Fernández), jmrdrar@ugr.es (J.M. Ruiz de Almodóvar).

¹ Tel.: +34 958 241000x20013.

² Tel.: +34 958 24 10 00x20009.

³ Both authors have contributed equally to this work.

However, despite the growing research interest in UCSSC biology, no precise study on their *in situ* identification has been reported to date. CD10 is a well-known biomarker of B-cell lymphomas [17], and its expression has also been reported in other cell types, including placental and bone marrow MSCs [18], and human fibroblasts [21]. In contrast, we could find no scientific report on CD10 expression in normal smooth muscle cells (SMCs), prompting us to investigate the usefulness of CD10 to segregate SMCs and UCSSCs from the UC. In addition, no tests have yet been performed on the experimental contractile properties of UCSSCs anticipated from ultrastructural studies of the human UC [22,23]. The objective of this study was: i) to identify a surface marker for discriminating between vascular SMCs and UCSSCs by using immunohistochemistry on cultured UCSSCs and UC sections; ii) to assess UCSSC growth parameters, the stability of their surface phenotype, and their trilineage potentialities, in a 5% oxygen atmosphere; iii) to investigate whether the expression of α -smooth muscle actin (SMA) by UCSSCs correlates with a functional phenotype, by using collagen gel contraction assays to examine the capacity of TGF β -1, PDGF, and IL-10 to induce reversible cell contractility. Our results demonstrate that UCSSC growth parameters are improved when cultured in low oxygen atmosphere and that they behave as functional myofibroblasts despite maintaining an MSC-like degree of plasticity.

2. Material and methods

2.1. Generation and expansion of UCSSCs

Term UC samples were collected from women with healthy pregnancies, after obtaining their informed consent, at the Department of Obstetrics and Gynecology, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada. Institutional ethics committee approval was obtained for all procedures. Tissues were transported in a cold PBS solution containing 20 mM EDTA (Sigma), 2.5 μ g/ml amphotericin B (Gibco), 50 μ g/ml gentamicin (Gibco), and 1% penicillin-streptomycin (HyClone) and were processed within 4 h. UC vein and arteries were separated from the stroma by manual stripping. Vessels with their surrounding Wharton's jelly were enzymatically digested using a digestion solution containing 1.38 mg/ml dispase (Worthington, 2104), 0.2 mg/ml hyaluronidase (Sigma, H6254), and 0.8 mg/ml collagenase IV (Worthington, 4188). Tissues underwent two 45-min digestion rounds at 37 °C in digestion solution followed by a 20-min digestion in 0.25% trypsin-EDTA (Sigma). Digestion was stopped by adding 10% fetal bovine serum (FBS), and all suspensions were stored on ice until all digestion incubations were concluded. Suspensions were pooled and passed through a 70 μ m cell strainer (BD Falcon, 352350). Red blood cells were lysed in a buffer of 15.5 mM NH₄Cl, 1 mM KHCO₂, and 10 μ M EDTA at room temperature for 5 min. The resulting cell suspension was washed in culture medium, counted in Neubauer's chamber, and seeded in 75 cm² flasks (T-75). Typically, around 10⁶ cells were obtained from a UC of 10–15 cm length. The 18 UCs used in our study generated 18 hUCSSCs lines (100% yield).

UCSSCs were cultured in low-serum culture media (LSCM) as previously described [24]. LSCM contained 60% low-glucose DMEM (Gibco), 40% MCDB-201 (Sigma), 1x insulin-transferrin-selenium (ITS, Sigma), 1x linoleic acid-bovine serum albumin (LA-BSA, Sigma), 10⁻⁹ M dexamethasone (Sigma), 10⁻⁴ M ascorbic acid 2-phosphate (Sigma), 10 ng/ml EGF (Sigma E-9644) and 10 ng/ml PDGF-BB (Peprotech, 100-14B), 100 U penicillin, 1000 U streptomycin (Gibco) and 2% FBS (PAA). Cells were cultured at 37 °C in a hypoxic atmosphere (5% CO₂/5% O₂) (Thermo Scientific Forma series II incubators, ref 3141, with both CO₂ and O₂ controls). For cell passaging, culture flasks were handled under regular atmosphere in the cell culture hood. Media were changed every 3–4 days. When confluence of 70–80% was reached, cells were detached with 0.25% trypsin-EDTA (Sigma) and 1.5–10⁵ cells were seeded in a new T-75 culture flask.

2.2. Growth kinetics studies

Cells were counted for 12 UCSSC lines at each passage. Growth kinetics were analyzed by calculating the cumulative population doublings (PD) and population doubling time (PDT) using the following formulas: $PD = C_t \cdot \ln 2 / \ln [N_t / N_i]$ and $PDT = C_t / PDT$, where N_i is the number of cells seeded and N_t is the number of cells grown after time C_t of culture.

2.3. Colony forming unit (CFU) assay

The capacity of UCSSCs to form colonies was studied in triplicate by plating 2 · 10² cells in a p100 plate and culturing for 14 days in LSCM. Plates were incubated either in O₂-regulated incubators at 5% O₂ or in conventional incubator at 21% O₂.

Plates were fixed with 70% v/v ethanol and then stained with crystal violet. Colonies were monitored under a binocular microscope and recorded when composed of at least 50 cells. The mean number of colonies ($n = 3$) was used to estimate the clonogenic potential, i.e., the percentage of total number of seeded cells that produce colonies, and was expressed as $M \pm SD$.

2.4. Karyotyping

After 40–45 duplications, cells were incubated for 2 h with 50 μ g/ml colchicin (Logical Industries). Cells were detached with warm 0.25% trypsin-EDTA (Gibco) and lysed by incubation in warm hypotonic 0.56% (w/v) KCl for 20 min at 37 °C. Nuclei were repeatedly washed in cold 3:1 methanol:acetic acid, and 50 μ l of the fixed preparation were then dropped onto pre-cleaned slides and left to dry. After 24-h incubation at 47 °C, slides were treated with 2 mg/ml trypsin at room temperature for a few seconds, washed in PBS, and left to dry. The slides were stained with a 1:1:8 Giemsa:H₂O:PBS solution for 10 min at room temperature, washed with tap water, and left to dry. We analyzed 23 metaphases by microscopy and the modal number of chromosomes was determined.

2.5. Histology and immunohistochemistry

UC vein and arteries were separated from the stroma by manual stripping. UCs or UC vessels were fixed in 10% buffered formalin for 24 h and paraffin embedded. Then, 4- μ m sections were cut along the horizontal axis of the cord tissue, dewaxed, and hydrated for staining with hematoxylin-eosin. Cultured UCSSCs were seeded on sterile cover slips, left to adhere for 24 h, and then fixed for 5 min in 4% PFA.

For the immunohistochemistry study, paraffin-embedded sections were dewaxed, hydrated, and treated at 98 °C for 20 min in 1 mM EDTA buffer (pH8) in PT module (Thermo Fisher, Fremont, CA) for antigenic unmasking. Immunophenotypic expression of different markers was determined by using the following commercially available monoclonal antibodies (Master Diagnostica, Granada, Spain): vimentin (clone V9, dilution 1/200), CD45 (clone cocktail, dilution 1/60), CD68 (clone Kp1, dilution 1/30), CD31 (clone JC/70A, dilution 1/25), CD34 (clone QBEND/10, dilution 1/50), keratin (clone AE1/AE3, dilution 1/500). AE1/AE3 is an anti-pan keratin cocktail in which MAb AE1 recognizes acidic keratins with molecular weights of 56.5, 50, 50', 48, and 40 kDa, whereas AE3 MAb reacts with basic keratins of 65–67, 64, 59, 58, 56, and 52 kDa), CD10 (clone 56C6, dilution 1/50), h-caldesmon (clone TD107, dilution 1/50), desmin (clone D33, dilution 1/20), SMA (clone 1A4, dilution 1/200), specific actin (clone HHF35, dilution 1/40), podoplanin (clone D2-40, dilution 1/40), Ki67 (clone PS6, dilution 1/100), and collagen II (clone 2B1.5, dilution 1/20). All antibodies used in this study are mouse monoclonal antibodies from the IgG1/ κ isotype except for anti-Ki67, which is a rabbit antibody. Control experiments were performed with IgG1/ κ isotype and normal rabbit serum. Antibody incubations were at room temperature. The immunohistochemical study was done on an automatic immunostainer (Autostainer 480, Thermo Fisher) using the polymer-peroxidase-based method, followed by development with diaminobenzidine (giving a dark brown precipitate) or aminoethylcarbazole (giving a red precipitate) (Master Diagnostica).

2.6. Electron microscopy

UCSSC culture monolayers on the plastic substrate were fixed in 2.5% glutaraldehyde solution for 24 h, postfixed in 1% OsO₄ at 4 °C for 2 h, dehydrated in increasing concentrations of acetone, and embedded in Epon. Ultrathin (70 nm) sections were obtained on an ultramicrotome (Reichert–Jung ULTRACUT, Leica Microsystems, Barcelona, Spain) and stained with lead citrate and uranyl acetate. Sections were examined with a transmission electron microscope (Zeiss EM 902, Barcelona, Spain) and processed using analySIS[®] for Windows (Soft Imaging System, Münster, Germany).

2.7. Flow cytometry

All staining was done according to the manufacturer's instructions, using 10⁵ cells and the recommended amount of antibodies, which were incubated on ice for 40 min. Expressions of CD10-FITC (Caltag, clone MEM-78), CD14-FITC (BD, clone M5E2), CD29-FITC (Caltag, Clone MEM-101A), CD31-APC (R&D, clone 9G11), CD34-FITC (BD, clone 2D1), CD44-APC (BD, clone G44-26), CD45-APC (Caltag, clone HI30), CD54-FITC (Caltag, clone MEM 111), CD73-PE (BD Pharmingen, clone AD2-PE), CD90 (eBioscience, clone eBio5E10), CD105 (Serotec, clone SN6), and ASM-Cy3 (Sigma, clone IA4-Cy3) and corresponding isotype controls were determined by flow cytometry using the FACSCanto II cytometer (BD). A total of six UCSSC lines were analyzed for the expression of CD genes, using the Cell Quest Pro software (BD).

2.8. Trilineage differentiation

Osteogenic and adipogenic differentiation were described elsewhere [25]. After four weeks of induction, cultures were fixed with 4% w/v PFA and stained by Von-Kossa for osteogenic differentiation and by Oil Red O for adipogenic differentiation. For chondrogenic differentiation, 200000 cells were cultured as an aggregate at the bottom of a 15 ml tube in LSCM supplemented with 10⁻⁷ M dexamethasone, 50 μ g/ml 2-phosphate ascorbic acid, and 10 ng/ml TGF- β 3 in the absence of serum.

Media were changed every 3–4 days, and cultures were maintained for 3 weeks. Cellular pellets were fixed in 4% w/v PFA and differentiation to chondrocytes was assessed by: macroscopic examination of the cell aggregate, demonstrating a shiny-surfaced cell mass; and by Alcian blue staining, for which deparaffinized sections were hydrated in water and stained with 2% Alcian Blue 8GX (Sigma) at pH 2.5 for 30 min, washed in water, and processed for microscopic examination.

2.9. Gel contraction assays

Cellular collagen gel contraction assays were performed as previously described [21]. A sterile solution of 8:1:1 bovine collagen type I (BD Bioscience, 354231):0.01 M NaOH:10x PBS was prepared according to the manufacturer's instructions to produce a collagen concentration of 0.3 mg/ml and was combined with $1 \cdot 10^6$ cells/ml from passage 3. The collagen/cell mixture (50 μ l/well) was dispensed as single drops into 6-well culture plates and allowed to polymerize at 37 °C for 2 h. Immediately after gel polymerization, 2 ml of high serum culture media (HSCM) (89%DMEM-LG [Gibco, 11885092], 10% FBS [PAA, A11-043], 1% Penicillin-Streptomycin, and 50 μ M β -mercaptoethanol [Gibco]) were added and collagen embedded cells were cultured for 24 h at 37 °C in a hypoxic atmosphere (5% CO₂/5% O₂).

Culture medium was then changed for HSCM supplemented with the appropriate cytokine (PDGF, TGF β -1, IL-10) at 10, 25, or 50 ng/ml. In some cases, after the 48-h incubation in the presence of 50 ng/ml of the cytokine, medium was changed

for HSCM without cytokines and the culture was pursued for an additional 24 h in order to test the reversibility of the cytokine-induced cell contraction/relaxation. At the end of the treatments, the height (h) and radius (r) of each collagen drop were measured with a microscope micrometer. The volume (V) of each gel drop was assimilated to a spherical cap and calculated by the formula: $V = 1/2 \cdot \pi \cdot h \cdot (h^2/3 + r^2)$. The mean of measurements ($n = 3$ for each sample) taken for each concentration was used to estimate the gel volume. Data were normalized using the following formula:

$V_{(\%)} = 100 \times ((V_0 - V_{ck})/V_0)$, where $V_{(\%)}$ is the percentage of gel contraction of cytokine-treated UCSSCs, V_0 is the volume of the collagen-cell drop before treatment with any cytokine, and V_{ck} is the volume of the collagen-cell drop after the cytokine treatment period. The differences between the reference condition and the tested condition were addressed by using a one-way ANOVA test.

3. Results

3.1. Immunohistochemical study

Fig. 1 shows a comparative immunohistochemical study of keratin expression (Fig. 1A, B, C, D) and CD10 expression (Fig. 1E, F, G, H) in

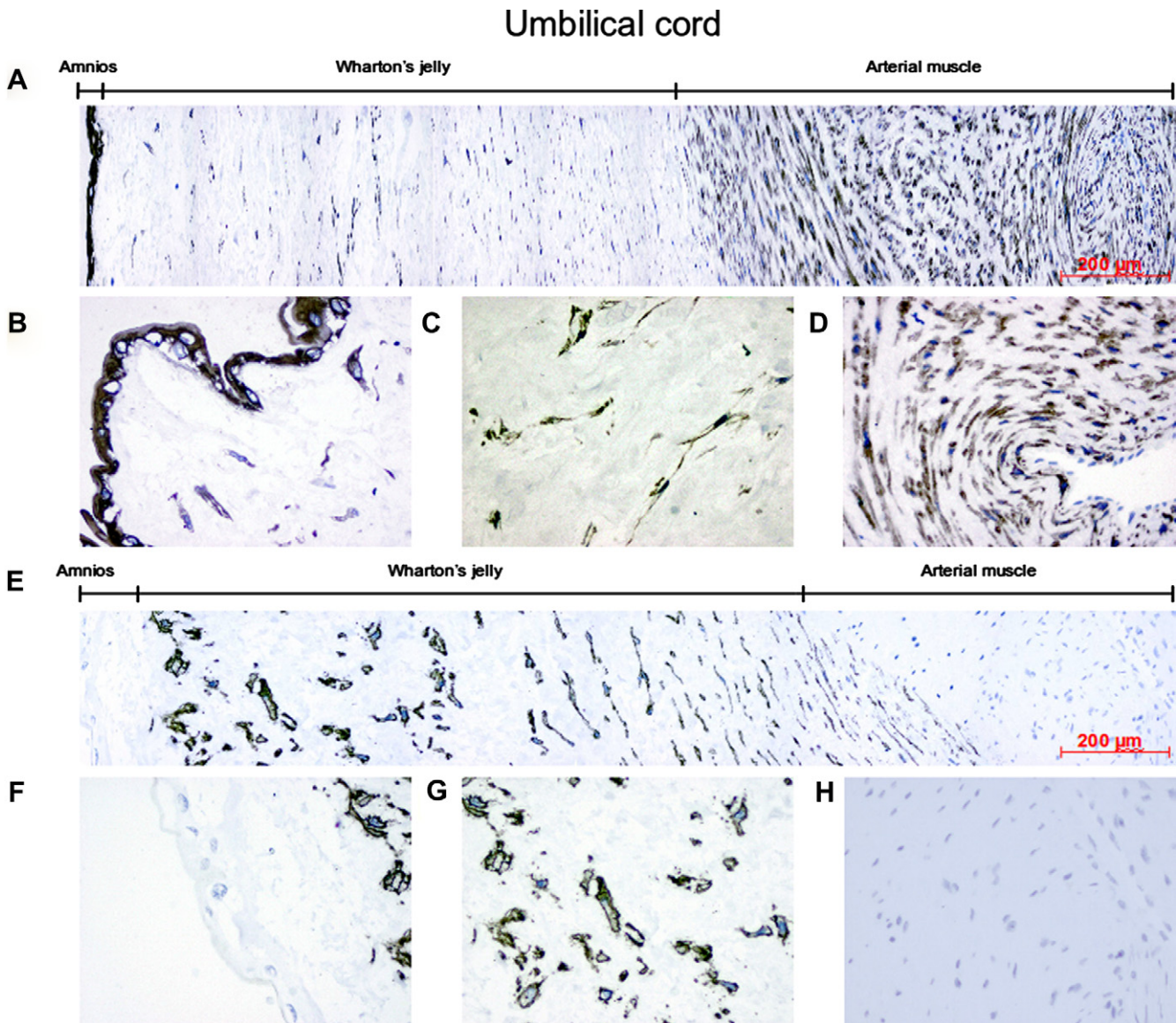


Fig. 1. *In situ* identification of cUCSSCs. Panoramic view of Umbilical cord transversal sections (A, F) and the details of the three distinctive zones, amnion (B, F), Wharton's jelly (C, G) and arterial muscle (D, H). Immunohistochemistry where realized with antibodies anti keratines (Clone AE1/AE3) in A, B, C, D and with anti-CD10 in E, F, G, H. (Magnification for B, C, D, F, G, H is 400 \times . A and E where obtained by merging various pictures through Adobe Photoshop and the scale is given by the scale bar).

panoramic views of the UC transversal sections and in detailed views of the amniotic epithelium, Wharton's jelly, and arterial smooth muscle cells of the UC. Anti-keratins stained the cytoplasm of arterial smooth muscle cells, *in situ* UCSSCs (isUCSSCs = UCSSCs *in situ* in Wharton's jelly), and epithelial amniotic cells, whereas anti-CD10 only stained the membranes of isUCSSCs, and no staining was observed for the amnion or arterial smooth muscle layer. Fig. 2 shows the immunohistochemical results for different antibodies tested on UC sections and on cultured UCSSCs (cUCSSCs) at passage 9. In Fig. 2A, where full UC sections are shown, the positivity for cytokeratins, SMA, and h-caldesmon is clearly visible in SMCs in vessels, where the cellularity is high. The amniotic epithelium also revealed positivity for cytokeratins. CD34 staining can be distinguished in the endothelia of the two UC arteries. In Fig. 2B, SMCs and isUCSSCs express vimentin, keratin (AE1/AE3), actins, h-caldesmon, and desmin, but only isUCSSCs are 100% positive for CD10. No compartment of the UC expressed CD68, while CD34 was only expressed in endothelial cells. No staining was observed in the negative control. Fig. 2C shows an isolated umbilical artery stained for CD10 antibody before and after the enzymatic treatment to release isUCSSCs from around the UC vessel (see material and methods). Most of the CD10⁺ cells were released through the process of enzymatic digestion, while the integrity of CD10⁻ vascular SMCs remained mostly intact.

The immunophenotype of cultured UCSSCs (cUCSSCs) (Fig. 2 D) was similar to that of isUCSSCs except for a decreased actin expression and the acquisition of CD68 expression. Ki67 staining of proliferating cells is shown as specific control, and no staining was detected in isotype controls.

Table 1 summarizes the percentages and intensities of all immunostainings performed on UC sections and cUCSSCs at passage 9. The expression of CD10, keratin, caldesmon, desmin, and vimentin were similar in intensities and percentages between cUCSSCs and isUCSSCs. SM and Sp actins were expressed in 90–100% of the isUCSSCs, but these expression levels fell to 20–30% in cultured cells after 9 passages. The expression of podoplanin, which was detectable in $36.0 \pm 31.8\%$ of the isUCSSCs, decreased to $2.8 \pm 1.9\%$ in cUCSSCs. It is noteworthy that sub-amniotic stromal cells of the UC lost most of the markers expressed in the Wharton's jelly with the exception of cytokeratins, whose expression was maintained in most cells, and CD10, whose expression decreased from around 100% to $38.6 \pm 8.4\%$.

3.2. Expansion and clonogenic properties of cUCSSCs cultured in 5% oxygen atmosphere

We followed the growth kinetics of cUCSSCs in LSCM under hypoxic (5% O₂ and 5% CO₂) and normoxic (21% O₂ and 5% CO₂) conditions, as represented in Fig. 3A. Cells grown under hypoxic conditions showed a greater slope ($S_{5\%} = 0.69 \pm 0.02$) and reached the Hayflick's limit after 72 days of culture, with a CPD_{5%} of 52, while the same donor cUCSSCs grown under normoxic conditions were characterized by a slope $S_{21\%}$ of 0.47 ± 0.03 and a total CPD_{21%} of 34. Hence, in addition to the growth potentiality, the PDT was also affected by the oxygen level, which was around 42 h in normoxia versus 30.4 h in hypoxia. cUCSSCs from 12 different umbilical cords cultured in hypoxia showed a mean PDT of 35.8 ± 5.3 h and reached the Hayflick limit at around 50 PD after about 80 days of culture (Fig. 3B).

The clonogenic potential of cUCSSCs grown at 5% O₂ fell from ~30% at day 10 of culture to a stable level of ~15% from day 17 to day 58 of culture (Fig. 3C). In contrast, the clonogenic potential of the same donor cUCSSCs grown at 21% O₂ did not exceed 5% during the first 33 days of culture and became zero from day 37 of culture. Because of their prolonged life span, cUCSSCs grown at 5% O₂ were assessed for chromosomal abnormalities and showed a normal

karyotype until PD 40–45, as demonstrated by the G-binding depicted in Fig. 3D.

3.3. Flow cytometry

The phenotype of the same donor cUCSSCs was compared when grown in normoxia and hypoxia at passage 3–5 (Fig. 4). Under both culture conditions, cUCSSCs were 100% positive for CD10, CD29, CD44, CD73, CD90 and CD105 and were around 90% positive for CD54. Under both conditions, cUCSSCs were negative or very dim for CD34 and CD45. In the last lane of Fig. 4, for both culture conditions, a small fraction of the cUCSSCs population is dim for CD14 but concomitantly negative for CD45, hence ruling out hematopoietic cell contamination. SMA expression was maintained in nearly 100% of cells at passage 3–5 under both culture conditions.

3.4. UCSSCs cultured in hypoxia maintain their multipotentiality

We confirmed that cUCSSCs grown at 5% oxygen maintained their differentiation potentialities. Oil Red-O staining revealed that multiloculated inclusions were induced by adipogenic induction media, with no staining in uninduced cell culture (Fig. 5A). Von-Kossa staining showed that differentiation to bone was induced by the osteogenic induction media, with no staining detected in uninduced cell culture (Fig. 5B). Differentiation to cartilage was demonstrated by macroscopic observation of the shiny surface of cell aggregates and by Alcian blue staining of sulfated glycosaminoglycans visible in cell aggregate sections (Fig. 5C and D).

3.5. Contractile activity of UCSSCs

Under transmission electron microscopy, cUCSSCs showed a spindle shape, prominent rough endoplasmic reticulum, modestly developed Golgi apparatus, well-developed mitochondria, myofilaments with focal densities that were frequently peripherally located, and gap junctions (Fig. 6D and E), which are all ultrastructural features of myofibroblastic cells.

We investigated whether the expression of SMA by cUCSSCs and their ultrastructural myofibroblastic cell features correlated with a functional phenotype by examining the effects of cytokines PDGF, TGF- β 1, and IL-10, which are known to modify cell contraction in myofibroblastic cells [26,27]. cUCSSCs were cultured in collagen matrices in which the state of contraction of the cells determines the gel volume [27,28]. Both TGF- β 1 and PDGF-BB induced cell contractility in cUCSSCs in a dose-dependent manner (Fig. 6, A and B), whereas IL-10-induced cell relaxation (Fig. 6C). After the 48-h incubation in the presence of 50 ng/ml of the specified cytokine, the medium was changed for HSCM without cytokines, and cultures were continued for an additional 24 h to test the reversibility of the cytokine-induced effect. Results obtained demonstrate the reversibility of PDGF- and TGF- β 1-induced cell contraction and IL-10-induced cell relaxation.

4. Discussion

Various authors have described the isolation and culture of UCSSCs from the complete umbilical cord [29], umbilical vessels alone [4], or Wharton's jelly [30]. However, it remained unclear whether cultured cells originate exclusively in the Wharton's jelly or also from SMCs of the cord vessels, since no distinctive marker had been developed. isUCSSCs express smooth muscle-specific actins, h-caldesmon, desmin, and vimentin, showing a myofibroblast/SMC phenotype [31,32]. SMCs surrounding the vessels share the same phenotype but are 100% negative for CD10, whereas

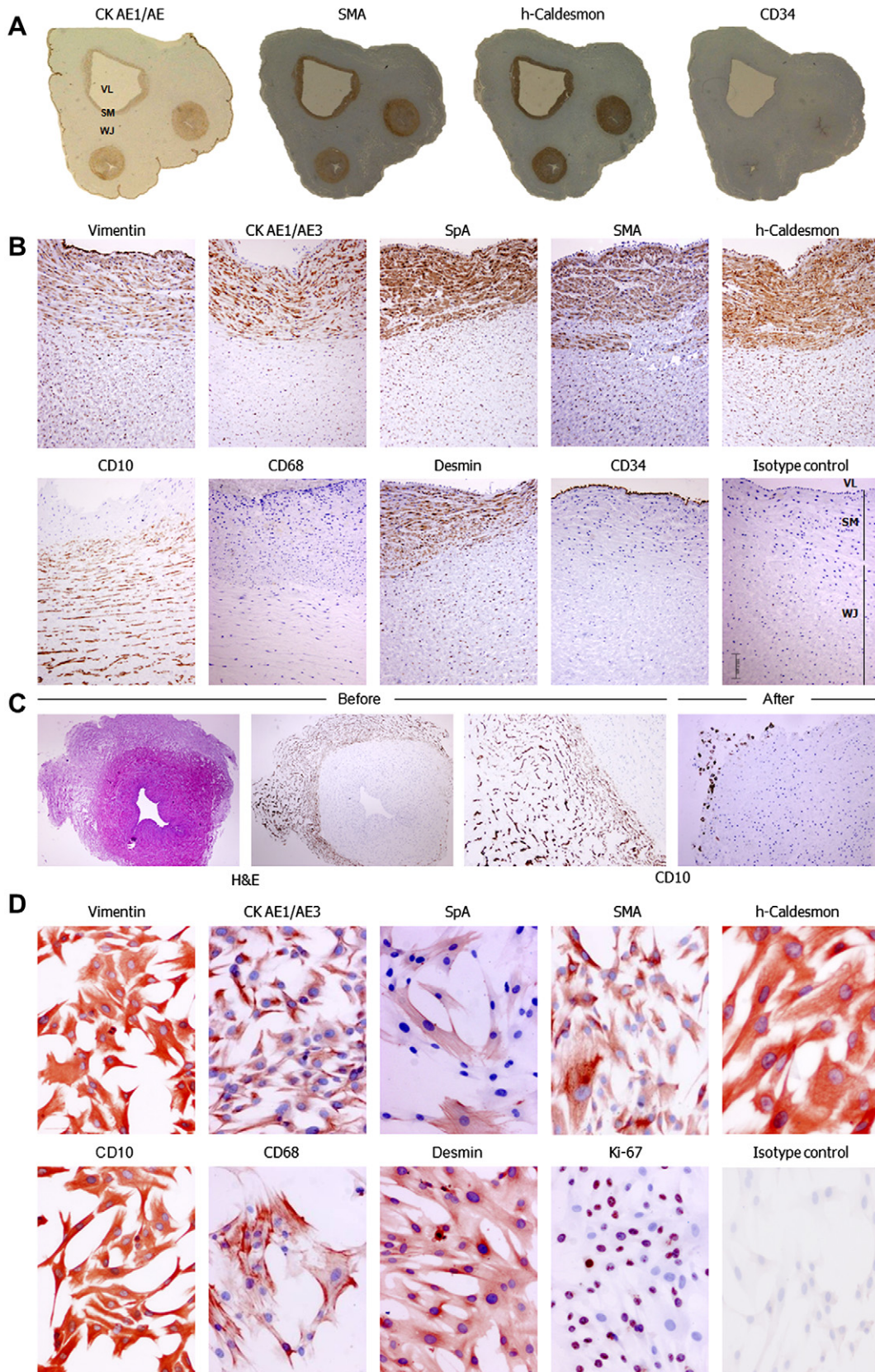


Fig. 2. *In situ* characterization of cUCSSCs. (A) Umbilical cord transversal section at low magnification showing intense expression of cytokeratins, SMA and caldesmon in the SMCs surrounding the vessels. The amniotic epithelium also stains positive for cytokeratins. At low magnification, CD34 expression is only detected in endothelial cells of arteries. (B) Immunohistochemical detection using several antibodies in transversal umbilical cord sections. The structural features of the tissue are indicated in the isotype control (VL: vessel lumen; SM: vascular smooth muscle cells; WJ: Wharton Jelly). Note the similar expression on muscular vascular cells and in iUCSSCs for most markers. In contrast, CD10 is only detected in cells from the WJ. CD34 antibody only stains the endothelial cells and CD68 is not expressed. (Polymer-peroxidase method, 10× magnification). (C). Isolated artery with asymmetric rest of perivascular area before and after enzymatic treatment. Note that mostly, perivascular CD10 positive cells are released during the process of enzymatic treatment (see Material and methods). (D) Monolayer culture of UCSSCs at passage 9 immunostained with the same antibodies as in B plus Ki67 antibody. The cultured UCSSC phenotype is similar to iUCSSCs in B except for the neo-expression of monocyte marker (CD68) in $10.4 \pm 3.2\%$ of cUCSSCs (see Table 1) (Polymer-peroxidase x100 except for caldesmon, x200).

Table 1
Immunohistochemistry results in umbilical cord and culture cells.

Antibody	Endothelial cells		Vascular smooth muscle		In situ UCSCs		Subamniotic cells		Cultured UCSCs	
	%	Intensity	%	Intensity	%	Intensity	%	Intensity	%	Intensity
CD45	0 ± 0	–	0 ± 0	–	0 ± 0	–	0 ± 0	–	0 ± 0	–
CD68	0 ± 0	–	0 ± 0	–	0 ± 0	–	0 ± 0	–	10.4 ± 3.2	+
CD31	100 ± 0	++	0 ± 0	–	0 ± 0	–	0 ± 0	–	0 ± 0	–
CD34	100 ± 0	+++	0 ± 0	–	0 ± 0	–	0 ± 0	–	0 ± 0	–
CD10	0 ± 0	–	0 ± 0	–	97.4 ± 1.5	++/+++	38.6 ± 8.4	+	98.8 ± 1.2	+++
Keratin	0 ± 0	–	99.2 ± 0.8	++/+++	75.2 ± 19.6	++/+++	100 ± 0	+++	89.2 ± 4.3	++/+++
SM Actin	0 ± 0	–	99.2 ± 0.8	++	94 ± 4.6	++	0 ± 0	–	33 ± 6.6	++
Sp Actin	0 ± 0	–	100 ± 0	+++	95.6 ± 4.4	+++	0 ± 0	–	22.8 ± 4.3	++
Caldesmon	0 ± 0	–	100 ± 0	++/+++	93.2 ± 4.8	++/+++	0 ± 0	–	100 ± 0	+++
Desmin	0 ± 0	–	62 ± 15.7	++/+++	66.8 ± 16.4	++	0 ± 0	–	89.2 ± 6.5	++/+++
Podoplanin	0 ± 0	–	0 ± 0	–	36.6 ± 31.8	++	1.6 ± 2.6	–	2.8 ± 1.9	++
Vimentin	100 ± 0	+++	100 ± 0	+++	100 ± 0	+++	0 ± 0	–	100 ± 0	+++
Ki67	0 ± 0	–	0.8 ± 1.8	++	0.2 ± 0.45	++	0.2 ± 0.45	++	41.8 ± 6.3	+++

Intensity score: Absence (–) to intense (+++).

UCSSCs all highly express CD10. cUCSSCs generated with our protocol were 100% positive for CD10 as determined by immunohistochemistry and flow cytometry, indicating that they all derived from the Wharton's jelly remaining around the blood vessels after manual stripping. Moreover, the integrity of the vascular smooth muscle layer was mostly preserved during the process of digestion of the UC vessels, while the perivascular Wharton's jelly was

degraded and isUCSSCs were released into the medium (see Fig. 2C). The phenotype of cUCSSCs was mostly preserved when compared to isUCSSCs, except for a drop in actin expression at late passages. Around 10% of cUCSSCs acquired the expression of the myelomonocytic marker CD68 during cell culturing. CD68 was previously shown to be expressed in some non-hemopoietic cells, including human fibroblasts [33]. Interestingly, CD68 expression

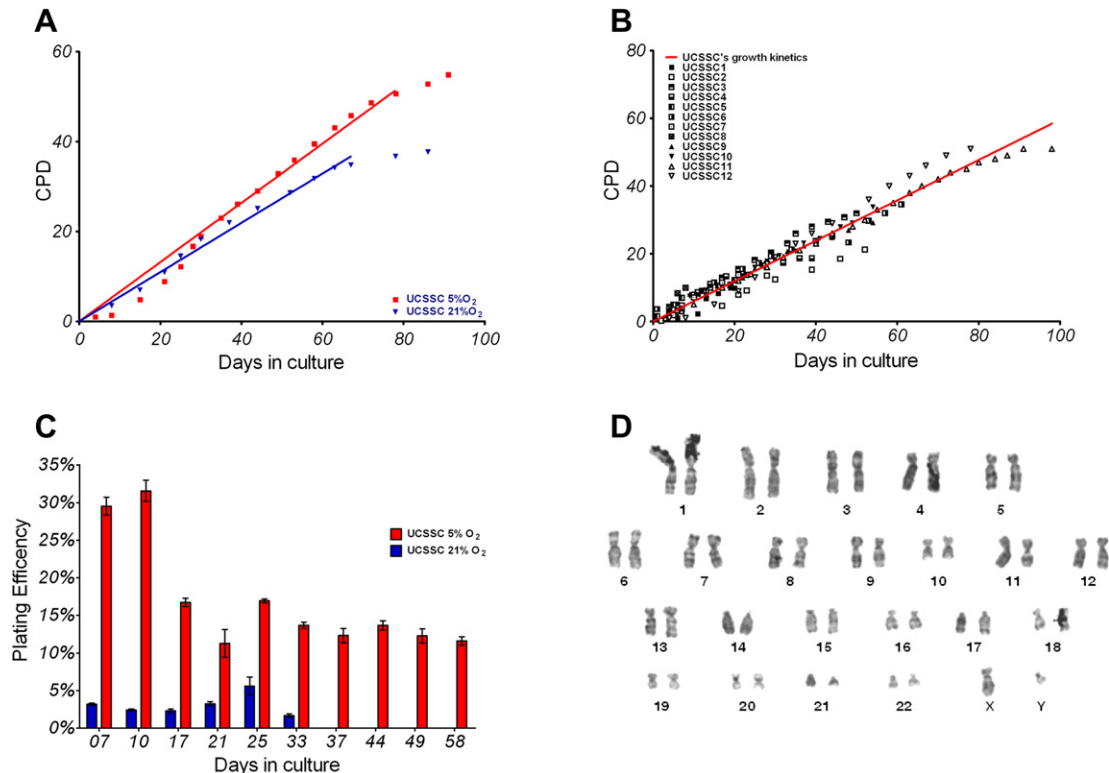


Fig. 3. Growth kinetics of UCSSCs. (A): UCSSC growth curves from the same donor were estimated under a 5% or 21% O₂ atmosphere. cUCSSCs were grown in LSCM containing EGF and PDGF at 21% (blue line; slope = 0.466 ± 0.03) and 5% O₂ (red line; slope = 0.685 ± 0.022). At each passage, cells were counted and PD estimated and plotted in the graph. Kinetics data were analyzed by linear regression, and the equality of lines was tested. Results obtained ($p < 0.0001$) support the hypothesis that growth is significantly improved in LSCM and 5% O₂. (B): 12 independent UCSSC lines were grown in LSCM containing EGF and PDGF at 5% O₂. At each passage, cells were counted and PD estimated and plotted in the graph. UCSSCs continue to grow until PD 50 (total n° cells theoretically expanded = 5.6 · 10²⁰ cells) and then show the classic property of Hayflick's limit. (C): At various passages, 200 UCSSCs cultured at 5% or 21% O₂ were plated in a p100 and grown for 2 weeks with medium changes every 3–4 days in a 5% O₂ or 21% O₂ incubator, respectively. Colonies were fixed with 70% ethanol and stained. Colonies of ≥50 cells were recorded. The mean number of colonies (n = 3) was used to estimate the clonogenic potential as a percentage of the total number of seeded cells that produce colonies and expressed as M ± SD. (D): cUCSSCs were plated in LSCM and passed for 40–45 cell doublings. Cells were harvested after treatment with colcemide 50 µg/ml for 2–3 h and were then cytogenetically analyzed. A total of 23 metaphases were recorded.

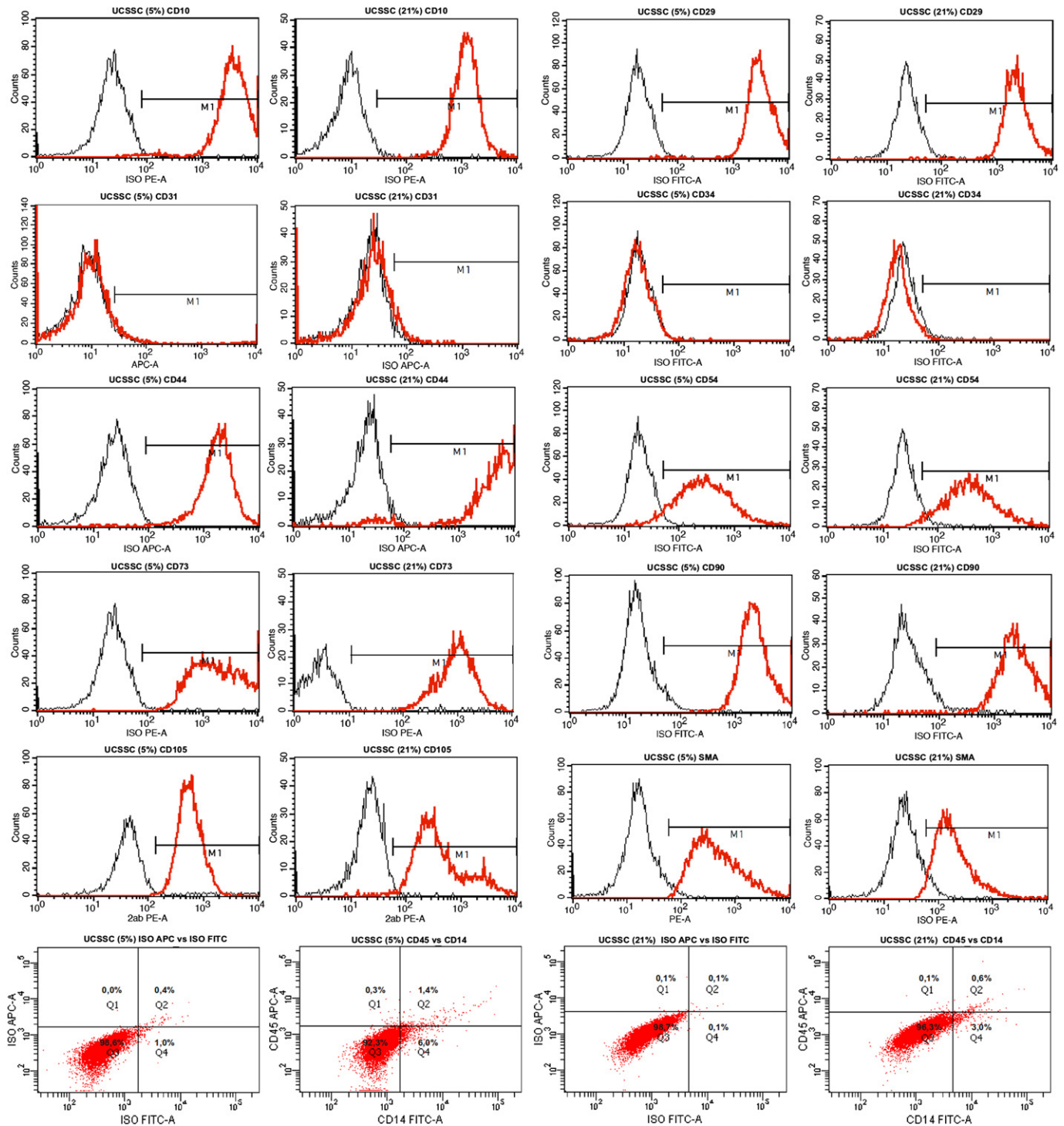


Fig. 4. Flow cytometry analysis of cluster of differentiation genes in cUCSSCs from the same donor cultured in a 21% or 5% O₂ atmosphere, at passage 3–5. A minimum of 10 000 events were recorded in all cases and analyzed using the Cell Quest Pro software (BD).

was also shown to be inducible in adipose tissue resident MSCs under specific culture conditions [34].

4.1. Growth characteristics of UCSSCs

Primary isolated MSCs are often inadequate for cell-based therapy and require further *in vitro* expansion. However, the expansion potentiality of a primary cultured cell line is limited by

cellular senescence, a form of irreversible cell cycle arrest regulated by intrinsic and extrinsic factors [35]. Intrinsic mechanisms include normal telomere erosion and are common to most somatic cells, resulting in growth arrest at the Hayflick limit. This mechanism, which is also called replicative senescence, prevents cell immortalization and suppresses oncogenesis. Besides intrinsic factors, senescence is modulated by stress-induced senescence, which is related to the cell culture conditions. The umbilical cord is a tissue

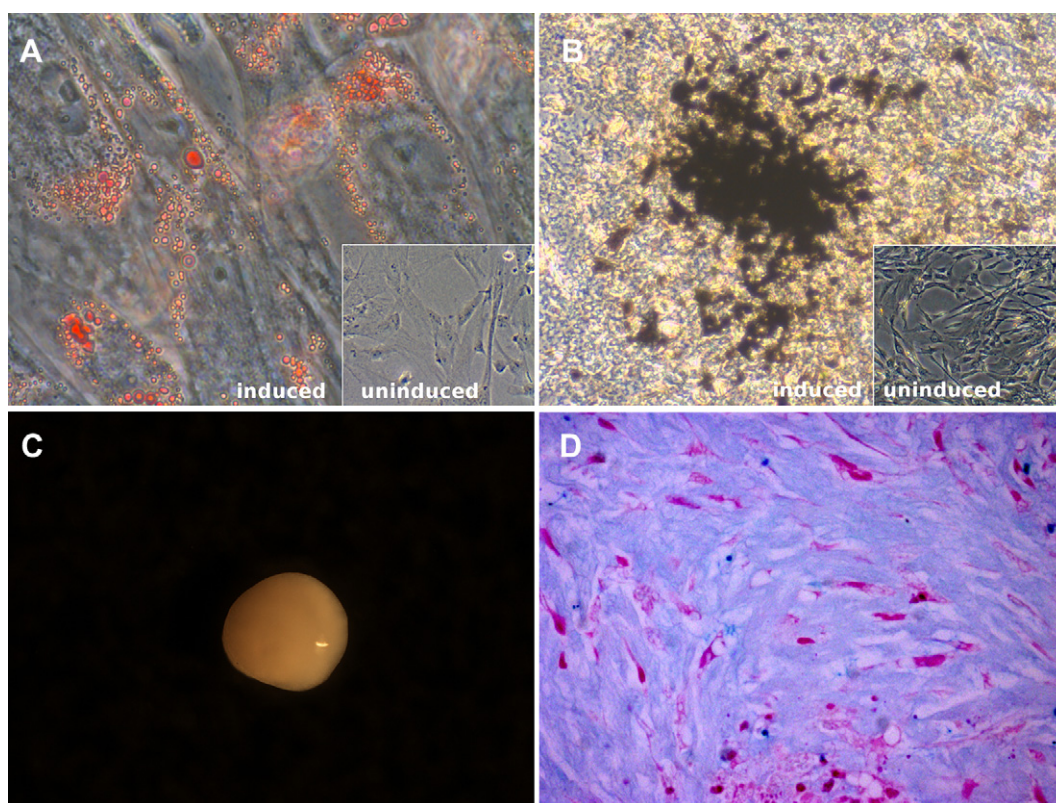


Fig. 5. *In vitro* differentiation of cUCSSCs. (A) Adipogenically induced cUCSSCs differentiate to adipocytes, as shown by oil-red staining of lipid-containing vacuoles, not observed in uninduced cultures. (400 \times magnification). (B) Osteogenically induced cUCSSCs differentiate to osteoblasts, as shown by VonKossa staining of CaPO₄ crystals, not observed in uninduced cultures. (40 \times magnification). (C) Chondrogenic differentiation of cUCSSCs. UCSSCs were trypsinized and cultured in micromass at the bottom of a 15 ml tube in chondrogenic medium for 28 days (see [Material and methods](#)). Differentiation to cartilage was shown by macroscopic examination of the cell aggregate, revealing the shiny surface of the cell mass (C), and by Alcian blue staining (D).

totally devoid of capillaries (see [Figs. 1 and 2A and B](#)). Cells from Wharton's jelly depend on the nutrient diffusing from the amniotic fluid across the amniotic membrane and, more importantly, from UC vessels in a centripetal gradient. Cells residing in the Wharton's jelly can be as far as several millimeters from the closest UC vein or artery. We therefore reasoned that isUCSSCs are probably exposed to a very low partial pressure of oxygen *in vivo* and hypothesized that a decreased O₂ level in our culture system could improve the growth characteristics of cUCSSCs. This hypothesis was supported by our findings: cUCSSCs grown in hypoxia (5% O₂) have an increased growth rate and CPD before reaching the Hayflick limit and demonstrate higher clonogenic potential in comparison to the same donor cUCSSCs cultured in normoxia. While this manuscript was under review, Lavrentieva et al. reported a similar observation and described a lower level of cUCSSC damage under hypoxia, which could account for a reduced production of reactive oxygen species leading to lesser cell damage, thereby offering a possible explanation for the increased life span and clonogenic potential of cUCSSCs grown under hypoxia [36].

We followed the growth of 12 cUCSSC lines from 12 independent umbilical cords in LSCM under 5% O₂ and 5% CO₂, finding a mean PDT of 35.8 ± 5.3 h and Hayflick limit at around 50 PD. The PDT ranged from 30.5 to 41.1 h, illustrating an intrinsic heterogeneity of cUCSSCs growth rate among UCs from different donors. Sarugaser et al. recently reported a mean PDT of 41 ± 7 h and 46 ± 9 h for UCSSCs cultured at 21% oxygen and without growth factors in 5% and 2% serum media, respectively [37]. Therefore, cUCSSCs have a shortened PDT when grown in low oxygen and in low serum in the presence of PDGF and EGF. This increased growth potential in hypoxia was also reported in human bone marrow

MSCs [38–40] and in MSCs from human placental decida basalis [41]. Under these conditions, extensively cultured UCSSC lines maintained a normal karyotype, as confirmed by a normal G-banding pattern, until late passages.

4.2. UCSSCs surface phenotype and their differentiation potentialities

cUCSSCs showed a very stable phenotype regardless of the oxygen concentration used for their culturing. In both conditions, at passage 3–5, 100% of the cells expressed CD10, CD29, CD44, CD73, CD90 and CD105 while they were negative for CD34 and CD45. A dim positivity was observed for CD14 and was detectable in both hypoxic and normoxic cell culture conditions. This faint CD14 fraction was negative for CD45, hence ruling out possible contamination by hematopoietic cells of our cUCSSC lines. Although there is no clear explanation of these findings, CD14 expression was recently shown to be inducible in human adipose tissue-derived MSCs by Freisinger et al., suggesting that a low level of expression may be constitutively expressed in some MSC populations [34], depending on their culture conditions.

It was previously reported that reduced oxygen tension extends the life span of human bone marrow MSCs but attenuates their differentiation capacity [38]. We recently showed that cUCSSCs could be efficiently differentiated to bone in 5% O₂ atmosphere when cultured on carbon cloths [42]. In the present study, cUCSSCs cultured in 5% oxygen retained their potential to differentiate to mesenchymal lineage, including adipogenesis, osteogenesis, and chondrogenesis. However, the adipogenic differentiation of cUCSSCs gave rise to atypical adipocytes containing multiloculated

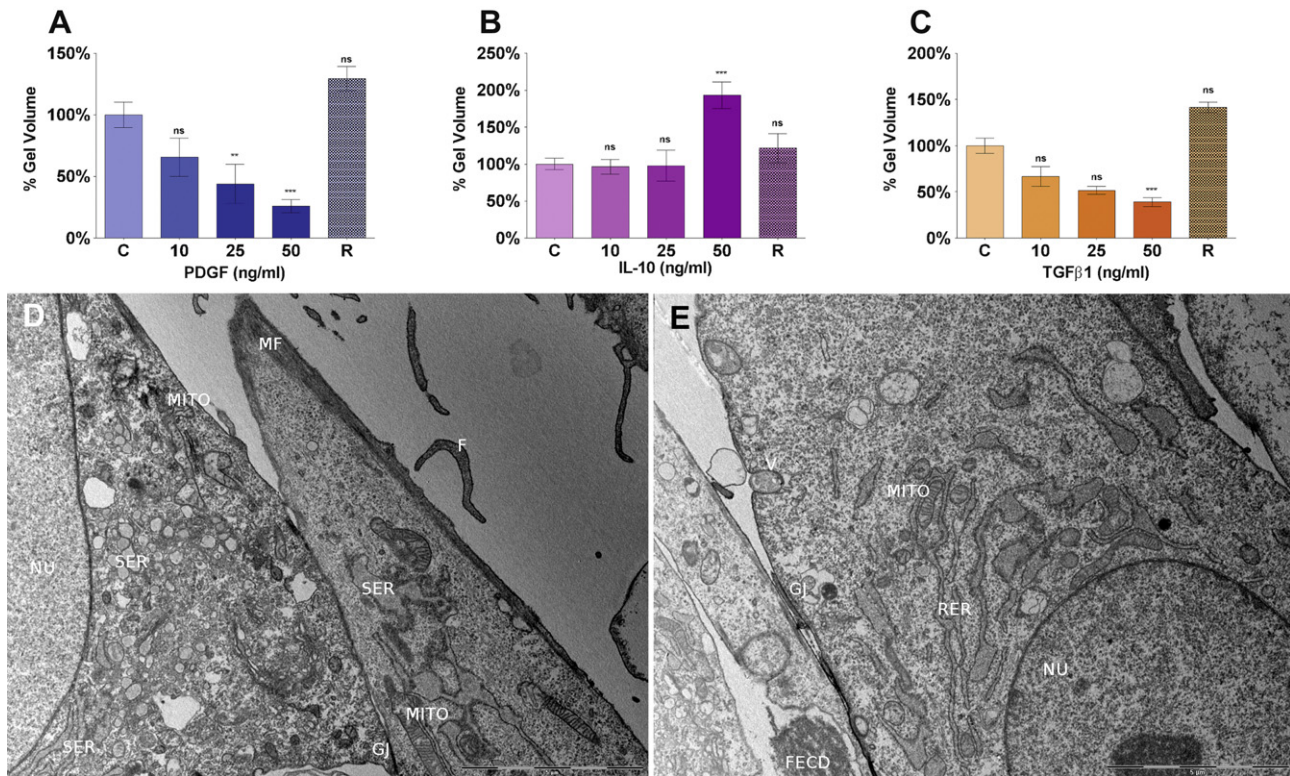


Fig. 6. (A) Effect of PDGF, (B) TGF- β 1 and (C) IL-10 on the volume of collagen gel matrixes containing cUCSSCs. The cUCSSCs were included in collagen gel matrixes and cultured for 48 h in the absence or presence of increasing amounts of cytokines. The reversibility of the cytokine-induced contraction/relaxation was tested by culturing back stimulated UCSSC/collagen drops in media without cytokines for 24 h (column R). The mean number of measurements ($n = 3$) taken at each concentration bar was used to estimate the gel volume. The data are presented as percentage \pm standard error with reference to the non-cytokine-treated control. One-way ANOVA was used to compare between reference and test conditions (ns: not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (D–E). Ultrastructural features of cUCSSCs in culture showing myofibroblastic cell-type characteristics. Spindle cell with nucleus (Nu), rough endoplasmic reticulum (RER) and smooth endoplasmic reticulum (SER) showing well-developed mitochondria (MITO), micropinocytotic vesicles (V), peripherally located myofilaments (MF), and membrane gap junctions (GJ). In the periphery of the cell, transversally cut filopodia (F) and fibrillar-like extracellular deposits (FECD) can be observed. Magnification: D. 4000 \times , E.6000 \times .

inclusions that stained specifically with Oil Red-O in agreement with previous reports [43]. The trilineage potentialities of the cUCSSCs, their lack of expression of CD34 and CD45 and very dim expression of CD14, and their elevated surface expression of CD90 and CD105 meet the minimum criteria defined by the International Society of Cellular Therapy to define an MSC [8].

4.3. UCSSCs are ultrastructurally and functionally related to myofibroblasts

Among the six different isoforms of actin described in mammals, SMA is the isoform typically expressed in SMCs [44]. SMA is also expressed in myofibroblasts [45], and the expression level is related to the degree of their differentiation [46]. Myofibroblasts play a major role in tissue remodeling through the synthesis and organization of the extracellular matrix and the production of force [46]. Extracellular matrix proteins of umbilical cord stroma are likely produced by the stromal cells of the umbilical cord [23], which also generate the cUCSSCs in our culture system. SMA expression was maintained in >90% of the cUCSSCs until passage 5 and then decreased progressively with subculturing, explaining the contrasting results obtained at passage 3–5 in Fig. 4C ($92.69 \pm 2.33\%$) and at passage 9 in Fig. 2 ($33 \pm 6.6\%$). We challenged cUCSSCs for contractile activity at passage 3 by using TGF- β 1 and PDGF, two cytokines known to induce myofibroblast contractility [26]. Both TGF- β 1 and PDGF induced cell contractility in cUCSSCs in a dose-dependent manner, as previously observed in myofibroblasts [47]. In contrast, IL-10 treatment increased the collagen gel volume due to a relaxation of the cells. After the 48-h cytokine stimulation

period, collagen embedded cell cultures were continued for an additional 24 h in the absence of stimulation to test the reversibility of the cytokine-induced effect. Our results demonstrate the reversibility of PDGF- and TGF- β 1-induced cell contraction and IL-10-induced cell relaxation, demonstrating the involvement of a physiological rather than toxicological mechanism. Hence, contractile UCSSCs are functionally related to myofibroblasts. In addition, their ultrastructural features are reminiscent of myofibroblastic cells, presenting well-developed rough endoplasmic reticulum, cytoplasmic bundles of microfilaments, pinocytotic vesicles beneath plasma membranes, basement membrane-like material, and intercellular connections of gap-junction type. Cultured UCSSCs share these ultrastructural characteristics with their counterpart cells observed *in situ* in Wharton jelly by transmission electron microscopy [48]. Hence, UCSSCs display a specific function related to that of a differentiated myofibroblast. This function probably contributes to the regulation of blood flow through the umbilical cord, counterbalancing pressure in the uterus from the environment. Therefore, these cells may act as a cushion, using their contractility to prevent the disruption of blood flow at the time when they can generate MSCs upon *in vitro* culturing.

Acknowledgments

The authors acknowledge the contribution of Mohamed Tassi, technician at the Microscopy Unit of the University of Granada Biomedical Research Center and are grateful to the parents who consented to the use of the umbilical cords in this study. This research project was supported by a grant from the Junta de

Andalucía (P06-CTS-1385) and partially supported by research group grant CTS-138 (Junta de Andalucía, Spain).

References

- [1] Ye ZQ, Burkholder JK, Qiu P, Schultz JC, Shahidi NT, Yang NS. Establishment of an adherent cell feeder layer from human umbilical cord blood for support of long-term hematopoietic progenitor cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(25):12140–4.
- [2] Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004;22(4):625–34.
- [3] Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003;21(1):105–10.
- [4] Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 2005;23(2):220–9.
- [5] Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 2007;25(6):1384–92.
- [6] Karahuseynoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells* 2007;25(2):319–31.
- [7] Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, Calore C, Turetta M, Bellini S, et al. CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *Int J Mol Med* 2006;18(6):1089–96.
- [8] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315–7.
- [9] Wang L, Detamore MS. Insulin-like growth factor-I improves chondrogenesis of predifferentiated human umbilical cord mesenchymal stromal cells. *J Orthop Res*; 2009.
- [10] Pereira WC, Khushnooma I, Madkaikar M, Ghosh K. Reproducible methodology for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord and its potential for cardiomyocyte generation. *J Tissue Eng Regen Med* 2008;2(7):394–9.
- [11] Campard D, Lysy PA, Najimi M, Sokal EM. Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. *Gastroenterology* 2008;134(3):833–48.
- [12] Zhao Q, Ren H, Li X, Chen Z, Zhang X, Gong W, et al. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stromal cells into low immunogenic hepatocyte-like cells. *Cytotherapy*; 2009:1–13.
- [13] Wu KH, Zhou B, Lu SH, Feng B, Yang SG, Du WT, et al. In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. *J Cell Biochem* 2007;100(3):608–16.
- [14] Ennis J, Gotherstrom C, Le Blanc K, Davies JE. In vitro immunologic properties of human umbilical cord perivascular cells. *Cytotherapy* 2008;10(2):174–81.
- [15] Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, VanderWerff I, et al. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells* 2008;26(11):2865–74.
- [16] Ennis J, Sarugaser R, Gomez A, Baksh D, Davies JE. Isolation, characterization, and differentiation of human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs). *Methods Cell Biol* 2008;86:121–36.
- [17] Tzankov A, Zlobec I, Went P, Robl H, Hoeller S, Dirnhofer S. Prognostic immunophenotypic biomarker studies in diffuse large B cell lymphoma with special emphasis on rational determination of cut-off scores. *Leuk Lymphoma* 2010;51(2):199–212.
- [18] Battula VL, Bareiss PM, Tremel S, Conrad S, Albert I, Hojak S, et al. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation* 2007;75(4):279–91.
- [21] Nishihara Y, Aishima S, Hayashi A, Iguchi T, Fujita N, Taketomi A, et al. CD10+ fibroblasts are more involved in the progression of hilar/extrahepatic cholangiocarcinoma than of peripheral intrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology* 2009;55(4):423–31.
- [22] Kobayashi K, Kubota T, Aso T. Study on myofibroblast differentiation in the stromal cells of Wharton's jelly: expression and localization of alpha-smooth muscle actin. *Early Hum Dev* 1998;51(3):223–33.
- [23] Nanaev AK, Kohonen G, Milovanov AP, Domogatsky SP, Kaufmann P. Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta* 1997;18(1):53–64.
- [24] Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001;98(9):2615–25.
- [25] De Coppi P, Bartsch Jr G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 2007;25(1):100–6.
- [26] Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(5):349–63.
- [27] Kimatrai M, Oliver C, Abadia-Molina AC, Garcia-Pacheco JM, Olivares EG. Contractile activity of human decidual stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(2):844–9.
- [28] 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):308–12.
- [29] Jo CH, Kim OS, Park EY, Kim BJ, Lee JH, Kang SB, et al. Fetal mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord sustain primitive characteristics during extensive expansion. *Cell Tissue Res* 2008;334(3):423–33.
- [30] Friedman R, Betancur M, Boissel L, Tuncer H, Cetrulo C, Klingemann H. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13(12):1477–86.
- [31] Halayko AJ, Salari H, Ma X, Stephens NL. Markers of airway smooth muscle cell phenotype. *Am J Physiol* 1996;270(6 Pt 1):L1040–51.
- [32] Remy-Martin JP, Marandin A, Challier B, Bernard G, Deschaseaux M, Herve P, et al. Vascular smooth muscle differentiation of murine stroma: a sequential model. *Exp Hematol* 1999;27(12):1782–95.
- [33] Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Weber A, Rehli M, Peuker A, Muller A, et al. Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *Scand J Immunol* 2008;67(5):453–63.
- [34] Freisinger E, Cramer C, Xia X, Murthy SN, Slakey DP, Chiu E, et al. Characterization of hematopoietic potential of mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*; 2010.
- [35] Lloyd AC. Limits to lifespan. *Nat Cell Biol* 2002;4(2):E25–7.
- [36] Lavrentieva A, Majore I, Kasper C, Hass R. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun Signal* 2010;8:18.
- [37] Sarugaser R, Hanoun L, Keating A, Stanford WL, Davies JE. Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. *PLoS One* 2009;4(8):e6498.
- [38] Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitingner S, Kloss F, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell* 2007;6(6):745–57.
- [39] Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;358(3):948–53.
- [40] Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, da Silva CL, Cabral JM. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol*; 2009.
- [41] Huang YC, Yang ZM, Jiang NG, Chen XH, Li XQ, Tan MY, et al. Characterization of MSCs from human placental decidua basalis in hypoxia and serum deprivation. *Cell Biol Int*; 2009.
- [42] Peñalver JL, L-F J-L, VdA Fariás, López-Ramón MV, Tassi M, Oliver FJ, et al. Activated carbon cloth as support for mesenchymal stem cell growth and differentiation to osteocytes. *Carbon* 2009;47(15):3574–7.
- [43] Karahuseynoglu S, Kocaece C, Balci D, Erdemli E, Can A. Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-derived stem cells. *Stem Cells* 2008;26(3):682–91.
- [44] Chaponnier C, Gabbiani G. Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J Pathol* 2004;204(4):386–95.
- [45] Majino G, Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR. Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science* 1971;173(996):548–50.
- [46] Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 2007;127(3):526–37.
- [47] Drobic V, Cunningham RH, Bedosky KM, Raizman JE, Elimban VV, Rattan SG, et al. Differential and combined effects of cardiotrophin-1 and TGF-beta1 on cardiac myofibroblast proliferation and contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293(2):H1053–64.
- [48] Takechi K, Kuwabara Y, Mizuno M. Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells. *Placenta* 1993;14(2):235–45.

Reproductive Sciences

<http://rsx.sagepub.com/>

Expression of the Vasoactive Proteins AT1, AT2, and ANP by Pregnancy-Induced Mouse Uterine Natural Killer Cells

Kota Hatta, Alexandra L. Carter, Zhilin Chen, Ester Leno-Durán, Carmen Ruiz-Ruiz, Enrique G. Olivares, M. Yat Tse, Stephen C. Pang and B. Anne Croy

Reproductive Sciences 2011 18: 383 originally published online 19 October 2010

DOI: 10.1177/1933719110385136

The online version of this article can be found at:

<http://rsx.sagepub.com/content/18/4/383>

Published by:



<http://www.sagepublications.com>

On behalf of:



Society for Gynecologic Investigation

Additional services and information for *Reproductive Sciences* can be found at:


Email Alerts: <http://rsx.sagepub.com/cgi/alerts>

Subscriptions: <http://rsx.sagepub.com/subscriptions>

Reprints: <http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav>

Permissions: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

Expression of the Vasoactive Proteins AT1, AT2, and ANP by Pregnancy-Induced Mouse Uterine Natural Killer Cells

Reproductive Sciences
18(4) 383-390
© The Author(s) 2011
Reprints and permission:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1933719110385136
http://rs.sagepub.com


Kota Hatta, MSc^{1,2}, Alexandra L. Carter, BSc³,
Zhilin Chen, MD, PhD³, Ester Leno-Durán, MSc^{3,4},
Carmen Ruiz-Ruiz, PhD⁴, Enrique G. Olivares, PhD^{4,5},
M. Yat Tse, PhD³, Stephen C. Pang, PhD³, and
B. Anne Croy, DVM, PhD³

Abstract

Angiotensin II receptor type 1 (AT1) activation leads to vasoconstriction and type 2 receptor (AT2) leads to vasodilation. Atrial natriuretic peptide (ANP) antagonizes the effects of AT1. In human and murine pregnancies, uterine natural killer (uNK) cells closely associate with decidual blood vessels. Protein localization of AT1, AT2, and ANP to mouse uNK cells was examined between gestation days (gds) 6 and 12, the interval of uNK cell expansion. Percentages of uNK cells expressing AT1 or AT2 changed between gd6 and gd10. Atrial natriuretic peptide did not localize to uNK cells at gd6 or 8, but did colocalize to uNK cells at gd10 and 12, times immediately after spiral arterial modification. This is the first report of AT1, AT2, and ANP expression in uterine immune cells. Expression of these molecules suggests that uNK cells have the potential to contribute to the changes in blood pressure that occur between days 5 and 12 of pregnancy in mice.

Keywords

angiotensin II receptors, atrial natriuretic peptide, mice, pregnancy, uterine natural killer cell

Introduction

The renin–angiotensin system (RAS) is a hormone system that acts as one of the master regulators of blood pressure and water balance. When blood pressure is low, the kidney responds to decreased perfusion and secretes renin, which converts the zymogen angiotensinogen (synthesized mainly by the liver) to angiotensin I (AngI). Angiotensin I is further cleaved to angiotensin II (AngII) by angiotensin-converting enzyme (ACE), an enzyme secreted primarily by renal and pulmonary endothelial cells.¹⁻³ Angiotensin II increases blood pressure by acting as a vasoconstrictor of arterioles; acting on intraglomerular mesangial cells and associated blood vessels causing them to contract; acting on zona glomerulosa in the adrenal cortex to stimulate the release of aldosterone; and by stimulating the pituitary to secrete antidiuretic hormone (ADH, also known as vasopressin) which leads to increased water absorption.^{1,3,4} These effects are mediated by signal transduction of the G-protein-coupled receptor (GPCR) angiotensin II receptor type 1 (AT1).^{1,5-8} When blood pressure is high, kidney renin secretion drops. In addition to this feedback mechanism, atrial natriuretic peptide (ANP), an inhibitor of renin and aldosterone secretion,^{9,10} is produced, primarily by atrial cardiac myocytes in response to increased afterload.^{11,12} Atrial natriuretic

peptide also dilates the afferent glomerular arteriole, constricts the efferent glomerular arteriole, relaxes mesangial and smooth muscle cells, and has an overall effect of water excretion and blood pressure reduction to counteract AngII.^{9,10,13} Additionally, AngII-mediated increases in blood pressure can be antagonized by the activation of angiotensin II receptor type 2 (AT2). Angiotensin II receptor type 2, like AT1, shares AngII as its ligand. However, AT2 signaling leads to vasodilation.^{5,7,8,14} In

¹Division of Cardiovascular Surgery and Department of Surgery, Toronto General Research Institute and University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

²Departments of Microbiology and Immunology, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada

³Anatomy and Cell Biology, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada

⁴Unidad de Inmunología, IBIMER, Universidad de Granada, Centro de Investigación Biomédica, Granada, Spain

⁵Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología, Universidad de Granada, Centro de Investigación Biomédica, Granada, Spain

Corresponding Author:

Kota Hatta, MaRS Centre, Toronto Medical Discovery Tower 3-703F, 101 College Street, Toronto, Ontario, M5G 1L7, Canada
Email: khatta@uhnres.utoronto.ca

this way, the physiology concerning blood pressure regulation is governed by several key molecules.

Although RAS has been associated with renal and cardiovascular physiology, recent work has shown that other biological systems such as the nervous system¹⁵⁻¹⁷ and immune system also produce or respond to RAS-related molecules. For example, human peripheral blood T cells and natural killer (NK) cells respond to AngII via AT1 and AT2.¹⁸⁻²¹ In addition, ANP has been reported to be expressed by ~5% of Thy1.2⁺ (CD90.2) rat thymocytes.²² Angiotensin II-mediated effects on immune cells have been described in the contexts of cell proliferation, differentiation, and activation.²³ The concept of immune cells contributing to blood pressure regulation has been suggested; however, there is limited primary literature on this emerging theme. To date, there have been no reports on the expression of these vasoregulatory receptors by uterine lymphocytes.

Lymphocytes found in the pregnant uterus are a unique population of immune cells. In early gestation, this population lacks B cells, is composed of a small number of T cells, and is dominated by NK cells. Uterine lymphocytes increase in number with decidualization. Therefore, in humans, they are most abundant in the luteal phase of the menstrual cycle and first trimester of pregnancy, whereas in mice they appear postimplantation.^{24,25} Although NK cells in human blood make up 8% to 12% of lymphocytes, uterine natural killer (uNK) cells in early decidua represent 70% to 80% of lymphocytes.²⁴ Human decidual histopathology and cell explant cultures,²³ mouse in vivo adoptive cell transplant models,^{26,27} and molecular studies in other species²⁸ have characterized uNK cells as highly proangiogenic cells functionally different from peripheral blood NK cells. In humans and mice, uNK cells physically associate with and surround decidual spiral arteries and may be exclusively responsible for the initiation events that lead to physiological modification of these vessels during pregnancy.²⁹⁻³¹ Mouse models show uNK cell-derived interferon gamma (Ifng) is essential for spiral arteries to lose their smooth muscle coat and dilate.^{29,30,32} This transformation changes the vessels from elastic tubes with narrow lumens into large, dilated structures delivering an increased volume of blood to the placenta at low pressure.³² Thus, uNK cells contribute to angiogenesis and establishing of the proper vascular architecture in the pregnant uterus. Spiral artery modification is believed to be critical for proper placental perfusion, as lack of spiral artery modification in human pregnancy is associated with the gestational complications of fetal growth retardation, preeclampsia, and, in some cases, recurrent spontaneous abortions.³³

Because uNK cells promote implantation site angiogenesis, vascular remodeling, and associate closely with decidual arteries, we hypothesized that uNK cells express vasoregulatory proteins. Since the final effector pathway of RAS is via receptor engagement, the current study examined whether uNK cells express AT1 and AT2. Because ANP is an antagonist of the effects of AngII-mediated signaling, we also asked whether ANP colocalized to uNK cells.

Materials and Methods

Mice

Use of animals was approved by the Queen's University Animal Care Committee. C57BL6/J mice aged 6 to 8 weeks were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) and mated. Day of vaginal plug detection was designated gestation day (gd) 0. Implantation sites, spleens and hearts were collected from female virgin (n = 3), gd6 (n = 3), gd8 (n = 3), gd10 (n = 6), and gd12 (n = 3) mice.

Laser Capture Microdissection

Gestation day 10 (n = 3) mice were used. Implantation sites were embedded in Shandon Cryomatrix (Thermo Fisher; Mississauga, Ontario, Canada) and snap frozen in liquid nitrogen cooled isopentane. Sections of 7 μ m were cut using a cryostat (Leica CM1850, Leica Microsystems; Richmond Hill, Ontario, Canada) and melted onto charged glass slides. Slides were treated with 70% ethanol for 1-minute, nuclease-free water for 30 seconds and blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) for 5 minutes. Sections were subsequently incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) lectin (1:100, Sigma; Oakville, Ontario, Canada), a marker of uNK cells,³⁴ for 5 minutes, washed 3 times with nuclease-free tris-buffered saline (TBS), rapidly dehydrated with graded series of ethanol (2 changes each 1 minute of 70%, 95%, and 100%) and cleared with xylene for 5 minutes. Slides were allowed to air-dry and 1000 uNK cells were isolated using a CellPix II fitted with CapSure HS caps (Molecular Devices; Toronto, Ontario, Canada). Ribonucleic acid (RNA) was isolated using a PicoPure isolation kit (Molecular Devices) following manufacturer's instructions.

Polymerase Chain Reaction

Ribonucleic acid isolated from laser capture microdissection (LCM) purified uNK cells was reverse transcribed, ligated, and amplified using a QuantiTect Whole Transcriptome Kit (Qiagen; Mississauga, Ontario, Canada) and the resulting complementary DNA (cDNA) was used as template for polymerase chain reaction (PCR). Primers targeting *ANP* (202bp; forward 5'TGAAAAGCAAAGCTGAGGGCT3', reverse 5'ACACACCA CAAGGGCTTAGG3') were used. Polymerase chain reaction was performed using a Taq DNA polymerase PCR kit (Qiagen) under the following conditions: 94°C for 3 minutes (1 cycle); 94°C for 30 seconds; 55°C for 30 seconds; 72°C for 30 seconds (35 cycles); and 72°C for 10 minutes (1 cycle). Polymerase chain reaction products were separated on a 1.0% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

Preparation of ANP Antiserum

The ANP antiserum was produced by Affinity Biologicals Inc (Hamilton, Ontario), using the following method. Synthetic rat

ANP₍₉₉₋₁₂₈₎ (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, California) was conjugated to bovine thyroglobulin using carbodiimide (Sigma). The ANP conjugate was emulsified with complete Freund adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, Michigan). New Zealand white rabbits were immunized by injecting the emulsion intradermally. Animals were boosted with the conjugate emulsified with Freund incomplete adjuvant at 4-week intervals and bled 10 to 14 days after each booster injection by ear vein puncture. Serum was aliquoted and stored at -70°C . This antiserum had an ANP titer of 1:5000 as determined by radioimmunoassay.

Immunohistochemistry

Gestation days 6, 8, 10, and 12 ($n = 3$) mouse implantation sites, spleens and hearts, as well as spleens and hearts from virgin mice ($n = 3$) were dissected, fixed in 4% paraformaldehyde overnight at 4°C , and processed into paraffin blocks (ATP Tissue processor, Triangle Biomedical Sciences, Inc; Durham, North Carolina). Tissue was cut at $6\ \mu\text{m}$ and used for immunohistochemistry. Briefly, slides were de-waxed and rehydrated before being blocked with 1% BSA for 30 minutes. Tissue sections were incubated with primary antibody overnight at 4°C . Following incubation, slides were washed with TBS, incubated with fluorescently labeled secondary antibody (or fluorescent lectin or avidin) for 2 hours at room temperature, washed, mounted with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-supplemented mounting media (ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI, Invitrogen; Burlington, Ontario, Canada), and imaged using a Zeiss AxioCam microscope system with Axiovision software (Zeiss; Toronto, Ontario, Canada). After preliminary titration studies, the following primary antibodies were used: rabbit-anti-mouse AT1 (1:200, Abcam; Cambridge, Massachusetts); rabbit-anti-mouse AT2 (1:200, Abcam); rabbit-anti-mouse ANP (1:200, Affinity Biologicals Inc); and biotinylated rat-anti-mouse NK group 2D (NKG2D; 1:25, R&D Systems; Minneapolis, Minnesota). In addition, FITC-DBA lectin (1:500) was used. Secondary antibody used was Alexa594-goat-anti-rabbit antibody (1:200, Invitrogen). Alexa488 conjugated ExtrAvidin (1:200, Invitrogen) was also used. Negative controls were performed using normal goat serum when appropriate (Invitrogen). Implantation sites were stained with anti-AT1, anti-AT2, or anti-ANP, with Alexa594 secondary antibody, FITC-DBA lectin, and DAPI. Spleens were stained with anti-AT1, anti-AT2, or anti-ANP with Alexa594 secondary antibody, anti-NKG2D with Alexa488-ExtrAvidin and DAPI. Hearts were stained with anti-ANP with Alexa594 secondary antibody and DAPI.

Cell Counting and Scoring

Gestation days 6 and 10 implantation sites were scored for the percentage of DBA lectin and DAPI reactive cells that also expressed AT1 or AT2. In all, 25 random high-power fields of view per pregnancy in the decidua basalis or mesometrial lymphoid aggregate of pregnancy (MLAp) were photographed

using a $\times 40$ magnification objective lens and the cells were enumerated based on the criteria discussed in the preceding section. Pregnancies ($N = 3$) were examined per gd and an average was determined. Using Microsoft Excel software (Version7, Microsoft; Toronto, Ontario, Canada), 2-way analysis of variance (ANOVA) was followed by Tukey post hoc test, with $P < .05$ considered significant.

The reactivity of each primary antibody with NKG2D or DBA lectin reactive NK cells was scored “-” if the antibody in question did not colocalize with the NK cell marker and “+” if there was colocalization.

Results

Uterine NK cells expressed AT1 and AT2 (Figure 1A and B). Expression of these receptors by uNK cells was observed at all time points examined. However, uNK cell expression was heterogeneous; the percentage of AT1 or AT2 expressing uNK cells appeared proportional to the numerical population of uNK cells at each time point. Therefore, the percentages of AT1 or AT2 expressing uNK cells at gd6 and 10, time points when uNK cells are rare and most abundant,^{34,35} were calculated. The percentages of AT1 or AT2 expressing uNK cells changed between gd6 and 10 ($P < .05$; Figure 1C). The expression of AT1 or AT2 by uNK cells could not be related to cell size or cytoplasmic granularity (markers that increase with uNK cell maturation) or to the location of uNK cells in the decidua basalis or myometrial wall. Although we were unable to determine whether dual expression of AT1 and AT2 occurred in some uNK cells, it is clear (from the gd10 histograms) that AT2 can be expressed in the absence of AT1.

To determine whether uNK cells expressed ANP transcripts, gd10 was chosen for initial study because the abundance of uNK cells at this time point allowed a sufficient number of uNK cells of 100% purity to be isolated by LCM. Uterine NK cells were identified by FITC-DBA lectin staining and isolated by LCM (Figure 2A). Ribonucleic acid was isolated and real-time PCR showed that gd10 uNK cells express ANP (Figure 2B). Equivalent PCR product could not be amplified from negative control of RNA sample without reverse transcription (not shown). Using tri-color immunohistochemistry, ANP protein localization to uNK cells was confirmed. Mouse atrium was used as a positive control for ANP staining (Figure 2C). Atrial natriuretic peptide immunoreactivity in gd10 implantation sites colocalized with uNK cells (Figure 2D). Atrial natriuretic peptide staining was also observed on other cell types such as trophoblast. To determine whether ANP protein localization was stable in uNK cells over pregnancy, immunohistochemistry was repeated using gd6, 8, and 12 implantation site sections. Gestation days 6 and 8 uNK cells had no detectable ANP protein expression, whereas gd12 uNK cells colocalized with ANP immunoreactivity. Therefore, ANP protein cannot be detected in uNK cells until mid pregnancy (Figure 3). Atrial natriuretic peptide colocalization to uNK cells was binary; no uNK cells showed detectable ANP at gd6 and 8, whereas ANP was

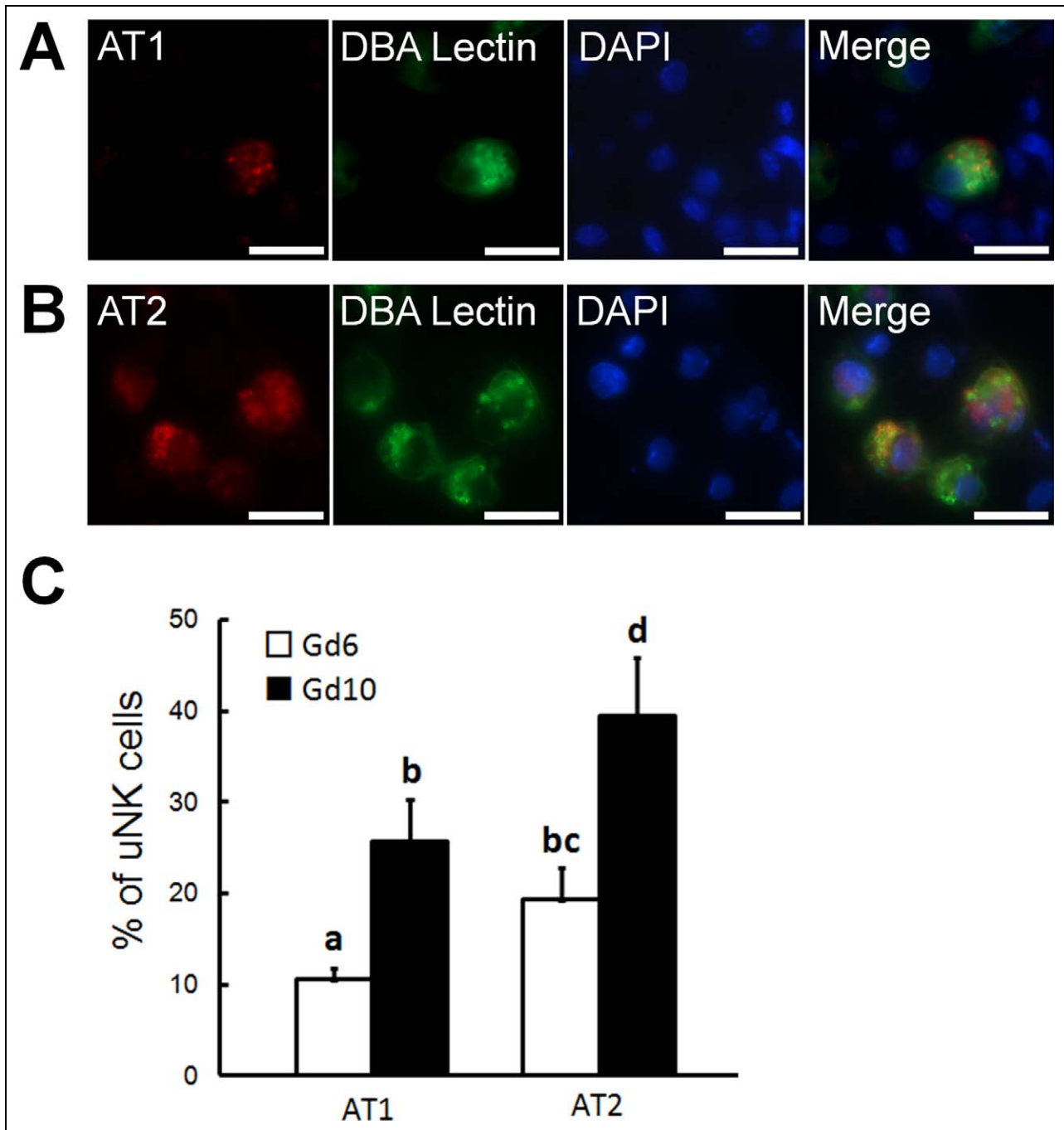


Figure 1. Uterine NK cells express angiotensin II receptors AT1 and AT2. A, AT1 was colocalized to uNK cells. B, Likewise, uNK cells also expressed AT2. AT1 and AT2 expressing uNK cells were detected at all of the gestational time points examined. Shown here are gd10 uNK cells. Scale bar = 20 μ m. C, Uterine NK cells are first found in the uterus at gd6 in small numbers. They become more numerically abundant at gd10; in this transition the percentage of AT1 or AT2 expressing uNK cells changes. Bars with different letters are significantly different ($P < .05$ by ANOVA followed by Tukey post hoc test). NK indicates natural killer; uNK, uterine natural killer; gd, gestation day; ANOVA, analysis of variance; AT1, angiotensin II receptor type 1; AT2, angiotensin II receptor type 2.

colocalized to all uNK cells at gd10 and 12, regardless of the cell size, granularity, or location.

To determine whether AT1, AT2, and ANP could be detected in peripheral NK cells, tri-color immunohistochemistry was performed on virgin or pregnant spleen tissue using

NKG2D to identify splenic NK cells since these cells lack the dual cytoplasmic granule and cell membrane DBA-lectin staining pattern seen in uNK cells.³⁶ The majority of NKG2D-positive splenic NK stained positively for AT1, AT2, and ANP (Figure 4). Table 1 summarizes these results.

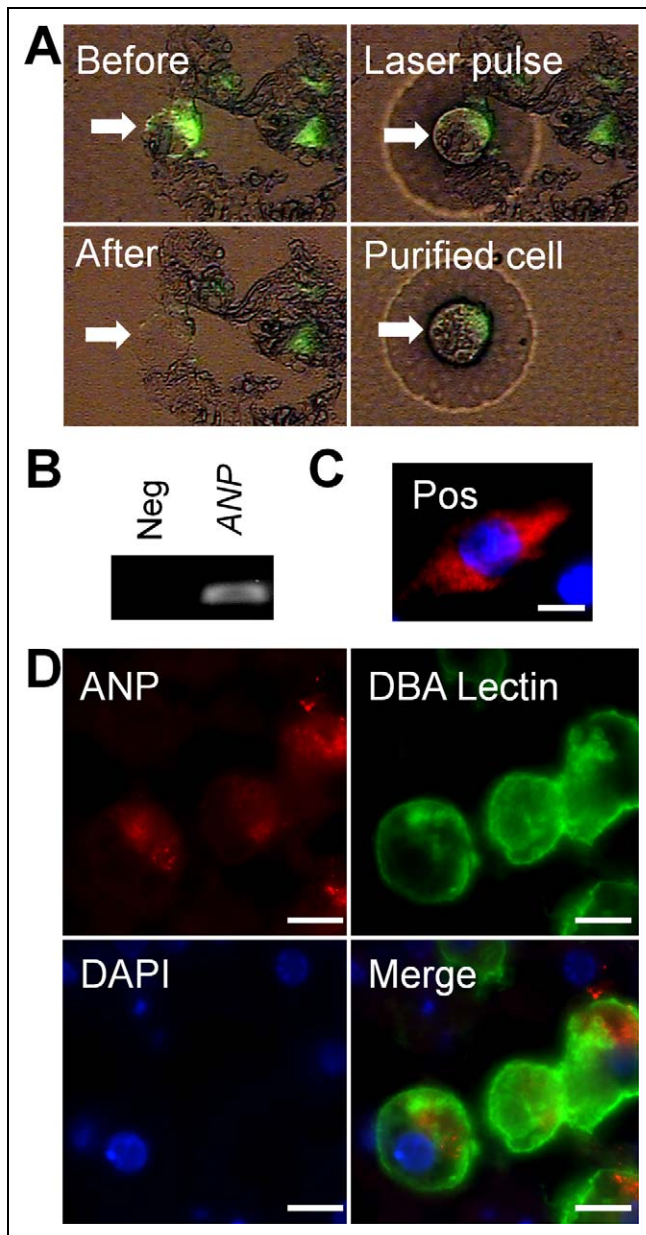


Figure 2. Uterine NK cells express ANP transcripts and are immunoreactive for ANP protein. A, Frozen sections of gd10 implantation sites were stained with FITC-DBA lectin (green) to detect uNK cells for LCM isolation. B, Uterine NK cells purified by LCM express ANP transcript. C, Positive control atrium stained cardiac myocytes with ANP (red). Scale bar = 20 μm . D, Uterine NK cells stain positively for ANP protein. Scale bar = 10 μm . AT1 indicates angiotensin II receptor type 1; AT2, angiotensin II receptor type 2; ANP, atrial natriuretic peptide; gd, gestation day; uNK, uterine natural killer; LCM, laser capture microdissection; FITC-DBA, fluorescein isothiocyanate-conjugated Dolichos biflorus agglutinin.

Discussion

The principle findings of this study are (1) uterine immune cells, specifically uNK cells, express vasoactive proteins AT1, AT2, and ANP, which could enable them to contribute to blood pressure regulation during pregnancy; (2) the

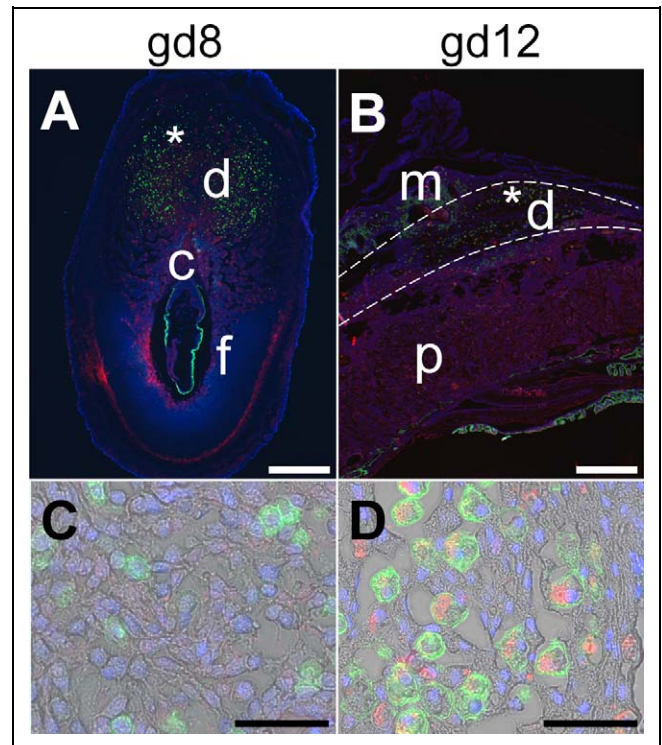


Figure 3. Atrial natriuretic peptide (ANP) colocalization to uNK cells is restricted to advanced stages of pregnancy. Gestation day 8 (A, C) and 12 (B, D) implantation sites were stained for ANP (red), uNK cells (green), and DNA (blue). Uterine NK cells present before the formation of a perfused placenta are not detectable for ANP (A, C). Uterine NK cells after the formation of the placenta are detectable for ANP (B, D). c indicates ectoplacental cone; d, decidua; f, fetus; m, mesometrial lymphoid aggregate of pregnancy (MLAp); p, placenta. Asterisks in A and B pinpoint magnified areas C and D, respectively. Scale bar A, B = 500 μm ; C, D = 50 μm .

colocalization of these vasoactive proteins to uNK cells is dynamic over the course of pregnancy; and (3) these vasoactive molecules can also be found in peripheral NK cells.

This is the first report to show that uterine lymphocytes express AT1 and AT2. This observation is consistent with reports by others that human blood lymphocytes express these receptors.¹⁸⁻²¹ The changes in frequency of these receptors at gd10 compared to gd6 may mean that uNK cells make greater contributions to vasoregulation at mid rather than at early pregnancy. Of interest, this interval of time is reported as an interval of declining systemic blood pressure in pregnant mice. Mean arterial pressures begin to drop at gd5 and this trend is reversed at gd10 when mean arterial pressure begins to rise toward its pre-pregnancy baseline in mice.³⁷⁻⁴⁰ Blood pressure in *AT1*^{-/-} knock-out mice during pregnancy is dramatically lower than in wild-type pregnancies, with lowest blood pressure recordings occurring at mid pregnancy (approximately gd10 of the mouse 19-20 day pregnancy).⁴¹ The period of this drop coincides with increasing frequency of AT1 protein colocalization to uNK cells. Determining whether uNK cell expression of AT1 influences gestational blood pressure patterns would require further experiments,

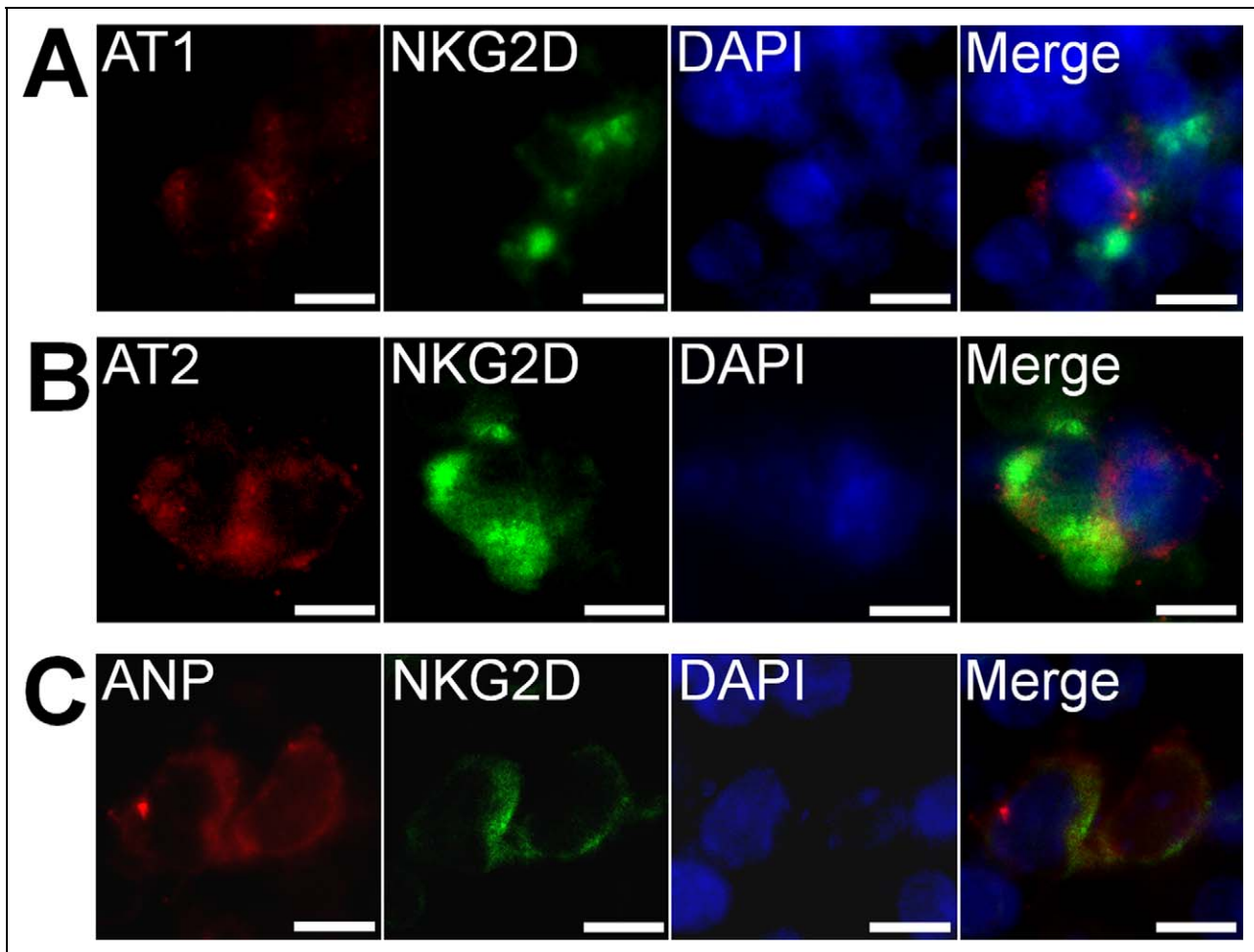


Figure 4. Splenic NK cells are immunoreactive for AT1, AT2, and ANP. Natural killer (NK) cells were stained for NKG2D (green) and AT1, AT2, or ANP (red) colocalization. Nuclei were stained using DAPI (blue). Results for splenic NK cells are representative of virgin and pregnant spleens. Scale bar = 5 µm. DAPI indicates 4',6-diamidino-2-phenylindole; AT1, angiotensin II receptor type 1; AT2, angiotensin II receptor type 2; ANP, atrial natriuretic peptide.

such as grafting bone marrow from *ATI*^{-/-} knock-out mice to recipient syngeneic NK-cell-deficient females and monitoring recipients' arterial pressure over pregnancy in comparison to control pregnancies in normal syngeneic mice or in NK-cell-deficient mice reconstituted with wild-type bone marrow.

Angiotensin II receptor type 2, in addition to being vasodilatory, is known to inhibit cell proliferation and induce apoptosis.^{42,43} Given our observation of a change in the percentage of uNK cells expressing AT2 protein at gd10 when uNK cells numerically reach peak in numbers, it can be postulated that AT2 expression may lead to uNK cell apoptosis. Apoptosis begins in some uNK cells at gd8 and becomes widespread at gd11.^{34,35} This could be addressed by study of uNK cells in implantation sites of *AT2*^{-/-} mice. Further studies will be required to determine the functional outcomes from uNK cell expression of these receptors in normal pregnancies.

Others have reported that agonist antibodies to AT1 are seen in hypertensive pregnancies complicated by preeclampsia⁴⁴ and have modeled this pathology in rodent gestations.⁴⁵ Although the origins of the antigens driving these antibodies remain unclear,

Table 1. Splenic and Uterine NK Cell Immunoreactivity for Vasoregulatory Proteins^a

Marker	Splenic NK	Uterine NK			
		gd6	gd8	gd10	gd12
AT1	+	+	+	+	+
AT2	+	+	+	+	+
ANP	+	-	-	+	+

Abbreviations: AT1, angiotensin II receptor type 1; AT2, angiotensin II receptor type 2; ANP, atrial natriuretic peptide; gd, gestation day; NK, natural killer.
^a Cell colocalizes with marker (+); does not (-).

our findings indicate that lymphocyte activation both systemically and in the implantation site will be a component of any pathology induced by AT1 agonist antibodies. Our data also predict that the “unconventional” tissue-resident lymphocytes of the kidney, a population enriched over blood in NK and NKT cells,⁴⁶ will express vasoregulation molecules and participate in circulatory regulation both during and outside of pregnancy.

This investigation is the first report on the expression of ANP by a peripheral or uterine lymphocyte. We were unable to determine whether uNK cells are a significant source of decidual ANP, however, evidence from our LCM-collected uNK cell sample showed uNK cells transcribe *ANP* at gd10 (Figure 2B) and evidence from immunohistochemistry showed ANP is highly localized to uNK cells, especially at gd12 (Figure 3D). The uNK cell-derived ANP is likely to have different physiological target cells than cardiomyocyte-derived ANP. Lymphocytes are mobile and traffic to different tissues by chemoattractants, whereas cardiomyocytes are restricted to the tissue structure they support. Therefore, unlike cardiac myocytes that secrete ANP into the circulation, uNK-derived ANP may deliver highly concentrated ANP to specific blood vessels. Further work is necessary to determine the significance of uNK cell-derived ANP.

Our findings show that uterine lymphocytes are equipped with components of RAS. Further studies will be required to determine whether these molecules permit uNK cell participation in the gestational regulation of blood pressure, activate functions related to decidualization, angiogenesis, regulation of trophoblast invasion, or give uNK cells novel functions that are not yet defined.

Declaration of Conflicting Interests

The authors declared no conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

Funding

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research and/or authorship of this article: Awards from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and The Canada Research Chairs Program to BAC, Queen's Graduate Award to KH, NSERC Undergraduate Summer Research Award to ALC and Programa de Formación del Profesorado Universitario (Ministerio de Educación) to ELD.

References

- Paul M, Poyan MA, Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*. 2006;86(3):747-803.
- Miyazaki M, Takai S. Tissue angiotensin II generating system by angiotensin-converting enzyme and chymase. *J Pharmacol Sci*. 2006;100(5):391-397.
- Bernstein KE, Xiao HD, Frenzel K, et al. Six truisms concerning ACE and the renin-angiotensin system deduced from the genetic analysis of mice. *Circ Res*. 2005;96(11):1135-1144.
- Bernstein KE, Xiao HD, Adams JW, et al. Establishing the role of angiotensin-converting enzyme in renal function and blood pressure control through the analysis of genetically modified mice. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(3):583-591.
- van Zwieten PA. The role of angiotensin II receptors and their antagonists in hypertension. *Ann Ital Med Int*. 2000;15(1):85-91.
- Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol*. 2006;20(5):953-970.
- Goodfriend TL. Angiotensin receptors: history and mysteries. *Am J Hypertens*. 2000;13(4 pt 1):442-449.
- Johren O, Dendorfer A, Dominiak P. Cardiovascular and renal function of angiotensin II type-2 receptors. *Cardiovasc Res*. 2004;62(3):460-467.
- Atlas SA, Kleinert HD, Camargo MJ, et al. Atrial natriuretic factor (auriculin): structure and biological effects. *J Clin Hypertens*. 1985;1(2):187-198.
- Trippodo NC. An update on the physiology of atrial natriuretic factor. *Hypertension*. 1987;10(5 pt 2):1122-1127.
- Summers C, Tang W, Paulding W, Raizada MK. Peptide receptors in astroglia: focus on angiotensin II and atrial natriuretic peptide. *Glia*. 1994;11(2):110-116.
- Dietz JR. Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium. *Cardiovasc Res*. 2005;68(1):8-17.
- Melo LG, Steinhilber ME, Pang SC, Tse Y, Ackermann U. ANP in regulation of arterial pressure and fluid-electrolyte balance: lessons from genetic mouse models. *Physiol Genomics*. 2000;3(1):45-58.
- Carey RM. Update on the role of the AT2 receptor. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005;14(1):67-71.
- Imaizumi T, Takeshita A. Influence of ANP on sympathetic nerve activity and chronotropic regulation of the heart. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1993;4(6):719-729.
- von Bohlen und HO, Albrecht D. The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res*. 2006;326(2):599-616.
- Saavedra JM. Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cell Mol Neurobiol*. 2005;25(3-4):485-512.
- Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med*. 2007;204(10):2449-2460.
- Jurewicz M, McDermott DH, Sechler JM, et al. Human T and natural killer cells possess a functional renin-angiotensin system: further mechanisms of angiotensin II-induced inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(4):1093-1102.
- Harrison DG, Guzik TJ, Goronzy J, Weyand C. Is hypertension an immunologic disease? *Curr Cardiol Rep*. 2008;10(6):464-469.
- Hoch NE, Guzik TJ, Chen W, et al. Regulation of T-cell function by endogenously produced angiotensin II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296(2):R208-R216.
- Vollmar AM, Wolf R, Schulz R. Co-expression of the natriuretic peptides (ANP, BNP, CNP) and their receptors in normal and acutely involuted rat thymus. *J Neuroimmunol*. 1995;57(1-2):117-127.
- Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med*. 2006;12(9):1065-1074.
- Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:656-663.
- Croy BA, van den Heuvel MJ, Borzychowski AM, Tayade C. Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunol Rev*. 2006;214:161-185.
- Greenwood JD, Minhas K, di Santo JP, Makita M, Kiso Y, Croy BA. Ultrastructural studies of implantation sites from mice deficient in uterine natural killer cells. *Placenta*. 2000;21(7):693-702.

27. Tayade C, Hilchie D, He H, et al. Genetic deletion of placenta growth factor in mice alters uterine NK cells. *J Immunol.* 2007;178(7):4267-4275.
28. Tayade C, Fang Y, Croy BA. A review of gene expression in porcine endometrial lymphocytes, endothelium and trophoblast during pregnancy success and failure. *J Reprod Dev.* 2007; 53(3):455-463.
29. Ashkar AA, di Santo JP, Croy BA. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med.* 2000;192(2):259-270.
30. Zhang J, Dong H, Wang B, Zhu S, Croy BA. Dynamic changes occur in patterns of endometrial EFNB2/EPHB4 expression during the period of spiral arterial modification in mice. *Biol Reprod.* 2008;79(3):450-458.
31. Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, Harris LK, Jones RL. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *Am J Pathol.* 2009;174(5): 1959-1971.
32. Murphy SP, Tayade C, Ashkar AA, Hatta K, Zhang J, Croy BA. Interferon gamma in successful pregnancies. *Biol Reprod.* 2009;80(5):848-859.
33. Pijnenborg R, Vercruyse L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta.* 2006;27(9-10):939-958.
34. Paffaro VA Jr, Bizinotto MC, Joazeiro PP, Yamada AT. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. *Placenta.* 2003;24(5):479-488.
35. Delgado SR, McBey BA, Yamashiro S, Fujita J, Kiso Y, Croy BA. Accounting for the peripartum loss of granulated metrial gland cells, a natural killer cell population, from the pregnant mouse uterus. *J Leukoc Biol.* 1996;59(2):262-269.
36. Bianco J, Stephenson K, Yamada AT, Croy BA. Time-course analyses addressing the acquisition of DBA lectin reactivity in mouse lymphoid organs and uterus during the first week of pregnancy. *Placenta.* 2008;29(12):1009-1015.
37. Chan JCY, Knudson O, Wu F, Morser J, Dole WP, Wu Q. Hypertension in mice lacking the proatrial natriuretic peptide convertase corin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(3):785-790.
38. Caron K, Hagaman J, Nishikimi T, Kim HS, Smithies O. Adrenomedullin gene expression differences in mice do not affect blood pressure but modulate hypertension-induced pathology in males. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 2007;104(9):3420-3425.
39. Chan JC, Knudson O, Wu F, Morser J, Dole WP, Wu Q. Hypertension in mice lacking the proatrial natriuretic peptide convertase corin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(3):785-790.
40. Burke SD, Barrette VF, Bianco J, et al. Spiral arterial remodeling is not essential for normal blood pressure regulation in pregnant mice. *Hypertension.* 2010;55(3):729-737.
41. Takeda-Matsubara Y, Iwai M, Cui TX, et al. Roles of angiotensin type 1 and 2 receptors in pregnancy-associated blood pressure change. *Am J Hypertens.* 2004;17(8):684-689.
42. Lehtonen JY, Horiuchi M, Daviet L, Akishita M, Dzau VJ. Activation of the de novo biosynthesis of sphingolipids mediates angiotensin II type 2 receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1999;274(24):16901-16906.
43. Lehtonen JY, Daviet L, Nahmias C, Horiuchi M, Dzau VJ. Analysis of functional domains of angiotensin II type 2 receptor involved in apoptosis. *Mol Endocrinol.* 1999;13(7):1051-1060.
44. Dechend R, Homuth V, Wallukat G, et al. Agonistic antibodies directed at the angiotensin II, AT1 receptor in preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 2006;13(2):79-86.
45. Zhou CC, Zhang Y, Irani RA, et al. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nat Med.* 2008;14(8):855-862.
46. Ascon M, Ascon DB, Liu M, et al. Renal ischemia-reperfusion leads to long term infiltration of activated and effector-memory T lymphocytes. *Kidney Int.* 2009;75(5):526-535.