

**DEPARTAMENTO BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR  
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**CARACTERIZACIÓN DE LA CÉLULA DECIDUAL  
ESTROMAL Y SU IMPLICACIÓN EN LA INTERFASE  
MATERNO-FETAL**

Memoria presentada por D<sup>a</sup>. María Kimatrai Salvador para optar al Grado de  
Doctor por la Universidad de Granada.  
Granada, Diciembre 2005.



## **AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS**

**D. ENRIQUE GARCIA OLIVARES**, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA,

**D. MARCOS GARCÍA PACHECO**, UNIDAD DE INMUNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, HOSPITAL MEIXOEIRO, VIGO.

**D<sup>a</sup>. ANA CLARA ABADÍA MOLINA**, PROFESORA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

**CERTIFICAN:** Que la presente tesis titulada “**CARACTERIZACIÓN DE LA CELÚLA DECIDUAL ESTROMAL Y SU IMPLICACIÓN EN LA INTERFASE MATERNO-FETAL**”, de la que es autora **MARÍA KIMATRAI SALVADOR** superó el programa de doctorado “Inmunología Celular y Molecular” y que ha sido dirigida bajo su dirección en la Unidad de Inmunología del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Granada

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

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

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expedimos la presente certificación en Granada, Diciembre 2005.

Dr. Enrique García Olivares. Dr. Marcos García Pacheco. Dra. Ana Clara Abadía Molina.

A mis, siempre maestros,  
y mejores amigos de mi vida; mis padres.

## **AGRADECIMIENTOS:**

Debe ser porque, como seguramente esta es la parte de la tesis que todos os vais a leer, por lo que dicen que es la más difícil de escribir. No sé si será la más difícil, pero para mí, desde luego el no tener que poner “et al.,” cada siete palabras me simplifica por lo pronto bastante el trabajo. ☺

Bromas aparte, esto no es más que repetir lo que me habéis escuchado hasta la saciedad; GRACIAS.

Al Dr. García Olivares, por guiarme durante estos años, y enseñarme que aunque efectivamente un experimento podría tener mil caminos, una tesis sólo tiene uno. Por su paciencia en las “n” correcciones que hemos hecho de este trabajo (y también por la paciencia que yo he desarrollado en los “n+1 “ berrinches que he pillado cuando no entendía porque algo no estaba correcto), por enseñarme y aconsejarme hasta dejarlo pulido. Muchísimas gracias.

A la Dra. Abadía Molina, por su más que crítica y objetiva visión de esta tesis y por su enriquecedora colaboración, aún en la distancia, en todos los aspectos, tanto metodológicos como formales del presente trabajo. Mil, mil gracias.

Al Dr. García Pacheco, por su incalculable ayuda para sacar los papers adelante.

A Jose Antonio, por enseñarme a dar mis primeros pasos en el laboratorio cuando llegué, haciendo sencillo por su experiencia aquello que, cuando te cuentan en clase, algunos profesores se empeñan en hacer incomprensible. Gracias.

Por supuesto a Araceli, una “genia” en hacer del papeleo y la burocracia precisamente un mero trámite. Por su amabilidad y su ingeniosa ironía. Gracias.

Y a Jesús Torres, mi oráculo, muchísimas gracias porque siempre has tenido una respuesta para cada duda que he bajado a plantearte.

A todos mis compañer@s, sois tantos ya que es imposible nombraros a todos, por todas nuestras charlas, agobios cuando algo no nos salía, y puestas en común para sacar estos papers adelante.. y sobre todo por las risas; gracias, y ¡ánimo!, que ya os va quedando menos a todos.

A todos aquellos que de alguna u otra manera me habéis ayudado. Muchas gracias.

Y por supuesto, a mi familia, sabéis que sin ustedes nada de esto, nada, hubiera sido posible. Que suerte infinita que seamos todos una piña para cualquier cosa; es el pilar maestro no sólo para hacer menos amarga la distancia de la casa, sino también del éxito. A mis padres. Papá, mamá, os lo debo todo; la piña que somos, los valores que tenemos, la importancia del trabajo...cualquier cosa. Habéis sido, sois y seréis mi modelo de vida a seguir. Gracias por todo lo que soy.

A mi hermana Carmelita, tu cariño, tu inocencia, y tu especial visión de la vida me enseñan cada día que es lo más importante, te adoro y te quiero. A mis hermanos y mejores amigos, Antonio y Javi, hasta que no llegasteis a Granada conmigo era una niña triste, me habéis regalado los años más felices aquí. Como dicen en esa adorable película, “se está mejor en casa que en ningún sitio”, y nosotros hemos conseguido hacer aquí un mini-hogar-satélite. Os quiero, lo sabéis de sobra.

Y por supuesto a ti, Christian, mi felicidad completa, mi sonrisa de cada día así estuviera alegre, triste, enfadada, agobiada..., lo que fuera, siempre has estado ahí, gracias por tu apoyo incondicional y continuo ánimo para todo. Gracias por nosotros. Te quiero.

**Gracias al Señor  
de las Pequeñas Cosas.**



## INDICE

<b>. Introducción</b>	9
<b>1 - Tolerancia materna al feto</b>	13
<b>2 - Expresión de MHC</b>	13
<b>3 - LIF y su receptor</b>	15
<b>4 - 1-Metil-Triptófano e indolamina 2,3-dioxigenasa</b>	16
<b>5 - Hormonas</b>	18
<b>6- CD95 y su ligando</b>	18
<b>7 - Anexina II</b>	20
<b>8 - Baja actividad del complemento</b>	21
<b>9 - Células inmunes en la decidua</b>	
<b>9.1 - Macrófagos</b>	22
<b>9.2 - Equilibrio Th1/Th2</b>	22
<b>9.3 - Las células NK y los antígenos HLA-C, -G, -E</b>	26
<b>9.4 - El aborto</b>	29
<b>10 - Célula decidual estromal</b>	30
<b>10.1 - Decidualización</b>	31
<b>10.2 - Antígenos y funciones asociadas al carácter hematopoyético de la célula decidual estromal</b>	32
<b>10.3 - Relación de las células deciduales estromales y las células foliculares dendríticas</b>	35
<b>10.4 - Producción de citocinas y otras moléculas biológicamente activas por las células deciduales estromales</b>	36
<b>10.5 - Fagocitosis</b>	38
<b>10.6 - Las células deciduales estromales como células presentadoras del antígeno</b>	39
<b>10.7 - Las células deciduales humanas expresan <math>\alpha</math>-SM (<math>\alpha</math> smooth muscle) actina y presenta características ultraestructurales de los miofibroblastos</b>	39
<b>11 - Referencias</b>	42
<b>. Objetivos</b>	62
<b>. Las células deciduales estromales expresan CD24 y STRO-1 y están relacionadas con precursores de la médula ósea</b>	64
<b>. Actividad contráctil de las células deciduales humanas</b>	83
<b>. La interleucina 10 produce relajación de las células deciduales estromales</b>	102
<b>. Discusión general</b>	118
Referencias	126
<b>. Conclusiones</b>	133
<b>. Apéndice</b>	135

## **ABREVIATURAS COMÚNMENTE UTILIZADAS:**

$\alpha$ -SM-actina:  $\alpha$ -Smooth Muscle-actina

AcMo: Anticuerpo Monoclonal

ALP: Alkaline Phosphatase

APC: Antigen Presenting Cell

COX: Ciclooxygenasa

DC: Dendritic Cell

DSC: Decidual Stromal Cell

ESC: Endometrial Stromal Cell

EVT: Trofoblasto extravelositario

FBS: Fetal Bovine Serum

FCS: Fetal Calf Serum

FDC: Follicular Dendritic Cell

GCP-2: Granulocyte Chemotactic Protein-2

hCG: Human chorionic gonadotropin

HLA: Human Leucocyte Antigen

IDO: Indolamina 2,3-dioxigenasa

IFN: Interferon

IGFBP-1: Insulin-like Growth Factor Binding Protein

IL- : Interleuquina

KIR: Killer cell Ig-like Receptors

LCA: Leukocyte Common Antigen

LIF: Leukaemia Inhibitory Factor

LIF-R: LIF-Receptor



LPS: Lipopolisacárido

MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1

M-CSF: Macrophage Colony-Stimulating Factor

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells

PDGF: Platelet-Derived-Growth Factor

PGs: Prostaglandinas

pre-DSC: Precursor DSC

TGF: Transforming Growth Factor

TNF: Tumor Necrosis Factor

uNK: uterine Natural Killer

VA: fenotipo Vimentina+ (V)  $\alpha$ -SM-actina+ (A)

VAD: fenotipo Vimentina+ (V)  $\alpha$ -SM-actina+ (A) desmina+ (D)

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

W: Triptófano

# **INTRODUCCIÓN**

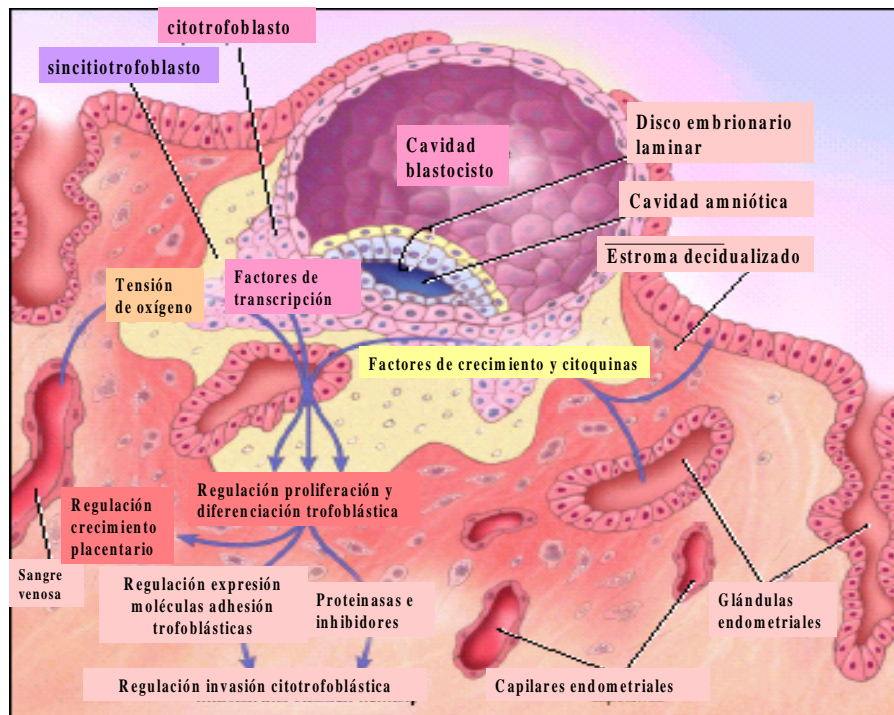
## INTRODUCCIÓN

La reproducción humana es una curiosa paradoja, pues aunque se trata de un proceso esencial para la supervivencia de la especie, su eficiencia no es tan alta como cabría esperar. Sólo un 50% de las concepciones logran superar las 20 primeras semanas de gestación (Wilcox et al., 1988). De los embarazos que se pierden, el 75% corresponden a un fallo en la implantación (Wilcox et al., 1988), que es a su vez la mayor limitación en las técnicas de reproducción asistida (Spandorfer et al., 1999). Una mayor comprensión de los mecanismos que intervienen en, no sólo la implantación sino también la placentación y desarrollo del embrión, proveería sin duda de mayores herramientas para el tratamiento de los desórdenes relacionados con esta patología, incluyendo la infertilidad y el aborto.

La fertilización ocurre en las trompas de Falopio. Los estadios iniciales de desarrollo desde el óvulo fertilizado (zigoto) hasta una masa de 12 a 16 células (mórula) (cubierta por una capa protectora conocida como pelúcida, que recorre la trompa y accede a la cavidad uterina) se produce aproximadamente 2 ó 3 días después de la fertilización. La aparición de una cavidad interna de fluido (blastocele) gracias a la actividad de bombas dependientes de ATP determina la transición desde mórula a blastocisto, que se acompaña de una diferenciación celular: las células de superficie o trofoectodermo originarán el trofoblasto (que formará las estructuras extraembrionarias incluida la placenta), mientras que las células del interior o embrioblasto originarán el embrión. Setenta y dos horas después de ingresar en la cavidad uterina el embrión abandona la zona pelúcida, dejando al descubierto los villis de su cara sincitial que entrará en contacto con microprotrusiones (pinópodos) de la cara apical del epitelio uterino (aposición) (Figura 1). Tras afianzar esta unión el sincitiotrofoblasto comienza un proceso invasivo que alcanzará gradualmente el epitelio uterino. Para entonces, el blastocisto está orientado con su polo embriónico hacia dicho epitelio (Hertig et al., 1959). Hacia el décimo día tras la concepción, el blastocisto se encuentra embebido totalmente en el tejido estromal del útero, el epitelio ha crecido hasta cubrir todo el sitio de la implantación, y citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto continúan su expansión. Eventualmente el citotrofoblasto puede invadir la totalidad del endometrio, la capa interna del miometrio (proceso denominado invasión intersticial) y el sistema vascular del útero (invasión endovascular) (Pijnenborg et al., 1981). El proceso más tardío es el

establecimiento de la circulación uteroplacental, lo que sitúa en contacto directo al trofoblasto con la sangre materna.

De forma que la madre pueda protegerse de esa potencialmente agresiva invasión por parte del trofoblasto que migra hacia las arterias espirales uterinas, las células estromales del endometrio se transforman en una densa matriz celular que se conoce como **DECIDUA** (Lala 1983), constituyendo una especie de barrera física capaz de crear un ambiente de citoquinas local que promueva más el anclaje del trofoblasto que la invasión por parte de éste (Graham et al., 1992; Tabibzadeh et al., 1998; Roth et al., 1999). Por tanto la decidua es el tejido materno que tapiza el útero gestante que se encuentra en íntimo contacto con las células del feto y que constituirán la denominada interfase materno-fetal. Las células deciduales estromales (DSC: Decidual Stromal Cell) son un tipo particular de célula que aparece en el endometrio uterino de los mamíferos durante el embarazo, justo después de la implantación del blastocisto.



**Figura 1.** Implantación del blastocisto. El dibujo muestra el proceso invasivo del trofoblasto (a los 9-10 días de la concepción) (Norwitz et al. 2001).

Se originan de la proliferación y diferenciación (decidualización) de un precursor estromal de aspecto fibroblástico (Dunn et al., 2003), fusiforme, ya presente en el endometrio no

gestante que se llena gradualmente de glucógeno en la fase secretora, y que adoptan un aspecto epiteloide durante el embarazo en el caso de que este llegara a producirse.

La proliferación de estas células, detectada mediante análisis inmunohistológico de cortes criopreservados y expresada a través del marcador de proliferación Ki67, es máxima en la primera fase del ciclo menstrual, aunque también puede detectarse en la decidua de estadios precoces del embarazo (Pace et al., 1989). Durante la fase luteal del ciclo menstrual o si se produce la gestación, este precursor se decidualiza por efecto de la progesterona (Bulmer et al., 1974; Kelly et al., 2001). Las células decidualizadas se vuelven redondeadas, expresan desmina en su citoplasma y secretan prolactina (Riddick et al., 1977; Glasser et al., 1986; Tabanelli et al., 1992; L.A. Salamonsen et al., 2002; Dunn et al., 2003). En el caso de que esa implantación no ocurra, el endometrio retornará a un estado receptivo no decidualizado gracias a la menstruación (Finn 1996; Strassmann 1996; Finn 1998; Kelly et al., 2001).

El hecho de que las DSC acumulen una gran cantidad de mucina (procedente de una elevada actividad del epitelio glandular, llenándose de vacuolas que contienen glucógeno, mucopolisacáridos ácidos y neutros, proteínas, lípidos neutros y fosfatídicos (Bulmer et al., 1986), ha propiciado que tradicionalmente, se les haya supuesto un **papel nutricional**. La circulación materno-fetal no se establece correctamente hasta las 10-12 semanas de gestación, así que durante el primer trimestre el espacio intervelllositario se llena de un líquido claro en su mayoría procedente de las secreciones de las glándulas endometriales vía pequeñas aberturas en la lámina basal, que constan en su mayoría de nutrientes, factores de crecimiento, LIF (Leukaemia Inhibitory Factor), etc (Hempstock et al., 2004). Por otra parte, en presencia de progesterona, las DSC secretan prolactina, lo que sugiere una **función endocrina** a nivel local (paracrino) (Krebhiel 1937; Riddick et al., 1977; Reis et al., 2002). Por tanto, aunque las funciones de las DSC y su adscripción a un determinado origen celular sigue siendo motivo de discusión, se les ha considerado fibroblastos con una función de tipo nutricional y endocrino durante el embarazo.

El endometrio no gestante y la decidua realmente contienen las mismas poblaciones celulares, fundamentalmente células de origen estromal, células glandulares y leucocitos, (Bulmer 1995; Trundley et al., 2004), y vasos sanguíneos (Lala et al., 1984) pero en diferentes proporciones relativas y con una actividad que varía durante el ciclo menstrual ó

el embarazo. Es raro encontrar células B, aunque si se detectan células T. Una población de linfocitos grandes granulosos (LGL) aparecen en la fase secretora tardía y aumentan en número si se produce el embarazo (Kelly et al., 2001). Estas células son natural killers uterinas (uNK ) CD56 bright (CD3- , CD16-), que, a pesar de su clara implicación en el desarrollo decidual, remodelado del sistema vascular uterino y formación de glándulas metriales (en el caso de ratones) sobre la superficie de la placenta (Adrian 2001; Dosiou et al., 2004), aún no se conoce exactamente en que clase de procesos inmunológicos relacionados con el embarazo participan.

Cómo el feto, siendo una estructura de carácter semialogénico (mitad del genoma materno, mitad del genoma paterno), evita el rechazo por parte del sistema inmunológico materno, es una cuestión que aún, desde que fue propuesta por Billingham y Medawar en 1953, queda por esclarecer.

### **1 - Tolerancia materna hacia el feto.**

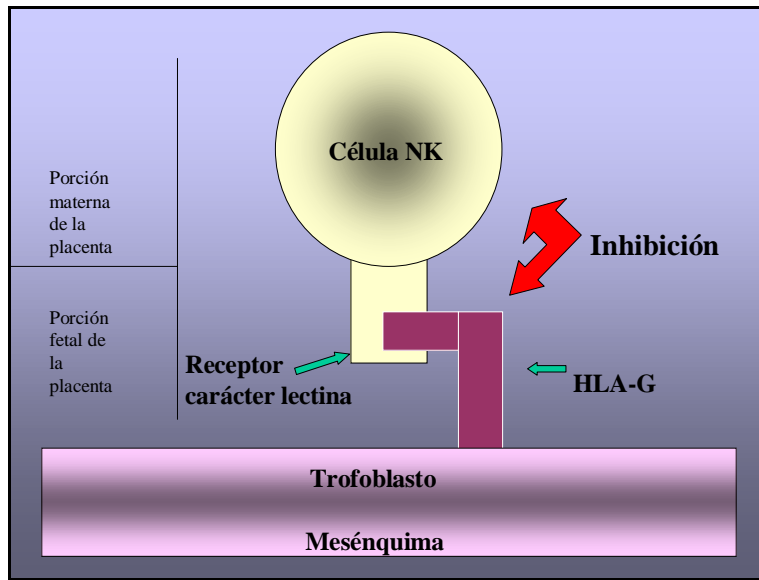
Teniendo en cuenta este carácter semialogénico, el feto sintetizaría una serie de antígenos que serían extraños para el sistema inmunológico materno (Bouma et al., 1996; Loke et al., 2000; Heikkinen et al., 2004). De hecho, células fetales y moléculas antigénicas fetales de carácter potencialmente inmunogénico han sido detectadas en la sangre materna (Reading et al., 1995). Todo el sistema inmunológico podría entrar en contacto con estas moléculas, y desarrollar una respuesta inmunitaria agresiva. Los factores que se detallan abajo y sus resultantes hipótesis parecen implicar a diferentes mecanismos que funcionarían sinérgicamente para conferir tolerancia.

### **2 - Expresión de MHC.**

El porqué la placenta, teniendo un origen fetal es aceptada por la madre es una pregunta aún sin respuesta, aunque hipótesis desde luego no han faltado para tratar de darle una explicación (Loke et al., 2000). En un principio se creyó que la placenta era una estructura inerte incapaz de activar al sistema inmunológico materno. Mas tarde se comprobó que esto no era cierto y que el trofoblasto extravelositario (EVT) capaz de invadir el útero expresaba una inusual combinación de moléculas MHC de clase Ia (HLA-C), y moléculas MHC de clase Ib (HLA-E y HLA-G) (Kovats et al., 1990; Varla-

Leftherioti 2005) (no clásicas). Estas moléculas podrían interactuar con receptores inhibidores expresados por las NK deciduales: receptores KIRs (killer-cells immunoglobulin like receptors) y receptores de carácter lectina como el CD94/NKG2A (Moffet-King 2002), bloqueando la potencial actividad citotóxica de las NK frente al trofoblasto (Figura 2). El carácter monomórfico de los HLA-G y HLA-E, así como el poco polimórfico de HLA-C garantiza una inhibición general de las NK deciduales y una ausencia de estimulación de las células T maternas. Los transcritos de HLA-G aumentan durante el primer trimestre y son mayores a nivel de las membranas extravelositarias, confiriendo protección al feto en expansión (Agrawal et al., 2003).

El hecho de que la placenta exprese principalmente HLA-G en lugar de los HLA I clásicos, (HLA-A, HLA-B) sugiere un rol específico de estos antígenos en la relación materno-fetal durante la gestación (Trowsdale et al., 1980; Ellis et al., 1990; Kovats et al., 1990). En cambio, en situaciones patológicas como la pre-eclampsia, la expresión del HLA-G sobre el trofoblasto se encuentra disminuída (Hara et al., 1996; Goldman-Wohl et al., 2000), lo que indicaría que efectivamente el HLA-G podría tener un papel fisiológico en el desarrollo placentario (Kanai et al., 2001). Existe además una forma de HLA-G soluble, de menor tamaño (Kovats et al., 1990) que secreta el trofoblasto. Siendo el embarazo un fenómeno Th2 (ver el apartado “Equilibrio Th1/Th2” de la introducción), existen datos publicados que revelan como al co-cultivar *in vitro* células positivas para HLA-G de membrana con células mononucleares de sangre periférica, estas secretan mas cantidad de IL4 e IL3 en detrimento de TNF $\alpha$  e INF $\gamma$  (citocinas Th1), mientras que la forma soluble del mismo antígeno añadido al medio produce un aumento TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  y una citocina Th2, la IL10, lo que podría sugerir que ambas formas se autorregulan para mantener la viabilidad fetal (Kanai et al., 2001).

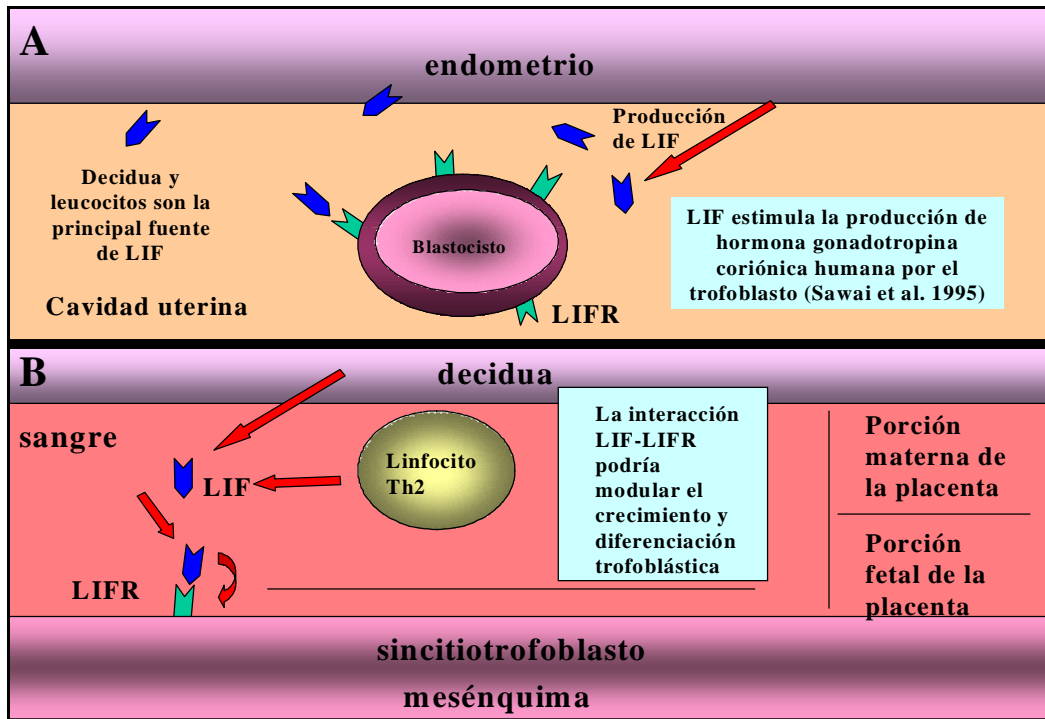


**Figura 2.** El HLA-G expresado por el trofoblasto inhibiría a las células NK maternas a través de sus receptores de carácter lectina.

### 3 - LIF (Leukaemia Inhibitory Factor) y su receptor.

El endometrio humano sintetiza y secreta una molécula hidrosoluble llamado factor inhibidor de leucemia (LIF) (Nakajima et al., 2003; Chen et al., 2004) en cada ciclo menstrual, relacionado con la progesterona (Ace et al., 1995; Piccinni et al., 2000). Durante la implantación, el endometrio secreta LIF, a la vez que el blastocisto expresa en su superficie receptor de LIF (LIF-R) (Charnok-Jones et al., 1994; Senturk et al., 1998), lo que, al parecer, es imprescindible para la implantación (ver figura 3A). Durante el embarazo, LIF será sintetizado no sólo por la decidua (parte materna de la placenta) sino también por los linfocitos Th2 (Piccinni et al., 1998) (Figura 3b). La función exacta del LIF es desconocida, pero se sabe que favorece al crecimiento y diferenciación del trofoblasto (Kojima et al., 1995) y su carencia se asocia a fallos en la implantación (Piccinni et al., 2001; Sherwin et al., 2004). Este proceso parece estar íntimamente relacionado con otros mecanismos de tolerancia materno fetal, el equilibrio Th1/Th2 y progesterona que más adelante se mencionan.





**Figura 3.** Posible papel modulador del crecimiento y diferenciación trofoblástica del LIF secretado por el endometrio y células Th2.

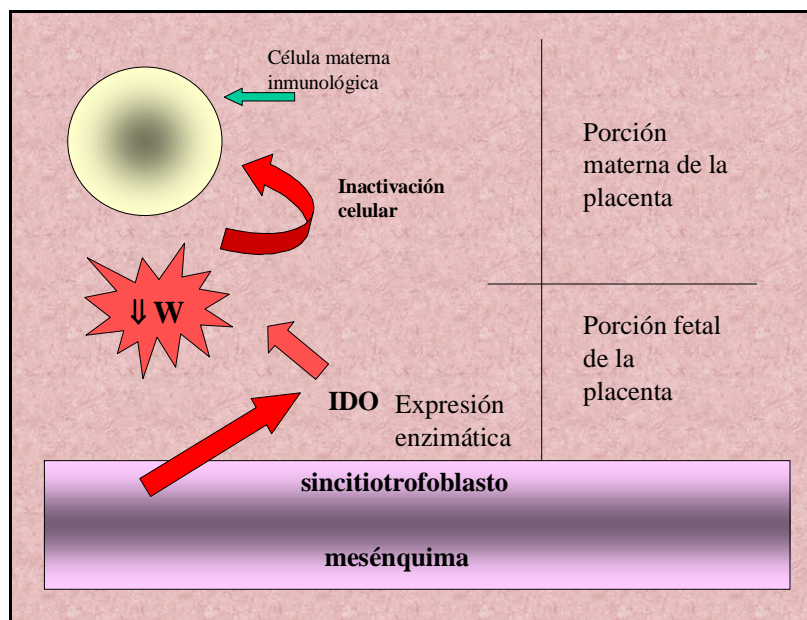
#### 4 - 1-Metil-Triptófano e indolamina 2,3-dioxigenasa.

La indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) es una enzima encargada del metabolismo del triptófano. Se sintetiza y es secretada por el trofoblasto, y se ha demostrado que es esencial para el mantenimiento del embarazo en el ratón (Munn et al., 1998; Mellor et al., 1999). Quizás uno de los resultados más llamativos obtenidos recientemente es que el tratamiento de ratonas preñadas con 1-metil-triptófano causa el aborto de aquellas concepciones alogénicas pero, sin embargo, no de las singénicas (Mellor et al., 1999).

Los efectos de la droga en el caso de ratones dependen de las células T, y solo se produce si hay disparidad en los MHC de ambos progenitores. Mellor et al. (1998), encontraron que el aborto inducido con 1-metil-triptófano está asociado con la deposición de moléculas de complemento en la interfase materno-fetal. Aunque no está claro si esta fijación del complemento es la causa principal de la pérdida del feto ó una causa secundaria que acompaña a otros mecanismos a través de los cuales se desencadena la muerte celular.

Dejando a un lado el mecanismo a través del cual la droga podría actuar, este descubrimiento es especialmente relevante dado que pone de manifiesto que existe un reconocimiento por parte del sistema inmunológico materno de esa alogenicidad y que incluso puede terminar con la expulsión del feto, como si de cualquier otro tejido alogénico se tratase. Este mismo grupo ha sugerido que el aborto podría estar causado por la inhibición de la enzima IDO.

Una posible explicación del papel relacionado con la tolerancia al feto es que IDO se encargaría de catabolizar el triptófano localizado en el área de la placenta, reduciendo su concentración hasta niveles por debajo de los necesarios para el normal funcionamiento de los linfocitos T, inhibiendo sus funciones y proliferación. De hecho se ha probado que es el trofoblasto extravelositario (EVT) de capacidad invasiva el que produce grandes cantidades de IDO, y puesto que es el EVT el que mantiene un contacto más acusado con el sistema inmunológico materno los resultados sugieren que es esta porción del trofoblasto la que se encargaría de evitar el rechazo fetal (Figura 4) (Honig et al., 2004). IDO también se expresa en los macrófagos deciduales (Heikkinen et al., 2003).



**Figura 4.** Rol potencial de IDO en la tolerancia fetal.

En publicaciones posteriores parece constatar que inclusive *in vitro*, las funciones de las células T se ven limitadas cuando los macrófagos son capaces de expresar IDO (Munn et al., 1998). El IFN $\gamma$  regula positivamente la formación de IDO (Heikkinen et al., 2004).

## **5 - Hormonas.**

Numerosas hormonas y citocinas están y son activas en la placenta (Petraglia et al 1996), actuando sobre los tejidos trofoblásticos de muy variadas formas, algunas de las cuales llevan a la modulación de la respuesta inmune.

Una molécula importante es la progesterona (Merviel et al., 2001; Dunn et al., 2003; Classen-Linke et al., 2004), sintetizada en primer lugar por los ovarios y luego por la placenta en grandes cantidades, es capaz de disminuir la respuesta inmunológica en gran medida (Siiteri et al., 1982; Piccinni et al., 2001). La progesterona promueve la síntesis de LIF por el endometrio (Ace et al., 1995) y por los linfocitos T (Piccinni et al., 2001), lo que induciría la polarización de las células T hacia Th2 favoreciendo del embarazo (Piccinni et al., 1995; 2001).

La progesterona, la hormona que promueve la diferenciación (decidualización) de las DSC, induce la producción de VEGF (vascular endothelial growth factor) y la expresión de sus receptores (Sugino et al., 2002) así como la producción de IL15 por las mismas (Dunn et al., 2003).

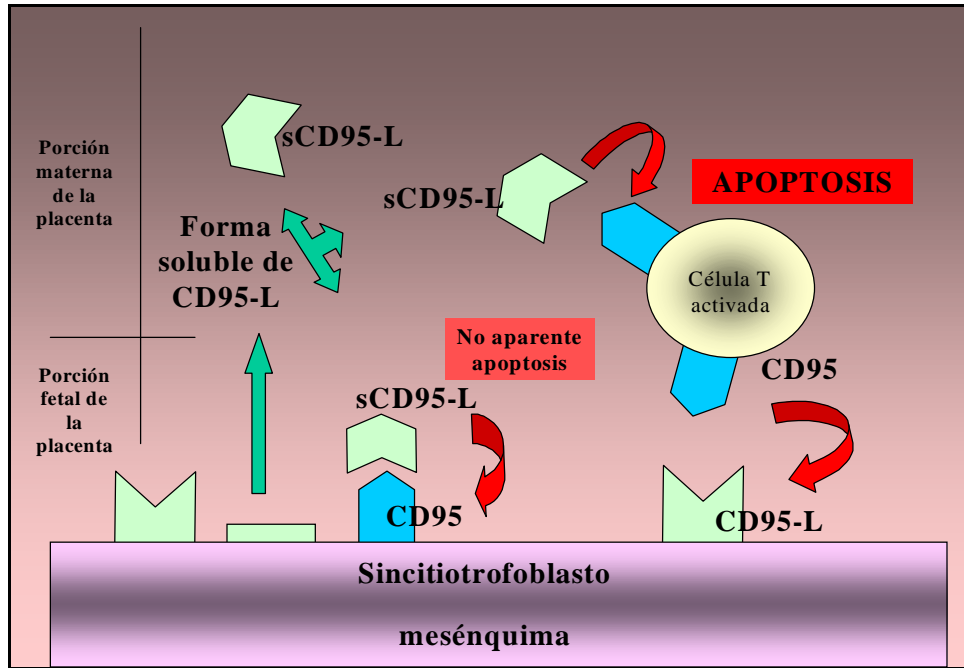
## **6 - CD95 y su ligando.**

El CD95 (APO-1, FAS) y su ligando CD95L (FasL) forman parte de una vía apoptótica ampliamente utilizada por el sistema inmunológico durante la linfopoyesis e inmunopoyesis. Implicada en la renovación celular, eliminación de células tumorales, respuesta antiviral y protección de determinados tejidos contra linfocitos potencialmente agresivos (Xerri et al., 1997), esta vía está también activa durante la selección clonal de células autoinmunes dentro de los órganos linfoides centrales y periféricos, así como en la vía citolítica de las células NK, células Th1 y células citotóxicas.

CD95L está expresado en las células efectoras, mientras que las células diana expresan CD95. Para la protección de tejidos en particular, CD95L se expresa en las células que

delimitan el sitio de inmunoprivilegio. Por ejemplo, el CD95/CD95L es activo en ciertos lugares del ojo (Griffith et al., 1995; Wilson et al., 1996), habiendo sido detectado el CD95L recientemente en el interior de los testículos humanos (Xerri et al., 1997).

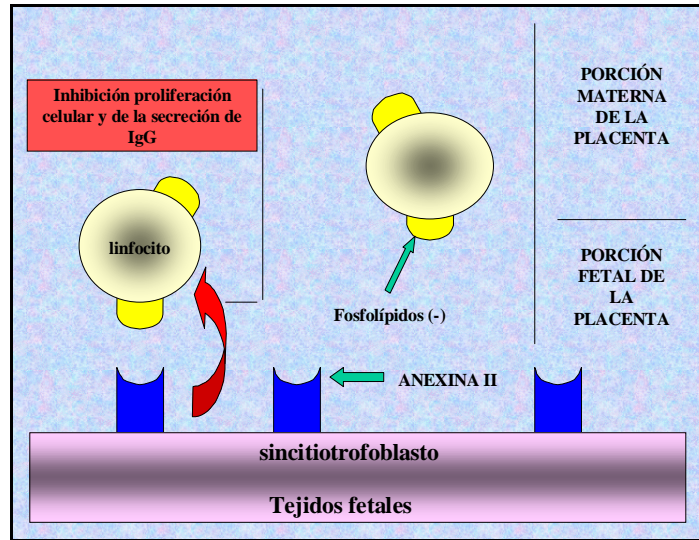
Thellin et al., (2000) junto a otros investigadores, han propuesto que CD95L es expresado por las células trofoblásticas, siendo capaz de eliminar a las células sanguíneas CD95+ que entran en contacto con el feto. Dicho grupo, además, en paralelo con otros (Xerri et al., 1997; Bamberger et al., 1997), han demostrado que las células trofoblásticas expresan y sintetizan CD95L tanto *in vivo* como *in vitro* (Zorzi et al., 1998). Las células trofoblásticas en cultivo son capaces de inducir apoptosis en células T sanguíneas CD95+ (Coumans et al., 1999). Las observaciones *in vivo* de Jerzak et al., (1998) incluyen efectivamente la existencia de linfocitos T apoptóticos en la decidua humana durante el primer trimestre, lo que vendría a sustentar la hipótesis de eliminación activa de las células T potencialmente dañinas por parte del trofoblasto. La apoptosis de las células inmunológicas deciduales maternas ocurre principalmente por mediación de CD95-CD95L, mecanismo de protección frente al rechazo fetal (Jerzak et al., 2002). Es de destacar que, al parecer también las células trofoblásticas son en parte positivas para CD95, y, aunque aparentemente estas no sufren las consecuencias típicas de la apoptosis (Payne et al., 1999), esta expresión podría tener un papel crucial en la limitación de la invasión exacerbada del trofoblasto (Thellin et al., 2000) (Figura 5). Recientemente se ha demostrado como el EVT de fenotipo invasivo presenta mayores proporciones de CD95 y CD95L que el EVT de fenotipo proliferativo, el cual en cambio presenta niveles más altos de Bcl-2, lo que sugeriría así mismo una regulación a este nivel (Murakoshiet al., 2003).



**Figura 5.** Papel potencial del CD95 y CD95L en la tolerancia materno fetal. El CD95L del sincitiotrofoblasto se uniría al CD95 de las células inmunitarias maternas y desencadenaría la apoptosis, mientras que la unión inversa, del CD95L soluble a su ligando CD95 en el sincitiotrofoblasto, no desencadenaría aparentemente apoptosis ninguna.

## 7 - Anexina II.

La anexina II es una glicoproteína presente en la placenta (Aarli et al., 1997; 1998), capaz de unirse a fosfolípidos cargados negativamente (unión calcio dependiente), y que puede localizarse tanto en células normales como de carácter maligno, En la placenta es donde parcialmente se ha visto que es capaz de inhibir no sólo la linfoproliferación sino también la secreción de IgG e IgM por parte de las células maternas inmunológicas. Esta misma molécula parece encontrarse presente en el sincitiotrofoblasto (Figura 6).



**Figura 6.** La unión anexina II del sincitiotrofoblasto y los fosfolípidos cargados negativamente de los linfocitos inhibiría su activación

## 8 - Baja actividad del complemento.

Una vía muy común usada por el sistema inmunológico para destruir “lo extraño” es el sistema del complemento, de manera que el reconocimiento de los antígenos paternos presentes en la superficie del trofoblasto podría inducir la producción de anticuerpos por la madre que activarían la cascada del complemento incurriendo en la muerte de todas las células trofoblásticas. Ciertas moléculas son capaces de reducir este fenómeno; el trofoblasto humano expresa tres proteínas unidas a membrana cuya función específica es la de regular el complemento. Estas proteínas son conocidas por estar ampliamente distribuidas por los tejidos adultos de un individuo con el fin de protegerle de fortuitas deposiciones del mismo. Estas proteínas son DAF (decay accelerating factor, CD55), un cofactor proteico de membrana (MCP, CD46), las cuales actúan a nivel de la enzima C3 convertasa que activa C3 a C3b, y otra proteína adicional, CD59, que actúa directamente sobre la formación del complejo citolítico terminal de ataque a membrana (MAC), a través de C8 y C9. DAF, MCP y CD59, expresadas en el trofoblasto que está en contacto con los tejidos y sangre materna desde la sexta semana de gestación, tendrían una especial función en la contención del complemento (Johnson et al., 1990; Holmes et al., 1990).

Xu et al. (2000) estudiaron igualmente la función del regulador del complemento Crry (complement receptor 1-related gene/protein, miembro de una familia que se encarga de regular negativamente los componentes C3 y C4 del complemento), demostrando que, una disfunción o deficiencia de Crry en ratones (expresado en el trofoblasto placentario) produce una muerte del embrión gradual y progresiva, consecuencia de una más que evidente fijación de C3 sobre el trofoblasto (Xu et al., 2000). La delección de este factor regulador conduce igualmente en ratones a una pérdida fetal resultado de una inflamación originada en la placenta (Xu et al., 2000; Miwa et al., 2001).

## **9 - Células inmunes en la decidua.**

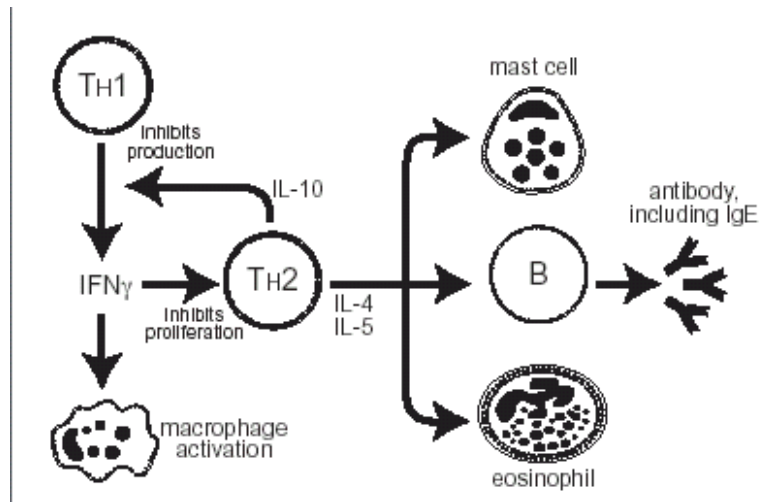
### **9.1 - Macrófagos.**

Los macrófagos localizados en la placenta protegen de manera natural al embrión (Chang et al., 1993; Lagadari et al. 2004) por su limitada capacidad para presentar antígenos y por sus bajos niveles de CD86 en comparación con los monocitos CD14<sup>+</sup> de sangre periférica de mujeres gestantes y no gestantes, siendo una especie de macrófagos “deprimidos” que, además parecen expresarIDO (Heikkinen et al., 2003) y moléculas de carácter anti-inflamatorio como IL10 (Goerdts et al., 1999; Heikkinen et al., 2003) e IL1Ra (Goerdts et al., 1999). La cantidad de IL10 que secretan los macrófagos deciduales es significativamente más elevada que las encontradas en los monocitos sanguíneos u otros tipos de macrófagos (Lidstrom et al., 2003).

### **9.2 - Equilibrio Th1/Th2.**

La eliminación de un agente infeccioso invasor va a depender de que la respuesta del sistema inmunitario sea la adecuada, y son las células T CD4<sup>+</sup> cooperadoras o “helper” (Th) las encargadas de dirigir u orquestar dicha respuesta. Clásicamente se vienen distinguiendo dos tipos de linfocitos Th, tipo 1 (Th1) y Th2 (tipo 2), que se distinguen por sus características funcionales y el perfil de citocinas. Las células Th1 inducen la activación de la inmunidad celular o citotóxica, para proteger al organismo frente a virus u otros patógenos intracelulares, y está definida fundamentalmente por la producción de INF $\gamma$ , TNF e IL2 y la activación de macrófagos. Las Th2 se caracterizan por la producción de

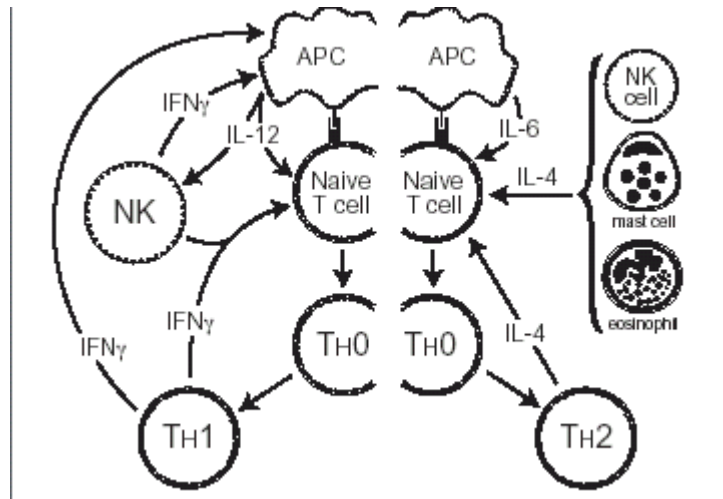
IL4, IL5, IL6, IL10, IL13 y potencian la producción de anticuerpos para hacer frente fundamentalmente a los patógenos extracelulares (Mossman et al. 1989; Constant et al., 1997). Este último tipo de respuesta está relacionada con la tolerancia a los xenotransplantes ó al feto durante el embarazo (Figura 7).



**Figura 7.** Representación esquemática de la hipótesis Th1/Th2. Las células Th1 secretan IFN $\gamma$  que activa las rutas inflamatorias principalmente a través de la activación de los macrófagos. Las Th2 secretan IL4 e IL10 regulando positivamente la formación de los anticuerpos a través de las células B, células cebadas ó eosinófilos. A su vez las células Th1 pueden inhibir a las Th2 y viceversa (Kidd 2003).

La polarización de las células T CD4<sup>+</sup> comienza cuando la célula virgen contacta con una APC (célula dendrítica, macrófago ó cualquier otra), que le presenta un antígeno de cuya naturaleza depende en que dirección vaya la célula a polarizar (Moser et al., 2000), diferenciación guiada por el ambiente de citocinas y otras moléculas que predominen en la zona (microambiente) (Figura 8) (Aggarwal et al., 1998). Así pues, son el IFN $\gamma$  y la IL12 las citocinas encargadas de la diferenciación de las células CD4 hacia Th1. Mientras el IFN $\gamma$  se encarga de prevenir la formación de Th2, la IL12 parece estar más directamente implicada en la diferenciación hacia Th1. En cambio, la diferenciación a Th2 esta inducida por la IL4, y en este caso la IL10 es la encargada de bloquear la diferenciación a Th1 (Mossman et al 1989; Constant et al 1997) (Figura 8).





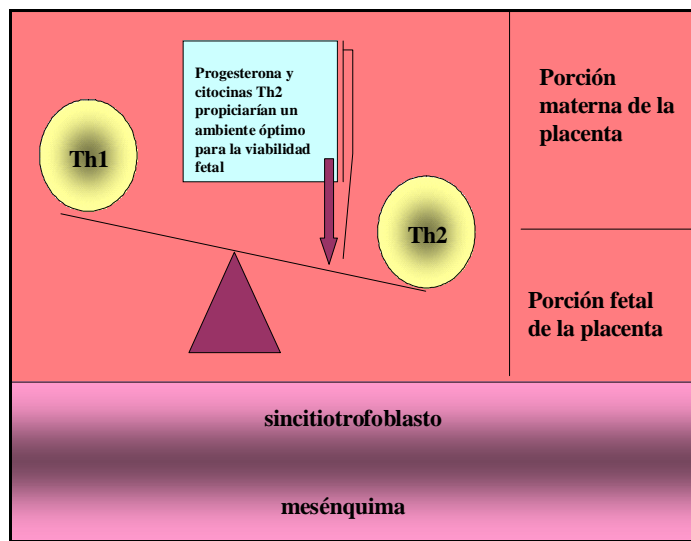
**Figura 8.** Esquema de la diferenciación a partir de células T vírgenes de linfocitos Th1 y Th2, dirigida por citocinas. Las células presentadoras interactúan con los linfocitos T novatos o indiferenciados compartiendo con ellos el antígeno captado a la vez que secretan citocinas específicas que promueven la diferenciación de ellos mismos (previo paso por Th0) hacia células Th1 o Th2. Las células NK también están relacionadas con el proceso de polarización (Kidd 2003).

El equilibrio Th1/Th2 en la placenta parece ser de la misma manera, crítico, pues un desplazamiento hacia Th1 genera una respuesta inmunitaria que desemboca en el aborto involuntario, mientras que si es hacia Th2 supone la supervivencia del feto y progresión del embarazo (Raghupathy 1997; Piccini et al., 1998; 2001).

El número de células productoras de IL12 en el total de la población de las células dendríticas de la decidua es significativamente menor que el encontrado en células periféricas, lo que sugiere que estas células podrían regular el equilibrio Th1/Th2 manteniendo un estado predominantemente Th2 y favoreciendo de esta forma la gestación (Miyazaki et al., 2003).

La gestación es un fenómeno Th2 que permite la pervivencia del feto. La progesterona contribuye a la inmunosupresión natural de la inmunidad celular que acompaña al embarazo favoreciendo un estado Th2 (Piccini et al., 2000; Saito 2000; Moro et al., 2001; Miyaura et al., 2002), y siendo capaz incluso de recuperar al feto en condiciones adversas

programadas en ratones, por descenso en las citocinas abortogénicas (Blois et al., 2004). Los efectos inmunomoduladores de la progesterona están mediados por una proteína llamada PIBF (progesterone-induced blocking factor) tanto en humanos como en ratón (Szekeres-Bartho et al., 1995). La progesterona induce la presencia de receptores para ella misma en los linfocitos que se encuentran en la decidua. La unión de la progesterona a su receptor en las células linfocitarias induce la síntesis de PIBF (Polgar et al., 2003) que a su vez desplazará la síntesis de citocinas hacia Th2, lo que llevaría aparejado la inhibición de la células NK y, por ende, la creación de un ambiente propicio de tolerancia al feto (Szekeres-Bartho et al., 1989; 1990; 2001; 2002). PIBF por actuación sobre la enzima fosfolipasa A2 interfiere con el metabolismo del ácido araquidónico dirigiendo la respuesta inmune hacia Th2 (Szekeres-Bartho et al., 2001). La progesterona promueve la producción de IL4 e IL5, a la vez que IL4 y progesterona regulan positivamente la producción de LIF, esencial en el desarrollo embrionario (Piccinni et al., 2001) (Figura 9).



**Figura 9.** Progesterona y citocinas Th2 favorecerían un microambiente óptimo para el desarrollo del feto.

Las células T no son las únicas capaces de secretar citocinas, y por tanto no sólo ellas modulan el microambiente local. Sincitiotrofoblasto y citotrofoblasto también producen citocinas (Krasnow et al., 1996; de Moraes-Pinto et al., 1997).

La IL10 que aparece en el útero tras la implantación a este mismo nivel ejerce un poderoso efecto beneficioso. El citotrofoblasto produce IL10 y se expresa en el trofoectodermo y masa celular interna hasta unos niveles muy superiores en comparación a los controles que no se hallan en gestación (Chaouat et al., 1995; Vigano et al., 2001), su administración previene el aborto (Chaouat et al., 1995), mientras que su nivel se sitúa por debajo de lo normal en mujeres con abortos recurrentes (Piccinni et al., 2000; Vigano et al., 2001).

A pesar de que la bibliografía ampliamente sugiere que las citocinas Th1 son incompatibles con el embarazo, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  son al parecer esenciales en la diferenciación primaria del trofoblasto en los primeros momentos de la gestación (Saito et al., 1999), para un correcto desarrollo vascular (Chaouat et al., 2004) y durante el parto (Saito et al., 1999), mientras que un exceso de las mismas resulta embriotóxico en ratones y, en humanos se correlaciona el aumento de IFN $\gamma$  con un rechazo fetal durante el primer trimestre (Athanasakis et al., 1996; Ju et al., 2000), mientras que en ratones parece promover la resorción fetal (Chaouat et al., 1995).

### **9.3 - Las células NK y los antígenos HLA-C, -G, -E.**

Tanto en humanos como en ratones, las células NK uterinas (uNK ) suponen la mayor parte de la población linfocitaria en el lugar de implantación, de hecho, aproximadamente el 70% de los leucocitos CD45+ presentes en la decidua son células NK CD56 *bright*, y, a pesar de su clara implicación en el desarrollo decidual, remodelado del sistema vascular uterino y formación de glándulas metriales sobre la superficie de la placenta (Adrian 2001), aún no está demasiado claro cómo participan en los procesos inmunológicos relacionados con el embarazo.

La infiltración de células uNK en la decidua forma parte de los cambios cíclicos que se suceden en el endometrio bajo la acción hormonal, en particular de la progesterona, estando al parecer también implicadas en el desarrollo y proliferación celular la IL15 y la prolactina, ambas producidas por las células endometriales estromales en respuesta a la progesterona (Dunn et al., 2002; Gubbay et al., 2002).

Las células uNK son pequeñas y sin granulaciones en la fase proliferativa preovulatoria, después en la fase secretora postovulatoria proliferan, se hacen más grandes y adquieren

una granulación patente (Spornitz et al., 1992). Aproximadamente dos días antes de la menstruación (cuando los niveles de progesterona decaen como consecuencia de la regresión del cuerpo lúteo), los cambios nucleares de las células uNK son indicativos de que se está dando la muerte celular (aunque las características típicas de la apoptosis estén ausentes), primer signo indicativo de la menstruación, a no ser que se produzca la implantación. Durante la fase temprana del embarazo, las células uNK, que se acumulan densamente alrededor de las células trofoblásticas, van desapareciendo conforme este progresa hasta hacerse totalmente ausentes en el embarazo a término, siendo destacable que su presencia es coincidente con el periodo de invasión trofoblástica (Moffet-King 2002).

Las células uNK tienen un fenotipo diferente a las células NK de sangre periférica, pues son CD16<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> entre lo más destacable (Koopman et al., 2003), y aunque su origen no está determinado, podría ser que procedentes de una población sanguínea, se infiltraran en el útero (Pijnenborg R 2002; Dosiou et al., 2004) y se diferenciaron atendiendo a un microambiente determinado (Moffet-King 2002). De hecho, el propio trofoblasto es capaz de producir determinados factores que funcionan como quimio-atrayentes de células NK deciduales que contribuirían a modular el microambiente de citocinas local (Wu et al., 2004). Las células uNK humanas producen citocinas y moléculas relacionadas con la angiogénesis y estabilidad vascular (VEGFC: Vascular Endothelial Growth Factor C (Li et al., 2001), las cuales posiblemente tengan un papel más destacado en la menstruación que en la decidualización. La primera incógnita que se plantea respecto a las células uNK que se sitúan entre el trofoblasto que comienza a invadir la decidua es, si estas no pueden reconocer los antígenos paternos y actuar controlando la invasión. Las células trofoblásticas son inherentemente invasivas, y en ausencia de decidua la invasión sería totalmente caótica y descontrolada (Moffett-King et al., 2002).

Recientemente, Croy y colaboradores (2000) en un experimento con ratones parecen dar ideas acerca de su importancia en el progreso del embarazo. Así usaron ratones Tg $\epsilon$ 26 (deficientes en células NK y T) y ratones Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ <sup>-/-</sup> (deficientes en células NK, T y B) para demostrar cómo ambos tenían problemas para formar las glándulas metriales durante el embarazo, teniendo incluso, algunos, dificultades para que se produjera la decidualización y cambios en el tejido uterino posteriores a la implantación que permiten

que la gestación llegue a término. Estos resultados pueden enlazar con el hecho de que los defectos vasculares en el embarazo están asociados a la preeclampsia, asociada a su vez con una inadecuada invasión por parte del trofoblasto de las arterias espirales uterinas en el primer trimestre (proceso que en condiciones normales sigue a un remodelado arteriolar previo, independiente del trofoblasto) (Ness et al., 1999) en el que participarían la uNK. Además, el mismo grupo de Croy, demostró que las células uNK son la principal fuente de IFN $\gamma$  en el lugar de la implantación, sabiéndose que ratonas IFN $\gamma$  -knockout presentan elevadas tasas de abortos (Ashkar et al., 1999), y que además esta misma citocina contribuye al inicio del remodelado vascular uterino de los roedores, la integridad de la decidua y la maduración de las propias uNK, lo que sería vital para conseguir un embarazo exitoso (Ashkar et al., 2000).

Hasta la fecha los ligandos potenciales encontrados para las células uNK han sido las moléculas MHC-I: HLA-C, HLA-E y HLA-G (Ellis et al., 1990; Kovats et al., 1990; King et al., 1996). Los receptores para HLA-C y HLA-E no están bien descritos (Braud et al., 1998; Lee et al., 1998; Vilches et al., 2002), aunque se sabe que se expresan sobre las células uNK. Estas observaciones abren el abanico de posibilidades para entender los posibles mecanismos que la madre puede emplear para reconocer al trofoblasto.

**HLA-E.** Todas las células uNK expresa elevados niveles del receptor CD94/NKG2A, ligando del HLA-E (King et al., 2000), pudiéndose comprobar que la afinidad de este por el receptor inhibidor CD94/NKG2A es mayor que la que tienen por el receptor activador CD94/NKG2C. La interacción con los receptores inhibidores de las uNK podría prevenir la lisis de cualquier tejido adyacente, sea materno ó fetal., mientras que la interacción con los receptores activadores podría desencadenar la respuesta de las células uNK (Llano et al., 1998; Vales-Gomez et al., 1999).

**HLA-C.** Los receptores para el HLA-C (MHC de clase I) de las células uNK son miembros de una familia multigénica denominada KIRs, de los que existen multitud de haplotipos en humanos y primates (Khakoo et al., 2000; Varla-Leftherioti M 2004). Los KIRs que son específicos del HLA-C aparecen expresados en mayor proporción en las células uNK que en las periféricas, lo que implicaría una cierta especificidad a nivel uterino (Hiby et al.,

1997; Verma et al., 1997), y si se confirma que las células NK sanguíneas son la fuente de las uNK indicaría que KIR es inducible en el útero. Todas las mujeres expresan KIRs para ambos grupos de alelos de HLA-C, y podría suceder que las uNK interaccionaran con el HLA-C paterno/fetal no propio durante el embarazo (Verma et al., 1997). De hecho, cada embarazo supondría diferentes combinaciones de HLA-Cs derivados del padre y KIRs de la madre, siendo posible que ciertas combinaciones sean bastante menos óptimas para la implantación y por tanto fracasasen (Moffett-King 2002). Además, en aquellos casos en los que se comprueba que la interacción KIR-HLA-C es deficiente o no apropiada, las mujeres están más predispuestas a desarrollar un aborto (Varla-Leftherioti M et al., 2003; 2004; 2005).

**HLA-G.** Se ha identificado como receptor de éste (desde que se vio su expresión conjunta con HLA-E) el CD94/NKG2. También los KIR inhibidores ILT2 y activadores KIR2DL4, ambos expresados por las uNK, reconocen al HLA-G (Moffett-King 2002).

Parece probable que las uNK produzcan citocinas que modulen estas interacciones, lo que a su vez repercutiría en el comportamiento del trofoblasto en lo que a expresión de integrinas ó producción de metaloproteinasas se refiere (Nortwitz et al., 2001; Le Bouteiller P 2004). Además sabemos que las uNK producen citocinas que no producen habitualmente las células NK que se encuentran en sangre periférica, como LIF (Wilson et al., 2000), ó factores de crecimiento angiogénico (Li et al., 2001), habiendo datos que además sugieren que la batería de citocinas producidas cambian en función de si la persona se halla o no en estado de gestación, de manera que los mecanismos efectores que usen las uNK y las NK sanguíneas deben ser bastante diferentes.

#### **9.4 - El aborto.**

Citocinas tipo Th1 (como TNF) son directamente citotóxicas para el trofoblasto (Lee et al., 2005). Las células NK y los linfocitos citotóxicos CD8+ de la decidua podrían ser activados por estas citocinas. De hecho, las pequeñas subpoblaciones de CD56+CD25+ y CD56+HLA-DR+ que se encuentran significativamente incrementadas en la decidua de abortos espontáneos pueden corresponderse con las células NK activadas encargadas de eliminar al feto (Olivares et al., 2002). Por otro lado la expresión elevada de receptores

inhibidores de la citotoxicidad (KIRs) por parte de las células NK en embarazos normales (Ponte et al., 1999), se reduce en abortos espontáneos humanos, lo que probablemente lleve a la desinhibición de las células citotóxicas contra el trofoblasto (Chao et al., 1999).

Recientemente Olivares et al., (2002) demostraron que las poblaciones de linfocitos T aumentan en la decidua de abortos espontáneos, y que los linfocitos deciduales de dichos abortos inducen apoptosis en el trofoblasto extraveloso. Es destacable el dato de que los linfocitos deciduales de abortos espontáneos inducen apoptosis y no necrosis en el trofoblasto extraveloso (Olivares et al., 2002), sugiriendo estos resultados que la apoptosis es un mecanismo de control gracias al cual la expansión excesiva del trofoblasto es controlada sin incurrir en una respuesta inflamatoria, y que se intensifica por diferentes causas en el caso de los abortos espontáneos, destruyendo masivamente al trofoblasto.

#### **10 - Célula decidual estromal.**

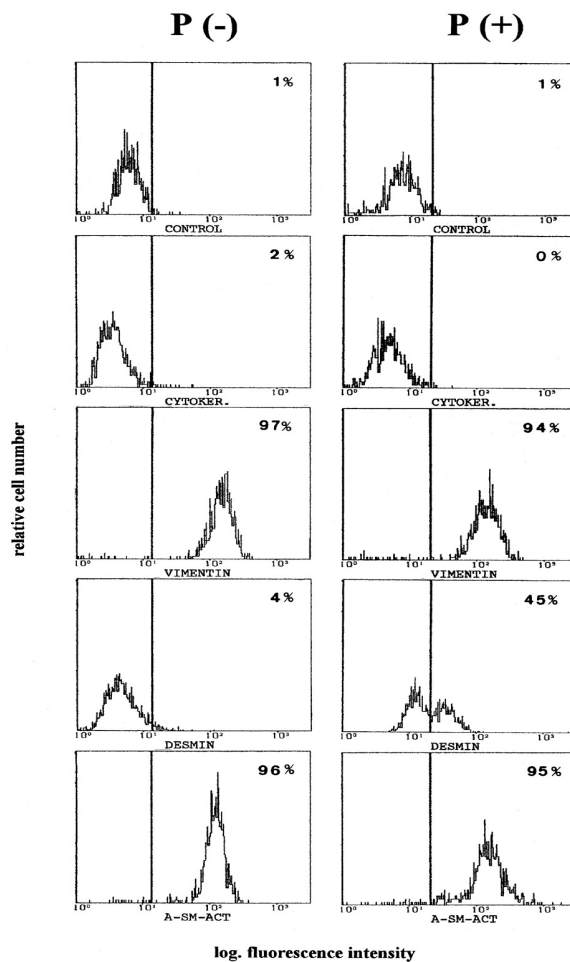
Las DSC constituyen un tipo particular de célula procedente de la proliferación y diferenciación de un precursor estromal de carácter fibroblástico (pre-DSC). Estos precursores, ya presentes en el endometrio no gestante (endometrial stromal cells, ESC) (Richards et al., 1995) se diferencian (decidualizan) bajo la influencia de las hormonas ováricas (progesterona) a lo largo de la fase luteal (secretora) del ciclo menstrual, diferenciación que se mantendrá en el tiempo si los niveles hormonales se mantienen, lo cual sucede siempre y cuando se dé el estado de gestación (Bulmer y Peel 1974). Si esto no ocurre, debido fundamentalmente a la retirada de progesterona se produce una descamación del endometrio que desemboca en el sangrado menstrual y regeneración subsiguiente de la mucosa.

El elevado contenido de glucógeno en la célula decidual estromal (DSC) (Krebhiel 1937), junto a su capacidad para secretar prolactina (Riddick y Kusmic 1977) sugieren un importante papel nutricional y endocrino (paracrino) en la interfase materno-fetal, no obstante, desde hace algunos años se viene documentando ciertas funciones inmunológicas, en DSC humanas y de ratón.

## 10.1 - Decidualización.

La decidualización puede ser definida como el proceso en el que el endometrio se transforma en un tejido decidual morfológica y funcionalmente diferente, involucrando la diferenciación de las células endometriales estromales (ESC, endometrial stromal cells) e infiltración local de cierto número de células linfoides granulares grandes (NK) (Kelly et al., 2001; Salamonsen et al., 2003). La decidualización supone también una variación morfológica y fenotípica de las ESC (DSC en el endometrio gestante), componente celular mayoritario de la porción materna de la interfase materno-fetal, en una DSC diferenciada o decidualizada (Salamonsen et al., 2003), que abandona su aspecto fibroblástico para hacerse gradualmente más redondeada. Además fenotípicamente estas células diferenciadas son diferentes de sus precursores (Figura 10); marcadores de decidualización tales como secreción de prolactina, expresión de desmina en el citoplasma (Riddick y Kusmic 1977; Glasser y Julian 1986; Tabanelli et al., 1992; Salamonsen et al., 2003), relaxina, proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-1), y ciertos componentes de la lámina basal y colágeno tipo IV, confirman el estado diferenciado de la célula (Salamonsen et al., 2003) (Figura 10). Este estado permanece si se produce un embarazo que permita mantener altas las concentraciones de progesterona. Si esto no ocurre y los niveles de progesterona caen, se producirá la menstruación o aborto, según el caso ( Kelly et al. 2001; Condon et al. 2003), acompañada de una descamación del endometrio por mediación de enzimas metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) y proteasas derivadas del epitelio estromal y de los leucocitos (Salamonsen et al. 1999). Posteriormente, se producirá una regeneración de la mucosa endometrial. La decidualización se inhibe en presencia de las citocinas inflamatorias IL1 y TNF $\alpha$  (Kariya et al., 1991; Jikihara y Handwergwer et al., 1994).





**Figura 10.** Análisis por citometría de flujo de filamentos citoesqueletales presentes en las células deciduales estromales cultivadas con (P+) y sin (P-) progesterona. Los números de los cuadrantes indican el tanto por ciento de células positivas para ese marcador (Oliver et al., 1999).

## 10.2 - Antígenos y funciones asociadas al carácter hematopoyético de la célula decidual estromal.

Las DSC purificadas mediante cultivo, presentan una combinación de antígenos asociados a diferentes tipos de células hematopoyéticas, tal y como se aprecia en la tabla I (Riddick et al., 1977; Glasser et al., 1986; Tabanelli et al., 1992; Montes et al., 1996).

**TABLA I**

<b>FENOTIPO ANTIGÉNICO CÉLULA DECIDUAL ESTROMAL CULTIVADA</b>	
<b>ANTÍGENO</b>	<b>CITOMETRÍA FLUJO/INMUNOCITOQUIMICA</b>
<b>FILAMENTOS INTERMEDIOS</b>	
Vimentina	+++
Desmina	- (+)*
Citoqueratina	-
<b>ANTÍGENO LEUCOCITARIO COMÚN</b>	
CD45	-
<b>LINAJE CÉLULAS T</b>	
CD1a	++
CD3	-
CD7	-
<b>LINAJE CÉLULAS B</b>	
CD20	++
CD21	+
CD22	-
CD23	+++
CD24	+
CD80(B7-1)**	++
CD86(B7-2)**	++
<b>LINAJE CÉLULAS NK</b>	
CD56	-
<b>LINAJE MIELOMONOCÍTICO</b>	
CD11b	++
CD13	+++
CD14	-
CD15	-

CD16	+++
CD33	-
CD36	++
<b>CÉLULAS FOLICULARES DENDRÍTICAS</b>	
DRC-1	++
<b>OTROS</b>	
PROLACTINA	-(++)*
CD10	+++
CD71	++
HLA-DR	++
CD34	- ***

(Continuación tabla I)

\* Resultados entre paréntesis correspondientes a prolactina y desmina tras el tratamiento con progesterona.

NE: No estudiado.

\*\*CD80: Presente en linfocitos B (dependiente de activación), macrófagos, monocitos (marcador de desarrollo) y células foliculares dendríticas.

\*\* CD86: Presente en linfocitos B (dependiente de activación), macrófagos y monocitos (marcador de desarrollo).

\*\*\* Objeto de estudio en este trabajo.

Esta combinación de antígenos, asociados a células hematopoyéticas expresados por las DSC ha propiciado que algunos autores las hayan considerado pertenecientes al linaje hematopoyético (Lysiak y Lala 1992). Ahora bien, son negativas para CD45 (Montes et al., 1996), y presentan algunas características de las células mesenquimales, lo que contradeciría esta hipótesis (Oliver et al., 1999). El CD45 es una tirosín fosfatasa también conocida como antígeno leucocitario común, (leukocyte common antigen, LCA) que está presente en todas las células humanas de origen hematopoyético con excepción de los eritrocitos, las plaquetas y sus precursores celulares, y que juega un papel crítico en la activación de los linfocitos. Codificado por un único gen, el CD45 es una proteína que

cuenta con muchas isoformas diferentes fruto de un procesamiento alternativo del ARN. Todas las células hematopoyéticas, con excepción de las comentadas, son positivas para una o varias de las isoformas de CD45, cuya expresión es aproximadamente un 10% de todas las moléculas que se localizan en superficie.

CD10 es un antígeno expresado tan intensamente por ESC y DSC (Imai et al., 1992) que se utiliza para identificar a estas células en la decidua (Montes et al., 1995). No obstante, el CD10 es expresado también por los neutrófilos en la decidua. Sin embargo, las diferencias morfológicas y antigénicas permiten distinguir fácilmente estos dos tipos celulares (Imai et al., 1992). CD10 y CD13 modularían el metabolismo de los diferentes péptidos bioactivos contribuyendo, bien al normal desarrollo del embarazo, bien al rechazo del mismo, pudiendo utilizarse como marcadores de superficie del endometrio (Imai et al., 1992).

Parte del objeto del presente trabajo es diferenciar entre una posible adscripción de éstas células a un linaje estromal/mesenquimal, o al linaje hematopoyético. Para estudiar las DSC fue necesario establecer un medio de purificación porque la decidua humana contiene elevadas proporciones de leucocitos (Bulmer 1995) que podrían contaminar los cultivos y llevarnos a conclusiones del todo erróneas (Ruiz et al., 1997). Nuestro grupo de investigación, ya con anterioridad había conseguido cultivos de DSC (Montes y col. 1995; Olivares y col. 1997; Oliver y col. 1999) que permitió obtener un fenotipo aproximado de estas células y conducirnos al estudio de sus funciones. No obstante hay que decir que la elevada proporción de suero fetal bovino (FBS) que suplementaba el medio de cultivo que empleábamos podía haber modificado el fenotipo antigénico, pues como publicaron Tsunoda et al., en 1990, la elevada presencia de FBS podía inhibir la expresión de ciertos antígenos. Es por esto que en esta tesis, nos ocupamos de aislar, purificar y cultivar DSC en un medio fibroblástico comercial, en el que la proporción de FBS se reduce al 2%, para luego comparar el fenotipo establecido con anterioridad con el obtenido en este trabajo

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

La negatividad de CD45 (Montes et al., 1996) unido a la expresión de otros antígenos de carácter eminentemente estromal, ponían en duda las teorías que afirman que las DSC, aunque células con actividad inmunológica, son células de carácter

hematopoyético. La asociación de antígenos mielomonocíticos y de células B, incluyendo los receptores del complemento (CR2, CR3), así como la expresión de HLA de clase II (Tabla I), recuerda a la batería antigénica de las células foliculares dendríticas de los folículos linfoides (FDC, follicular dendritic cell) (Schriever y Nadler 1992). La relación de las DSC con las FDC se confirma por la expresión por DSC de un marcador específico de FDC, el antígeno DRC-1 (Naiem et al., 1983) (Tabla I), y la ausencia de CD45 en ambos tipos de células (Montes y et al., 1996).

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

Desde hace años se ha venido constatando la capacidad de las ESC para producir y secretar citocinas (Casey et al., 1989; Tabibzadeh et al., 1989; Arici et al., 1993; Dudley et al., 1993; Hatayama et al., 1994), producción que se encuentra sujeta a regulación por las interacciones con las células circundantes y las moléculas que estas producen.

Se ha demostrado que ESC y DSC son capaces de producir y secretar IL6 (Tabibzadeh et al., 1989; Olivares et al., 1997), IL8 (Nasu et al., 1988, Arici et al., 1993; Dudley et al., 1993;; Bergqvist et al., 2000), IL10 (Dudley et al., 1997; Trautman et al., 1997), IL15 (Dunn et al., 2003), Factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF, macrophage colony-stimulating factor) (Hatayama et al., 1994; Nasu et al., 1998; 2001), Proteína quimiotáctica de macrófagos (MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1) (Nasu et al., 1998; 2001), LIF y VEGF (vascular endothelial growth factor) (Sugino et al., 2002), TNF $\alpha$  (Casey et al., 1989) y Prostaglandina E y F (Khan et al., 1992).

Podríamos dividir a las citocinas en dos grupos; las pro-decidualizadoras, y las inhibidoras de la decidualización. IL11, inducida por la progesterona, prepara al endometrio humano para una posible implantación. La neutralización de la IL11 endógena con un anticuerpo anti-human IL11 apropiado reduce la presencia de los marcadores de decidualización PRL e IGFBP-1 (Dimitriadis et al., 2002). Durante la decidualización las DSC también producen LIF, VEGF (vascular endothelial growth factor) (von Wolf et al., 2000) e IL15 (Dunn et al., 2003). El factor de crecimiento endotelial y sus receptores aumentan en presencia de progesterona (Sugino et al., 2002), y, por tanto, al producirse la diferenciación. En aquellas gestaciones en las que, por alguna razón patológica, se producen niveles inferiores de

progesterona y hCG, LIF mRNA se encuentra disminuido, lo que llevaría aparejado el inevitable aborto (Xia et al., 2001).

La IL10 (producida por células deciduales humanas y las trofoblásticas (Dudley et al., 1997; Trautman et al., 1997), se perfila como un mediador crucial en el mantenimiento del embarazo (Chaouat et al., 1996), habiendo sido capaz de prevenir los abortos inducidos por elevados niveles de Th1 en ratonas, a la vez que la administración de un anticuerpo monoclonal anti-IL10 producen en estas mismas el aborto (Chaouat et al., 1995). Ambos genes, para IL10 e IL10R, se encuentran presentes en las células deciduales humanas, y su expresión está regulada positivamente en el endometrio gestante frente al cíclico.

En el lado opuesto, IL1 y TNF, inhiben la decidualización (Kariya et al., 1991; Jikihara et al., 1994) no sólo a nivel morfológico, sino también en lo que a expresión de marcadores de diferenciación se refiere, demostrándose que los cultivos de DSC o ESC tratados con IL1 secretaban hasta un 40% de PRL y un 85% IGFBP-1 menos que aquellos cultivos no tratados (Frank et al., 1995).

Durante el proceso de decidualización *in vitro* con progesterona, el tratamiento con IL1 $\beta$  es capaz de reducir la secreción de IL15 por las DSC, interleuquina que se produce consecuencia del normal fenómeno de diferenciación bajo la mencionada hormona esteroidea como ya hemos comentado, a la vez que estimula la producción de IL8 (Okada et al., 2004).

La IL1 actúa en las ESC inhibiendo la expresión del mRNA de la connexina43 (la proteína principal en las uniones intercelulares del músculo cardíaco y del músculo liso), que llevaría aparejado un descenso en la comunicación entre células endometriales estromales (Semer et al., 1991).

IL1 $\beta$  en conjunción con INF $\gamma$ , que a elevados niveles se asocian al desencadenamiento de aborto, incrementa la producción de IL6 tanto en ESC como en DSC (Van Snick et al., 1990), una molécula que podríamos decir se halla en función opuesta a la decidualización si tenemos en cuenta que el tratamiento con estradiol disminuye su producción en ESC (Tabibzadeh et al., 1989), y la progesterona hace lo mismo en DSC (Montes et al., 1995).

Las DSC secretan proteínas quimiotácticas de granulocitos (granulocyte chemotactic protein-2 (GCP-2), producción que se estimula con IL1, TNF y LPS, pero no con INF $\gamma$ , pudiendo estar involucrados los niveles de GCP-2 en el desarrollo de los procesos

patológicos ó fisiopatológicos del embarazo, al regular el tráfico de neutrófilos en el endometrio (Mine et al., 2003).

Otros mediadores producidos por las células deciduales estromales son las prostaglandinas (PGs) E2 y F2 $\alpha$ , de hecho las DSC podrían ser una importante fuente de prostaglandinas desencadenantes del parto, constatándose un aumento significativo no sólo en cuanto a la producción de PGs se refiere, sino de células positivas para la ciclooxigenasa en aquellas DSC aisladas tras el alumbramiento (Khan et al., 1992).

La IL1 $\beta$  estimula a las DSC a producir PGE y PGF2 $\alpha$  de forma dosis-dependiente, producción asociada a un incremento en el número de células COX-2 positivas. Progesterona y dexametasona inhiben esta producción de PGs inducida por IL1 $\beta$ , y afecta negativamente al número de células COX-2 positivas. Ni IL1 $\beta$  ni los esteroides parecen afectar a las células COX-1 positivas. COX-2 parece ser la enzima que controlaría la producción de prostaglandinas en las células deciduales humanas, y se vería negativamente regulada por la progesterona (Ishihara et al., 1995).

### **10.5 - Fagocitosis.**

Aunque en un principio Searle et al. (1991) publicaron que la actividad fagocítica en la decidua era debida a la presencia de macrófagos, había otro conjunto celular presentador de antígenos (diferente a los macrófagos) que identificaron como una población similar a las células dendríticas (Oksenberg et al., 1986), que necesitaría internalizar los antígenos para posteriormente mostrarlos en superficie. Ruiz et al., (1997) demostraron que esas células podían ser las DSC, las cuales eran, capaces de fagocitar partículas, siendo una actividad que desciende con la maduración celular (durante la decidualización bajo el efecto de la progesterona; Kariya et al., 1991; Montes et al., 1996).

La IL1 activa la fagocitosis de las DSC mientras que la progesterona la reduce, hay resultados que sugieren la existencia de una red inmunológico-endocrina que involucra a las DSC, y según la cual IL1 y TNF primarían las funciones inmunológicas de las mismas para la defensa contra una posible infección ó, inclusive la eliminación del trofoblasto en situaciones patológicas, mientras que la progesterona favorecería el crecimiento fetal y el estado gestacional por inhibición de las funciones mencionadas (Ruiz et al., 1997).

### **10.6 - Las células deciduales estromales como células presentadoras del antígeno.**

Las células presentadoras de antígeno (antigen-presenting cell, APC) del tejido decidual de ratón, son capaces de procesar antígenos administrados intravenosamente y presentarlos en una forma reconocible para los linfocitos T *in vivo*, habilidad que se reduce cuando se administran anticuerpos anti-clase II (Matthews et al., 1988). Las ESC humanas también son capaces de estimular eficientemente la proliferación de linfocitos T, estímulo que se ve inhibido si tratamos así mismo con un anticuerpo anti-clase II (Oksenberg et al., 1986). Estas APC deciduales clase II +, aisladas de un tejido decidual normal expuestas a tejido fetal *in vitro* inducen la producción de células T supresoras requiriéndose para ello que las células embrionarias usadas en los ensayos *in vitro* sean estables y se encuentren totalmente intactas. Esto no sucede si las APC HLAII+ han sido aisladas de sangre periférica. La inducción de esta población de linfocitos T supresores está regulada por el sistema principal de histocompatibilidad, pudiendo ser HLA-DR la más importante (Oksenberg et al., 1988).

Las DSC humanas purificadas expresan CD80 y CD86, lo que unido a la presencia de antígenos de clase II, tres moléculas expresadas por las APC profesionales, sugiere que las DSC pudieran desempeñar esta función. El hecho de que las DSC, además, sean capaces de estimular células T alogénicas confirma esta posibilidad (Olivares et al., 1997). La actividad fagocítica, también demostrada en las DSC (Ruiz et al., 1997) es un dato más que favorece esta hipótesis.

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

Estroma es un viejo término histológico que viene a designar aproximadamente todas aquellas partes “no esenciales” de un tejido (generalmente conectivo), mientras que el término parénquima (tejido epitelial), alude a la parte funcional del mismo, y aunque ambas acepciones están vigentes, hoy día sabemos que el estroma es algo más que un tejido conectivo. La decidua, por ejemplo, posee un estroma que está compuesto predominantemente de leucocitos y DSC, células que participan activamente en el remodelado, proliferación e incluso adaptación del tejido a un posible blastocisto (Kelly et al., 2001).



Aunque las actividades y fenotipo inmunológicos descritos para las DSC y ESC (Tabibzadeh et al., 1989; Dudley et al., 1993; Montes et al., 1995; Olivares et al., 1997; Ruiz et al., 1997), así como el posible origen en la médula ósea de las DSC murinas (Lysiak y Lala 1992), sugerían que estas células eran auténticas células de carácter hematopoyético (Lysiak y La la 1992; Montes et al., 1996), la morfología fusiforme de las DSC, su capacidad para producir proteínas de la matriz extracelular, así como para auto-renovarse, han propiciado que tradicionalmente se las halla considerado células similares a los fibroblastos, es decir, células estromales (Oliveira et al., 1991). La relación DSC fibroblasto poco a poco se ha visto sustentada por diferentes funciones que ambos tipos de células comparten, por ejemplo la capacidad que tienen los fibroblastos de la dermis para secretar PRL (Richards y Hartman 1996), como ya hemos dicho que hacen las células estromales deciduizadas (Riddick y Kusmick 1977; Tabanelli et al., 1992). Más aún, el antígeno Thy-1, expresado por fibroblastos (Linge et al., 1989), se detecta en todas las DSC (Fernández-Shaw et al., 1992). Además, las DSC son positivas para la  $\alpha$ -SM-actina, microfilamento detectado sólo en células de origen mesenquimal (Darby et al., 1990), lo que claramente demuestra un linaje de tipo mesenquimal más que hematopoyético, en contra de lo defendido por diversos autores (Lysiak y Lala 1992; Montes et al., 1995).

La desmina, es otro filamento citoesquelético para el que son positivas las DSC (Glasser y Julian 1986; Tabanelli et al., 1992), se encuentra solamente en ciertas células mesenquimales. La expresión de vimentina (V) y  $\alpha$ -SM-actina (A) en pre-DSC (fenotipo VA) y de vimentina,  $\alpha$ -SM-actina y desmina (D) en DSC (fenotipo VAD) relaciona estas células con un tipo particular de fibroblasto, el miofibroblasto, que presenta tanto el fenotipo VA como el VAD, así como con células vasculares de músculo liso y pericitos (VAD+) (Schürch et al., 1992). Además, el hecho de que las pre-DSC se localicen circundando las arteriolas uterinas (Ferenczy y Guralnick 1983; Kelly et al., 2001), lugar donde típicamente se sitúan los pericitos (Schürch et al., 1992), confirmaría la relación entre estos tipos celulares.

Las actividades inmunológicas de las DSC y la expresión de antígenos hematopoyéticos no contradice esta relación entre DSC y miofibroblastos en cuanto al posible origen mesenquimal de las células deciduales estromales, pues los fibroblastos también expresan antígenos asociados a células hematopoyéticas (Pechhold et al., 1997; Sempowski et al.,

1997), secretan citocinas (Sempowski et al., 1997), coestimulan la proliferación de los linfocitos T (Roberts et al., 1997; Sempowski et al., 1997), y parecen estar implicados en el rechazo de tejidos transplantados (Pedagogos et al., 1997).

Los miembros de la familia de los miofibroblastos presentan actividades contráctiles, (por ejemplo, el papel de los miofibroblastos en la retracción de las heridas ó la modulación del flujo sanguíneo por los pericitos), junto a ciertas actividades inmunológicas (Pedagogos et al., 1997; Roberts et al., 1997). En el caso de las DSC, las actividades de carácter inmunológico si aparecen recogidas en la bibliografía (Tabibzadeh et al., 1989; Dudley et al., 1993; Montes et al., 1995; Olivares et al., 1997; Ruiz et al., 1997), no es el caso, en cambio de la actividad contráctil, aún no planteada por ningún grupo de investigación. De manera que, uno de los objetivos de esta tesis será, teniendo en cuenta la expresión de  $\alpha$ -SM-actina y la observación ultraestructural de multitud de microfilamentos que surcan el citoplasma tanto de pre-DSC como de DSC, comprobar su posible actividad contráctil, y la modulación de la misma en respuesta a citocinas de carácter proinflamatorio o no.

## 11 - REFERENCIAS

1. Aarli A, Kristoffersen EK, Jensen TS, Ulvestad E, Matre R. Suppressive effect on lymphoproliferation in vitro by soluble annexin II released from isolated placental membranes. *Am J Reprod Immunol.*1997; 38:313-9.
2. Aarli A, Matre R. Suppression of immunoglobulin secretion by soluble annexin II. *Scand J Immunol.*1998; 48: 522-6.
3. Ace CI, Okulicz WC. Differential gene regulation by estrogen and progesterone in the primate endometrium. *Mol Cell Endocrinol.*1995; 115: 95-103.
4. Aggarwal BB. *Human Cytokines*. London: Blackwell Science; 1998.
5. Agrawal S, Pandey MK. The potential role of HLA-G polymorphism in maternal tolerance to the developing fetus. *J Hematother Stem Cell Res.*2003; 12: 749-56 .
6. Arici A, Head JR, MacDonald PC, Casey ML. Regulation of interleukin-8 gene expression in human endometrial cells in culture. *Mol Cell Endocrinol.*1993; 94: 195-204.
7. Ashkar AA, Croy BA. Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. *Biol Reprod.*1999; 61: 493-502.
8. 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.
9. Athanassakis I, Aifantis Y, Ranella A, Vassiliadis S. Production of embryotoxic IgG antibodies during IFN-gamma treatment of pregnant mice. *Am J Reprod Immunol.*1996; 36: 111-7.
10. Bamberger AM, Schulte HM, Thunke I, Erdmann I, Bamberger CM, ASA SL. Expression of the apoptosis-inducing Fas ligand (FasL) in human first and third trimester placenta and choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab.*1997; 82: 3173-5.

11. Bergqvist A, Nejaty H Froyso B Bruse C Carlberg M Sjoblom P Soder O. Production of interleukins 1beta, 6 and 8 and tumor necrosis factor alpha in separated and cultured endometrial and endometriotic stromal and epithelial cells. *Gynecol Obstet Invest.*2000; 50: 1-6.
12. Billingham RE, Medawar. Actively acquired tolerance' of foreign cells. *Nature* 1953, 172:603-606.
13. Blois SM, Joachim R Kandil J Margni R Tometten M Klapp BF Arck PC. Depletion of CD8+ cells abolishes the pregnancy protective effect of progesterone substitution with dydrogesterone in mice by altering the Th1/Th2 cytokine profile. *J Immunol.*2004; 172: 5893-9.
14. Bouma GJ, van Caubergh P van Bree SP Castelli-Visser RM Witvliet MD van der Meer-Prins EM van Rood JJ Claas FH. Pregnancy can induce priming of cytotoxic T lymphocytes specific for paternal HLA antigens that is associated with antibody formation. *Transplantation.*1996; 62: 672-8 .
15. Braud VM, Allan DS O'Callaghan CA Soderstrom K D'Andrea A Ogg GS Lazetic S Young NT Bell JI Phillips JH Lanier LL McMichael AJ. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature.*1998; 391: 795-9.
16. Bulmer D, Peel S. An autoradiographic study of cellular proliferation in the uterus and placenta of the pregnant rat. *J Anat.*1974; 117: 433-41 .
17. Bulmer JN, Hagin SV Browne CM Billington WD. Localization of immunoglobulin-containing cells in human endometrium in the first trimester of pregnancy and throughout the menstrual cycle. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*1986; 23: 31-44 .
18. Bulmer JN, Rodeck C Adinolfi M. Immunohistochemical characterization of cells retrieved by transcervical sampling in early pregnancy. *Prenat Diagn.*1995; 15: 1143-53 .
19. Casey ML, Cox SM Beutler B Milewich L MacDonald PC. Cachectin/tumor necrosis factor-alpha formation in human decidua. Potential role of cytokines in infection-induced preterm labor. *J Clin Invest.*1989; 83: 430-6.
20. Chang MD, Pollard JW Khalili H Goyert SM Diamond B. Mouse placental macrophages have a decreased ability to present antigen. *Proc Natl Acad Sci U S*

A.1993; 90: 462-6 .

21. Chao KH, Wu MY Chen CD Yang JH Yang YS Ho HN. The expression of killer cell inhibitory receptors on natural killer cells and activation status of CD4+ and CD8+ T cells in the decidua of normal and abnormal early pregnancies. *Hum Immunol.*1999; 60: 791-7.
22. Chaouat G, Assal Meliani A Martal J Raghupathy R Elliot J Mosmann T Wegmann TG. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau. *J Immunol.*1995; 154: 4261-8.
23. Chaouat G, Ledee-Bataille N Dubanchet S Zourbas S Sandra O Martal J. TH1/TH2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the TH1/TH2 paradigm. *Int Arch Allergy Immunol.*2004; 134: 93-119.
24. Chaouat G, Menu E de Smedt D Khrihnan L Hui L Assal Meliani A Martal J Raghupathy R Wegmann TG. The emerging role of IL-10 in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.*1996; 35: 325-9 .
25. Charnock-Jones DS, Sharkey AM Fenwick P Smith SK. Leukaemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time. *J Reprod Fertil.*1994; 101: 421-6 .
26. Chen HF, Chao KH Shew JY Yang YS Ho HN. Expression of leukemia inhibitory factor and its receptor is not altered in the decidua and chorionic villi of human anembryonic pregnancy. *Hum Reprod.*2004; 19: 1647-54.
27. Classen-Linke I, Muller-Newen G Heinrich PC Beier HM von Rango U. The cytokine receptor gp130 and its soluble form are under hormonal control in human endometrium and decidua. *Mol Hum Reprod.*2004; 10: 495-504.
28. Condon JC, Jeyasuria P Faust JM Wilson JW Mendelson CR. A decline in the levels of progesterone receptor coactivators in the pregnant uterus at term may antagonize progesterone receptor function and contribute to the initiation of parturition. *Proc Natl Acad Sci U S A.*2003; 100: 9518-23.

29. Constant SL and Bottomly K. Induction of TH1 and TH2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Ann Rev Immunol* 1997;15:297-322.
30. Coumans B, Thellin O Zorzi W Melot F Bougoussa M Melen L Zorzi D Hennen G Igout A Heinen E. Lymphoid cell apoptosis induced by trophoblastic cells: a model of active foeto-placental tolerance. *J Immunol Methods*.1999; 224: 185-96.
31. Croy BA, Di Santo JP Greenwood JD Chantakru S Ashkar AA. Transplantation into genetically alymphoid mice as an approach to dissect the roles of uterine natural killer cells during pregnancy--a review. *Placenta*.2000; 21 Suppl A: S77-80.
32. Darby I, Skalli O Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest*.1990; 63: 21-9.
33. de Moraes-Pinto MI, Vince GS Flanagan BF Hart CA Johnson PM. Localization of IL-4 and IL-4 receptors in the human term placenta, decidua and amniochorionic membranes. *Immunology*.1997; 90: 87-94.
34. Dimitriadis E, Robb L Salamonsen LA. Interleukin 11 advances progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod*.2002; 8: 636-43.
35. Dongari-Bagtzoglou, A. I. Warren W. D. Berton M. T. CD40 expression by gingival fibroblasts: correlation of phenotype with function. *Int.Immunol*.1997;9,.1233-41 .
36. Dosiou C, Lathi RB Tulac S Huang ST Giudice LC. Interferon-related and other immune genes are downregulated in peripheral blood leukocytes in the luteal phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*.2004; 89: 2501-4 .
37. Dudley DJ, Chen CL Branch DW Hammond E Mitchell MD. A murine model of preterm labor: inflammatory mediators regulate the production of prostaglandin E2 and interleukin-6 by murine decidua. *Biol Reprod*.1993; 48: 33-9.
38. Dudley DJ, Edwin SS Dangerfield A Jackson K Trautman MS. Regulation of decidual cell and chorion cell production of interleukin-10 by purified bacterial products. *Am J Reprod Immunol*.1997; 38: 246-51.

39. Dudley DJ, Trautman MS Mitchell MD. Inflammatory mediators regulate interleukin-8 production by cultured gestational tissues: evidence for a cytokine network at the chorio-decidual interface. *J Clin Endocrinol Metab.*1993; 76: 404-10.
40. Dudley DJ, Trautman MS Araneo BA Edwin SS Mitchell MD. Decidual cell biosynthesis of interleukin-6: regulation by inflammatory cytokines. *J Clin Endocrinol Metab.*1992; 74: 884-9.
41. Dunn CL, Critchley HO Kelly RW. IL-15 regulation in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.*2002; 87: 1898-901.
42. Dunn CL, Kelly RW Critchley HO. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod Biomed Online.*2003; 7: 151-61.
43. Ellis SA, Palmer MS McMichael AJ. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. *J Immunol.*1990; 144: 731-5.
44. Ferenczy, A. and Guralnick M. Endometrial microstructure: structure–function relationships throughout the menstrual cycle. *Semin.Reprod.Endocrinol.*1983, 1, 205–12 .
45. Fernandez-Shaw S,Shorter SC,Naish CE,Barlow DH,Starkey PM.Isolation and purification of human endometrial stromal and glandular cells using immunomagnetic microspheres. *Hum Reprod.*1992 ;7:156-61.
46. Finn CA. Why do women menstruate? Historical and evolutionary review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*1996; 70: 3-8.
47. Finn CA. Menstruation: a nonadaptive consequence of uterine evolution. *Q Rev Biol.*1998; 73: 163-73.
48. Frank GR, Brar AK Jikihara H Cedars MI Handwerger S. Interleukin-1 beta and the endometrium: an inhibitor of stromal cell differentiation and possible autoregulator of decidualization in humans. *Biol Reprod.*1995; 52: 184-91.
49. Glasser SR, Julian J. Intermediate filament protein as a marker of uterine stromal cell decidualization. *Biol Reprod.*1986; 35: 463-74.

50. Goerdts S, Politz O Schledzewski K Birk R Gratchev A Guillot P Hakiy N Klemke CD Dippel E Kodelja V Orfanos CE. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology*.1999; 67: 222-6.
51. Goldman-Wohl, D. S. Ariel I. Greenfield C. Lack of human leukocyte antigen-G expression in extravillous trophoblasts is associated with pre-eclampsia. *Mol.Hum.Reprod*.2000, 6, 88–95.
52. Graham CH, Lala PK. Mechanisms of placental invasion of the uterus and their control. *Biochem Cell Biol*.1992; 70: 867-74.
53. Griffith TS, Brunner T Fletcher SM Green DR Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*.1995; 270: 1189-92.
54. Gubbay O, Critchley HO Bowen JM King A Jabbour HN. Prolactin induces ERK phosphorylation in epithelial and CD56(+) natural killer cells of the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*.2002; 87: 2329-35.
55. Hara, N. Fujii T. Yamashita T. Altered expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblasts in preeclampsia: immunohistochemical demonstration with anti-HLA-G specific antibody `87G' and anti-cytokeratin antibody `CAM5. 2'. *Am.J.Reprod.Immunol*.1996, 36, 349–358.
56. Hatayama H, Kanzaki H Iwai M Kariya M Fujimoto M Higuchi T Kojima K Nakayama H Mori T Fujita J. Progesterone enhances macrophage colony-stimulating factor production in human endometrial stromal cells in vitro. *Endocrinology*.1994;135: 1921-7.
57. Heikkinen J, Mottonen M Alanen A Lassila O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol*.2004; 136: 373-8 .
58. Heikkinen J, Mottonen M Komi J Alanen A Lassila O. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. *Clin Exp Immunol*.2003; 131: 498-505 .
59. Hempstock J, Cindrova-Davies T Jauniaux E Burton GJ. Endometrial glands as a source of nutrients, growth factors and cytokines during the first trimester of human pregnancy: a morphological and immunohistochemical study. *Reprod Biol Endocrinol*.2004; 2:58.



60. Hertig AT, Rock J Adams EC Menkin MC. Thirty-four fertilized human ova, good, bad and indifferent, recovered from 210 women of known fertility; a study of biologic wastage in early human pregnancy. *Pediatrics*.1959; 23: 202-11 .
61. Hiby SE, King A Sharkey AM Loke YW. Human uterine NK cells have a similar repertoire of killer inhibitory and activatory receptors to those found in blood, as demonstrated by RT-PCR and sequencing. *Mol Immunol*.1997; 34: 419-30.
62. Hill JA. T-helper 1-type immunity to trophoblast: evidence for a new immunological mechanism for recurrent abortion in women. *Hum Reprod*.1995; 10 Suppl 2: 114-20.
63. Holmes CH, Simpson KL Wainwright SD Tate CG Houlihan JM Sawyer IH Rogers IP Spring FA Anstee DJ Tanner MJ. Preferential expression of the complement regulatory protein decay accelerating factor at the fetomaternal interface during human pregnancy. *J Immunol*.1990; 144: 3099-105.
64. Honig A, Rieger L Kapp M Sutterlin M Dietl J Kammerer U. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance. *J Reprod Immunol*.2004; 61: 79-86.
65. Imai K, Maeda M Fujiwara H Okamoto N Kariya M Emi N Takakura K Kanzaki H Mori T. Human endometrial stromal cells and decidual cells express cluster of differentiation (CD) 13 antigen/aminopeptidase N and CD10 antigen/neutral endopeptidase. *Biol Reprod*.1992; 46: 328-34.
66. Ishihara O, Matsuoka K Kinoshita K Sullivan MH Elder MG. Interleukin-1 beta-stimulated PGE2 production from early first trimester human decidual cells is inhibited by dexamethasone and progesterone. *Prostaglandins*.1995; 49: 15-26.
67. Jerzak M, Bischof P. Apoptosis in the first trimester human placenta: the role in maintaining immune privilege at the maternal-foetal interface and in the trophoblast remodelling. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*.2002; 100: 138-42.
68. Jerzak M, Kasprzycka M Wierbicki P Kotarski J Gorski A. Apoptosis of T cells in the first trimester human decidua. *Am J Reprod Immunol*.1998; 40: 130-5.

69. Jikihara H, Handwerger S. Tumor necrosis factor-alpha inhibits the synthesis and release of human decidual prolactin. *Endocrinology*.1994; 134: 353-7.
70. Johnson PM, Risk JM Mwenda JM. Human trophoblast expression of retroviral like activity and CD46 (membrane cofactor protein,Hu Ly-m5 and H316 TLX antigen). Elsevier Science 1990:125-131.
71. Ju Z, Fan L Lu L. Study on normal pregnancy and recurrent spontaneous abortions from helper T cell 1/helper T cell 2 cytokines balance. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*.2000; 35: 473-5.
72. Kanai T, Fujii T Kozuma S Yamashita T Miki A Kikuchi A Taketani Y. Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. *Mol Hum Reprod*.2001; 7: 195-200.
73. Kariya M, Kanzaki H Takakura K Imai K Okamoto N Emi N Kariya Y Mori T. Interleukin-1 inhibits in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*.1991; 73: 1170-4 .
74. Kelly RW, King AE Critchley HO. Cytokine control in human endometrium. *Reproduction*.2001; 121: 3-19.
75. Khakoo SI, Rajalingam R Shum BP Weidenbach K Flodin L Muir DG Canavez F Cooper SL Valiante NM Lanier LL Parham P. Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans. *Immunity*.2000; 12: 687-98.
76. Khan H, Ishihara O Sullivan MH Elder MG. Changes in decidual stromal cell function associated with labour. *Br J Obstet Gynaecol*.1992; 99: 10-2.
77. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev*.2003; 8: 223-46.
78. King A, Allan DS Bowen M Powis SJ Joseph S Verma S Hiby SE McMichael AJ Loke YW Braud VM. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur J Immunol*.2000; 30: 1623-31.

79. King A, Gardner L Loke YW. Evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in uterine mucosal lymphocytes. *Hum Reprod* 1996; 11:1079–82 .
80. King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update*.2000; 6: 28-36.
81. Kojima K, Kanzaki H Iwai M Hatayama H Fujimoto M Narukawa S Higuchi T Kaneko Y Mori T Fujita J. Expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor in human placenta: a possible role for LIF in the growth and differentiation of trophoblasts. *Hum Reprod*.1995; 10: 1907-11 .
82. Koopman LA, Kopcow HD Rybalov B Boyson JE Orange JS Schatz F Masch R Lockwood CJ Schachter AD Park PJ Strominger JL. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med*.2003; 198: 1201-12.
83. Kovats S, Main EK Librach C Stubblebine M Fisher SJ DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science*.1990; 248: 220-3.
84. Krasnow JS, Tollerud DJ Naus G DeLoia JA. Endometrial Th2 cytokine expression throughout the menstrual cycle and early pregnancy. *Hum Reprod*.1996; 11: 1747-54.
85. Krebhiel, RH. Cytochemical studies of the decidua reaction in the rat during early pregnancy and in the production of deciduomata. *Physiol.Zool*.1937 10, 212-223 .
86. Lagadari M, Blois S Margni R Miranda S. Analysis of macrophage presence in murine placenta: influence of age and parity status. *Am J Reprod Immunol*.2004; 51: 49-55 .
87. Lala PK, Chatterjee-Hasrouni S Kearns M Montgomery B Colavincenzo V. Immunobiology of the feto-maternal interface. *Immunol Rev*.1983;75:87-116.
88. Lala PK, Kearns M Colavincenzo V. Cells of the fetomaternal interface: their role in the maintenance of viviparous pregnancy. *Am J Anat*.1984; 170: 501-17 .
89. Le Bouteiller P. The role of HLA-G expression in the embryo during implantation. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*.2004; 33: S9-12.

90. Lee J, Choi BC Cho C Hill JA Baek KH Kim JW. Trophoblast apoptosis is increased in women with evidence of TH1 immunity. *Fertil Steril.*2005; 83: 1047-9.
91. Lee N, Llano M Carretero M Ishitani A Navarro F Lopez-Botet M Geraghty DE. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A.*1998; 95: 5199-204.
92. 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: 1823-34.
93. Lidstrom C, Matthiesen L Berg G Sharma S Ernerudh J Ekerfelt C. Cytokine secretion patterns of NK cells and macrophages in early human pregnancy decidua and blood: implications for suppressor macrophages in decidua. *Am J Reprod Immunol.*2003; 50: 444-52.
94. Linge C, Green MR Brooks RF. A method for removal of fibroblasts from human tissue culture systems. *Exp Cell Res.*1989;185: 519-28.
95. Llano M, Lee N Navarro F Garcia P Albar JP Geraghty DE Lopez-Botet M. HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. *Eur J Immunol.*1998; 28: 2854-63.
96. Loke YW, King A. Immunological aspects of human implantation. *J Reprod Fertil Suppl.*2000;55:83-90.
97. Loke YW, King A. Decidual natural-killer-cell interaction with trophoblast: cytolysis or cytokine production? *Biochem Soc Trans.*2000; 28: 196-8.
98. Lysiak JJ, Lala PK. In situ localization and characterization of bone marrow-derived cells in the decidua of normal murine pregnancy. *Biol Reprod.*1992; 47: 603-13.
99. Matthews CJ, Searle RF. Antigen presenting capacity of murine decidual tissue in vivo. *J Reprod Immunol.*1988; 12: 287-95.

100. Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunol Today*.1999; 20: 469-73.
101. Merviel P, Evain-Brion D Challier JC Salat-Baroux J Uzan S. The molecular basis of embryo implantation in humans. *Zentralbl Gynakol*.2001; 123: 328-39.
102. Mine S, Nasu K Fukuda J Sun B Miyakawa I. Secretion of granulocyte chemotactic protein-2 by cultured human endometrial stromal cells. *Fertil Steril*.2003; 79: 146-50.
103. Miwa T, Song WC. Membrane complement regulatory proteins: insight from animal studies and relevance to human diseases. *Int Immunopharmacol*.2001; 1: 445-59.
104. Miwa T, Sun X Ohta R Okada N Harris CL Morgan BP Song WC. Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored decay accelerating factor (GPI-DAF) and transmembrane DAF gene expression in wild-type and GPI-DAF gene knockout mice using polyclonal and monoclonal antibodies with dual or single specificity. *Immunology*.2001; 104: 207-14.
105. Miyaura H, Iwata M. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J Immunol*.2002; 168: 1087-94.
106. Miyazaki S, Tsuda H Sakai M Hori S Sasaki Y Futatani T Miyawaki T Saito S. Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. *J Leukoc Biol*.2003; 74: 514-22.
107. Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*.2002; 2: 656-63.
108. Montes MJ, Aleman P Garcia-Tortosa C Borja C Ruiz C Garcia-Olivares E. Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with hematopoietic cells. *J Reprod Immunol*.1996; 30: 53-66.
109. Montes MJ, Tortosa CG Borja C Abadia AC Gonzalez-Gomez F Ruiz C Olivares EG. Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am J Reprod Immunol*.1995; 34: 188-94.

110. Moro MH, Bjornsson J Marietta EV Hofmeister EK Germer JJ Bruinsma E David CS Persing DH. Gestational attenuation of Lyme arthritis is mediated by progesterone and IL-4. *J Immunol.*2001; 166: 7404-9.
111. Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 2000;1:199-205 .
112. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73.
113. Munn DH, Zhou M Attwood JT Bondarev I Conway SJ Marshall B Brown C Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science.*1998 ; 281: 1191-3 .
114. Murakoshi H, Matsuo H Laoag-Fernandez JB Samoto T Maruo T. Expression of Fas/Fas-ligand, Bcl-2 protein and apoptosis in extravillous trophoblast along invasion to the decidua in human term placenta. *Endocr J.*2003; 50: 199-207.
115. Naiem M, Gerdes J Abdulaziz Z Stein H Mason DY. Production of a monoclonal antibody reactive with human dendritic reticulum cells and its use in the immunohistological analysis of lymphoid tissue. *J Clin Pathol.*1983; 36: 167-75.
116. Nakajima S, Tanaka T Umesaki N Ishiko O. Leukemia inhibitory factor regulates cell survival of normal human endometrial stromal cells. *Int J Mol Med.*2003; 11: 353-6 .
117. Nasu K, Matsui N Narahara H Tanaka Y Miyakawa I. Effects of interferon-gamma on cytokine production by endometrial stromal cells. *Hum Reprod.*1998; 13: 2598-601.
118. Nasu K, Sugano T Fujisawa K Arima K Narahara H Miyakawa I. Effects of interleukin-4 on the in-vitro production of cytokines by human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod.*2001; 7: 265-70.
119. Ness RB and Roberts JM. Epidemiology of hypertension. Hypertensive disorders in pregnancy 1999:43-66 .

120. Norwitz ER, Schust DJ Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med.*2001; 345: 1400-8.
121. Okada H, Nakajima T Yasuda K Kanzaki H. Interleukin-1 inhibits interleukin-15 production by progesterone during in vitro decidualization in human. *J Reprod Immunol.*2004; 61: 3-12.
122. Oksenberg JR, Mor-Yosef S Persitz E Schenker Y Mozes E Brautbar C. Antigen-presenting cells in human decidual tissue. *Am J Reprod Immunol Microbiol.*1986; 11: 82-8.
123. Oksenberg JR, Mor-Yosef S Ezra Y Brautbar C. Antigen presenting cells in human decidual tissue: III. Role of accessory cells in the activation of suppressor cells. *Am J Reprod Immunol Microbiol.*1988; 16: 151-8.
124. 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.
125. 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: 1211-7.
126. Oliveira SF, Nagata T Abrahamsohn PA Zorn TM. Electron microscopic radioautographic study on the incorporation of 3H-proline by mouse decidual cells. *Cell Mol Biol.*1991; 37: 315-23.
127. 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.
128. Pace D, Morrison L Bulmer JN. Proliferative activity in endometrial stromal granulocytes throughout menstrual cycle and early pregnancy. *J Clin Pathol.*1989; 42: 35-9.
129. Pechhold, K. Patterson N. B. Craighead N. et al. Inflammatory cytokines IFN-gamma plus TNF-alpha induce regulated expression of CD80 (B7-1) but not CD86 (B7-2) on murine fibroblasts. *J.Immunol.*1997, 158, 4921-4929 .

130. Pedagogos E, Hewitson TD Walker RG Nicholis KM Becker GJ. Myofibroblast involvement in chronic transplant rejection. *Transplantation*.1997; 64: 1192-7.
131. Piccinni MP, Beloni L Livi C Maggi E Scarselli G Romagnani S. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med*.1998; 4: 1020-4 .
132. Piccinni MP, Giudizi MG Biagiotti R Beloni L Giannarini L Sampognaro S Parronchi P Manetti R Annunziato F Livi C et al. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol*.1995; 155: 128-33.
133. Piccinni MP, Maggi E Romagnani S. Role of hormone-controlled T-cell cytokines in the maintenance of pregnancy. *Biochem Soc Trans*.2000; 28: 212-5.
134. Piccinni MP, Scaletti C Vultaggio A Maggi E Romagnani S. Defective production of LIF, M-CSF and Th2-type cytokines by T cells at fetomaternal interface is associated with pregnancy loss. *J Reprod Immunol*.2001; 52: 35-43.
135. Piccinni MP, Scaletti C Maggi E Romagnani S. Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy. *J Neuroimmunol*.2000; 109: 30-3.
136. Pijnenborg R, Bland JM Robertson WB Dixon G Brosens I. The pattern of interstitial trophoblastic invasion of the myometrium in early human pregnancy. *Placenta*.1981; 2: 303-16 .
137. Pijnenborg R, Robertson WB Brosens I Dixon G. Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta*.1981; 2: 71-91.
138. Pijnenborg R. Implantation and immunology: maternal inflammatory and immune cellular responses to implantation and trophoblast invasion. *Reprod Biomed Online*.2002;4 Suppl 3:14-7.
139. Polgar B, Kispal G Lachmann M Paar C Nagy E Csere P Miko E Szereday L Varga P Szekeres-Bartho J. Molecular cloning and immunologic characterization of a novel cDNA coding for progesterone-induced blocking factor. *J Immunol*.2003; 171:



5956-63.

140. Ponte M, Cantoni C Biassoni R Tradori-Cappai A Bentivoglio G Vitale C Bertone S Moretta A Moretta L Mingari MC. Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1999; 96: 5674-9.
141. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today*.1997; 18: 478-82.
142. Reading JP, Huffman JL Wu JC Palmer FT Harton GL Sisson ME and Keyvanfar K, Gresinger TH Cochrane WJ Fallon LA. Nucleated erythrocytes in maternal blood: quantity and quality of fetal cells. *Human Reprod* 1995, 10: 2510-15.
143. Reis FM, D'Antona D Petraglia F. Predictive value of hormone measurements in maternal and fetal complications of pregnancy. *Endocr Rev*.2002; 23: 230-57.
144. Reis FM, Vigano P Arnaboldi E Spritzer PM Petraglia F Di Blasio AM. Expression of prolactin-releasing peptide and its receptor in the human decidua. *Mol Hum Reprod*.2002; 8: 356-62 .
145. Richards RG, Brar AK Frank GR Hartman SM Jikihara H. Fibroblast cells from term human decidua closely resemble endometrial stromal cells: induction of prolactin and insulin-like growth factor binding protein-1 expression. *Biol Reprod*.1995; 52: 609-15.
146. Richards RG, Hartman SM. Human dermal fibroblast cells express prolactin in vitro. *J Invest Dermatol*.1996; 106: 1250-5.
147. Riddick DH, Kusmik WF. Decidua: a possible source of amniotic fluid prolactin. *Am J Obstet Gynecol*.1977; 127: 187-90 .
148. Roberts, A. I. Nadler S. C. and Ebert E. C. Mesenchymal cells stimulate human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology*.1997, 113, 144-50 .

149. Roth I, Fisher SJ. IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion. *Dev Biol.*1999; 205: 194-204.
150. Ruiz C, Montes MJ Abadia-Molina AC Olivares EG. Phagocytosis by fresh and cultured human decidual stromal cells: opposite effects of interleukin-1 alpha and progesterone. *J Reprod Immunol.*1997; 33: 15-26.
151. Saito S, Umekage H Sakamoto Y Sakai M Tanebe K Sasaki Y Morikawa H. Increased T-helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.*1999; 41: 297-306 .
152. Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol.*2000; 47: 87-103.
153. Salamonsen LA, Dimitriadis E Jones RL Nie G. Complex regulation of decidualization: a role for cytokines and proteases--a review. *Placenta.*2003; 24 Suppl A: S76-85.
154. Salamonsen LA, Kovacs GT Findlay JK. Current concepts of the mechanisms of menstruation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*1999; 13: 161-79.
155. Salamonsen LA, Nie G Findlay JK. Newly identified endometrial genes of importance for implantation. *J Reprod Immunol.*2002 ; 53: 215-25 .
156. Salamonsen LA, Nie G. Proteases at the endometrial-trophoblast interface: their role in implantation. *Rev Endocr Metab Disord.* 2002; 3: 133-43.
157. Schriver, F and Nadler LM. The central role of follicular dendritic cells in lymphoid tissues. *Immunol.*1992.51, 243-284.
158. Schürch, W. Seemayer T. A. Gabbiani G. Myofibroblast. In Sternberg, S.S. *Histology for Pathologists.*1992 Raven Press, New York, pp.109–144.
159. Semer D, Reisler K MacDonald PC Casey ML. Responsiveness of human endometrial stromal cells to cytokines. *Ann N Y Acad Sci.*1991; 622: 99-110.
160. Sempowski, G. D. Chess P. R. and Phipps R. P. CD40 is a functional activation antigen and B7-independent T cell costimulatory molecule on normal human lung

- fibroblasts. *J.Immunol.*1997, 158, 4670–77.
161. Senturk LM, Arici A. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Am J Reprod Immunol.*1998; 39: 144-51.
162. Sherwin JR, Freeman TC Stephens RJ Kimber S Smith AG Chambers I Smith SK Sharkey AM. Identification of genes regulated by leukemia-inhibitory factor in the mouse uterus at the time of implantation. *Mol Endocrinol.*2004; 18: 2185-95.
163. Siiteri PK, Stites DP. Immunologic and endocrine interrelationships in pregnancy. *Biol Reprod.*1982; 26: 1-14.
164. Spandorfer S, Rosenwaks Z. Embryo implantation: molecular, cellular and clinical aspects. New York: Springer-Verlag, 1999:12-9 .
165. Spornitz UM. The functional morphology of the human endometrium and decidua. *Adv Anat Embryol Cell Biol.*1992;124:1-99.
166. Strassmann BI. The evolution of endometrial cycles and menstruation. *Q Rev Biol.*1996 ; 71: 181-220.
167. 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.
168. Szekeres-Bartho J, Barakonyi A Par G Polgar B Palkovics T Szereday L. Progesterone as an immunomodulatory molecule. *Int Immunopharmacol.*2001; 1: 1037-48.
169. Szekeres-Bartho J, Faust Z Varga P. The expression of a progesterone-induced immunomodulatory protein in pregnancy lymphocytes. *Am J Reprod Immunol.*1995; 34: 342-8.
170. Szekeres-Bartho J, Kilar F Falkay G Csernus V Torok A Pacsa AS. The mechanism of the inhibitory effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: I. Progesterone-treated lymphocytes release a substance inhibiting cytotoxicity and prostaglandin synthesis. *Am J Reprod Immunol Microbiol.*1985; 9: 15-8.

171. Szekeres-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol.*2002; 21: 471-95.
172. Szekeres-Bartho, J. B. Autran P. Debre G. Andreu L. Denver G. Chaouat. Immunoregulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction. *Cell.Immunol.*1989 122:2 .
173. Szekeres-Bartho, J. Gy. Szekeres P. Debre B. Autran G. Chaouat. Reactivity of lymphocytes to a progesterone receptor-specific monoclonal antibody. *Cell. Immunol.* 1990, 125:273.
174. Szekeres-Bartho, J. M. F. Reznikoff-Etievant P. Varga Z. Varga G. Chaouat. Lymphocytic progesterone receptors in human pregnancy. *J.Reprod.Immunol.*1989 16:239 .
175. Tabanelli S, Tang B Gurbide E. In vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.*1992; 42: 337-44.
176. Tabibzadeh S, Lessey B Satyaswaroop PG. Temporal and site-specific expression of transforming growth factor-beta4 in human endometrium. *Mol Hum Reprod.*1998; 4: 595-602.
177. Tabibzadeh S. Molecular control of the implantation window. *Hum Reprod Update.*1998; 4: 465-71.
178. Tabibzadeh SS, Santhanam U Sehgal PB May LT. Cytokine-induced production of IFN-beta 2/IL-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells. Modulation by estradiol-17 beta. *J Immunol.*1989; 142: 3134-9.
179. Thellin O, Coumans B Zorzi W Igout A Heinen E. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Curr Opin Immunol.*2000; 12: 731-7.
180. Trautman MS, Collmer D Edwin SS White W Mitchell MD Dudley DJ. Expression of interleukin-10 in human gestational tissues. *J Soc Gynecol Investig.*1997; 4: 247-53.

181. Trowsdale, J. Travers J. P. Bodmer W. F. Expression of HLA-A, -B, -C and  $\beta$ 2m antigen in human choriocarcinoma cell lines. *J.Exp.Med.*1980, 152, 11–17.
182. Trundley A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens.*2004; 63: 1-12.
183. Vales-Gomez M, Reyburn HT Erskine RA Lopez-Botet M Strominger JL. Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *EMBO J.*1999; 18: 4250-60.
184. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol.*1990; 8: 253-78.
185. Varla-Leftherioti M, Spyropoulou-Vlachou M Keramitsoglou T Papadimitropoulos M Tsekoura C Graphou O Papadopoulou C Gerondi M Stavropoulos-Giokas C. Lack of the appropriate natural killer cell inhibitory receptors in women with spontaneous abortion. *Hum Immunol.*2005; 66: 65-71.
186. Varla-Leftherioti M, Spyropoulou-Vlachou M Niokou D Keramitsoglou T Darlamitsou A Tsekoura C Papadimitropoulos M Lepage V Balafoutas C Stavropoulos-Giokas C. Natural killer (NK) cell receptors' repertoire in couples with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol.*2003; 49: 183-91.
187. Varla-Leftherioti M. Role of a KIR/HLA-C allorecognition system in pregnancy. *J Reprod Immunol.*2004; 62: 19-27.
188. Varla-Leftherioti M. The significance of the women's repertoire of natural killer cell receptors in the maintenance of pregnancy. *Chem Immunol Allergy.*2005; 89: 84-95.
189. Verma S, King A Loke YW. Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine natural killer cells. *Eur J Immunol.*1997; 27: 979-83.
190. Vigano P, Gaffuri B Somigliana E Infantino M Vignali M Di Blasio AM. Interleukin-10 is produced by human uterine natural killer cells but does not affect their production of interferon-gamma. *Mol Hum Reprod.*2001; 7: 971-7.

191. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.*2002; 20: 217-51.
192. von Wolff M, Thaler CJ, Strowitzki T, Broome J, Stolz W, Tabibzadeh S. Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion. *Mol Hum Reprod.*2000; 6: 627-34.
193. Wilcox AJ, Weinberg CR O'Connor JF. Incidence of early loss of pregnancy culture fluid. . *N Engl J Med* 1988; 319: 189-94.
194. Wilson SE, Li Q Weng J Barry-Lane PA Jester JV Liang Q Wordinger RJ. The Fas-Fas ligand system and other modulators of apoptosis in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*1996; 37: 1582-92.
195. Wu X, Li DJ, Yuan MM, Zhu Y, Wang MY. The expression of chemokine receptors in CD56(bright) CD16- natural killer cells and the mechanism of their recruitment in decidua. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.*2004; 84: 1018-23.
196. Xerri L, Devilard E Hassoun J Mawas C Birg F. Fas ligand is not only expressed in immune privileged human organs but is also coexpressed with Fas in various epithelial tissues. *Mol Pathol.*1997; 50: 87-91.
197. Xia L, Yang J Feng S. Expression of leukemia inhibitory factor in the decidua of normal early pregnancy, threatened abortion and inevitable abortion. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.*2001; 36: 657-9.
198. Xu C, Mao D Holers VM Palanca B Cheng AM Molina H. A critical role for murine complement regulator crry in fetomaternal tolerance. *Science.*2000; 287: 498-501.
199. Zorzi W, Thellin O Coumans B Melot F Hennen G Lakaye B Igout A Heinen E. Demonstration of the expression of CD95 ligand transcript and protein in human placenta. *Placenta.*1998; 19: 269-77.
200. Payne SG, Smith SC Davidge ST Baker PN Guilbert LJ. Death receptor Fas/Apo-1/CD95 expressed by human placental cytotrophoblasts does not mediate apoptosis. *Biol Reprod.*1999; 60: 1144-50.

# **OBJETIVOS**

Los **OBJETIVOS A DESARROLLAR** en esta tesis serían, por tanto, los siguientes:

1. Estudiar un sistema de cultivo y purificación de las DSC que pudiera implicar una inhibición de la expresión de antígenos de superficie.
2. Determinar la asignación al linaje hematopoyético o mesenquimal de las DSC.
3. Estando demostrada la similitud ultraestructural y funcional inmunológicas DSC-fibroblasto/miofibroblasto, comprobar si la presencia de  $\alpha$ -SM-actina (marcador de miofibroblastos) tiene, en las DSC, efecto sobre la contractilidad celular.
4. Comprobar si existe o no diferencia en la respuesta contráctil de las DSC a la estimulación con citocinas Th1 y Th2 dado el microambiente de citocinas local diferencial que se produce en la decidua según estemos en situaciones de aborto espontáneo ó gestación normal.



**LAS CÉLULAS DECIDUALES EXPRESAN CD34  
Y STRO-1 Y ESTAN RELACIONADAS CON  
PRECURSORES DE LA MÉDULA ÓSEA**

# Las Células Deciduales Estromales Humanas Expresan CD34 y Stro-1, y Están Relacionadas Con Precursores De La Médula Ósea

---

José Marcos García-Pacheco<sup>1</sup>, Carmen Oliver<sup>2</sup>, Maria Kimatrai<sup>2</sup>, Francisco J. Blanco<sup>2</sup> y Enrique G. Olivares<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Inmunología y Biología Molecular, Hospital do Meixoeiro, Vigo y <sup>2</sup>Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, España.

## INTRODUCCIÓN

El tejido decidual, componente materno de la interfase materno-fetal, está compuesto fundamentalmente de células del tipo estromal típicas, así como de células glandulares y leucocitos (Bulmer, 1995). Las células deciduales estromales (DSC, Decidual Stromal Cell) constituyen un tipo particular de célula que aparece en el endometrio uterino de los mamíferos durante el embarazo, justo después de la implantación del blastocisto. Aunque la función, linaje celular u origen las DSC no son del todo conocidos, clásicamente han sido consideradas como células fibroblásticas con un relevante papel nutricional y endocrino durante la gestación (Riddick and Kusmik, 1977). No obstante, diversos autores han demostrado que las DSC humanas y de ratón, como su equivalente endometrial, las células endometriales estromales (ESC), están implicadas en distintas funciones inmunológicas tales como la producción de citocinas (Dudley et al., 1993; Montes et al., 1995; Nasu et al., 1999; Iwabe et al., 2000), la presentación de antígenos (Olivares et al., 1997) y la fagocitosis (Ruiz et al., 1997). En condiciones inflamatorias y en presencia de citocinas tipo Th1 algunas de estas funciones inmunológicas están incrementadas (Dudley et al., 1993; Ruiz et al., 1997; Arima et al., 2000), a la vez que inhiben el proceso de diferenciación de células deciduales (decidualización) (Kariya et al., 1991, Jikihara et al., 1994; Kanda et al., 1999). Por otra parte, son funciones que se ven mermadas cuando las

DSC o ESC son cultivadas con progesterona para inducir la decidualización (Kariya et al., 1991; Montes et al., 1995; Ruiz et al., 1997; Arici et al., 1999). Estudios previos han confirmado que las DSC expresan antígenos asociados a las células hematopoyéticas (Imai et al., 1992; Montes et al., 1996; Olivares et al., 1997). Este hecho, unido a las funciones inmunológicas previamente descritas, ha llevado a que varios autores propongan a las DSC como auténticas células inmunológicas (Lysiak y Lala, 1992). Sin embargo, el precursor primario de las DSC no está definido claramente. Lysiak y Lala, (1992) identificaron cierta población de células DCS y ESC de ratón con origen en médula ósea (Lysiak y Lala, 1992). No obstante, las DSC humanas exhiben ciertas características propias de células mesenquimales (no-hematopoyéticas) que contradicen la asignación de un origen hematopoyético (Oliver et al., 1999).

Para estudiar las DSC es necesaria la purificación de las células, pues la decidua contiene una elevada proporción de leucocitos (Bulmer, 1995) que podrían contaminar las preparaciones celulares y llevarnos a conclusiones erróneas (Ruiz et al., 1997). Nosotros hemos obtenido previamente cultivos puros de las DSC con los que hemos establecido el fenotipo de dichas células y además hemos podido estudiar sus funciones (Montes et al., 1995, 1996; Olivares et al., 1997; Ruiz et al., 1997; Oliver et al., 1999). Sin embargo, la elevada concentración de suero fetal (Fetal calf serum, FCS) usada entonces en el medio de cultivo podía haber inhibido la expresión de ciertos antígenos de superficie (Tsunoda et al., 1990). Por lo tanto, en este trabajo, nosotros aislamos, purificamos las DSC y las cultivamos en un medio especial para fibroblastos con sólo un 2% de FCS, para estudiar mejor el fenotipo antigénico de estas células. Este método nos ha permitido aislar DSC que presentan un fenotipo más estable, similar al que presentan los precursores estromales descritos por Simmons y Torok-Storb (1991a y b) en médula ósea.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Tejidos.**

Las muestras (n=18) procedieron de interrupciones voluntarias de primer trimestre (semana 6-11) de embarazo de mujeres sanas de entre 20 y 30 años, previo consentimiento

de las mismas. Dichas muestras fueron proporcionadas por la clínica El Sur (Málaga) y Gineclínica (Granada). Este estudio fue aprobado por el Comité Ético y de Investigación del Hospital Universitario San Cecilio, Granada.

### **Medio de cultivo para fibroblastos.**

Según la información proporcionada por la compañía (Sigma, St Louis; MO, USA) el medio de cultivo específico para fibroblastos, Fibroblast medium Kit, contiene: medio basal para fibroblastos (versión modificada del MCDB 105) suplementado con un 2% de FCS, y pequeñas cantidades no especificadas de heparina, hidrocortisona, factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento fibroblástico.

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

Los tejidos deciduales recogidos y procesados fueron examinados histológicamente para excluir la presencia de alguna posible infección ó reacción inflamatoria que pudieran influir en los resultados. Dichas muestras de decidua no se mezclaron en ningún momento para evitar cualquier tipo de reacción alérgica o alteraciones del fenotipo celular por la secreción de citocinas por parte de los leucocitos que inicialmente contaminan la muestra de cultivo. Las muestras se lavaron intensamente con tampón fosfato (phosphate buffered saline, PBS) y la decidua fue cuidadosamente separada del trofoblasto. A continuación la decidua se desmenuzó cuidadosamente con bisturí en un pequeño volumen de medio RPMI 1640 (Sigma) con 100 IU/ml de penicilina y gentamicina (50 ug/ml), para seguidamente ponerla en una solución de tripsina al 5% y de EDTA al 0.2% (Sigma) durante 15 min (minutos) a 37°C. La reacción se detuvo añadiendo medio RPMI 1640 al 20% de FCS (Gibco, Paisley, UK), se filtró la suspensión por una gasa estéril y se centrifugó a 450 g durante 10 min. El pellet se resuspendió en RPMI y se centrifugó sobre un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia) durante 20 min a 600 g. Las células de la interfase se recogieron, se resuspendieron y se lavaron en PBS. La suspensión, que contiene fundamentalmente DSC y leucocitos, fue incubada en RPMI 10% FCS durante 1 h para permitir a los macrófagos, granulocitos y células glandulares que se adhieran al frasco de cultivo. Finalmente se recogió el sobrenadante del frasco de cultivo (formado fundamentalmente por DSC y linfocitos), se volvió a lavar en PBS y se cultivaron las

células en medio para fibroblastos suplementado con 100 IU/ml de penicilina y 50 mg/ml de gentamicina o en medio RPMI completo con FCS al 20%. Después de la incubación durante toda la noche, de manera que las DSC se adhirieron al plástico, se cambió el medio y se eliminaron los linfocitos que permanecían en el sobrenadante, dejando las células adheridas que mayormente son DSC. Ambos tipos de medio de cultivo se cambian dos veces por semana. El crecimiento de las DSC en proliferación es superior a otras células que contaminen la muestra, garantizando aún más la pureza del cultivo. Las células se estudiaron una vez que cubrieron toda la superficie de los 25 cm<sup>2</sup> del frasco de cultivo. Los sobrenadantes de cada frasco fueron recogidos y concentrados 10 veces en un concentrador Minicon (Amicon, Beverly, MA, USA) para estudiar la presencia o no de prolactina mediante inmuno-quimioelectroluminiscencia (Roche, Diagnostics, Indianápolis, IN, USA).

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

La muestra de decidua se lavó con PBS libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> y cuidadosamente fue desmenuzada con bisturí en un pequeño volumen de RPMI al 10% de FCS. La suspensión celular se filtró a través de gasas estériles, se lavó por centrifugación y se suspendió en medio de cultivo, a continuación se centrifugó sobre un gradiente discontinuo de Percoll al 20% y 30% (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) a 650 g durante 30 min. Las células deciduales se recogieron de la interfase entre el 20% y 30% y se lavaron en PBS.

#### **Anticuerpos monoclonales.**

Los anticuerpos monoclonales utilizados (monoclonal antibodies, mAb) aparecen detalladamente en la tabla I.

#### **Citometría de flujo.**

Las células deciduales estromales se despegaron del frasco de cultivo con EDTA al 0.04% a 37°C. Las células fueron centrifugadas, el sobrenadante se desechó y se resuspendieron en PBS a una concentración de 10<sup>6</sup> cel./ml. Para el marcaje directo, 100 µl de la suspensión celular fueron incubados con 10 µl del correspondiente mAb en la oscuridad durante 30 min a 4°C. Después las células fueron lavadas con PBS y se

resuspendieron en un volumen de 1 ml para ser inmediatamente analizadas en el citómetro de flujo (Ortho-Cyturon, Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ, USA). Para identificar las células muertas incubamos las DSC con yoduro de propidio (Sigma). El porcentaje de células positivas para cada anticuerpo fue calculado comparando con el apropiado control isotipo (Tabla I). Para el marcaje doble, seguimos el mismo proceso salvo que se añadió un segundo anticuerpo marcado con una sustancia fluorescente distinta del primero. Para el marcaje indirecto, después del primer anticuerpo se añadió un anticuerpo de cabra frente a inmunoglobulina (Ig) de ratón marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Para el marcaje intracelular, las DSC fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 min a 4°C y permeabilizadas con acetona fría durante 10 min antes de añadir el monoclonal.

### **Cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa.**

Los cebadores usados en este estudio aparecen en la tabla II. Fueron diseñados de acuerdo a las secuencias disponibles en el Genbank ([www2.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank](http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank)) y sintetizados por Genset (Paris, Francia). Con el fin de prevenir cualquier amplificación de ADN contaminante, cuando fue posible, se diseñaron cebadores sentido y antisentido de secuencias localizadas bastante alejadas de los diferentes exones, y fueron comprobados en reacciones de PCR con ARN usado para la síntesis del ADN complementario (ADNc).

### **Reacción en cadena de polimerasa de la transcriptasa inversa (RT)-PCR.**

El ARN total se extrajo usando el kit Ultraspec™, de acuerdo al protocolo proporcionado por la casa comercial (Biotex Laboratories Inc., Houston, TX, USA). La cadena simple de ADNc se obtuvo partiendo de ARN total y usando hexámeros aleatorios (Pharmacy Biotech, Uppsala, Sweden) y la ARNasa transcriptasa inversa M-MLV H (Promega, Madison ,WI,USA). Para la desnaturalización se calentó (65°C) la muestra durante 5 min y se enfrió acto seguido en un termociclador (Geneamp PCR System 9600, Perkin-Elmer, Cetus, Norwalk, CT, USA). La transcripción inversa se realizó con la transcriptasa inversa por espacio de 1 h a 37°C. Empezando con una cantidad de ADNc equivalente a los 75 ng de ARN, la amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 125 µl de la mezcla de amplificación, 10 mmol/l Tris-Cl (pH 8.4), 50 mmol/l KCL, 2

mmol/l MgCL<sub>2</sub>, gelatina al 0.01%, 0.2 mmol/l dNTPs, glicerol al 5%, 0.25 mmol/l de cada cebador y 0.02 IU/ml de ADN Taq polimerasa (Promega). Después de la incubación durante 5 min a 96°C, cada ciclo consistió en 94° C durante 30 s, 57°C por 30 s y 72°C por 30 s, en un total de 32 ciclos. Un total de 1 µl procedente de la primera ronda se usó para una ronda posterior de 32 ciclos. Los productos de la PCR se separaron por tamaño en geles de agarosa al 2%, y en cada gel corrido se incluyó un patrón de 100 pb de DNA en escalera. La visualización fue llevada a cabo mediante tinción con bromuro de etidio.

**Tabla I.** Anticuerpos monoclonales (AcMo) empleados en este estudio

AcMo	Especificidad	Ig subclase	marcaje con <sup>a</sup>	Obtenido de <sup>b</sup>
Control Isotipo	–	IgG1	FITC or PE	Sigma
Control Isotipo	–	IgG2a	FITC or PE	Sigma
Control Isotipo	–	IgM	FITC	Sigma
Anti-CALLA	CD10	IgG1	PE	DAKO
CD13	CD13	IgG1	FITC	CALTAG
CD14	CD14	IgG2a	PE	Sigma
CD15	CD15	IgM	FITC	CALTAG
CD21	CD21	IgG1	FITC	DAKO
BU38	CD23	IgG1	FITC	The Binding Site
CD34	CD34	IgG1	FITC	CALTAG
CD45	CD45	IgG1	FITC	Sigma
CD80	CD80	IgG1	FITC	CALTAG
CD86	CD86	IgG1	FITC	CALTAG

OKDR	HLADR	IgG2a	FITC	OD
STRO-1	STRO-1	IgM	–	DHSB
Anti-follicular dendritic cells	HJ2	IgM	FITC	Sigma
Anti- $\alpha$ -SM <sup>c</sup> actina	$\alpha$ -SM actina	IgG2a	FITC	Sigma
B4-78	Isoenzimas de fosfatasa alcalina hueso/hígado/riñón	IgG1	–	DHSB

<sup>a</sup>FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: Ficoeritrina

<sup>b</sup>Sigma, Saint Louis, MO, USA; Dako, Glostrup, Denmark; CALTAG, San Francisco, CA, USA; The Binding Site, Birmingham, UK; OD, Ortho-Diagnostic System, Raritan, NJ, USA; DHSB: Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA, USA.

<sup>c</sup> $\alpha$ -Smooth muscle actin,  $\alpha$ -SM actina.

## RESULTADOS

### Modulación negativa del CD34 en las células deciduales estromales cultivadas en RPMI 1640 con 20% de FCS.

La figura 1 presenta líneas de DSC cultivadas con RPMI 1640 al 20% de FCS. Aunque la proporción de células positivas para el CD10 es constante, la proporción de células CD34 positivas decrece progresivamente con el tiempo. Después de 8-10 semanas de cultivo, el CD34 desaparece prácticamente de la mayoría de las líneas DSC. Estos resultados explican porqué en nuestras publicaciones anteriores describimos que CD34 no se expresaba en las DSC en cultivo (Montes et al., 1996); en los trabajos precedentes las líneas se estudiaron más tarde (12 semanas de cultivo) que en este trabajo.



**Tabla II.** Secuencias para los cebadores utilizados en la RT-PCR

mRNA	Cebadores	Tamaño producto PCR (bp)
<i>CD10</i>	AACATGGATGCCACCACTGAG-5'	525
	CACATATGCTGTACAAGCCTC-3'	
<i>CD13</i>	AAGCTCAACTACACCCTCAGC-5'	600
	GGGTGTGTCATAATGACCAGC-3'	
<i>CD34</i>	ACAACCTTGAAGCCTAGCCTG-5'	348
	CAAGACCAGCAGTAGACACTG-3'	
<i>Prolactina</i>	GGGTCATTACCAAGGCCATC-5'	276
	TTCAGGATGAACCTGGCTGAC-3'	

### **Fenotipo antigénico de las células deciduales estromales cultivadas en medio para fibroblastos.**

Las líneas celulares obtenidas se mantuvieron en medio para fibroblastos durante 2 a 4 semanas (ver material y métodos) posteriores al cultivo primario, un período más corto que los anteriores cultivos con RPMI al 20% FCS (Montes et al., 1996). Las DSC cultivadas en medio para fibroblastos carecen de la expresión de CD14, CD15 y CD45, mientras que sí expresan CD34 y STRO-1, un antígeno detectado en precursores estromales de la médula ósea (Simmons y Torok-Storb 1991). Otros antígenos detectados en las DSC fueron: CD10, CD13, CD21, CD23, CD80, CD86, HLA-DR, HJ2,  $\alpha$ -SM actina, y fosfatasa alcalina (Alkaline phosphatase, ALP; Tabla III, Fig. 2). El fenotipo antigénico obtenido de las DSC cultivadas en medio para fibroblastos es equivalente al que previamente hemos publicado para las DSC cultivadas en RPMI al 20% de FCS (Montes et al., 1996, Olivares et al., 1997, Oliver et al., 1999), con la excepción de CD34 (Montes et al., 1996), que era

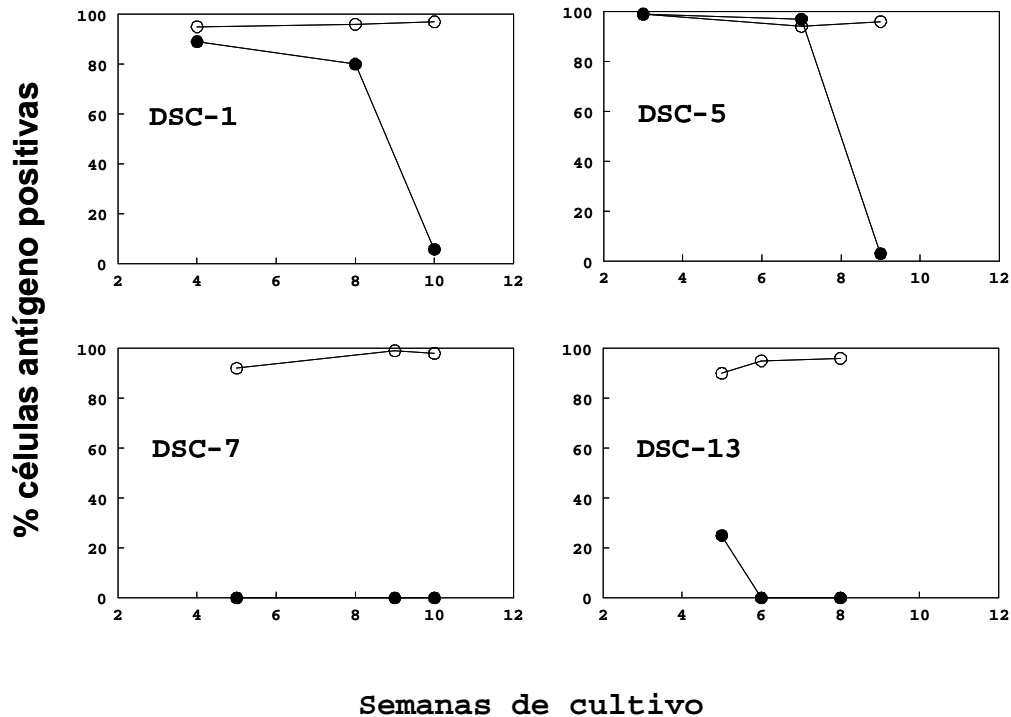
negativo para las DSC cultivadas en RPMI al 20% de FCS, y ALP y STRO-1, que no habían sido estudiados anteriormente. Las DSC cultivadas en medio para fibroblastos proliferaron durante de 8 a 10 semanas, periodo durante el cual el fenotipo se mantuvo estable y no se observó ningún tipo de disminución de la expresión de CD34 o de ningún otro antígeno.

#### **Detección de ARNm de CD34 en las DSC cultivadas en medio para fibroblastos.**

La expresión de CD34 (positivo por citometría de flujo), se confirmó mediante RT-PCR. En las DSC cultivadas en medio para fibroblastos se detectó ARNm de CD34 junto con ARNm de CD10 y CD13. Debido a que la prolactina es secretada por las DSC únicamente cuando han sido cultivadas con progesterona (Tabanelli et al., 1992), y nuestros cultivos carecían de ésta hormona, no la detectamos en los sobrenadantes recogidos (dato no mostrado). No obstante, sí fueron detectadas en algunas líneas pequeñas cantidades de ARNm de prolactina (Fig. 3).

#### **Expresión de CD34 y STRO-1 en DSC frescas.**

Para confirmar que la expresión de CD34 no era ningún artefacto debido a las condiciones de cultivo, éste antígeno también fue testado por citometría de flujo en DSC frescas. La ausencia de leucocitos contaminantes se confirmó por la falta de células positivas para CD45, CD14 ó CD15 en la suspensión de las DSC frescas. Las DSC se identificaron por la expresión de CD10, y observamos como una proporción significativa de células CD10 positivas expresaba también CD34 y STRO-1 (Fig. 4). Estos datos, junto a los previamente publicados para células frescas (Montes et al., 1996) confirman que el fenotipo de las DSC cultivadas en medio para fibroblastos es equivalente al de las DSC *in vivo*.

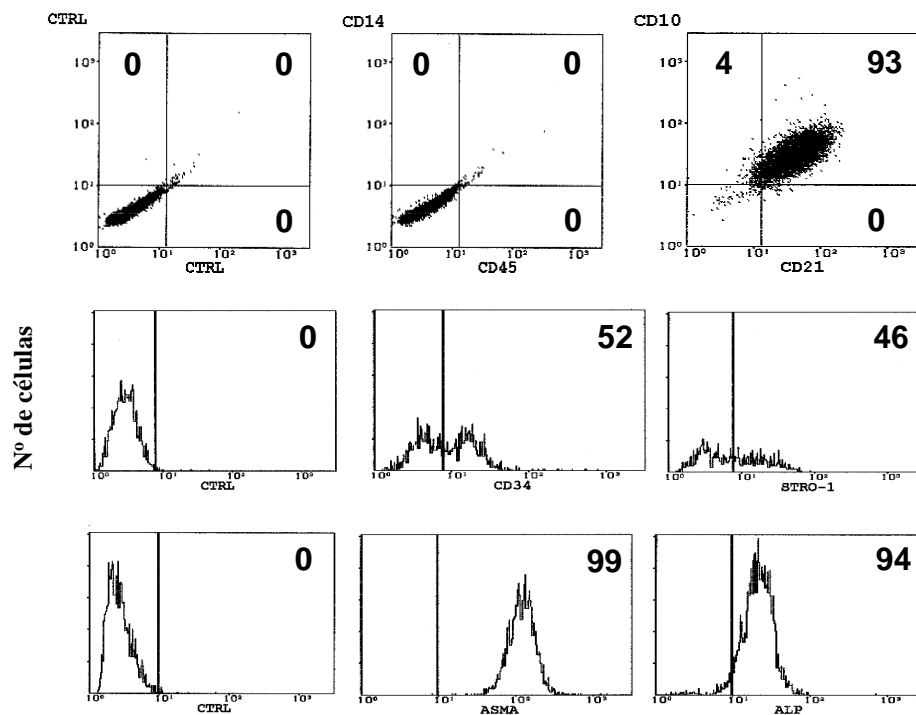


**Figura 1.** Resultados del análisis por citometría de flujo sobre la variación con el tiempo de la expresión de los antígenos CD10 (O) y CD34 (●) en cuatro líneas diferentes de células deciduales estromales cultivadas en RPMI 1640 con 20% de suero bovino fetal.

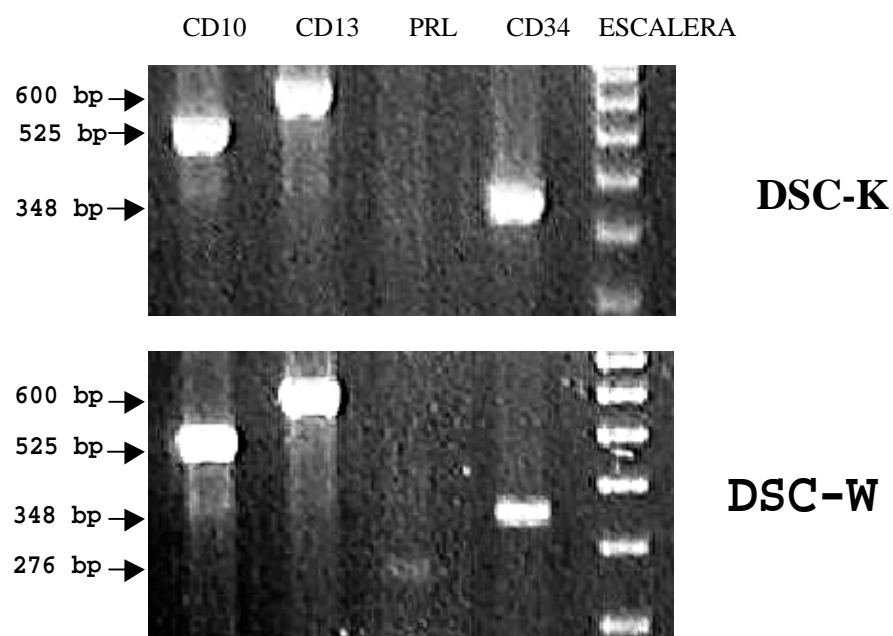
## DISCUSIÓN

Aunque las DSC son el principal componente celular de la decidua, hay otros elementos que son especialmente abundantes en este tejido como las células epiteliales ó los leucocitos (Bulmer et al., 1995). Cuando las DSC frescas y las ESC han sido obtenidas por métodos de sedimentación diferencial (Kariya et al., 1991; Imai et al., 1992), adhesión diferencial (Shiokawa et al., 1996; Iwabe et al., 2000), unión a anticuerpos frente a células hematopoyéticas (Fernández-Shaw et al., 1992) ó separación por gradientes de Percoll (Imai et al., 1995), los leucocitos han sido contaminantes frecuentes de estas preparaciones de células frescas (Ruiz et al., 1997). Esto puede haber llevado a una mala interpretación

de los resultados, especialmente en lo que concierne a las DSC y su expresión de antígenos clásicamente asociados a los leucocitos ó las funciones de carácter inmunológico. En las secciones de decidua es fácil distinguir morfológicamente las DSC; no obstante, en ocasiones se hace difícil diferenciarlas de otros tipos celulares grandes como los macrófagos. En cultivo, las DSC proliferan y sobrepasan a otras células contaminantes no proliferativas, lo que nos permite obtener cultivos puros de DSC (Montes et al., 1995,1996; Olivares et al., 1997; Ruiz et al., 1997; Oliver et al., 1999).



**Figura 2.** Análisis por citometría de flujo de los antígenos expresados por las células deciduales estromales cultivadas en medio para fibroblastos. Cada anticuerpo se ha comparado con su respectivo control isotipo (CTRL). Los números que aparecen son el porcentaje de células positivas.



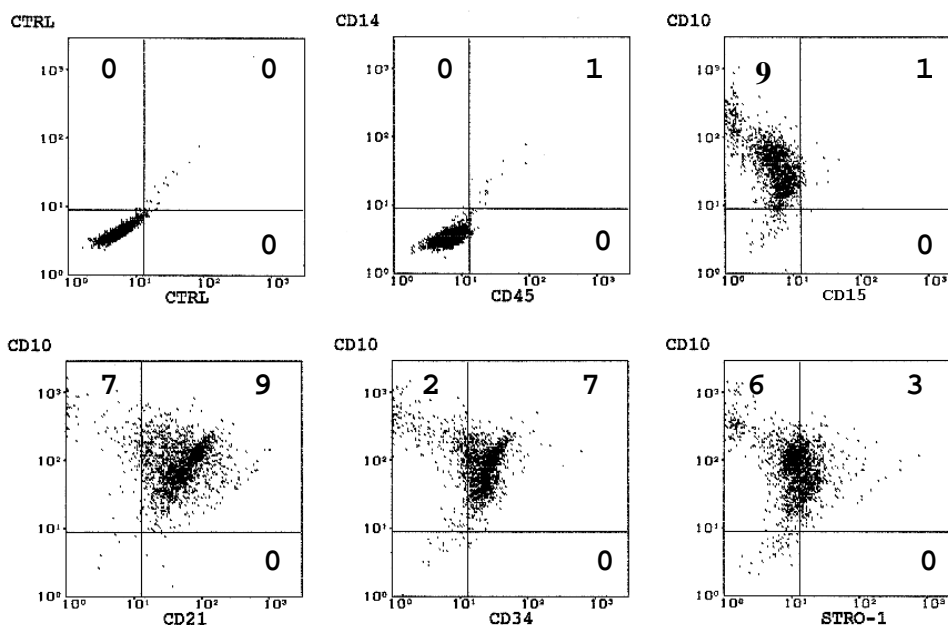
**Figura 3.** Expresión de mRNA para CD10, CD13, prolactina (PRL) y CD34 en dos líneas diferentes de células deciduales estromales (DSC-K, DSCW) cultivadas en medio para fibroblastos y analizadas por RT-PCR.

**Tabla III.** Expresión antigénica de las células deciduales estromales cultivadas en medio para fibroblastos (datos correspondientes a 12 cultivos diferentes).

Antígeno	Análisis de Citometría de flujo (% células positivas)
CD10	96–99
CD13	95–97
CD14	<1
CD15	<1
CD21	80–96
CD23	7–47

Antígeno	Análisis de Citometría de flujo (% células positivas)
CD34	18–59
CD45	<1
CD80	10–13
CD86	17–44
HLA-DR	10–46
HJ2	25–36
$\alpha$ -SM actina	99–100
Fosfatasa alcalina	94–96
STRO-1	11–53

(Continuación tabla III)



**Figura 4.** Análisis por citometría de flujo de los antígenos expresados por las células deciduales estromales frescas. Cada anticuerpo se ha comparado con su respectivo control isotipo (CTRL.). Los números que aparecen son el porcentaje de células positivas.

Sin embargo, las altas concentraciones de FCS necesarias para mantener las DSC en cultivo, podían inhibir la expresión de ciertos antígenos (Tsunoda et al., 1990). Así, en este estudio, encontramos cómo CD34 iba rápidamente disminuyendo en las DSC cultivadas al 20% de FCS (Figura 1), lo que explica porqué previamente se publicó que este antígeno no se expresaba por estas células cultivadas durante un largo periodo con alta concentración de FCS (Montes et al., 1996). La expresión de CD34 y otros antígenos por las DSC cultivadas en medio para fibroblastos fueron estables, siendo este un fenotipo antigénico equivalente al ya encontrado en las DSC *in vivo* (Montes et al., 1996). Estos datos, junto con el hecho de que las líneas de DSC se obtienen antes con medio para fibroblastos, convierten a este medio en una opción adecuada para el estudio de las DSC.

El hecho de que las DSC y ESC en ratones se originan en la médula ósea (Lysiak y Lala 1992) y que presentan ciertas funciones inmunológicas (Dudley et al., 1993; Montes et al., 1995; Olivares et al., 1997; Ruiz et al., 1997; Nasu et al., 1999; Iwabe et al., 2000) sugiere que las DSC puedan ser adscritas al linaje hematopoyético. La expresión de CD34, un antígeno detectado en los precursores de células hematopoyéticas (Civin et al., 1984) y otros antígenos asociados a éstas (CD10, CD13, CD21, CD23, CD80, CD86 y HLA-DR; Tabla II, Figura 2) sustentan esta hipótesis. Sin embargo, el hecho de que las DSC sean negativas para el CD45, un marcador del linaje hematopoyético, y que expresan antígenos asociados a células mesenquimales (no hematopoyéticas) tales como  $\alpha$ -SM actina ó ALP (Tabla II, Figura 2), contradice esta adscripción. La expresión en las DSC de STRO-1, un antígeno que identifica a precursores estromales de médula ósea (Simmons y Torok-Storb 1991a), relaciona estos dos tipos de células. Al igual que las DSC, estos precursores pierden rápidamente la expresión de CD34 en cultivos que contienen una elevada proporción de suero fetal (Simmons y Torok-Storb 1991). Además, tanto las DSC como los precursores estromales expresan CD10, CD13, ALP y  $\alpha$ -SM actina, y no expresan CD45 y CD14 (Simmons y Torok-Storb 1991a). Esta relación entre las DSC y los precursores estromales de la médula ósea también reconcilian la aparente contradicción sobre su origen en la médula ósea (Lysiak y Lala 1992) y su carácter mesenquimal, no hematopoyético (Oliver et al., 1999). Estudios en ratones sugieren que las células precursoras de las DSC podrían migrar desde su origen (saco vitelino y/o de la médula

ósea) hacia el útero, en algún momento entre la vida embrionaria y el establecimiento de la vida reproductiva, y a partir de ese periodo auto-replicarse a nivel local (Lysiak y Lala, 1992). Las DSC han sido también relacionadas con las células foliculares dendríticas (Follicular Dendritic Cells, FDC; Olivares et al., 1997), que son células del folículo linfoide que previenen la entrada en apoptósis de las células B y que están implicadas en la presentación del antígeno a células B en la respuesta secundaria (Lindhout et al., 1993). Las DSC expresan antígenos característicos de FDC (CD21, CD23, DRC-1 y HJ2) y carecen, como las FDC, de CD45 (Montes et al., 1996; Oliver et al., 1999). Por tanto, puede ser que las DSC y las FDC pertenecieran a la misma familia (Oliver et al., 1999) y que tengan un precursor estromal común en médula ósea.

Tras el cultivo primario, las DSC con capacidad para proliferar son seleccionadas positivamente. En ausencia de progesterona en el cultivo, estas células se corresponden con los precursores de las DSC, es decir con células predecidualizadas (Glaser y Julián 1986; Atabanelli et al., 1992; Montes et al., 1996). De hecho, al igual que las células predeciduales, las DSC cultivadas en medio para fibroblastos no secretaban prolactina (datos no mostrados). Por analogía con el desarrollo regulado del CD34 en las células hematopoyéticas primarias (Strauss et al., 1986), este antígeno puede ser considerado un marcador de precursores celulares (hematopoyéticos, estromales, o deciduales) el cual se va perdiendo con la diferenciación celular. No obstante, sería necesario estudiar en células decidualizadas con progesterona para confirmar esta posibilidad en las DSC. El CD34, expresado por las células madre hematopoyética y estromal, estaría probablemente involucrado en la adhesión e interacción de los dos tipos de células en la regulación de la hematopoyesis (Healy et al., 1995). Las células deciduales estromales que expresan dicho antígeno podrían tener una función equivalente en la decidua. La decidua humana normal contiene una muy elevada proporción de leucocitos que juegan un papel especial en la interacción materno-fetal (Bulmer 1995), y que se diferencian *in situ* conforme el embarazo progresa (Mincheva –Nilsson et al., 1997). La posibilidad de que las DSC estén involucradas en esta diferenciación se sustenta por los hallazgos de King et al., que demostraron que las DSC influyen la proliferación y supervivencia de las NK deciduales



a través de contactos célula-célula (King et al., 1999). Sería interesante determinar si el CD34 media en la interacción entre las DSC y las células NK deciduales.

## REFERENCIAS

Arici, A., Senturk, L.M., Seli, E. *et al.* (1999) Regulation of monocyte chemotactic protein-1 expression in human endometrial stromal cells by estrogen and progesterone. *Biol. Reprod.*, 61, 85–90

Arima, K., Nasu, K., Narahara, H. *et al.* (2000) Effects of lipopolysaccharide and cytokines on production of RANTES by cultured human endometrial stromal cells. *Mol. Hum. Reprod.*, 6, 246–251

Bulmer, J.N. (1995) Immune cells in decidua. In Kurpisz, M. and Fernandez, N. (eds) *Immunology of Human Reproduction*. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, pp. 313–334.

Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C. *et al.* (1984) Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.*, 133, 157–165.

Dudley, D.J., Trautman, M.S. and Mitchell, M.D. (1993a) Inflammatory mediators regulate interleukin-8 production by cultured gestational tissues: evidence for a cytokine network at the chorio-decidual interface. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 76, 404–410.

Dudley, D.J., Chen, C., Branch, D.W. *et al.* (1993b) A murine model of preterm labor: inflammatory mediators regulate the production of prostaglandin E2 and interleukin-6 by murine decidua. *Biol. Reprod.*, 48, 33–39

Fernández-Shaw, S., Shorter S.C., Naish C.E. *et al.* (1992) Isolation and purification of human endometrial stromal and glandular cells using immunomagnetic microspheres. *Hum. Reprod.*, 7, 156–161

Glasser, S.R. and Julian, J. (1986) Intermediate filament protein as a marker of uterine stromal cell decidualization. *Biol. Reprod.*, 35, 463–474

Healy, L., May, G., Gale, K. *et al.* (1995) The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hematopoietic cell adhesion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92, 12240–12244

Imai, K., Maeda, M., Fujiwara, H. *et al.* (1992) Human endometrial stromal cells and decidual cells express cluster of differentiation CD13 antigen/aminopeptidase N and CD10 antigen/neutral endopeptidase. *Biol. Reprod.*, 46, 328–334.

- Imai, K., Maeda, M., Fujiwara, H. *et al.* (1995) A mouse monoclonal antibody, S2n8, detects a 140 kDa protein on the surface of human endometrial stromal cells and decidual cells. *Mol. Hum. Reprod.*, 10, 1311–1318.
- Iwabe, T., Harada, T., Tsudo, T. *et al.* (2000) Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 824–829.
- Jikihara, H. and Handwerger, S. (1994) Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits the synthesis and release of human decidual prolactin. *Endocrinology*, 134, 353–357
- Kanda, Y., Jikihara, H., Markoff, E. *et al.* (1999) Interleukin-2 inhibits the synthesis and release of prolactin from human decidual cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 677–681
- Kariya, M., Kanzaki, H., Takamura, K. *et al.* (1991) Interleukin-1 inhibits *in vitro* decidualization of human endometrial stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 73, 1170–1174
- King, A., Garner, L. and Loke, Y.W. (1999) Co-stimulation of human decidual natural killer cells by interleukin-2 and stromal cells. *Hum. Reprod.*, 14, 656–663
- Lindhout, E., Mevissen, M.L., Kwekkeboom, J. *et al.* (1993) Direct evidence that human follicular dendritic cells (FDC) rescue germinal centre B cells from death by apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 91, 330–336.
- Lysiak, J.J. and Lala, P.K. (1992) *In situ* localization and characterization of bone-marrow derived cells in the decidua of normal murine pregnancy. *Biol. Reprod.*, 47, 603–613
- Mincheva-Nilsson, L., Kling, M., Hammarstrom, S. *et al.* (1997) Gamma-delta T cells of human early pregnancy decidua—evidence for local proliferation, phenotypic heterogeneity, acid extrathymic differentiation. *J. Immunol.*, 159, 3266–3277
- Montes, M.J., Tortosa, C.G., Borja, C. *et al.* (1995) Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 34, 188–194.
- Montes, M.J., Alemán, P., Tortosa, C.G. *et al.* (1996) Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with haematopoietic cells. *J. Reprod. Immunol.*, 30, 53–66
- Nasu, K., Narahara, H., Matsui, N. *et al.* (1999) Platelet-activating factor stimulates cytokine production by human endometrial stromal cells. *Mol. Hum. Reprod.*, 5, 548–553
- Olivares, E.G., Montes, M.J., Oliver, C. *et al.* (1997) Cultured human decidual stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. *Biol. Reprod.*, 57, 609–615

Oliver, C., Montes, M.J., Galindo, J.A. *et al.* (1999) Human decidual stromal cells express  $\alpha$ -smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum. Reprod.*, 14, 1599–1605

Riddick, D.H. and Kusmik, W.F. (1977) Decidua: a possible source of amniotic fluid prolactin. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 127, 187–190

Ruiz, C., Montes, M.J., Abadía-Molina, A.C. *et al.* (1997) Phagocytosis by fresh and cultured human decidual stromal cells: opposite effects of interleukin-1  $\alpha$  and progesterone. *J. Reprod. Immunol.*, 33, 15–26.

Shiokawa, S., Yoshimura, Y., Nagamatsu, S. *et al.* (1996) Expression of beta 1 integrins in human endometrial stromal and decidual cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81, 1533–1540.

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

Simmons, P.J. and Torok-Storb, B. (1991b) CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood*, 78, 2848–2853

Strauss, L.C., Rowley, S.D., LaRussa, V.F. *et al.* (1986) Antigenic analysis of hematopoiesis. V. Characterization of My-10 antigen expression by normal lymphohematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.*, 14, 878–886

Tabanelli, S., Tang, B. and Gurbide, E. (1992) *In vitro* decidualization of human endometrial stromal cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 42, 337–344

Tsunoda, R., Nakayama, M., Onozaki, K. *et al.* (1990) Isolation and long-term cultivation of human tonsil follicular dendritic cells. *Virchows Archiv. B. Cell. Pathol.*, 59, 95–105

# **ACTIVIDAD CONTRÁCTIL DE LAS CÉLULAS DECIDUALES HUMANAS**

## Actividad contráctil de las Células Deciduales Estromales Humanas

---

Maria Kimatrai, Carmen Oliver, Ana Clara Abadía-Molina, José Marcos García-Pacheco y Enrique G.Olivares

<sup>1</sup>Unidad de Inmunología y Biología Molecular, Hospital do Meixoeiro, Vigo y <sup>2</sup>Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, España.

### INTRODUCCIÓN

El tejido decidual, componente materno de la interfase materno-fetal, se compone predominantemente de células de tipo estromal, células glandulares y leucocitos (1). La célula decidual estromal (DSC) constituye un tipo particular de célula que se origina a partir de la proliferación y diferenciación (decidualización) de un precursor estromal fibroblástico (preDSC), localizado en el endometrio (2). Durante la fase lutea del ciclo menstrual ó si tiene lugar el embarazo, las preDSC se diferencian (ó decidualizan) por efecto de la progesterona (3). Las células decidualizadas se vuelven redondeadas, expresan desmina en el citoplasma y secretan prolactina (PRL; 4-6). Aunque su función, linaje celular u origen, no están del todo determinados, se ha demostrado que las DSC humanas como de ratón ó las células endometriales estromales (endometrial stromal cells, ESC), que se corresponden con las preDSC en endometrio no gestante, están involucradas en funciones inmunes, como la producción de citocinas (7-10), presentación de antígenos (11) y fagocitosis (12). Estas células también expresan antígenos clásicamente asociados a células hematopoyéticas (11, 13, 14). Además, las citocinas inflamatorias y tipo Th1 inhiben el proceso de decidualización (15-17). Las actividades inmunes de las DSC unido a su origen en la médula ósea, ha llevado a algunos investigadores a proponer que las DSC son auténticas células inmunológicas (18). Sin embargo, nosotros hemos demostrado en humanos que las DSC están más relacionadas con precursores estromales de médula ósea que con células de origen hematopoyético (19), y su morfología y fenotipo son muy similares a la de los miofibroblastos (20), células fibroblásticas con actividad contráctil

involucradas en la retracción de las heridas. En este trabajo investigamos la actividad contráctil de las DSC para confirmar su relación con los miofibroblastos. Además, analizamos el efecto de la IL-2 en la contractilidad, citocina Th1 que bloquea la deciduización (17) y está relacionada con los abortos espontáneos (21).

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Tejidos.**

Se procesaron dieciocho muestras procedentes de interrupciones voluntarias del embarazo de primer trimestre (6 a 11 semanas) de pacientes sanas, de entre 20 y 30 años. 14 de las muestras procedían de pacientes en su primer embarazo, 4 pacientes con embarazos previos (1, 1, 3, y 3 embarazos), y solo una mujer había tenido un aborto espontáneo previo. Se excluyeron mujeres que recibían medicación, tenían alguna infección, tenían alguna enfermedad autoinmune u otro tipo de patología sistémica ó local. Ninguno de los abortos fue inducido farmacológicamente. Las muestras se obtuvieron de la clínica El Sur (Málaga), la clínica Los Cármes (Granada) y el Hospital Universitario San Cecilio. Previamente se obtuvo el consentimiento del paciente. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético y de Investigación del Hospital Universitario San Cecilio, Granada.

### **Medio para fibroblastos.**

De acuerdo a la información proporcionada por el proveedor (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), el medio para fibroblastos contiene, medio basal para fibroblasto (una versión modificada del MCDB 105) suplementado con un 2% de FCS (Fetal Calf Serum) y pequeñas cantidades no especificadas de factor básico de crecimiento para fibroblastos, heparina, factor de crecimiento epidérmico e hidrocortisona.

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

Los tejidos deciduales recogidos y procesados fueron examinados histológicamente para excluir la presencia de alguna posible infección ó reacción inflamatoria. Las muestras de decidua de diferentes pacientes no se mezclaron para evitar la secreción de citocinas como consecuencia de una de reacción alogénica de los leucocitos que inicialmente

contaminan las DSC en cultivo. El tejido se lavó a fondo con tampón fosfato (phosphate buffered saline, PBS) y la decidua fue cuidadosamente separada del trofoblasto. Los fragmentos de decidua se desmenuzaron con bisturí en un pequeño volumen de medio RPMI 1640 (Sigma) con 100 IU/ml de penicilina y gentamicina (50 µg/ml), y se pusieron en una solución de tripsina al 5% y de EDTA al 0.2% (Sigma) durante 15 minutos a 37°C. La reacción se detuvo añadiendo medio RPMI 1640 al 20% de FCS (Gibco, Paisley, UK); la suspensión se filtró por una gasa estéril y se centrifugó a 450 g durante 10 min (minutos). El sobrenadante se desechó y el botón de células fue resuspendido en RPMI y centrifugado sobre un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia) durante 20 min a 600 g. Las células de la interfase se recogieron, se suspendieron en PBS y se lavaron. La suspensión, conteniendo fundamentalmente DSC y leucocitos, fue incubada en RPMI 10% FCS durante 1 h a 37°C para permitir que los macrófagos, granulocitos y células glandulares se adhieran al frasco de cultivo. El sobrenadante, que contenía DSC y linfocitos, se recogió y se lavo, y fue incubado en medio para fibroblastos suplementado con 100 IU/ml de penicilina y 50 µg/ml de gentamicina. Después de la incubación durante toda la noche, que permite que las DSC se adhirieran al plástico, se eliminaron los linfocitos que permanecían en el sobrenadante. Las células que permanecen adheridas son mayormente DSC. Se añadió medio básico para fibroblastos y se cambió dos veces por semana, y al cabo de dos a cuatro semanas las células adheridas cubrían completamente el frasco de cultivo. El crecimiento de las DSC en proliferación es superior a otras células que contaminen la muestra, garantizando aún más la pureza del cultivo. La pureza del cultivo se determinó confirmando la coexpresión por citometría de flujo de CD10 y CD13, y la ausencia de CD45 (11-14, 19, 20, 23). Las células proliferaron en medio para fibroblastos durante 8 a 12 semanas, tiempo durante el cual el fenotipo se mantuvo estable (19). Los sobrenadantes de éstos cultivos confluentes se recogieron y se concentraron 10 veces (10x) en un Minicon Concentrator (Amicon, Beverly, MA, USA), y se analizaron para la presencia de PLR mediante un inmunoanálisis de electroquimioluminiscencia (Roche Diagnostics, IN, USA).

### **Anticuerpos monoclonales.**

Los anticuerpos monoclonales empleados aparecen en la Tabla I.

### **Citometría de flujo.**

Las células deciduales estromales se despegaron del frasco de cultivo con EDTA al 0.04% a 37°C. Las células fueron centrifugadas, el sobrenadante se desechó y se resuspendieron en PBS a una concentración de  $10^6$  cel./ml. Para el marcaje directo, 100  $\mu$ l de la suspensión celular fueron incubados con 10  $\mu$ l del correspondiente mAb en la oscuridad durante 30 min a 4°C. Después las células fueron lavadas con PBS y se resuspendieron en un volumen de 1 ml para ser inmediatamente analizadas en el citómetro de flujo (Ortho-Cytoron, Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ, USA). Para identificar las células muertas incubamos las DSC con yoduro de propidio (Sigma). El porcentaje de células positivas para cada anticuerpo fue calculado comparando con el apropiado control isotipo (Tabla I). Para el marcaje doble, seguimos el mismo proceso salvo que se añadió un segundo anticuerpo marcado con una sustancia fluorescente distinta del primero. Para el marcaje indirecto, se añadió un anticuerpo de cabra frente a inmunoglobulina (Ig) de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) después del primer anticuerpo. Para el marcaje intracelular, las DSC fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20min a 4°C y permeabilizadas con acetona fría durante 10 min antes de añadir el monoclonal.



**Tabla I.** Anticuerpos monoclonales (AcMos) empleados en este estudio.

AcMo	Especificidad	Ig subclase	Marcaje con	Procedente de <sup>1</sup>
Control Isotipo		IgG1	FITC or PE	Sigma
Control Isotipo		IgG2a	FITC or PE	Sigma
Anti-CALLA	CD10	IgG1	PE	DAKO
CD13	CD13	IgG1	FITC	Caltag Laboratories, Inc.
CD45	CD45	IgG1	FITC	Sigma
OKDR	HLADR	IgG2a	FITC	Ortho-Diagnostic
Anti- $\alpha$ actina	SM $\alpha$ -SM actina	IgG2a	FITC	Sigma
B4-78	Isoenzimas de fosfatasa alcalina hueso/hígado/riñón	IgG1		DHSB

FITC, Isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina

<sup>1</sup> Sigma (St. Louis, MO); DAKO (Glostrup, Denmark); Caltag Laboratories, Inc. (San Francisco, CA); Ortho-Diagnostic System (Raritan, NJ); DHSB (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA).

### **Cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa.**

Los cebadores usados en este estudio aparecen en la Tabla II. Fueron diseñados de acuerdo a las secuencias disponibles en el Genbank ([www2.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank](http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank)) y sintetizados por Genset (Paris, Francia). Para prevenir cualquier amplificación de ADN contaminante, cuando fué posible, se diseñaron cebadores sentido y antisentido de secuencias localizadas bastante alejadas de los diferentes exones, y fueron comprobados en reacciones de PCR con ARN usado para la síntesis del ADN complementario (ADNc).

### **Reacción en cadena de polimerasa de la transcriptasa inversa (RT)-PCR.**

El ARN total se extrajo usando el kit Ultraspec™, de acuerdo al protocolo proporcionado por la casa comercial (Biotex Laboratories Inc., Houston, TX, USA). La cadena simple de ADNc se obtuvo partiendo de ARN total y usando hexámeros aleatorios (Pharmacy Biotech, Uppsala, Sweden) y la ARNasa transcriptasa inversa M-MLV H (Promega, Madison, WI, USA). Para la desnaturalización se calentó (65°C) la muestra durante 5 min y se enfrió acto seguido en un termociclador (Geneamp PCR System 9600, Perkin-Elmer, Cetus, Norwalk, CT, USA). La transcripción inversa se realizó con la transcriptasa inversa por espacio de 1 h a 37°C. Empezando con una cantidad de ADNc equivalente a los 75 ng de ARN, la amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 125 µl de la mezcla de amplificación, 10 mmol/l Tris-Cl (pH 8.4), 50 mmol/l KCL, 2 mmol/l MgCL<sub>2</sub>, gelatina al 0.01%, 0.2 mmol/l dNTPs, glicerol al 5%, 0.25 mmol/l de cada cebador y 0.02 U/ml de ADN Taq polimerasa (Promega). Después de la incubación durante 5 min a 96°C, cada ciclo consistió en 94°C durante 30 s, 57°C por 30 s y 72°C por 30 s, en un total de 32 ciclos.

**Tabla II:** Secuencias de los cebadores empleados en la RT-PCR

mRNA	Cebadores	Tamaño producto PCR (bp)
CD10	5'-AACATGGATGCCACCACTGAG-3'	525
	5'-CACATATGCTGTACAAGCCTC-3'	
CD13	5'-AAGCTCAACTACACCCTCAGC-3'	600
	5'-GGGTGTGTCATAATGACCAGC-3'	
$\alpha$ -SM actina	5'-ACTGTGTTATGTAGCTCTGGAC-3'	465
	5'-ACAATGGAAGGCCCGCTTC-3'	
ALP	5'-GGACAAGTTCCCCTTCGTGG-3'	362
	5'-GCATGAGCTGGTAGGCGATG-3'	
Prolactina	5'-GGGTTTCATTACCAAGGCCATC-3'	276
	5'-TTCAGGATGAACCTGGCTGAC-3'	
DR-B	5'-CCTACTGCAGACACAACACTACG-3'	154
	5'-TCAATGCTGCCTGGATAGAAAC-3'	

Un total de 1  $\mu$ l procedente de la primera ronda se usó para una ronda posterior de 32 ciclos. Los productos de la PCR se separaron por tamaño en geles de agarosa al 2%, y en cada gel se incluyó un patrón de 100 pb de DNA en escalera. La visualización fue llevada a cabo mediante tinción con bromuro de etidio.

### **Citocinas.**

Las citocinas empleadas fueron el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (Transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF $\beta$ 1), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (platelet-derived-growth-factor-BB, PDGF) e interleucina-2 (IL-2), suministradas por Sigma.

### **Ensayo de contractilidad en gel.**

El ensayo de contractilidad celular se realizó de acuerdo a lo previamente descrito (22). Una solución estéril y purificada de colágeno bovino solubilizado en pepsina (Vitrogen, Cohesion Technologies, Inc., Palo Alto, CA) y preparado de acuerdo a las instrucciones proporcionadas con el producto comercial y mezclada con  $25 \times 10^4$  DSC. La mezcla de colágeno/células (100  $\mu$ l/pocillo) se deposita en placa de cultivo y se deja polimerizar por espacio de 30 min a 37°C. Inmediatamente después de la polimerización se añadió 2 ml de medio para fibroblastos con o sin citocinas en cada pocillo. Después de 24 horas de incubación, la altura (h) y el diámetro (d) de cada burbuja de colágeno se determinó con el tornillo micrométrico del microscopio, y el volumen (V) de cada gel se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$V = 1/24 \times \pi \times h \times (3 \times d^2 + h^2)$$

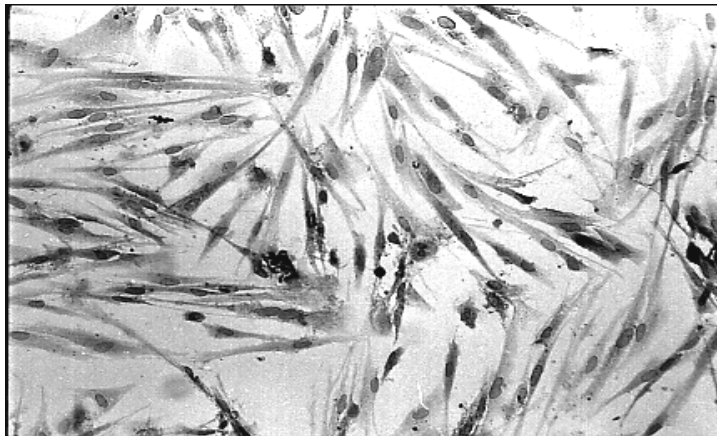
La media de las medidas (n=3 para cada muestra) tomadas en cada pocillo se usaron para estimar el volumen. Los datos se presentan como el porcentaje de contracción de gel con DSC tratadas con citocinas frente a las DSC no tratadas de acuerdo a la siguiente formula: contractilidad celular (%) =  $100 \times (V \text{ sin citocinas} - V \text{ con citocinas}) / V \text{ sin citocinas}$ . Como control negativo para la contractilidad celular usamos células procedentes de una línea inmortalizada de un linfoma B (células Ramos), las cuales no pueden adherirse a cualquier superficie (plástico ó gel), de manera que son incapaces de contraer el gel porque ésta actividad depende de la adhesión de la célula a la matriz de colágeno. Las células Ramos se cultivan en RPMI 1640 con 100 IU/ ml de penicilina, 50  $\mu$ g/ml de gentamicina y 10% de FCS.

## **RESULTADOS**

### **Líneas DSC.**

Las DSC con morfología fibroblástica se obtuvieron en medio para fibroblastos después de 2-4 semanas de cultivo primario (Fig. 1). Mediante citometría de flujo observamos que la mayoría de las células son positivas para CD10 y CD13, pero carecen de CD45 (Fig. 2). Esto se corresponde con el fenotipo básico de las DSC y ESC humanas,

demostrado por diferentes autores (11-14, 19, 20, 23). El CD10 se considera el marcador de éstas células (24). Estos resultados confirman la pureza del cultivo y la ausencia de células hematopoyéticas contaminantes. Además, como ya se ha publicado (19), la mayoría de las DSC cultivadas fueron positivas para la fosfatasa alcalina (ALP), y algunas líneas fueron positivas para HLA-DR. La  $\alpha$  actina ( $\alpha$ -Smooth muscle actin,  $\alpha$ -SM actina), marcador de miofibroblastos (25), se detecta en la mayoría de las DSC (Fig. 2).



**Fig. 1.** Las líneas DSC cultivadas en medio para fibroblastos presentan características morfológicas similares a los miofibroblastos

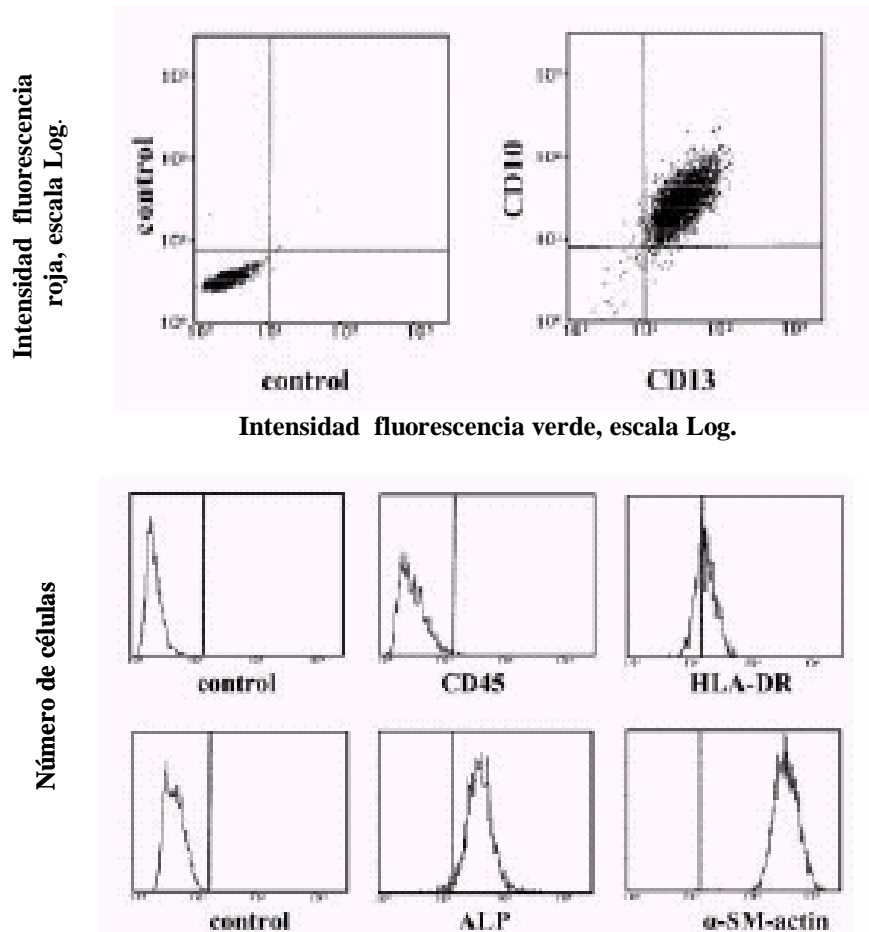
#### **Detección de mRNA de $\alpha$ actina ( $\alpha$ Smooth muscle actin) en células DSC cultivadas.**

La expresión de  $\alpha$ -SM actina se confirmó por RT-PCR. La  $\alpha$ -SM actina, al igual que los ARNm de CD10, CD13 y ALP, fueron detectados en todas las DSC (Fig. 3). Puesto que la PLR la expresan las células sólo cuando se cultivan con progesterona (6), y nuestros cultivos carecen de esta hormona, no detectamos PLR en los sobrenadantes. Sin embargo, pequeñas cantidades de ARNm PRL fueron detectadas en algunas líneas (Fig. 3). Al igual que se detectó la expresión de HLA-DR mediante citometría de flujo, algunas, aunque no todas las líneas de las DSC, expresaban ARNm HLA-DRB. (Fig. 3). Aunque, las DSC cultivadas en medio para fibroblastos presentan un fenotipo antigénico estable equivalente al que las células expresan *in vivo* (11, 14, 19, 20, 23), y no observamos ningún cambio significativo en la expresión de antígenos a lo largo de este estudio, la detección de células

HLA-DR positivas y negativas en las líneas de las DSC puede deberse a que el HLA-DR pueda estar modulado negativamente en cultivo.

### Actividad contráctil de las DSC.

Para determinar si la expresión de  $\alpha$ -SM actina se correspondía con un fenotipo funcional, examinamos el efecto de TGF $\beta$ 1 y PDGF, dos citocinas con capacidad para inducir la contractilidad en células fibroblásticas (26), sobre las DSC emplazadas en una matriz de colágeno. Ambas estimulan la actividad contráctil de forma dosis dependiente (Fig. 4). La IL-2, una citocina capaz de bloquear la decidualización (17) y asociada al aborto espontáneo (21), también produce el mismo efecto contráctil en DSC. Ninguna de estas citocinas afectó a las células Ramos, usadas como control negativo (Fig. 4).

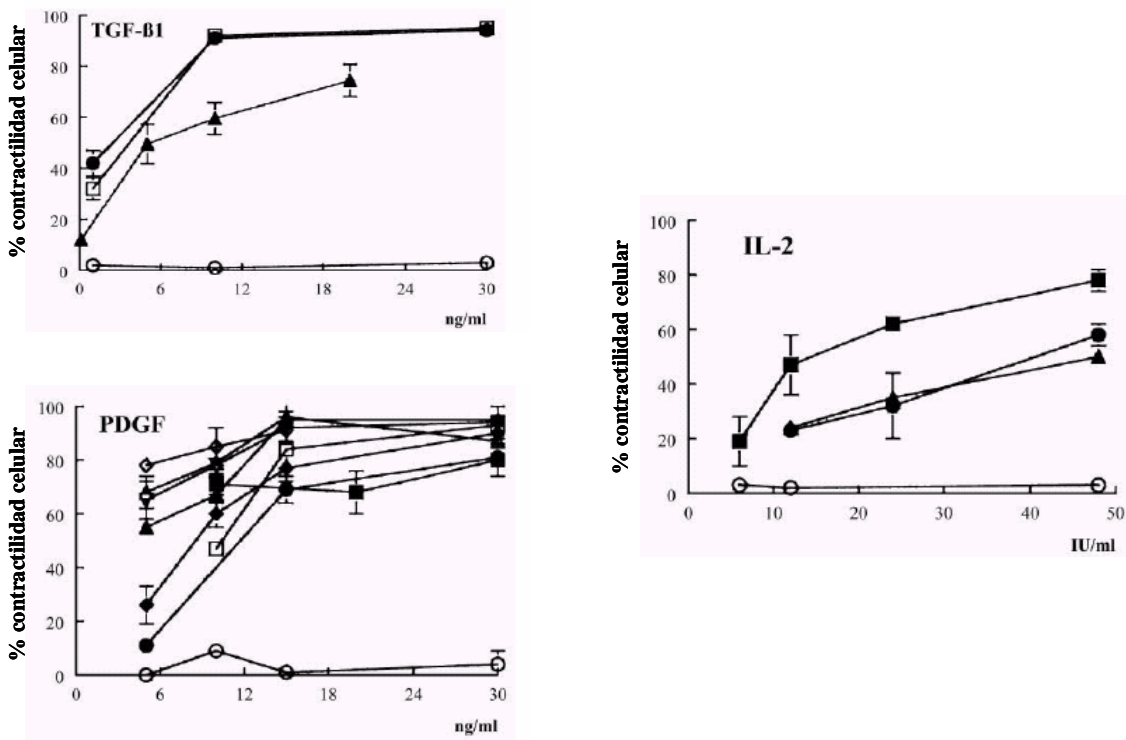


**Fig.2.** Análisis por citometría de flujo de los antígenos expresados por las DSC en cultivo. Cada anticuerpo monoclonal fue comparado con su respectivo control isotipo.

**Fig.3.** Expresión de mRNA para CD10, CD13,  $\alpha$ -SM-actina, ALP, PRL y HLA-DRB en dos líneas diferentes de DSC (GR-1 Y MA-3) analizadas por RT-PCR.

## **DISCUSIÓN**

Aunque las muchas actividades inmunológicas de las DSC y su probable origen en la médula ósea han llevado a algunos autores a proponer a estas células como células de linaje hematopoyético (18), recientemente hemos demostrado que las DSC humanas están relacionadas con precursores estromales de médula ósea, capaces de diferenciarse en diferentes tipos de células mesenquimales (19). Además, en el fenotipo de los filamentos citoesqueléticos y la morfología de las DSC son similares a los miofibroblastos (20). En este estudio demostramos como las DSC expresan  $\alpha$ -SM actina y ARNm para  $\alpha$ -SM actina, un microfilamento considerado marcador de miofibroblastos (25). Puesto que las DSC son capaces de contraer las matrices de colágeno, concluimos que además son funcionalmente similares a los mismos. Más aún, como las DSC, los fibroblastos y los miofibroblastos expresan antígenos hematopoyéticos (27, 28), secretan citocinas (29), co-estimulan la proliferación de las células T (30), y parece que están implicados en el rechazo de tejidos transplantados (31). Bajo la regulación local de ciertas citocinas, tanto las DSC como los miofibroblastos producen metaloproteinasas, (enzimas capaces de degradar la matriz intersticial).



**Fig.4.** Inducción de contractilidad en líneas DSC con TGFβ1, PDGF e IL-2, determinada en ensayos de contracción de geles de colágeno. Cada curva (● ◇ ■ ◆) representa la actividad contráctil de un línea diferente de DSC. Como control negativo de contracción se usaron células Ramos (○) en cada muestra) en cada punto de concentración se usó para determinar la contractilidad. Los datos se presentan en porcentaje de contracción ± la desviación típica de cada DSC tratada con citocinas comparado con el volumen obtenido en las DSC no tratadas.

En los miofibroblastos intestinales, esta degradación lleva a la muda y renovación del epitelio intestinal (32); en las células ESC, este proceso conduce a la pérdida de la integridad de los vasos sanguíneos, a la destrucción de la matriz intersticial endometrial, y el consiguiente sangrado característico de la menstruación (33). La actividad contráctil de las ESC favorecería la expulsión del endometrio durante la menstruación.



El TGF $\beta$ 1 y PDGF, citocinas capaces de inducir la contractilidad en miofibroblastos (26), también producen la contractilidad de las DSC. El hecho de que estas citocinas además inhiban la decidualización (34), sugiere que la actividad contráctil es llevada a cabo por las células preDSC. En este sentido, nuestras DSC cultivadas están más cercanas a las preDSC que a las DSC propiamente dichas (19). Tras el cultivo primario, sólo las DSC con capacidad para proliferar son seleccionadas positivamente. En ausencia de progesterona en el medio de cultivo, estas células aisladas pueden ser consideradas preDSC (5, 6, 19). De hecho, al igual que las preDSC, las DSC cultivadas en medio para fibroblastos no secretan prolactina (resultados no mostrados). El hecho de que las preDSC estén localizadas alrededor de los vasos (35) sugiere que estas células contráctiles puedan tener un papel en la regulación del flujo sanguíneo.

TGF $\beta$ 1 y PDGF también estimulan la proliferación de las DSC, probablemente afectando a las preDSC, en vista al efecto anti-decidualizador de estas citocinas (34). En humanos, el tejido decidual expresa ARNm tanto de TGF $\beta$ 1 (36) como de PDGF-A y B (37). Los receptores para el PDGF se localizan tanto en DSC (37) como ESC (38), y el receptor TGF tipo II se detecta sobre las ESC (39). Además, TGF $\beta$ 1 y PDGF, han sido detectados en ESC (38, 39), y estas células han sido descritas como la fuentes de estas citocinas (40, 41), aunque TGF $\beta$ 1 es producido también por las células epiteliales (41), sugiriendo que un mecanismo paracrino y autocrino tiene lugar en la inducción de la contractilidad de las DSC o las ESC.

Otro papel funcional de la actividad contráctil de las DSC puede ser la expulsión del trofoblasto durante un aborto espontáneo. Hay una creciente evidencia de que el sistema inmune esta implicado en el embarazo normal y el aborto (42). En ratones y en humanos, el embarazo normal está asociado a la producción de citocinas tipo Th2 (43), mientras que el aborto se asocia con la producción de citocinas Th1 (21, 43). La progesterona regula positivamente la producción de citocinas Th2 de los linfocitos (44) e inhibe la producción de citocinas Th1 (45). Las DSC poseen receptores para la IL-2 (46), una citocina Th1. La IL-2, al igual que el TGF $\beta$ 1 y el PDGF, inhibe la decidualización (17), y de acuerdo a nuestros datos, además inducen contractilidad. La progesterona, hormona que favorece el

embarazo, diferencia las DSC hacia un estado progestático e inhibe sus funciones inmunológicas (7, 12), mientras citocinas tales como TGFβ1, PDGF e IL-2 inhiben la decidualización (17, 34) y favorecen la actividad contráctil de las DSC, la cual puede llevar a la expulsión del trofoblasto. El hecho de que los niveles de IL-2 (21) y TGFβ1 (47) estén elevados en los abortos espontáneos, apoya esta opinión y sugiere la existencia de una correspondencia inmunológico-endocrina que implica a las DSC, la cual puede llevar bien a un embarazo normal ó a un aborto espontáneo.

## REFERENCIAS

- 1 Bulmer JN 1995 Immune cells in decidua. In: Kurpisz M, Fernandez N, eds. Immunology of human reproduction. Oxford: BIOS Scientific; 313–334
- 2 Richards RG, Brar AK, Frank GR, Hartman SM, Jikihara H 1995 Fibroblast cells from term human decidua closely resemble endometrial stromal cells: induction of prolactin and insulin-like growth factor binding protein-1 expression. Biol Reprod 52:609–615
- 3 Bulmer D, Peel S 1974 An autoradiographic study of cellular proliferation in the uterus and placenta of the pregnant rat. J Anat 117:433–441
- 4 Riddick DH, Kusmik WF 1977 Decidua: a possible source of amniotic fluid prolactin. Am J Obstet Gynecol 127:187–190
- 5 Glasser SR, Julian J 1986 Intermediate filament protein as a marker of uterine stromal cell decidualization. Biol Reprod 35:463–474
- 6 Tabanelli S, Tang B, Gursipide E 1992 In vitro decidualization of human endometrial stromal cells. J Steroid Biochem Mol Biol 42:337–344
- 7 Montes MJ, Tortosa CG, Borja C, Abadía AC, González-Gomez F, Ruiz C, Olivares, EG 1995 Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. Am J Reprod Immunol 34:188–194
- 8 Nasu K, Narahara H, Matsui N, Kawano Y, Tanaka Y, Miyakawa I 1999 Platelet-activating factor stimulates cytokine production by human endometrial stromal cells. Mol Hum Reprod 5:548–553
- 9 Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Nagano Y, Yoshida S, Tanikawa M, Terakawa N 2000 Tumor necrosis factor-α promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression. J Clin Endocrinol Metab 85:824–829

- 10 Kai K, Nasu K, Nakamura S, Fukuda J, Nishida M, Miyakawa I 2002 Expression of interferon- $\gamma$ -inducible protein-10 in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 8:176–180
- 11 Olivares EG, Montes MJ, Oliver C, Galindo JA, Ruiz C 1997 Cultured human decidual stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. *Biol Reprod* 57:609–615
- 12 Ruiz C, Montes MJ, Abadía-Molina AC, Olivares EG 1997 Phagocytosis by fresh and cultured human decidual stromal cells. Opposite effects of interleukin-1 $\alpha$  and progesterone. *J Reprod Immunol* 33:15–26
- 13 Imai K, Maeda M, Fujiwara H, Okamoto N, Kariya M, Emi N, Takakura K, Kanzaki H, Mori T 1992 Human endometrial stromal cells and decidual cells express cluster of differentiation (CD) 13 antigen/aminopeptidase N and CD10 antigen/neutral endopeptidase. *Biol Reprod* 46:328–334
- 14 Montes MJ, Alemán P, Tortosa CG, Borja C, Ruiz C, Olivares EG 1996 Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with hematopoietic cells. *J Reprod Immunol* 30:53–66
- 15 Kariya M, Kanzaki H, Takakura K, Imai K, Okamoto N, Emi N, Kariya Y, Mori T 1991 Interleukin-1 inhibits *in vitro* decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 73:1170–1174
- 16 Jikihara H, Handwerger S 1994 Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits the synthesis and release of human decidual prolactin. *Endocrinology* 134:353–357
- 17 Kanda Y, Jikihara H, Markoff E, Handwerger S 1999 Interleukin-2 inhibits the synthesis and release of prolactin from human decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab* 84:677–681
- 18 Lysiak JJ, Lala PK 1992 In situ localization and characterization of bone-marrow derived cells in the decidua of normal murine pregnancy. *Biol Reprod* 47:603–613
- 19 García-Pacheco JM, Oliver, Kimatrai M, Blanco FJ, Olivares EG 2001 Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related with bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod* 7:151–157
- 20 Oliver C, Montes MJ, Galindo JA, Ruiz C, Olivares EG 1999 Human decidual stromal cells express  $\alpha$ -smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum Reprod* 14:1599–1605
- 21 Raghupathy R 1997 Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 18:478–482

- 22 Kleinman H, McGoodwin EB, Rennard SI, Martin GR 1979 Preparation of collagen substrates for cell attachment: effect of collagen concentration and phosphate buffer. *Anal Biochem* 94:308–313
- 23 Oliver C, Cowdrey C, Abadía-Molina AC, Olivares EG 1999 Antigen phenotype of cultured decidual stromal cells of human term decidua. *J Reprod Immunol* 45:19–30
- 24 SumathiVP, McCluggage WG 2002 CD10 is useful in demonstrating endometrial stroma at ectopic sites and in confirming a diagnosis of endometriosis. *J Clin Pathol* 55:391–392
- 25 Foo IT, Naylor IL, Timmons MJ, Trejdosiewicz LK 1992 Intracellular actin as a marker for myofibroblasts in vitro. *Lab Invest* 67:727–733
- 26 Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chapponier C, Brown R 2002 Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:349–363
- 27 Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A 1994 Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1:71–81
- 28 Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN 2001 Peripheral blood fibrocytes: Differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 166:7556–7562
- 29 Chesney J, Metz C, Stavitsky AB, Bacher M, Bucala R 1998 Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol* 160:419–425
- 30 Chesney J, Bacher M, Bender A, Bucala R 1997 The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6307–6312
- 31 Pedagogos E, Hewitson TD, Walker RG, Nicholis KM, Becker GJ 1997 Myofibroblast involvement in chronic transplant rejection. *Transplantation* 64:1192–1197
- 32 MacDonald TT, Bajaj-Elliott M, Pender SLF 1999 T cells orchestrate intestinal mucosal shape and integrity. *Immunol Today* 20:505–510
- 33 Chitchley HOD, Kelly RW, Brenner RN, Baird DT 2001 The endocrinology of the menstruation: a role for the immune system. *Clin Endocrinol (Oxf)* 55:701–710
- 34 Vicovac LM, Starkey PM, Aplin JD 1994 Effect of cytokines on prolactin production by human stromal cells in culture: studies using cells freed from bone marrow contaminants. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1877–1882
- 35 Ferenczy A, Guralnick M 1983 Endometrial microstructure: structure-function relationships throughout the menstrual cycle. *Semin Reprod Endocrinol* 1:205–212

- 36 Kauma S, Matt D, Storm S, Eierman D, Tuner T 1990 Interleukin-1 $\beta$ , human leukocyte antigen HLA-DR $\alpha$ , and transforming growth factor-beta expression in endometrium, placenta, and placental membranes. *Am J Obstet Gynecol* 163:1430–1437
- 37 Saji M, Taga M, Matsui H, Suyama K, Kurogi K, Minaguchi H 1997 Gene expression and specific binding of platelet-derived growth factor and its effect in DNA synthesis in human decidual cells. *Mol Cell Endocrinol* 132:73–80
- 38 Chegini N, Rossi MJ, Masterson BJ 1992 Platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), and EGF and PDGF  $\beta$ -receptors in human endometrial tissue: localization and *in vitro* action. *Endocrinology* 130:2373–2385
- 39 Chegini N, Zhao Y, Williams RS, Flanders KC 1994 Human uterine tissue throughout the menstrual cycle expresses transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1), TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3, and TGF $\beta$  type II receptor messenger ribonucleic acid and protein and contains [<sup>125</sup>I]TGF $\beta$ 1-binding sites. *Endocrinology* 135:429–449
- 40 Giudice LC 1994 Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil Steril* 61:1–17
- 41 Tang XM, Zhao Y, Rossi MJ, Abu-rustum RS, Ksander GA, Chegini N 1994 Expression of transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) isoforms and TGF $\beta$  type II receptor messenger ribonucleic acid and protein, and the effect of TGF $\beta$ s on endometrial stromal cell growth and protein degradation *in vitro*. *Endocrinology* 135:450–459
- 42 Olivares EG, Muñoz R, Tejerizo G, Montes MJ, Gómez-Molina F, Abadía-Molina AC 2002 Decidual lymphocytes of human spontaneous abortions induce apoptosis but not necrosis in JEG-3 extravillous trophoblast cells. *Biol Reprod* 67:1211–1217
- 43 Marzi M, Vigano A, Trabattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, Clerici M 1996 Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 106:127–133
- 44 Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C, Romagnani S, Maggi E 1995 Progesterone favours the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol* 155:128–133
- 45 Choi BC, Polgar K, Xiao L, Hill JA 2000 Progesterone inhibits in-vitro embryotoxic Th1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 15:46–59
- 46 Starkey PM 1991 Expression on cells of early human pregnancy, of the p75, IL-2 and p145, IL-4 receptor proteins. *Immunology* 73:64–70

47 Ogasawara MS, Aoki K, Aoyama T, Katano K, Inuma Y, Ozaki Y, Suzumori K 2000  
Elevation of transforming growth factor- $\beta$ 1 is associated with recurrent miscarriage. *J Clin Immunol* 20:453–457

**LA INTERLEUCINA 10 PRODUCE  
RELAJACIÓN DE LAS CÉLULAS  
DECIDUALES ESTROMALES**

## La Interleucina-10 produce relajación de las Células Deciduales Estromales

---

María Kimatrai<sup>1</sup>, Osmany Blanco<sup>1</sup>, Raquel Muñoz-Fernández<sup>1</sup>, Irene Tirado<sup>1</sup>, Francisco Martín<sup>2</sup>, Ana Clara Abadía Molina<sup>1</sup> y Enrique G.Olivares<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Hospital Universitario San Cecilio, Universidad de Granada, España.

<sup>2</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Granada, España.

### INTRODUCCIÓN

Las células deciduales estromales (DSC) son el principal componente celular de la interfase materno-fetal. Estas células constituyen un tipo distintivo de células cuyo origen y linaje ha permanecido desconocido hasta hace poco. Nosotros hemos demostrado que las DSC humanas están relacionadas con precursores estromales de médula ósea, y su morfología, fenotipo y funciones son similares a la de los miofibroblastos, células fibroblásticas con actividad contráctil involucradas en la retracción de las lesiones (1-3). Las células deciduales estromales expresan  $\alpha$  actina de músculo liso (smooth muscle actin,  $\alpha$ -SM actina) (1-3), un microfilamento marcador de miofibroblastos (4), y son capaces de contraer matrices de gel de colágeno bajo el efecto de TGF $\beta$ 1 y PDGF (platelet-derived growth factor, Factor de crecimiento derivado de plaquetas) (3). Además, al igual que los miofibroblastos, las DSC presentan actividades inmunes que aparentemente parecen ser muy relevantes en el diálogo materno-fetal (5-8).

Hay una evidencia cada vez mayor de que el sistema inmunológico está involucrado en el embarazo normal ó en un aborto (9). Tanto en ratones como en humanos, el embarazo normal está relacionado con la producción local y periférica de citocinas anti-inflamatorias (10), mientras que el aborto está relacionado con Th1 y la producción de citocinas inflamatorias (10,11). Las células deciduales estromales parecen estar implicadas en el balance de citocinas Th1-inflamatorias / citocinas anti-inflamatorias, ya que citocinas Th1 como la IL2 bloquean la decidualización (12) e inducen la contractilidad celular de las DSC, y esto podría contribuir a la expulsión del trofoblasto en el aborto espontáneo (3). Aquí estudiamos el efecto de las citocinas anti-inflamatorias, que favorecen el embarazo normal (10), en la contractilidad de las células DSC.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Tejidos.**

Se procesaron diez muestras procedentes de interrupciones voluntarias del embarazo de primer trimestre (6 a 11 semanas) de pacientes sanas, de entre 20 y 30 años. Se excluyeron mujeres que recibían medicación o tenían alguna infección, o con alguna enfermedad autoinmune u otro tipo de patología sistémica ó local. Ninguno de los abortos fue inducido farmacológicamente. Las muestras se obtuvieron mediante raspado vaginal en la clínica El Sur (Málaga), y la clínica Ginegranada (Granada). Previamente se obtuvo el consentimiento del paciente. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético y de Investigación del Hospital Universitario San Cecilio, Granada.

### **Medio para fibroblastos.**

De acuerdo a la información proporcionada por el proveedor (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), el medio para fibroblastos consiste en un medio basal para fibroblastos (versión modificada del medio de cultivo MCDB 105), y un suplemento que contiene suero fetal bovino (FCS, Fetal Calf Serum, concentración final 2%) y pequeñas cantidades no especificadas de factor de crecimiento de fibroblastos básico, heparina, factor de crecimiento epidérmico e hidrocortisona.

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

Los tejidos deciduales fueron examinados histológicamente para excluir la presencia de alguna posible infección ó infiltración inflamatoria. Las muestras de decidua no se mezclaron para evitar la inducción de secreción de citocinas como resultado de una reacción alogénica de los leucocitos que inicialmente contaminan los cultivos de DSC. Las muestras se lavaron en PBS (phosphate buffered saline, tampón fosfato) y la decidua fue cuidadosamente separada del trofoblasto. Los fragmentos de decidua fueron desmenuzados con bisturí en un volumen pequeño de medio RPMI 1640 (Sigma) con 100 IU/ml de penicilina y gentamicina (50 µg/ml), y se pusieron en una solución de tripsina al 5% con EDTA al 0.2% (Sigma) durante 15 min (minutos) a 37°C. La reacción se detuvo añadiendo medio RPMI 1640 al 20% de FCS (Gibco, Paisley, UK), la suspensión se filtró por una

gasa estéril y se centrifugó a 450 g durante 10 min. El pellet se resuspendió en RPMI y se centrifugó sobre un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia) durante 20 min a 600 g. Las células de la interfase se recogieron, se resuspendieron en PBS y se lavaron. Esta suspensión fue incubada en frascos de cultivo durante 1 h con RPMI 10% FCS para permitir que los macrófagos, granulocitos se adhieran al frasco de cultivo. El sobrenadante fue lavado y se incubó en medio para fibroblastos suplementado con 100 IU/ml de penicilina y 50 µg/ml de gentamicina. Después de la incubación durante toda la noche para permitir que las DSC se adhirieran al frasco de cultivo, se eliminaron las células que permanecían en el sobrenadante. Las células adheridas son principalmente DSC. El medio para fibroblastos fue entonces reemplazado y cambiado dos veces por semana, y después de dos a cuatro semanas, las células adherentes cubrían toda la superficie de 25cm<sup>2</sup> del frasco. Las células que permanecen adheridas son principalmente DSC. El crecimiento de las DSC en proliferación es superior a otras células que contaminen la muestra, garantizando aún más la pureza del cultivo. La pureza del cultivo se determinó confirmando la co-expresión por citometría de flujo de CD10 y CD13, y la ausencia de CD45 (1-3,5). En el medio para fibroblastos las células proliferan durante 8-12 semanas; durante este periodo el fenotipo antigénico fue estable (2).

### **Reactivos.**

Interleucina-10 (IL10) e IL4 fueron proporcionadas por la casa comercial Sigma-Aldrich. Los anticuerpos monoclonales neutralizantes para IL10 (JES3-19F1) y IgG2a de rata (R35-95) fueron proporcionados por Pharmingen (BD Bioscience, Erembodegem, Bélgica).

### **Ensayo de contractilidad en gel de colágeno.**

El ensayo de contractilidad celular se realizó de acuerdo a lo previamente descrito (13). Una solución estéril y purificada de colágeno bovino solubilizado en pepsina (Vitrogen, Cohesion Technologies, Inc., Palo Alto, CA) y preparado de acuerdo a las instrucciones proporcionadas con el producto comercial con 25 x 10<sup>4</sup> DSC. La mezcla de colágeno/células (100 µl/pocillo) se deposita en placas de cultivo y se deja polimerizar a

37°C durante 30 min. Inmediatamente después de la polimerización se añadió 2 ml de medio para fibroblastos con o sin citocinas en cada pocillo. Después de 48 h, la altura (l) y el diámetro (d) de cada burbuja de colágeno se miden con una escala de ajuste fino (para l) y con el tornillo micrométrico del microscopio (para d), y el volumen (V) de cada gel se calcula aplicando con la siguiente fórmula:

$$V = 1/24 \times \pi \times l \times (3 \times d^2 + l^2).$$

La media de las medidas (n=6) tomadas en cada pocillos se usaron para estimar el volumen. Los datos se presentan como el volumen de gel obtenido para las DSC tratadas con citocinas comparado con el volumen de aquellas cultivadas en la ausencia de citocinas.

Para demostrar la especificidad de la acción de la IL10, el ensayo de contracción fue llevado a cabo como se ha indicado, pero añadiendo un anticuerpo monoclonal neutralizante anti-IL10 (JES3-19F1) (1, 5 10 µg/ml) o el control de rata IgG2a (10 µg/ml) a los pocillos después de la polimerización del gel y se incubo durante 1 h antes de añadir 50 ng/ml de IL10. Las células deciduales estromales con el anticuerpo y la citocina fueron entonces incubadas por un periodo adicional de 48 h antes de medir la altura y el diámetro de los geles.

### **Western immunoblotting.**

Las células fueron lisadas con búfer de lisis 1% NP-40 conteniendo un cocktail de inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich), se resolvieron en geles de poli(acrilamida) 10% (SDS-PAGE) y fueron electro-transferidas a membranas Hybond-P PVDF (Amersham, Buckinghamshire, England). Las membranas se bloquearon con 5% leche desgrasada en polvo y sondadas por espacio de 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -SM actina (Sigma-Aldrich), seguido de una incubación de 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpos de cabra anti-ratón marcado con HRPO (Caltag, Burlingame, CA). La membrana fue revelada por quimioluminiscencia (ECL, Amersham) y en contacto con una película de autorradiografía (Amersham). Los controles de carga se rehibridaron sobre la membrana previamente lavada con un anticuerpo policlonal anti-ERK (Anti-MAP-Kinasa1/2, Upstate Biotechnology, UK).

### **Microscopía de inmunofluorescencia.**

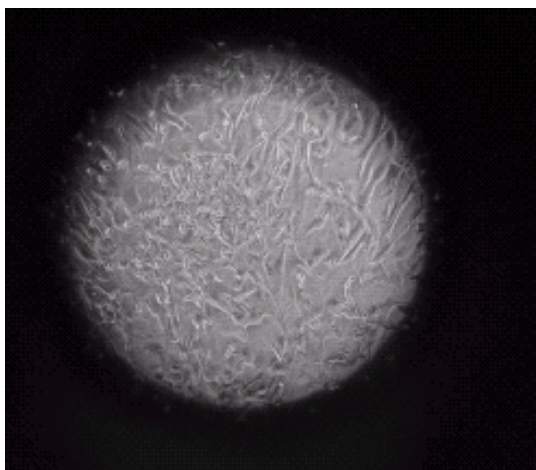
Se cultivaron células deciduales estromales en placas adecuadas con medio para fibroblastos. Tras 48 h se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído 4% (4°C 20 min) y se permeabilizaron con acetona fría durante 10 min antes de añadir el anticuerpo monoclonal marcado con fluoresceína anti  $\alpha$ -SM actina (Sigma-Aldrich) y faloidina marcada con tetrametil-rodamina isotiocianato (TRITC) (Molecular Probes Eugene OR). Las preparaciones fueron observadas con un microscopio confocal Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

### **Ensayo de IL10.**

La concentración de IL10 en el sobrenadante de los cultivos de DSC fueron determinadas por enzimo-inmuno ensayo con un kit comercial (R&D systems, Minneapolis, MN). El ensayo es sensible hasta 3.9 pg/ml de IL10. La precisión interna del ensayo es CV<6,6% y entre ensayos de CV<7.6%. El ensayo se llevo a cabo de acuerdo a las instrucciones del proveedor y las muestras se determinaron por duplicado.

### **Análisis estadístico.**

Cada experimento se realizó de 3 a 5 veces y las figuras muestran un resultado representativo de cada experimento (figuras 2 y 5). El volumen de los geles fue comparado con el test de la *t* de Student. Los valores para P de 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos (Figuras 2 y 3).

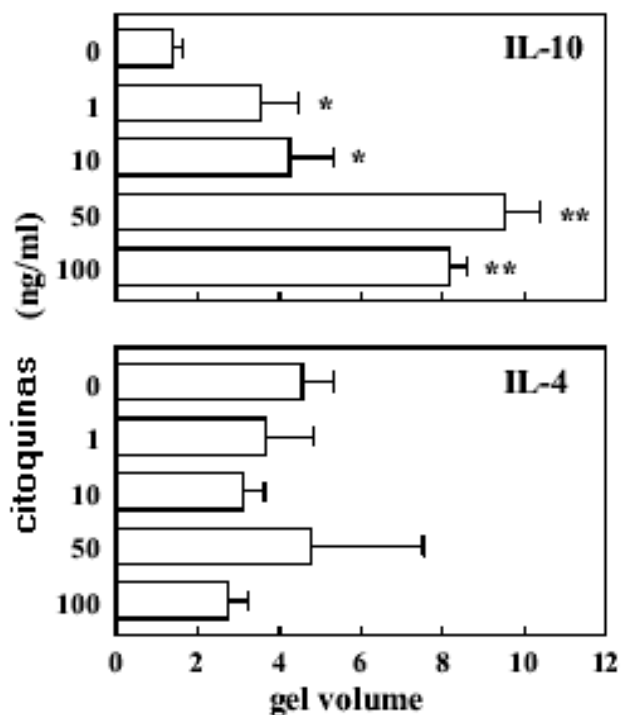


**Figura 1.** Matriz de colágeno-gel conteniendo DSC (40X)

## RESULTADOS

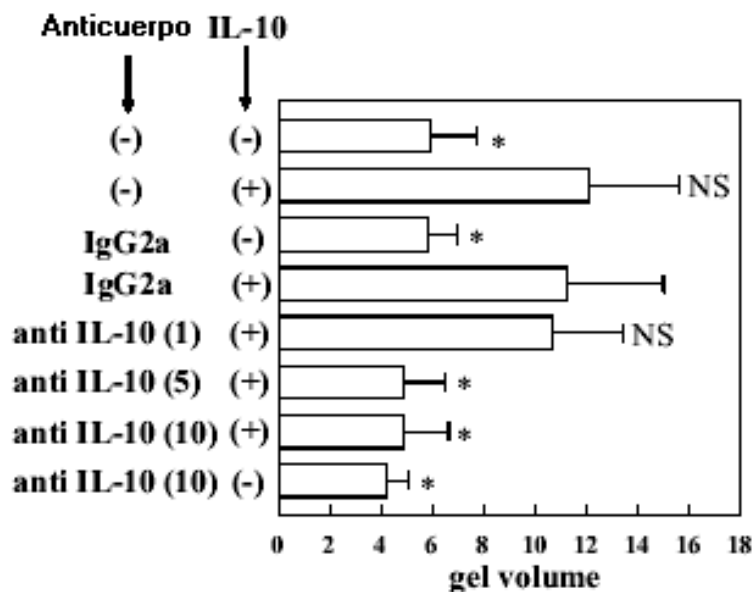
### Efecto de la IL10 e IL4 sobre la contractilidad celular.

Las células deciduales estromales fueron cultivadas en matrices colágeno (Figura 1). En éstas matrices el efecto de contractilidad de las DSC determina el volumen del gel (3,13). La IL10 incrementa el volumen de forma dosis dependiente, sin embargo la IL-4 no tiene ningún efecto significativo en el volumen de los geles (Figura 2). Estos resultados demostraban que la IL10, y no la IL4, relajó las DSC cultivadas. La especificidad del efecto de la IL10 en las DSC fue confirmada mediante bloqueo del efecto con un anticuerpo neutralizador de anti-IL10. Este anticuerpo significativamente reduce o incluso elimina el incremento de volumen de las matrices de gel inducido por la IL10, mientras que el control de rata IgG mostró no bloquear dicho efecto. La anti-IL10 también redujo significativamente el volumen de la matriz de gel de DSC cultivadas en la ausencia de IL10 (Figura 3).

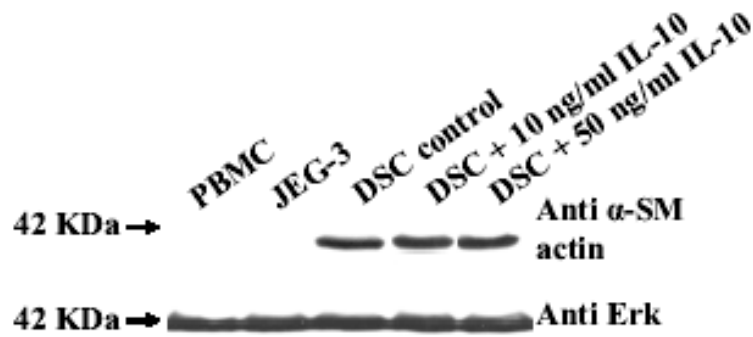


**Figura 2.** Efecto de la IL10 e IL4 sobre el volumen de las matrices de colágeno gel que contienen DSC. Las células deciduales estromales se cultivaron en dichas matrices por

espacio de 48 h en ausencia de citocinas o en presencia de las cantidades crecientes de citocinas IL10 e IL4. La media de las medidas (n=6) se utilizó para calcular el volumen de cada matriz. Los datos se presentan en unidades arbitrarias de volumen  $\pm$  SD. \*  $P < 10^{-4}$ ; \*\*  $P < 10^{-9}$  versus controles de DSC no tratadas. La IL10 pero no la IL4 produce un incremento significativo de volumen de las matrices de colágeno. Los resultados representados muestran uno de cinco experimentos totales.



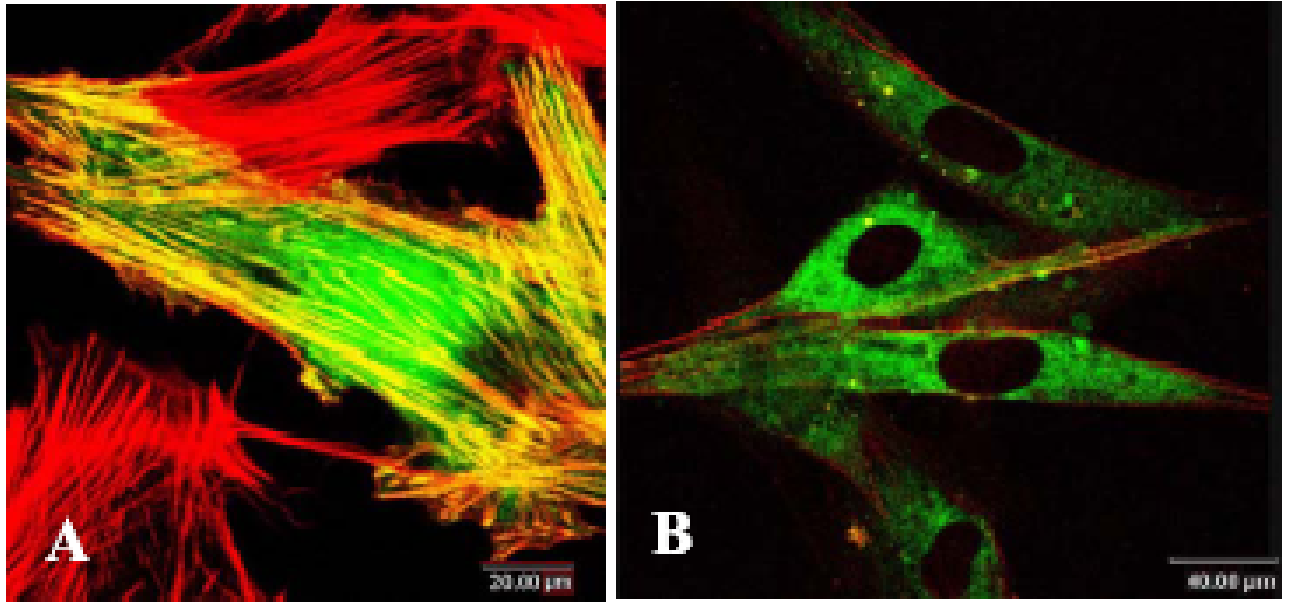
**Figura 3.** Bloqueo de la actividad neutralizante del anticuerpo monoclonal anti-IL10 humana (JES3-19F1) sobre el efecto de la IL10. Las células deciduales estromales se cultivaron en dichas matrices por espacio de 48 h en ausencia o la presencia de 50 ng/ml IL10, sin o con cantidades crecientes de anticuerpo anti-IL10 (en paréntesis 1, 5 o 10  $\mu$ g/ml). Como control se utilizó una IgG2a de rata (R35-95) (10  $\mu$ g/ml). La media del número de medidas (n=6) tomadas en cada una de las barras de concentración se utilizó para calcular el volumen del gel. Los datos se presentan como unidades arbitrarias de volumen  $\pm$  SD, \*  $P < 5 \times 10^{-3}$  versus las DSC cultivadas con IL-10 o IgG2a. El anticuerpo anti-IL10 reduce significativamente el incremento de volumen de la matriz de gel por la IL10. Este anticuerpo reduce significativamente además el volumen de las matrices de colágeno de las DSC que no fueron cultivadas con IL10 ( $P < 5 \times 10^{-2}$  significación no mostrada en la figura). Los resultados representados muestran uno de tres experimentos totales.



**Figura 4.** Detección de  $\alpha$ -SM actina en DSC cultivadas en presencia/ausencia de IL10 durante de 48 h. Células mononucleares de sangre periférica (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) y células de la línea tumoral JEG-3 se usaron como controles negativos para la expresión de  $\alpha$ -SM actina. ERK MAP-kinasa se utilizó como control de carga. Los resultados representados muestran uno de tres experimentos totales.

**El tratamiento con IL10 desciende los niveles de  $\alpha$ -SM actina en las fibras de estrés celulares.**

El efecto relajante de la IL10 sobre las DSC no depende de la inhibición en la síntesis de  $\alpha$ -SM actina, ya que como revelan los resultados del western-blot, las cantidades de  $\alpha$ -SM actina en las células no se ven afectadas (Figura 4). Sin embargo, observamos por microscopía de fluorescencia que la IL10 desciende la presencia de  $\alpha$ -SM actina de las fibras de estrés (Figure 5). Este efecto parece estar relacionado con los recientes hallazgos en miofibroblastos, en los que la contractilidad se correlaciona con una incorporación de  $\alpha$ -SM actina en las fibras de estrés (14,15). Por tanto, la contracción o relajación de los miofibroblastos o células de carácter miofibroblástico parecen estar asociadas a la incorporación ó pérdida respectiva de  $\alpha$ -SM actina en las fibras de estrés.

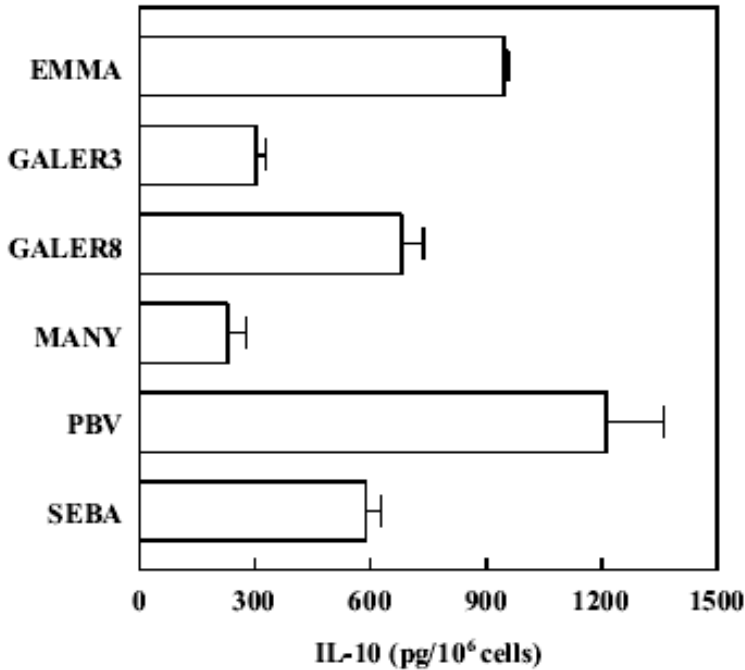


**Figura 5.** Detección de  $\alpha$ -SM actina por inmunofluorescencia en el citoplasma de las DSC. La  $\alpha$ -SM actina se detectó mediante el empleo de un anticuerpo fluoresceinado. Las fibras de estrés se evidencian con faloidina marcada con tetrametil-rodamina isotiocianato (TRITC, rojo). Las DSC sin tratar (**A**) revelan la presencia de  $\alpha$ -SM actina en las fibras de estrés (colocalización con faloidina en amarillo). Las tratadas con IL10 (50 ng/ml) durante 48 h (**B**) revelan menor intensidad en el verde y apenas colocalización. Los resultados representados muestran uno de tres experimentos totales.

### **Las células deciduales estromales cultivadas producen IL10.**

Hemos detectado IL10 en los sobrenadantes recogidos de los cultivos de las distintas líneas de DSC (Figura 6). Esto muestra que nuestras DSC cultivadas secretan IL10. Esta IL10 endógena podría contribuir a la relajación de DSC. El hecho de que la anti-IL10 añadida a los cultivos de DSC sin IL10 exógena reduzca de manera significativa el volumen de las matrices de gel, sugiere que el anticuerpo esté bloqueando el efecto de la IL10 endógena (Figura 3).





**Figura 6.** Concentraciones de IL10 en los sobrenadantes de seis líneas diferentes de DSC.

## DISCUSIÓN

Diferentes líneas de evidencias experimentales tanto en humanos como en ratones apoyan la noción de que los embarazos patológicos están asociados con diferentes mecanismos inmunológicos. En general, en los embarazos normales la respuesta de citocinas anti-inflamatorias predomina, mientras que en los abortos espontáneos la respuesta se torna a inflamatoria (9-11). Estas actividades inmunológicas tienen lugar principalmente en la decidua, el tejido materno en más estrecho contacto con el trofoblasto fetal. Las células deciduales estromales, componente celular característico de la decidua, ejerce diferentes funciones inmunológicas que pueden jugar un papel en el diálogo materno-fetal (5,16,17). Recientemente hemos demostrado que la IL2, una citocina Th1, incrementa la contractilidad celular y especulamos que esta actividad podría facilitar la expulsión del trofoblasto durante el aborto (3). En este estudio demostramos que la citocina anti-inflamatoria IL10, aunque no la IL4, relaja las DSC (Figuras 2 y 3). Este efecto de relajamiento ha sido también observado en la musculatura uterina, donde Sadowsky et al. (18) demostraron que la IL10 reducía la contractilidad uterina inducida por

la IL1 $\beta$  en monos rhesus. Este efecto puede, por tanto, favorecer la progresión normal del embarazo.

La expresión de  $\alpha$ -SM actina por las DSC y su habilidad para contraerse nos llevo a concluir que estas células son una forma particular de miofibroblasto (1,3). La contractilidad de los miofibroblastos parece estar relacionada con la incorporación de  $\alpha$ -SM actina a las fibras de estrés (15). En este sentido, el efecto relajador de la IL10 en las células (Figura 2) parece estar relacionado con la disminución de  $\alpha$ -SM actina en las fibras de estrés de las DSC (Figura 5). La progesterona, hormona que favorece el embarazo, induce la producción de citocinas de tipo Th2 por los linfocitos (19) e inhibe la producción de Th1 (20). Esta también diferencia las DSC a un estatus de progestación y bloquea sus actividades inmunológicas (16,17). De hecho, hemos observado que la progesterona también relaja las DSC cultivadas en las matrices de colágeno (resultados en preparación), aunque este puede ser un efecto indirecto a través de la inducción en la secreción de IL10 por las DSC (21).

El trofoblasto es la principal fuente de IL10 en la interfase materno-fetal (22), aunque los leucocitos deciduales (23,24) o las DSC (21) pueden producirla, y en nuestro sistema, las DSC secretaban IL10 en el medio de cultivo (Figura 6). Por lo tanto, esta citocina puede tener un efecto paracrino/autocrino en la relajación de las DSC. Se ha demostrado que la IL10 restaura el embarazo en ratones predispuestos a adquirir inmunidad inflamatoria como resultado de una polarización intrínseca de la respuesta (25), e incluso prevenir un parto inducido pretermino con LPS (26). En humanos, una deficiencia de IL10 en la placenta tiene lugar en la preeclampsia (27) y un detrimento de IL10 en la decidua se observó en los abortos perdidos (29). Esta citocina además incrementa la resistencia de las células trofoblásticas a la apoptosis mediada por Fas (29), e induce la expresión de HLA-G, una molécula MHC-Ib relacionada con la tolerancia materna al feto (30). Nuestros resultados, junto a estos hallazgos, muestran que la IL10 es una molécula relevante en los mecanismos de tolerancia materno-fetal. Sin embargo, en ratones IL10 deficientes (IL10 $^{-/-}$ ) se observa que esta molécula es determinante durante la trayectoria del crecimiento de la progenie en el útero y después de nacer, más que en llevar el embarazo a buen término (31). Al igual que la IL10, la mutación de HLA-G ( $^{-/-}$ ), una molécula que parece esencial para la tolerancia materno-fetal en humanos, se asoció con gestaciones a buen termino (31). Estas

contradicciones aparentes podrían explicarse si tenemos en cuenta el alto rango de redundancia en las acciones de moléculas del sistema inmunológico. Por otra parte, la reproducción es una función importante para la supervivencia de las especies y no podría depender de una sola molécula: muchas moléculas pueden contribuir redundantemente a esta función. Una de estas moléculas podría ser la IL10.

## REFERENCIAS

1. Oliver C, Montes MJ, Galindo JA, Ruiz C, Olivares EG 1999 Human decidual stromal cells express  $\alpha$ -smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum Reprod* 14:1599–1605
2. García-Pacheco JM, Oliver, Kimatrai M, Blanco FJ, Olivares EG 2001 Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related with bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod* 7:151–157
3. Kimatrai M, Oliver C, Abadía-Molina AC, García-Pacheco JM, Olivares EG 2003 Contractile activity of human decidual stromal cells. *J Clin Endocrinol Metabol* 88:844–849
4. Foo IT, Naylor IL, Timmons MJ, Trejdosiewicz LK 1992 Intracellular actin as a marker for myofibroblasts in vitro. *Lab Invest* 67:727–733
5. Olivares EG, Montes MJ, Oliver C, Galindo JA, Ruiz C 1997 Cultured human decidual stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. *Biol Reprod* 57:609–615
6. Huang H-Y, Wen Y, Kruessel JS, Raga F, Soong Y-K, Polan ML 2001 Interleukin (IL)-1 regulation of IL-1 and IL-1 receptor antagonist expression in cultured human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1387–1393
7. Kai K, Nasu K, Nakamura S, Fukuda J, Nishida M, Miyakawa I 2002 Expression of interferon- $\gamma$ -inducible protein-10 in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 8:176–180
8. Dunn CL, Critchley HOD, Kelly RW 2002 IL-15 regulation in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1898–1901
9. Olivares EG, Muñoz R, Tejerizo G, Montes MJ, Gómez-Molina F, Abadía-Molina AC 2002 Decidual lymphocytes of human spontaneous abortions induce apoptosis but not necrosis in JEG-3 extravillous trophoblast cells. *Biol Reprod* 67:1211–1217
10. Marzi M, Vigano A, Trabattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, Clerici M 1996 Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 106:127–133

11. Raghupathy R 1997 Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 18:478–482
12. Kanda Y, Jikihara H, Markoff E, Handwerger S 1999 Interleukin-2 inhibits the synthesis and release of prolactin from human decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab* 84:677–681
13. Kleinman H, McGoodwin EB, Rennard SI, Martin GR 1979 Preparation of collagen substrates for cell attachment: effect of collagen concentration and phosphate buffer. *Anal Biochem* 94:308–313
14. Arora PD, McCulloch CA 1994 Dependence of collagen remodelling on alpha-smooth muscle actin expression by fibroblasts. *J Cell Physiol* 159:161–175
15. Hinz B, Gabbiani G, Chaponnier C 2002 The NH2-terminal peptide of  $\alpha$ -smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo. *J Cell Biol* 157:657–663
16. Montes MJ, Tortosa CG, Borja C, Abadía AC, González-Gomez F, Ruiz C, Olivares, EG 1995 Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am J Reprod Immunol* 34:188–194
17. Ruiz C, Montes MJ, Abadía-Molina AC, Olivares EG 1997 Phagocytosis by fresh and cultured human decidual stromal cells. Opposite effects of interleukin-1 and progesterone. *J Reprod Immunol* 33:15–26
18. Sadowsky DW, Novy MJ, Witkin SS, Gravett MG 2003 Dexamethasone or interleukin-10 blocks interleukin-1-induced uterine contractions in pregnant rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 188:252–263
19. Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C, Romagnani S, Maggi E 1995 Progesterone favours the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol* 155:128–133
20. Choi BC, Polgar K, Xiao L, Hill JA 2000 Progesterone inhibits in-vitro embryotoxic Th1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 15:46–59
21. Krasnow JS, Tollerud DJ, Naus G, DeLoia JA 1996 Endometrial Th2 cytokine expression throughout the menstrual cycle and early pregnancy. *Hum Reprod* 11:1747–1754
22. Roth I, Corry DB, Locksley RM, Abrams JS, Litton MJ, Fisher SJ 1996 Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp*

23. Heikkinen J, Möttönen M, Comi J, Alanen A, Lassila O 2003 Phenotypic characterization of human decidual macrophages *Clin Exp Immunol* 131:498–505
24. Vigano P, Gaffuri B, Somigliana E, Infantino M, Vignali M, Di Blasio AM 2001 Interleukin-10 is produced by human uterine natural killer cells but does not affect their production of interferon-gamma *Mol Human Reprod* 7:971-977
25. Chaouat G, Assal Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliot J, Mosmann T, Wegmann TG 1995 IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBAx DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau. *J Immunol* 154:4261–4268
26. Dudley DJ, Dangerfield A, Edwin SS 1996 Interleukin-10 (IL-10) prevents preterm birth in a mouse model of infection-mediated preterm labor. *J Soc Gynecol Investig* 3:67A
27. Hennessy A, Pilmore HL, Simmons LA, Painter DM. 1999 A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. *J Immunol* 163:3491-3495
28. Plevyak M, Hanna N, Mayer S, Murphy S, Pinar H, Fast L, Ekerfelt C, Ernerudh J, Berg G, Matthiesen L, and Sharma S 2002 Deficiency of decidual IL-10 in first trimester missed abortion: A lack of correlation with the decidual immune cell profile. *Amer J Reprod Immunol* 47: 242-250
29. Aschkenazi S, Straszewski S, Verwer KMA, Foellmer H, Rutherford T, Mor G 2002 Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells *Biol. Reprod.* 66:1853-1861
30. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, Carosella ED, Paul P 1999 IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 11:803–811
31. White CA, Johansson M, Roberts CT, Ramsay AJ, Robertson SA 2004. Effect of interleukin-10 null mutation on maternal immune response and reproductive outcome in mice. *Biol Reprod* 70:123-131
32. Ober C, Aldrich C, Rosinsky B, Robertson A, Walker MA, Willadsen S, Verp MS, Geraghty DE, Hunt JS 1998 HLA-G1 protein expression is not essential for fetal survival. *Placenta* 19:123-132



# **DISCUSIÓN GENERAL**

## **DISCUSIÓN**

### **Las DSC expresan antígenos asociados a células hematopoyéticas, pero son células mesenquimales.**

El tejido decidual, componente materno de la interfase materno fetal, está compuesto fundamentalmente por células de tipo estromal, células glandulares y leucocitos (Bulmer, 1995). La DSC constituye un tipo particular de célula que se origina a partir de la proliferación y diferenciación (decidualización) de un precursor estromal fibroblástico (pre-DSC) localizado en el endometrio (Richards et al., 1995). Aunque la presencia de antígenos asociados a células hematopoyéticas (Imai et al., 1992; Montes et al., 1996; Olivares et al., 1997), unido a su origen en médula ósea en ratón las clasificaría como células de carácter hematopoyético (Lysiak and Lala, 1992), los resultados presentados sugieren que son células estromales de origen mesenquimal (García-Pacheco et al., 2001; Kimatrai et al., 2003; Kimatrai et al., 2005; Blanco et al., sometido) .

Obteniendo cultivos de DSC altamente purificados en medios con no más del 2% de FBS (para evitar la modulación negativa de los antígenos de membrana inducida por concentraciones elevadas de FBS indicada por Tsunoda et al., en 1990), decidimos fenotipar las DSC, para tratar de casar las conclusiones acerca de su más que posible origen en la médula ósea (Lysiak and Lala, 1992), la presencia de antígenos hematopoyéticos tales como CD10, CD13, CD21, CD23, CD80 ó CD86 (Imai et al., 1992; Montes et al., 1996; Olivares et al., 1997), y sus funciones inmunológicas (Dudley et al., 1993 a,b; Montes et al., 1995; Olivares et al., 1997; Ruiz et al., 1997; Nasu et al., 1999; Iwabe et al., 2000), con evidencias a priori totalmente incompatibles con esta hipótesis como es el hecho de que las DSC carezcan del marcador de la línea hematopoyética CD45 (Montes et al., 1996; Oliver et al., 1999), y posean sin embargo, de manera tan evidente caracteres estromales como la presencia de  $\alpha$ -SM-actina, marcador de células miofibroblásticas (Oliver et al., 1999), e incluso expresen un marcador de células osteoblásticas como la ALP ( Leung et al., 1993.)

### **Las DSC son semejantes a las FDC.**

Las FDC son células de origen incierto localizadas en los centros germinales donde posiblemente se encuentren implicadas en el desarrollo de las células B (van Nierop et al., 2002). Nuestras DSC expresan antígenos específicos de las FDC (Montes et al. 1996;



García-Pacheco et al., 2001) como el DRC-1 (Naiem et al., 1983) y HJ2 (Butch et al., 1994), siendo además positivas para CD21, CD23 y CD35, y negativas, al igual que las FDC, para los CD3, CD15 y CD45 (Tew et al., 1990; Schriver et al., 1992, Montes et al., 1996; Oliver et al., 1999). Es muy significativo el que las FDC expresen STRO-1 y CD34 (Blanco et al., sometido), detectados en DSC (García-Pacheco et al., 2001), que asocian ambos tipos celulares con el precursor estromal de médula ósea

La expresión de  $\alpha$ -SM-actina y la capacidad de retraer matrices de colágeno por las FDC también relaciona a estas células con los miofibroblastos (Blanco et al., sometido), en una forma semejante a como sucedía con las DSC (Oliver et al., 1999, Kimatrai et al., 2003), sugiriendo que ambos tipos de células son formas especializadas de miofibroblasto.

El número de células NK es bajo en el endometrio durante la fase proliferativa del ciclo, pero aumenta durante la fase secretora. Las células NK mueren por apoptosis durante el periodo premenstrual pero sobreviven durante el primer trimestre cuando se produce la gestación (Bulmer et al., 1991). Esta variación ha sugerido que las hormonas esteroideas son las que están involucradas en la estimulación de las NK, no obstante, estas células carecen de receptores para estrógeno o progesterona (King et al., 1996; Stewart et al., 1998). Aunque se sabe que la IL2 es un potente estimulador de las NK *in vitro* (Ferry et al., 1990; King et al., 1992), esta citocina es difícil de detectar en un endometrio o decidua no patológico (Saito et al., 1993; Jokhi et al., 1997), lo que es compatible con nuestros resultados presentados respecto a la contractilidad y la expulsión trofoblástica. Por ello se ha propuesto como posible mediadora la IL15, con una estructura y función similar a la de la IL2, es capaz de ejercer efectos proliferativos sobre toda la población linfocitaria, incluido las NK (Carson et al., 1994; Armitage et al., 1995), contribuyendo el INF $\gamma$  que producen estas a los cambios vasculares que se producen en las arterias uterinas durante una gestación normal, en un modo aún no definido (Ashkar et al., 2000). La IL15 uterina humana, aparece cuando comienza la decidualización (Moffett-King 2002), y se incrementa durante la gestación cuando el tejido decidualizado aumenta (Okada et al., 2000; Kitaya et al., 2000), especialmente en las células perivasculares que rodean las arterias espirales uterinas (Kitaya et al., 2000), donde se localizan los precursores de las DSC (Ferenczy et al., 1983), si a esto le añadimos que las DSC producen IL15, y que además la producción

aumenta cuando son estimuladas con progesterona (Kitaya et al., 2000), y que en ausencia de dicha citocina las NK no se desarrollan (Ashkar et al., 2003), podemos decir, y puesto que las uNK establecen un estrecho contacto con las DSC, (King 2000), (pudiendo ser el CD34 el nexo de unión (García-Pacheco et al., 2001), que ambas colaborarían en una función inmunomoduladora, dado que una escasa presencia de uNK se ha correlacionado con la pérdida de integridad de la decidua y la menstruación (King 2000). Y como comentábamos que, en base a las características fenotípicas y ultra-estructurales de las FDC respecto a las DSC, ambas podrían ser células equivalentes, podríamos encontrar una función equivalente de esta interacción DSC-uNK a la que tienen las FDC en relación a la selección de los linfocitos B memoria. FDC presentan el antígeno en su forma nativa a los linfocitos B, de los cuales, sólo aquellos con receptores B de alta afinidad podrán unir, (el resto de ellos, morirá por apoptosis).

#### **Las DSC están relacionadas con el precursor estromal de médula ósea.**

Nuestras conclusiones son, que aunque, ambas teorías son a priori contrapuestas, no son sin embargo excluyentes, así, la presencia en nuestras células de CD34, antígeno detectado en los precursores de las células hematopoyéticas (Civin et al., 1984) indicaría efectivamente un origen localizado en la médula ósea, no obstante, ni origen ni marcador tienen porqué asociarlas directamente a un linaje hematopoyético, pues dicho antígeno no sólo se expresa en células de este tipo sino también en precursores de carácter estromal localizados en la médula ósea (Simmons et al., 1991), los cuales diferirían de aquellos en la expresión de STRO-1 (Simmons and Torok-Storb, 1991b).

Las DSC son, como los precursores fibroblásticos de Simmons and Torok-Storb, 1991a,b) CD34+ y STRO-1+, pero aún más, demostramos como comparten entre sí con otros elementos celulares (tales como fibroblastos, adipocitos, osteoblastos y condrocitos) antígenos que incluye la presencia de CD10, CD13, CD29,  $\alpha$ -SM-actina y fosfatasa alcalina, lo que nos permite, no sólo conciliar la relación de estas células en cuanto a su origen en la médula ósea con la presencia de características no hematopoyéticas (mesenquimales), sino también concluir, hipotetizando, que, de las células formadoras de colonias fibroblásticas localizadas en la médula ósea STRO-1+, similares (sino idénticas) a las células progenitoras mesenquimales (Caplan 1991) procederían como de un precursor

común cada una de ellas y por migración hasta su ubicación definitiva y posterior diferenciación originarían todos los tipos celulares anteriormente mencionados. Igualmente esto explicaría el hecho de que compartan una batería antigénica común, pero que en función del lugar en el que se diferencien, pierdan o desarrollen determinados marcadores de acuerdo a las funciones que van a ejercer.

De la misma manera, se debe tener en cuenta, que a mayor tiempo de cultivo *in vitro*, parecen presentarse regulaciones negativas de determinados antígenos. En el caso de las DSC, la regulación a la baja que, con respecto a las células frescas encontramos en el CD34, podría indicarnos, que puesto que se trata de un marcador de precursores (Strauss et al., 1986), es lógico que se pierda conforme la célula se diferencia *in vitro*. En cuanto a su posible función, de la misma manera que CD34 parece mediar en el contacto célula hematopoyética-célula estromal en el desarrollo y regulación de la hematopoyesis (Healy et al., 1995), y dado que la decidua contiene elevadas proporciones de leucocitos (Bulmer 1995) necesarios para la diferenciación y progreso del embarazo (Mincheva-Nilsson et al., 1997), sería interesante comprobar si es el CD34 el que media el contacto célula decidua-célula NK, dado que son, al parecer las DSC, las que por interacción con las NK se encargan de su proliferación y diferenciación (King et al., 1999).

### **Las DSC como miofibroblastos.**

Aunque las muchas actividades inmunológicas que son capaces de ejercer las DSC y, según muchos autores, su origen en la médula ósea, han propiciado que se las clasifique como células hematopoyéticas (Lysiak and Lala 1992), hemos defendido en los dos epígrafes anteriores porqué las DSC las encuadramos más en células de carácter estromal, basándonos, entre otras cosas, en la expresión de estas de un marcador considerado de miofibroblastos: la  $\alpha$ -SM-actina (Foo et al., 1992)

Como las DSC, los fibroblastos y miofibroblastos expresan antígenos hematopoyéticos (Bucala et al., 1994; Abe et al., 2001), secretan citocinas (Chesney et al., 1998), coestimulan la proliferación de las células T (Chesney et al., 1997), y están implicados en el rechazo de tejidos transplantados (Pedagogos et al., 1997). Cabría preguntarse, de forma equivalente, si las DSC, como los miofibroblastos desarrollan actividad contráctil.

Nuestros resultados demuestran que citocinas como la TGF $\beta$ 1 y PDGF, que inducen la contractilidad en miofibroblastos (Tomasek et al., 2002), son capaces de inducir la contracción de las DSC. El hecho de que estas citocinas además inhiban la decidualización y estimulen la proliferación celular (Vicovac et al., 1994), lleva a pensar que la actividad contráctil estaría fundamentalmente asociada a las células preDSC. De hecho, las DSC cultivadas por nosotros en ausencia de progesterona son equivalentes a las preDSC, (Glasser et al., 1986; Tabanelli et al., 1992).

¿Qué implicación funcional puede tener esto?, las preDSC se localizan circunscribiendo las venas (Ferenczy et al., 1983) lo que sugiere que podrían tener una papel importante en la regulación del flujo sanguíneo, y, como en el caso de caso de los miofibroblastos intestinales encargados de renovar la mucosa intestinal (MacDonald et al., 1999), en las células endometriales estromales, este proceso conduciría a la pérdida de la integridad de las venas y capilares y destrucción de los intersticios de la matriz endometrial para dar finalmente el sangrado característico de la menstruación. La actividad contráctil de las ESC favorecería la expulsión del endometrio durante la menstruación. Por otra parte, la actividad contráctil de las DSC podría contribuir a la expulsión del trofoblasto durante el aborto espontáneo.

### **Las DSC y la balanza Th1/Th2, aborto espontáneo/embarazo normal.**

Diferentes líneas experimentales evidencian que tanto en humanos como en ratones los embarazos patológicos están asociados con mecanismos de tipo inmunológico. En general, los embarazos normales se asocian a un predominio de citocinas Th2, mientras que los abortos espontáneos se asocian a una prevalencia de Th1 (Marzi et al., 1996; Raghupaty et al., 1997). Las funciones inmunológicas desarrolladas por las DSC se incrementan en presencia de citocinas inflamatorias y Th1 (Dudley et al., 1993a; Ruiz et al., 1997; Arima et al., 2000), a la vez que estas citocinas inhiben el proceso de diferenciación (decidualización) (Kariya et al., 1991; Jikihara y Handwerger 1994; Kanda et al., 1999). Por otra parte estas funciones de tipo inmunitario, se ven disminuidas significativamente cuando, tanto DSC como ESC, son cultivadas con progesterona, responsable de la decidualización (Kariya et al., 1991; Montes et al., 1995; Ruiz et al., 1997; Arici et al., 1999).

Desde el punto de vista de la actividad contráctil demostrada en las DSC, TGF $\beta$ 1 y PDGF, dos citocinas capaces de inducir la contractilidad en miofibroblastos (Tomasek et al., 2002), son capaces de hacer lo mismo en las células deciduales. Otra citocina capaz de inducir la contractilidad de las DSC, según nuestros resultados, ha sido la IL-2 (Th1). El hecho de que estas tres citocinas inhiban la decidualización (fenómeno asociado al embarazo normal) (Kanda et al., 1999) y estimulen la contractilidad de las DSC, sugiere que se encuentran implicadas en el aborto. Esta hipótesis es confirmada por el incremento en abortos espontáneos de TGF $\beta$ 1 (Ogasawara et al., 2000) e IL2 (Raghupathy et al., 1997). Es probable que la actividad contráctil de las DSC intervenga en la expulsión del trofoblasto durante el aborto espontáneo.

Y puesto que el embarazo normal es un fenómeno Th2, ¿qué les sucede a las DSC en presencia de este tipo de citocinas?. En nuestros resultados, la IL10 inhibe la contractilidad de las DSC. Es lógico pensar que esta actividad relajante favorece el desarrollo normal del embarazo. Hemos podido observar, no obstante, que la IL4, otra citocina Th2, no presenta efecto alguno sobre la actividad contráctil de las DSC.

El trofoblasto es la principal fuente de IL10 (Roth et al., 1996) en la interfase materno-fetal, aunque linfocitos deciduales (Heikkinen et al., 2003; Viganò et al., 2001) y las propias DSC (Krasnow et al., 1996) pueden producirla (Kimatrai et al., 2005). De acuerdo con el concepto anteriormente dado, una producción anormalmente baja de IL10 (descenso de Th2) se asocia con embarazos patológicos (Hill et al., 1995; Darmochwal-Kolarz et al., 1999; Hennessy et al., 1999; Jenkins et al., 2000) y aborto (Plevyak et al., 2002). Esta citocina aumenta la resistencia de las células trofoblásticas a la apoptosis mediada por Fas (Aschkenazi et al., 2002), e induce en el trofoblasto la expresión de HLA-G, una molécula MHC-Ib relacionada con la tolerancia al feto (White et al., 2004). Nuestros resultados sugieren que la IL10 es, efectivamente, una molécula relevante en la tolerancia materno-fetal, pues demostramos como relaja las DSC (Kimatrai et al., 2005; figuras 2,3), de forma semejante a como lo hace con la musculatura uterina de monos rhesus (Sadowsky et al., 2003). Según concluimos anteriormente, las DSC son una forma especializada de miofibroblasto (Oliver et al., 1999; Kimatrai et al., 2003), y, puesto que en los miofibroblastos, la contractilidad depende de la incorporación de  $\alpha$ -SM-actina a las fibras de estrés (Hinz et al., 2002), nosotros, de forma semejante pero contrapuesta, hemos

demostrado cómo, el efecto relajante está relacionado con un descenso de los niveles de  $\alpha$ -SM-actina en las fibras de stress de las DSC (Kimatrai et al., 2005).

En línea con estos hallazgos, hemos observado como la progesterona, hormona asociada al embarazo normal, responsable de la decidualización y capaz de aumentar la secreción de citocinas Th2 (Piccinni et al., 1995) en detrimento de las Th1 (Choi et al., 2000), induce un efecto relajante en las DSC. Es probable, no obstante que este efecto sea indirecto, a través de la producción de la IL10 (en preparación).

Con esto concluimos que, la propia célula DSC, regulada por citocinas, no sólo podría participar en el aborto con su capacidad contráctil, sino también, que podría estar implicada directamente en todo lo contrario, mediando en la tolerancia al feto. Las DSC, por tanto, constituyen un punto de control y regulación inmunológico, en la balanza Th1/Th2 del embarazo normal y patológico,

## REFERENCIAS

1. Abe R, Donnelly SC Peng T Bucala R Metz CN. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol.*2001 Jun; 166: 7556-62.
2. Arici A, Senturk LM Seli E Bahtiyar MO Kim G. Regulation of monocyte chemotactic protein-1 expression in human endometrial stromal cells by estrogen and progesterone. *Biol Reprod.*1999; 61: 85-90.
3. Arima K, Nasu K Narahara H Fujisawa K Matsui N Miyakawa I. Effects of lipopolysaccharide and cytokines on production of RANTES by cultured human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod.*2000; 6: 246-51.
4. Armitage RJ, Macduff BM Eisenman J Paxton R Grabstein KH. IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J Immunol* 1995; 154:483–90 .
5. Aschkenazi S, Straszewski S Verwer KM Foellmer H Rutherford T Mor G. Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells. *Biol Reprod.*2002; 66: 1853-61.
6. 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: 2937-44.
7. 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.
8. Bucala R, Spiegel LA Chesney J Hogan M Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med.*1994; 1: 71-81.
9. Bulmer JN, Longfellow M Ritson A. Leukocytes and resident blood cells in endometrium. *Ann N Y Acad Sci.*1991; 622: 57-68.
10. Bulmer JN, Morrison L Longfellow M Ritson A Pace D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod* 1991; 6:791–98 .
11. Bulmer JN, Rodeck C Adinolfi M. Immunohistochemical characterization of cells retrieved by transcervical sampling in early pregnancy. *Prenat Diagn.*1995; 15: 1143-53 .

12. Butch AW, Hug BA Nahm MH. Properties of human follicular dendritic cells purified with HJ2, a new monoclonal antibody. *Cell Immunol.*1994; 155 : 27-41.
13. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.*1991; 9: 641-50.
14. Carson WE, Giri JG Lindemann MJ Linett ML Ahdieh M Paxton R Anderson D Eisenmann J Grabstein K Caligiuri MA. IL-15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 1994; 180:1395–1403 .
15. Chesney J, Bacher M Bender A Bucala R. The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A.*1997; 94: 6307-12.
16. Chesney J, Metz C Stavitsky AB Bacher M Bucala R. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol.*1998; 160: 419-25.
17. Choi BC, Polgar K Xiao L Hill JA. Progesterone inhibits in-vitro embryotoxic Th1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod.*2000 Jun;15 Suppl 1: 46-59.
18. Civin CI, Strauss LC Brovall C Fackler MJ Schwartz JF Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.*1984; 133: 157-65.
19. Darmochwal-Kolarz D, Leszczynska-Gorzela B Rolinski J Oleszczuk J. T helper 1- and T helper 2-type cytokine imbalance in pregnant women with pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*1999; 86: 165-70.
20. Dudley DJ, Chen CL Branch DW Hammond E Mitchell MD. A murine model of preterm labor: inflammatory mediators regulate the production of prostaglandin E2 and interleukin-6 by murine decidua. *Biol Reprod.*1993; 48: 33-9.
21. Dudley DJ, Trautman MS Mitchell MD. Inflammatory mediators regulate interleukin-8 production by cultured gestational tissues: evidence for a cytokine network at the chorio-decidual interface. *J Clin Endocrinol Metab.*1993; 76: 404-10.
22. Ferenczy, A. and Guralnick M. Endometrial microstructure: structure–function relationships throughout the menstrual cycle. *Semin.Reprod.Endocrinol.*1983, 1, 205–12 .
23. Ferry BL, Starkey PM Sargent IL Watt GMO Jackson M Redman CWG. Cell populations in the human early pregnancy decidua: natural killer activity and response to interleukin-2 of CD56-positive large granular lymphocytes. *Immunology* 1990; 70:446–52 .



24. Foo IT, Naylor IL Timmons MJ Trejdosiewicz LK. Intracellular actin as a marker for myofibroblasts in vitro. *Lab Invest.*1992; 67: 727-33.
25. Garcia-Pacheco JM, Oliver C Kimatrai M Blanco FJ Olivares EG. Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related to bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod.*2001; 7: 1151-7 .
26. Glasser SR, Julian J. Intermediate filament protein as a marker of uterine stromal cell decidualization. *Biol Reprod.*1986; 35: 463-74.
27. Healy L, May G Gale K Grosveld F Greaves M Enver T. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.*1995; 92: 12240-4.
28. Heikkinen J, Mottonen M Komi J Alanen A Lassila O. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. *Clin Exp Immunol.*2003; 131: 498-505.
29. Hennessy A, Pilmore HL Simmons LA Painter DM. A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. *J Immunol.*1999; 163: 3491-5.
30. Hill JA. T-helper 1-type immunity to trophoblast: evidence for a new immunological mechanism for recurrent abortion in women. *Hum Reprod.*1995; 10 Suppl 2: 114-20.
31. Hinz B, Gabbiani G Chaponnier C. The NH<sub>2</sub>-terminal peptide of alpha-smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo. *J Cell Biol.*2002; 157: 657-63.
32. Imai K, Maeda M Fujiwara H Okamoto N Kariya M Emi N Takakura K Kanzaki H Mori T. Human endometrial stromal cells and decidual cells express cluster of differentiation (CD) 13 antigen/aminopeptidase N and CD10 antigen/neutral endopeptidase. *Biol Reprod.*1992; 46: 328-34.
33. Iwabe T, Harada T Tsudo T Nagano Y Yoshida S Tanikawa M Terakawa N. Tumor necrosis factor-alpha promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression. *J Clin Endocrinol Metab.*2000; 85: 824-9.
34. Jenkins C, Roberts J Wilson R MacLean MA Shilito J Walker JJ. Evidence of a T(H) 1 type response associated with recurrent miscarriage. *Fertil Steril.*2000; 73: 1206-8.
35. Jikihara H, Handwerger S. Tumor necrosis factor-alpha inhibits the synthesis and release of human decidual prolactin. *Endocrinology.*1994; 134: 353-7.

36. Jokhi PP, King A Loke YW. Cytokine production and cytokine receptor expression by cells of the human first trimester placental-uterine interface. *Cytokine* 1997; 9:126-37.
37. Kanda Y, Jikihara H Markoff E Handwerger S. Interleukin-2 inhibits the synthesis and release of prolactin from human decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab.*1999; 84: 677-81.
38. Kariya M, Kanzaki H Takakura K Imai K Okamoto N Emi N Kariya Y Mori T. Interleukin-1 inhibits in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.*1991; 73: 1170-4 .
39. King A, Boocock C Sharkey AM Gardner L Beretta A Siccardi AG Loke YW. Evidence for the expression of HLA-C class I mRNA and protein by human first trimester trophoblast. *J Immunol.*1996; 156: 2068-76.
40. 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.
41. King A, Gardner L Loke YW. Evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in uterine mucosal lymphocytes. *Hum Reprod* 1996; 11:1079-82 . 2005.
42. King A, Wheeler R Carter NP Francis DP Loke YW. The response of human decidual leukocytes to IL-2. *Cell Immunol* 1992; 14:409-21 .
43. King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update.*2000; 6: 28-36.
44. Kitaya, K. J. Yasuda I. Yagi Y. Tada S. Fushiki H. Honjo. IL-15 expression at human endometrium and decidua. *Biol.Reprod.*63:683 2000 .
45. Krasnow JS, Tollerud DJ Naus G DeLoia JA. Endometrial Th2 cytokine expression throughout the menstrual cycle and early pregnancy. *Hum Reprod.*1996; 11: 1747-54.
46. Leung KS, Fung KP Sher AHL Li CK Lee KM. Plasma specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. *Journal of Bone and Joint Surgery (Br)* 75-B: 288-292; 1993 .
47. Lysiak JJ, Lala PK. In situ localization and characterization of bone marrow-derived cells in the decidua of normal murine pregnancy. *Biol Reprod.*1992; 47: 603-13.
48. MacDonald TT, Bajaj-Elliott M Pender SL. T cells orchestrate intestinal mucosal shape and integrity. *Immunol Today.*1999; 20: 505-10.

49. Marzi M, Vigano A Trabattoni D Villa ML Salvaggio A Clerici E Clerici M. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol.*1996; 106: 127-33.
50. Mincheva-Nilsson L, Kling M Hammarstrom S Nagaeva O Sundqvist KG Hammarstrom ML Baranov V. Gamma delta T cells of human early pregnancy decidua: evidence for local proliferation, phenotypic heterogeneity, and extrathymic differentiation. *J Immunol.*1997; 159: 3266-77.
51. Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol.*2002; 2: 656-63.
52. Montes MJ, Aleman P Garcia-Tortosa C Borja C Ruiz C Garcia-Olivares E. Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with hematopoietic cells. *J Reprod Immunol.*1996; 30: 53-66.
53. Montes MJ, Tortosa CG Borja C Abadia AC Gonzalez-Gomez F Ruiz C Olivares EG. Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am J Reprod Immunol.*1995; 34: 188-94.
54. Naiem M, Gerdes J Abdulaziz Z Stein H Mason DY. Production of a monoclonal antibody reactive with human dendritic reticulum cells and its use in the immunohistological analysis of lymphoid tissue. *J Clin Pathol.*1983; 36: 167-75.
55. Nasu K, Narahara H Matsui N Kawano Y Tanaka Y Miyakawa I. Platelet-activating factor stimulates cytokine production by human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod.*1999; 5: 548-53.
56. Ogasawara MS, Aoki K Aoyama T Katano K Iinuma Y Ozaki Y Suzumori K. Elevation of transforming growth factor-beta1 is associated with recurrent miscarriage. *J Clin Immunol.*2000; 20: 453-7.
57. Okada, S. H. Okada M. Sanezumi T. Nakajima K. Yasuda H. Kanzaki. Expression of interleukin-15 in human endometrium and decidua. *Mol.Hum.Reprod.*6:75 2000 .
58. 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.
59. 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.
60. Pedagogos E, Hewitson TD Walker RG Nicholis KM Becker GJ. Myofibroblast involvement in chronic transplant rejection. *Transplantation.*1997; 64: 1192-7.

61. Piccinni MP, Giudizi MG Biagiotti R Beloni L Giannarini L Sampognaro S Parronchi P Manetti R Annunziato F Livi C et al. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol.*1995; 155: 128-33.
62. Plevyak M, Hanna N Mayer S Murphy S Pinar H Fast L Ekerfelt C Ernerudh J Berg G Matthiesen L Sharma S. Deficiency of decidual IL-10 in first trimester missed abortion: a lack of correlation with the decidual immune cell profile. *Am J Reprod Immunol.*2002; 47: 242-50.
63. Raghupathy R. Maternal anti-placental cell-mediated reactivity and spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol.*1997; 37: 478-84.
64. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today.*1997; 18: 478-82.
65. Richards RG, Brar AK Frank GR Hartman SM Jikihara H. Fibroblast cells from term human decidua closely resemble endometrial stromal cells: induction of prolactin and insulin-like growth factor binding protein-1 expression. *Biol Reprod.*1995; 52: 609-15.
66. Roth I, Corry DB Locksley RM Abrams JS Litton MJ Fisher SJ. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med.*1996; 184: 539-48.
67. Ruiz C, Montes MJ Abadia-Molina AC Olivares EG. Phagocytosis by fresh and cultured human decidual stromal cells: opposite effects of interleukin-1 alpha and progesterone. *J Reprod Immunol.*1997; 33: 15-26.
68. Sadowsky DW, Novy MJ Witkin SS Gravett MG. Desamethasone or interleukin-10 blocks interleukin-1-b-induced uterine contractions in pregnant rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol.*2003; 188: 252-63 .
69. Saito S, Nishikawa K Morii T Enomoto M Narita N Motoyoshi K Ichijo M. Cytokine production by CD16–CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *Int Immunol* 1993; 5:559–63 .
70. Schriver, F and Nadler LM. The central role of follicular dendritic cells in lymphoid tissues. *Immunol.*1992.51, 243-284.
71. Simmons PJ, Torok-Storb B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood.*1991; 78: 2848-53.
72. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood.*1991; 78: 55-62.

73. Stewart JA, Bulmer JN Murdoch AP. Endometrial leukocytes: expression of steroid hormone receptors. *J Clin Pathol* 1998; 51:121–126 .
74. Strauss LC, Rowley SD La Russa VF Sharkis SJ Stuart RK Civin CI. Antigenic analysis of hematopoiesis. V. Characterization of My-10 antigen expression by normal lymphohematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol.*1986; 14: 878-86.
75. Tabanelli S, Tang B Gurpide E. In vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.*1992; 42: 337-44.
76. Tew JG, Kosco MH Burton GF Szakal AK. Follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol Rev.*1990; 117: 185-211.
77. 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: 349-63.
78. Tsunoda R, Nakayama M Onozaki K Heinen E Cormann N Kinet-Denoel C Kojima M. Isolation and long-term cultivation of human tonsil follicular dendritic cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.*1990; 59: 95-105.
79. van Nierop K, de Groot C. Human follicular dendritic cells: function, origin and development. *Semin Immunol.*2002; 14: 251-7.
80. Vicovac LM, Starkey PM Aplin JD. Comment: effect of cytokines on prolactin production by human decidual stromal cells in culture: studies using cells freed of bone marrow-derived contaminants. *J Clin Endocrinol Metab.*1994; 79: 1877-82.
81. Vigano P, Gaffuri B Somigliana E Infantino M Vignali M Di Blasio AM. Interleukin-10 is produced by human uterine natural killer cells but does not affect their production of interferon-gamma. *Mol Hum Reprod.*2001; 7: 971-7.
82. White CA, Johansson M Roberts CT Ramsay AJ Robertson SA. Effect of interleukin-10 null mutation on maternal immune response and reproductive outcome in mice. *Biol Reprod.*2004; 70: 123-31 .

# CONCLUSIONES

## Conclusiones

1. Las células deciduales estromales presentan antígenos y funciones asociadas a células hematopoyéticas, pero son células de carácter estromal procedentes de un precursor estromal ubicado en la médula ósea.
2. Las células deciduales estromales expresan  $\alpha$ -SM-actina y presentan capacidad de contraerse/relajarse en respuesta a diferentes citocinas, por lo que pueden considerarse una forma especializada de miofibroblastos en la decidua.
3. Las células deciduales estromales se encuentran funcionalmente integradas en la red de citocinas que regulan el desarrollo normal o patológico del embarazo en humanos. Las citocinas que se asocian al aborto (IL-2, PDGF, TGF $\beta$ ) inducen la contractilidad de las DSC, mientras que la IL-10, citocina Th2 que favorece la gestación, relaja las DSC.

### **Publicaciones originales de esta tesis**

- 1-** Kimatrai M, Blanco O, Muñoz Fernández R, Tirado I, Martín F, Abadía Molina AC, Olivares EG. **Contractile activity of human decidual stromal cells. II. Effect of interleukin10.** J Clin Endocrinol Metab. 2005 ; 90 : 6126-30
- 2-** 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.
- 3-** 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 Dec ; 7: 1151-7.



# Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related to bone marrow stromal precursors

José Marcos García-Pacheco<sup>1</sup>, Carmen Oliver<sup>2</sup>, María Kimatrai<sup>2</sup>, Francisco J. Blanco<sup>2</sup> and Enrique G. Olivares<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Inmunología y Biología Molecular, Hospital do Meixoeiro, Vigo and <sup>2</sup>Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Spain

<sup>3</sup>To whom correspondence should be addressed at: Unidad de Inmunología, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, 18012-Granada, Spain. E-mail: engarcia@ugr.es

**Decidual stromal cells (DSC) are the main cellular component of the human decidua, but thus far their ascription to a given cell lineage is uncertain. In previous studies, these cells have been isolated and maintained in culture, and their antigen phenotype has been analysed to determine their affiliation. However, the presence in the culture medium of high proportions of fetal calf serum (FCS) may inhibit the expression of some surface antigens. In the present study, we show by flow cytometry that CD34 is rapidly down-regulated in human DSC cultured in RPMI 1640 with 20% FCS. For this reason, we used fibroblast medium, which contains only a small proportion (2%) of FCS, to isolate and culture these cells. Under these conditions DSC exhibited a stable antigen phenotype highly similar to that of these cells *in vivo*. Flow cytometry results confirmed that DSC cultured in fibroblast medium expressed CD34 protein, and reverse transcription–polymerase chain reaction findings showed that they have *CD34* mRNA. Decidual stromal cells were also positive for STRO-1, an antigen that identifies stromal precursors of the bone marrow which also expresses CD34. The expression of CD10, CD13, alkaline phosphatase and  $\alpha$ -smooth muscle actin by DSC, and the absence of expression of CD14 and CD45, further confirmed their relationship with the stromal precursors.**

*Key words:* CD34/decidual stromal cells/fetal calf serum/STRO-1/stromal precursors

## Introduction

Decidual tissue, the maternal component of the maternal–fetal interface, is composed predominantly of typical stromal-type cells as well as glandular cells and leukocytes (Bulmer, 1995). Decidual stromal cells (DSC) constitute a distinctive cell class that appears in the endometrium of mammalian uteri during pregnancy, usually after implantation of the blastocyst. Although their function, cell lineage and origin are not fully understood, DSC have classically been considered as fibroblastic cells with a nutritional and endocrine role in pregnancy (Riddick and Kusmik, 1977). Nevertheless, several reports have demonstrated that human and murine DSC or their endometrial counterpart, endometrial stromal cells (ESC), are also involved in different immune functions such as the production of cytokines (Dudley *et al.*, 1993b; Montes *et al.*, 1995; Nasu *et al.*, 1999; Iwabe *et al.*, 2000), antigen presentation (Olivares *et al.*, 1997) and phagocytosis (Ruiz *et al.*, 1997). Furthermore, inflammatory and Th1 cytokines enhance some of these functions (Dudley *et al.*, 1993a; Ruiz *et al.*, 1997; Arima *et al.*, 2000), while inhibiting the process of DSC differentiation (decidualization) (Kariya *et al.*, 1991; Jikihara

and Handwerger, 1994; Kanda *et al.*, 1999). On the other hand, these immune functions decrease significantly when DSC or ESC are cultured with progesterone to induce decidualization (Kariya *et al.*, 1991; Montes *et al.*, 1995; Ruiz *et al.*, 1997; Arici *et al.*, 1999). Previous studies with human material have demonstrated that DSC express antigens associated with haematopoietic cells (Imai *et al.*, 1992; Montes *et al.*, 1996; Olivares *et al.*, 1997). This finding, together with the immune functions summarized above, has led some authors to propose that DSC might be true immune cells (Lysiak and Lala, 1992). Nevertheless, the ultimate precursor of these cells has not yet been determined unequivocally. Lysiak and Lala showed that certain mouse DSC and ESC are actually of bone marrow origin (Lysiak and Lala, 1992); however, some mesenchymal (non-haematopoietic) cell characteristics exhibited by human DSC contradict their possible haematopoietic ascription (Oliver *et al.*, 1999).

To study DSC, cell purification is necessary because the human decidua contains high proportions of leukocytes (Bulmer, 1995) which may contaminate the DSC preparations and lead to spurious conclusions (Ruiz *et al.*, 1997). We have

previously obtained pure DSC populations in culture (Montes *et al.*, 1995, 1996; Olivares *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 1997; Oliver *et al.*, 1999), which has allowed us to perform phenotypic and functional studies. Nevertheless, high proportions of fetal calf serum (FCS) in the culture medium may inhibit the expression of some surface antigens (Tsunoda *et al.*, 1990). Therefore in this work, we isolated, purified and cultured DSC with fibroblast medium, which contains a low proportion of FCS, to further study the antigen phenotype of these cells. With this method, we isolated DSC with a stable antigen phenotype, similar to that of the bone marrow stromal precursors (Simmons and Torok-Storb, 1991a,b).

## Materials and methods

### Tissues

Eighteen samples from elective vaginal terminations of first trimester pregnancy (6–11 weeks) from healthy patients aged 20–30 years were used. The specimens were obtained at the Clínica El Sur (Málaga) and Gineclínica (Granada). Informed consent was obtained from each patient. This study was approved by the Comité Ético y de Investigación of the Hospital Universitario de San Cecilio, Granada.

### Fibroblast medium

According to the information provided by the manufacturer (Sigma, St Louis, MO, USA), fibroblast medium contains Fibroblast Basal Medium (a modified version of the culture medium MCDB 105) supplemented with 2% FCS and unspecified amounts of basic fibroblast growth factor, heparin, epidermal growth factor and hydrocortisone.

### Isolation and culture of DSC

Decidual tissues were examined histologically to exclude the presence of infection or inflammatory infiltration. Samples of decidua from different patients were not mixed, to avoid the induction of cytokine secretion as a result of an allogeneic reaction of leukocytes that initially contaminate DSC cultures. Tissues were extensively washed in phosphate-buffered saline solution (PBS) and the decidua was carefully freed from the trophoblast. Decidual fragments were finely minced between two scalpels in a small volume of RPMI 1640 medium with 100 IU/ml penicillin and 50 mg/ml gentamicin, and put in a solution of 0.5% trypsin and 0.2% EDTA (Sigma) for 15 min at 37°C. The reaction was stopped by adding cold RPMI with 20% FCS (Gibco, Paisley, UK) and the suspension was filtered through gauze and centrifuged at  $\times 425$  g for 10 min. The supernatant was discarded and the cell pellet was suspended in RPMI and centrifuged on Ficoll-Paque (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) for 20 min at  $\times 600$  g. Cells were collected from the interface, suspended in PBS and washed. This suspension, containing mainly DSC and leukocytes, was incubated in culture flasks for 1 h in complete RPMI with 10% FCS to allow macrophages, granulocytes and gland cells to adhere to the flask. The supernatant, containing DSC and lymphocytes, was washed and incubated either in fibroblast medium with 100 IU/ml penicillin and 50 mg/ml gentamicin, or in complete RPMI medium with 20% FCS. After overnight incubation so that DSC adhered to the flask, lymphocytes in the supernatant were then discarded, leaving the adherent cells, which were mainly DSC. The corresponding culture medium was then replaced. Both types of culture medium were changed twice a week. Proliferating DSC overgrew other possible contaminant cells, thus further guaranteeing the purity of the cultures. Cell lines were first studied when they covered the whole

surface of the 25 cm<sup>2</sup> culture flask. Supernatants from confluent cultures were collected, concentrated  $\times 10$  by a Minicon concentrator (Amicon, Beverly, MA, USA) and analysed for the presence of prolactin by using an electrochemiluminescence immunoassay (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA).

### Isolation of fresh decidual stromal cells

The decidua was washed in Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free PBS and minced between two scalpels in a small volume of RPMI 1640 with 10% FCS. The cell suspension was filtered through sterile gauze, washed by centrifugation and suspended in culture medium. This suspension was centrifuged at  $\times 650$  g for 30 min over a discontinuous gradient of 20 and 30% Percoll (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden). Decidual stromal cells were collected from the 20/30% interphase and washed in PBS.

### Monoclonal antibodies

The monoclonal antibodies (mAb) used in this study are shown in Table I.

### Flow cytometry

Decidual stromal cells were detached from the culture flask by treatment with 0.04% EDTA at 37°C. Cells were centrifuged, the supernatant was discarded and the pellet was suspended in PBS at  $1 \times 10^6$  cells/ml. For direct staining, 100  $\mu$ l of the cell suspension was incubated with 10  $\mu$ l of the appropriate monoclonal antibody for 30 min at 4°C in the dark. Cells were washed, suspended in 1 ml PBS and immediately analysed in a flow cytometer (Ortho-Cyturon, Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ, USA). To identify dead cells we incubated DSC with propidium iodide (Sigma). The percentage of cells that were antibody-positive was calculated by comparison with the appropriate isotype control (Table I). For double labelling, we followed the same procedure except that a second mAb with a different fluorescent marker from the first mAb was also added. For indirect labelling, fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled goat anti-mouse immunoglobulin was added after the first mAb. For intracytoplasmic labelling, DSC were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at 4°C, and permeabilized with cold acetone for 10 min before the mAb was added.

### Polymerase chain reaction (PCR) primers

Primers used in this study are shown in Table II. They were designed according to sequences available from Genbank (<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank>) and synthesized by Genset (Paris, France). In order to prevent the amplification of contaminant genomic DNA, sense and antisense primers were designed, when possible, from sequences located far apart on different exons, and tested in PCR reactions with the RNA used for cDNA synthesis.

### Reverse transcription (RT)-PCR

Total RNA from cells was extracted by the Ultraspec<sup>TM</sup> RNA isolation method according to the manufacturer's protocol (Biotech Laboratories Inc., Houston, TX, USA). A single strand cDNA copy was made from total RNA using random hexamers (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and M-MLV H minus RNase reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA). After heating to 65°C for 5 min and quickly cooling to 4°C in a thermal cycler (Geneamp PCR System 9600, Perkin-Elmer, Cetus, Norwalk, CT, USA) for denaturation, reverse transcription was performed for 1 h at 37°C. Starting with cDNA equivalent to 75 ng RNA, amplification was carried out in a total volume of 12.5  $\mu$ l of the amplification mix, 10 mmol/l Tris-Cl (pH 8.4), 50 mmol/l KCl, 2 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatine, 0.2 mmol/l dNTPs, 5% glycerol, 0.25 mmol/l of

**Table I.** Monoclonal antibodies (mAbs) used in this study

mAb	Specificity	Ig subclass	Labelled with <sup>a</sup>	Obtained from <sup>b</sup>
Isotype control	–	IgG1	FITC or PE	Sigma
Isotype control	–	IgG2a	FITC or PE	Sigma
Isotype control	–	IgM	FITC	Sigma
Anti-CALLA	CD10	IgG1	PE	DAKO
CD13	CD13	IgG1	FITC	CALTAG
CD14	CD14	IgG2a	PE	Sigma
CD15	CD15	IgM	FITC	CALTAG
CD21	CD21	IgG1	FITC	DAKO
BU38	CD23	IgG1	FITC	The Binding Site
CD34	CD34	IgG1	FITC	CALTAG
CD45	CD45	IgG1	FITC	Sigma
CD80	CD80	IgG1	FITC	CALTAG
CD86	CD86	IgG1	FITC	CALTAG
OKDR	HLADR	IgG2a	FITC	OD
STRO-1	STRO-1	IgM	–	DHSB
Anti-human follicular dendritic cells	HJ2	IgM	FITC	Sigma
Anti- $\alpha$ -smooth muscle actin	$\alpha$ -smooth muscle actin	IgG2a	FITC	Sigma
B4-78	Bone/liver/kidney isoenzyme of alkaline phosphatase	IgG1	–	DHSB

<sup>a</sup>FITC: Fluorescein isothiocyanate; PE: Phycoerythrin.

<sup>b</sup>Sigma, Saint Louis, MO, USA; Dako, Glostrup, Denmark; CALTAG, San Francisco, CA, USA; The Binding Site, Birmingham, UK; OD, Ortho-Diagnostic System, Raritan, NJ, USA; DHSB: Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA, USA.

**Table II.** Primer sequences used for RT-PCR

mRNA	Oligonucleotide primers	PCR product size (bp)
<i>CD10</i>	AACATGGATGCCACCACTGAG-5' CACATATGCTGTACAAGCCTC-3'	525
<i>CD13</i>	AAGCTCAACTACACCCTCAGC-5' GGGTGTGTCATAATGACCAGC-3'	600
<i>CD34</i>	ACAACCTTGAAGCCTAGCCTG-5' CAAGACCAGCAGTAGACACTG-3'	348
<i>Prolactin</i>	GGGTTCATTACCAAGGCATC-5' TTCAGGATGAACCTGGCTGAC-3'	276

each primer and 0.02 IU/ml Taq DNA Polymerase (Promega). After incubation for 5 min at 96°C, each cycle consisted of 94°C for 30 s, 57°C for 30 s and 72°C for 30 s, for a total of 32 cycles. A total of 1  $\mu$ l of the first round product was used for the second 32-cycle round. The PCR products were size-separated on ethidium bromide-stained 2% Agarose gels, and a 100 bp DNA ladder was included in each run.

## Results

### *Down-regulation of CD34 by decidual stromal cells cultured with RPMI 1640 with 20% FCS*

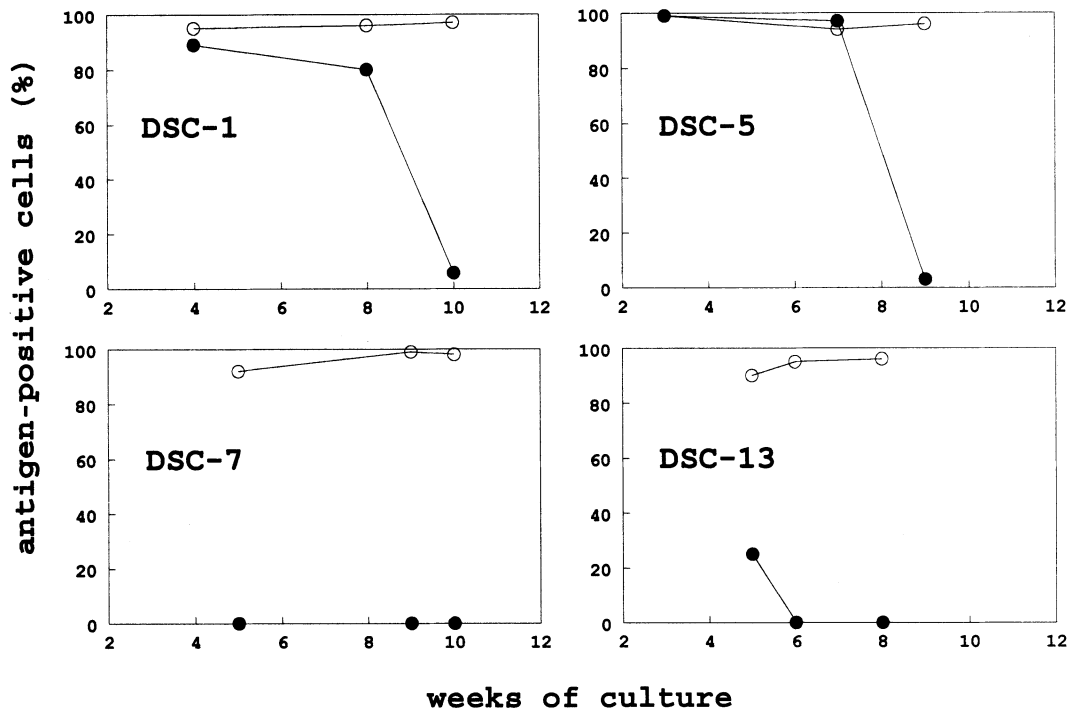
Figure 1 shows data from DSC lines cultured with 20% FCS. Although the proportion of CD10-positive cells was constant, the proportion of CD34-positive cells decreased steadily with time. After 8–10 weeks of culture, CD34 was practically absent in most DSC lines. These results explain why we previously reported that CD34 was not expressed by DSC in culture (Montes *et al.*, 1996); in earlier work all DSC lines were studied much later (after 12 weeks of culture) than in the present work.

### *Antigen phenotype of decidual stromal cells cultured in fibroblast medium*

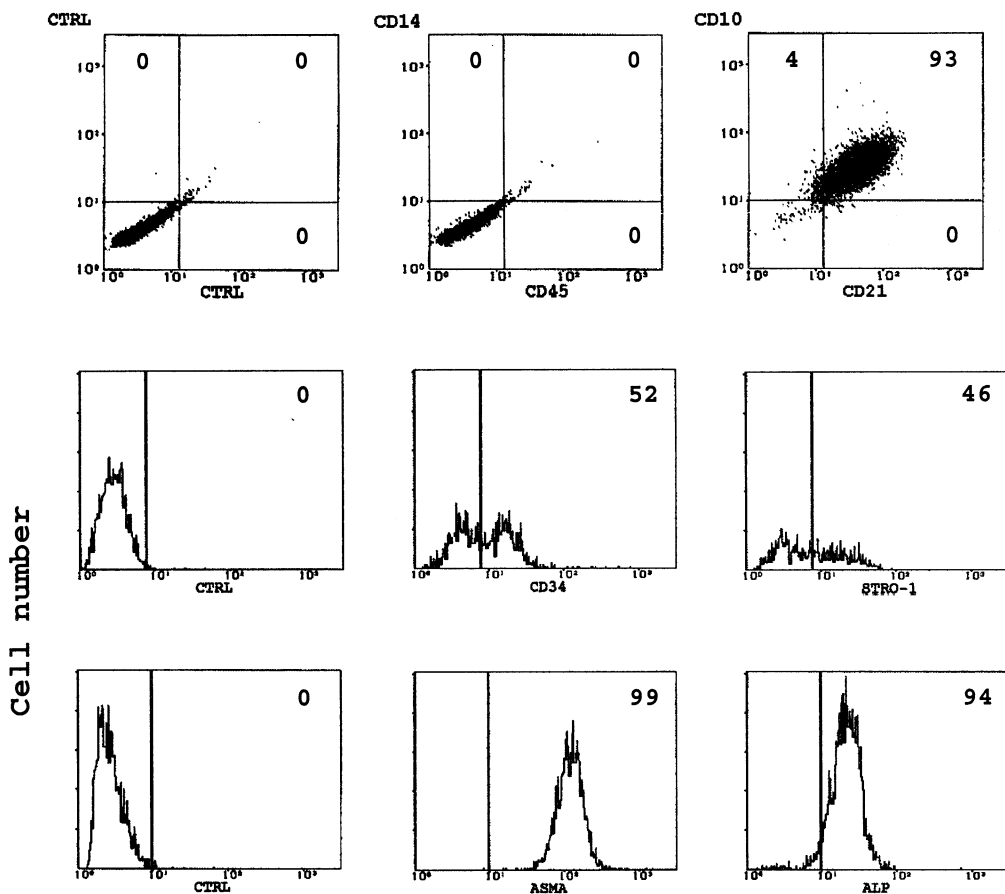
Cells lines were maintained in fibroblast medium for 2–4 weeks after the primary culture (see Materials and methods), a shorter period than earlier cultures with RPMI 1640 with 20% FCS (Montes *et al.*, 1996). In fibroblast medium, DSC lacked CD14, CD15 and CD45, whereas they expressed CD34 and STRO-1, an antigen detected in stromal precursors of the bone marrow (Simmons and Torok-Storb, 1991a). Other antigens detected in the DSC were CD10, CD13, CD21, CD23, CD80, CD86, HLA-DR, HJ2,  $\alpha$ -smooth muscle actin (ASMA), and alkaline phosphatase (ALP) (Table III, Figure 2). The antigen phenotype of DSC cultured in fibroblast medium was equivalent to that reported previously by us in DSC cultured with RPMI 1640 and 20% FCS (Montes *et al.*, 1996; Olivares *et al.*, 1997; Oliver *et al.*, 1999). The exceptions were CD34, which was reported to be negative in cultures containing RPMI 1640 and 20% FCS (Montes *et al.*, 1996), and ALP and STRO-1, which were not previously studied. DSC proliferated in fibroblast medium for ~8–12 weeks; during this period, this antigen phenotype was observed to be stable, and no down-regulation of CD34 or any other antigen was observed.

### *Detection of CD34 mRNA in DSC cultured in fibroblast medium*

The expression of CD34 was confirmed by RT-PCR. *CD34* mRNA, together with *CD10* and *CD13* (antigens that are expressed by most DSC, Table III) mRNAs, were detected in DSC cultured in fibroblast medium. Because prolactin is secreted by DSC only when they are cultured with progesterone (Tabanelli *et al.*, 1992), and our cultures lacked this hormone, we did not detect prolactin in the supernatants (results not shown). Nevertheless, small amounts of *prolactin* mRNA were detected in some lines (Figure 3).



**Figure 1.** Results from flow cytometric analysis of the variation over time of the expression of CD10 (○) and CD34 (●) in four different lines of decidual stromal cells cultured with RPMI 1640 containing 20% fetal calf serum.



**Figure 2.** Flow cytometric analysis of the antigens expressed by decidual stromal cells cultured in fibroblast medium. Each monoclonal antibody was matched with its respective isotype control (CTRL). Numbers are percentages of positive cells.

### Expression of CD34 and STRO-1 by fresh DSC

To confirm that the expression of CD34 was not due to an artefact of the culture conditions, we tested this antigen by flow cytometry in fresh DSC. The absence of contaminant leukocytes was confirmed by the lack of CD45-, CD14- or CD15-positive cells in the fresh DSC suspension. Decidual stromal cells were identified by the expression of CD10 and we observed that significant proportions of the fresh CD10-positive DSC also expressed CD34 and STRO-1 (Figure 4). These data, together with those reported previously for fresh DSC (Montes *et al.*, 1996), confirmed that the phenotype of DSC in fibroblast medium is equivalent to that of DSC *in vivo*.

### Discussion

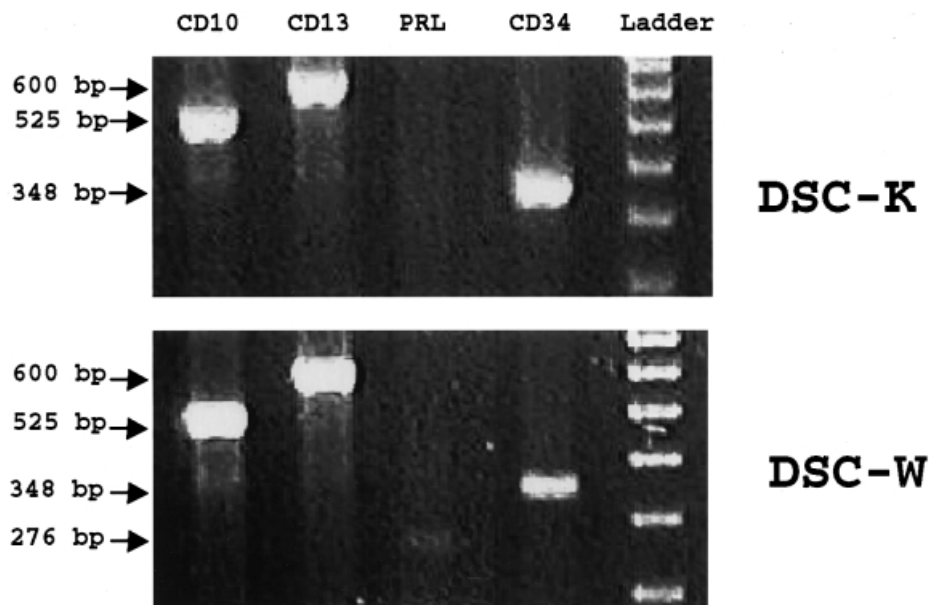
Although DSC are the main cellular component of the decidua, other elements such as epithelial cells or leukocytes are also abundant in this tissue (Bulmer, 1995). When fresh DSC or

ESC have been obtained by differential sedimentation (Kariya *et al.*, 1991; Imai *et al.*, 1992), differential adhesion (Shiokawa *et al.*, 1996; Iwabe *et al.*, 2000), binding to monoclonal antibodies against antigens expressed by haematopoietic cells (Fernández-Shaw *et al.*, 1992) or separation on Percoll gradients (Imai *et al.*, 1995), leukocytes have been frequent contaminants of fresh cell preparations (Ruiz *et al.*, 1997). This may have led to misinterpretation of experimental results, especially with regard to the expression by DSC of antigens normally associated with leukocytes, or to the immunological functions of DSC. In decidual sections, DSC are usually identified by their morphology; however, sometimes it is difficult to distinguish them from other large cells such as macrophages. In culture, DSC proliferate and overwhelm other non-proliferating contaminant cells, so that pure preparations of DSC can be obtained (Montes *et al.*, 1995, 1996; Olivares *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 1997; Oliver *et al.*, 1999). However, the high concentration of FCS necessary to maintain DSC in culture may inhibit the expression of some antigens (Tsunoda *et al.*, 1990). In this study, we found that CD34 was rapidly down-regulated by DSC in culture with 20% FCS and this explains why this antigen was previously reported to be not expressed by these cells in long-term cultures with a high proportion of FCS (Montes *et al.*, 1996). The expression of CD34 and other antigens by DSC cultured in fibroblast medium was found to be stable, and their antigen phenotype was equivalent to that of the DSC *in vivo* (Montes *et al.*, 1996). These findings, together with the fact that DSC lines are obtained earlier in fibroblast medium than in other culture media, makes fibroblast medium a suitable option for the study of DSC.

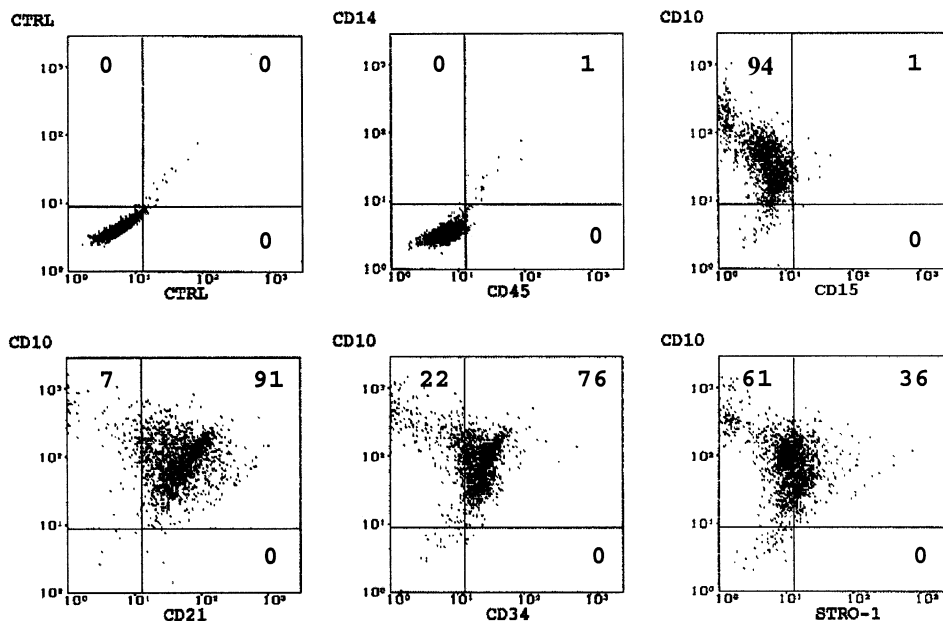
The findings that DSC and ESC in mice originate from the bone marrow (Lysiak and Lala, 1992) and exhibit several immune functions (Dudley *et al.*, 1993a,b; Montes *et al.*, 1995; Olivares *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 1997; Nasu *et al.*, 1999; Iwabe *et al.*, 2000) suggest that DSC may be ascribed to the

**Table III.** Antigen expression by human decidual stromal cells cultured in fibroblast medium (data were obtained from 12 different cultures)

Antigen	Flow cytometric reactions (% of positive cells)
CD10	96–99
CD13	95–97
CD14	<1
CD15	<1
CD21	80–96
CD23	7–47
CD34	18–59
CD45	<1
CD80	10–13
CD86	17–44
HLA-DR	10–46
HJ2	25–36
$\alpha$ -smooth muscle actin	99–100
Alkaline phosphatase	94–96
STRO-1	11–53



**Figure 3.** Expression of CD10, CD13, prolactin (PRL) and CD34 mRNA by two different lines of decidual stromal cells (DSC-K and DSC-W) cultured in fibroblast medium and examined by RT-PCR.



**Figure 4.** Flow cytometric analysis of the antigens expressed by fresh decidual stromal cells. Each monoclonal antibody was matched with its respective isotype control (CTRL). Numbers are percentages of positive cells.

haemopoietic lineage. The expression by DSC of CD34, an antigen detected on the precursors of haemopoietic cells (Civin *et al.*, 1984), and of other antigens associated with haematopoietic cells (CD10, CD13, CD21, CD23, CD80, CD86 and HLA-DR) supports this possibility. Nevertheless, the findings that DSC lack CD45, a marker of the haematopoietic lineage, and that they express antigens associated with mesenchymal (non-haemopoietic) cells, such as ASMA and ALP, contradict this ascription. The expression by DSC of STRO-1, an antigen that identifies stromal precursors of the bone marrow (Simmons and Torok-Storb, 1991a), relates these two types of cell. Like DSC, these stromal precursors express CD34 and also rapidly lose this antigen in cultures containing a high proportion of FCS (Simmons and Torok-Storb, 1991b). Furthermore, DSC and the stromal precursors both express CD10, CD13, ALP and ASMA and both lack the expression of CD14 and CD45 (Simmons and Torok-Storb, 1991a). The relationship between DSC and the stromal cell precursors of the bone marrow also reconciles the apparent contradiction between the bone marrow origin of DSC (Lysiak and Lala, 1992) and their mesenchymal (non-haematopoietic) characteristics (Oliver *et al.*, 1999). Studies in mice have suggested that precursor cells of DSC can migrate from their origin (yolk sac and/or bone marrow) to the uterus any time between embryonic life and the onset of reproductive life, and that beyond this period they locally self-renew (Lysiak and Lala, 1992). Decidual stromal cells have also been related with follicular dendritic cells (FDC), cells of the lymphoid follicle which prevent B cells from undergoing apoptosis and which are involved in antigen presentation to B cells in the secondary response (Lindhout *et al.*, 1993). Decidual stromal cells express FDC antigens (CD21, CD23, DRC-1, HJ2) and, like FDC, also lack CD45 (Montes *et al.*, 1996; Oliver *et al.*, 1999). Follicular dendritic cells and DSC may therefore belong to the same cell family (Oliver *et al.*, 1999), and may have a common bone marrow stromal cell precursor.

After primary culture, obviously only DSC with the capacity to proliferate are positively selected. In the absence of progesterone in the culture medium, these cells correspond to precursors of the DSC, i.e. predecidualized cells (Glasser and Julian, 1986; Tabanelli *et al.*, 1992; Montes *et al.*, 1996). In fact, like predecidualized cells, DSC cultured in fibroblast medium did not secrete prolactin (results not shown). By analogy with the developmentally regulated expression of CD34 by primitive haematopoietic cells (Strauss *et al.*, 1986), CD34 may be considered a marker of cell precursors (haematopoietic, stromal or decidual) which is lost as cells differentiate. Nevertheless, serial experiments with progesterone-decidualized cells need to be carried out to confirm this possibility in DSC. CD34, expressed by haematopoietic stem cells and by stromal cells, is probably involved in the adhesion and interaction between these two types of cell in the regulation of haematopoiesis (Healy *et al.*, 1995). Decidual stromal cells that express CD34 may have an equivalent function in decidua. Normal human decidua contains a high proportion of leukocytes that play a role in the maternal-fetal inter-relationships (Bulmer, 1995) and differentiate *in situ* as pregnancy progresses (Mincheva-Nilsson *et al.*, 1997). The possibility that DSC are involved in this differentiation is supported by the findings of King *et al.* who showed that DSC influence proliferation and survival of decidual NK cell through cell-to-cell contact (King *et al.*, 1999). It will be interesting to determine whether CD34 mediates in the interaction between DSC and decidual NK cells.

**Acknowledgements**

We are grateful to Dr S.Jordán and Dr C.Sánchez from the Clínica el Sur (Málaga) and Dr A.Stolzenburg from Gineclínica (Granada) for providing us with decidual specimens. We thank K.Shashok for improving the use of English in the manuscript. This work was supported by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias.

## References

- Arici, A., Senturk, L.M., Seli, E. *et al.* (1999) Regulation of monocyte chemotactic protein-1 expression in human endometrial stromal cells by estrogen and progesterone. *Biol. Reprod.*, **61**, 85–90.
- Arima, K., Nasu, K., Narahara, H. *et al.* (2000) Effects of lipopolysaccharide and cytokines on production of RANTES by cultured human endometrial stromal cells. *Mol. Hum. Reprod.*, **6**, 246–251.
- Bulmer, J.N. (1995) Immune cells in decidua. In Kurpisz, M. and Fernandez, N. (eds) *Immunology of Human Reproduction*. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, pp. 313–334.
- Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C. *et al.* (1984) Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.*, **133**, 157–165.
- Dudley, D.J., Trautman, M.S. and Mitchell, M.D. (1993a) Inflammatory mediators regulate interleukin-8 production by cultured gestational tissues: evidence for a cytokine network at the chorio-decidual interface. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**, 404–410.
- Dudley, D.J., Chen, C., Branch, D.W. *et al.* (1993b) A murine model of preterm labor: inflammatory mediators regulate the production of prostaglandin E2 and interleukin-6 by murine decidua. *Biol. Reprod.*, **48**, 33–39.
- Fernández-Shaw, S., Shorter S.C., Naish C.E. *et al.* (1992) Isolation and purification of human endometrial stromal and glandular cells using immunomagnetic microspheres. *Hum. Reprod.*, **7**, 156–161.
- Glasser, S.R. and Julian, J. (1986) Intermediate filament protein as a marker of uterine stromal cell decidualization. *Biol. Reprod.*, **35**, 463–474.
- Healy, L., May, G., Gale, K. *et al.* (1995) The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hematopoietic cell adhesion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 12240–12244.
- Imai, K., Maeda, M., Fujiwara, H. *et al.* (1992) Human endometrial stromal cells and decidual cells express cluster of differentiation CD13 antigen/aminopeptidase N and CD10 antigen/neutral endopeptidase. *Biol. Reprod.*, **46**, 328–334.
- Imai, K., Maeda, M., Fujiwara, H. *et al.* (1995) A mouse monoclonal antibody, S2n8, detects a 140 kDa protein on the surface of human endometrial stromal cells and decidual cells. *Mol. Hum. Reprod.*, **10**, 1311–1318.
- Iwabe, T., Harada, T., Tsudo, T. *et al.* (2000) Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 824–829.
- Jikihara, H. and Handwerger, S. (1994) Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits the synthesis and release of human decidual prolactin. *Endocrinology*, **134**, 353–357.
- Kanda, Y., Jikihara, H., Markoff, E. *et al.* (1999) Interleukin-2 inhibits the synthesis and release of prolactin from human decidual cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 677–681.
- Kariya, M., Kanzaki, H., Takamura, K. *et al.* (1991) Interleukin-1 inhibits *in vitro* decidualization of human endometrial stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **73**, 1170–1174.
- King, A., Garner, L. and Loke, Y.W. (1999) Co-stimulation of human decidual natural killer cells by interleukin-2 and stromal cells. *Hum. Reprod.*, **14**, 656–663.
- Lindhout, E., Mevissen, M.L., Kwekkeboom, J. *et al.* (1993) Direct evidence that human follicular dendritic cells (FDC) rescue germinal centre B cells from death by apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.*, **91**, 330–336.
- Lysiak, J.J. and Lala, P.K. (1992) *In situ* localization and characterization of bone-marrow derived cells in the decidua of normal murine pregnancy. *Biol. Reprod.*, **47**, 603–613.
- Mincheva-Nilsson, L., Kling, M., Hammarstrom, S. *et al.* (1997) Gamma-delta T cells of human early pregnancy decidua—evidence for local proliferation, phenotypic heterogeneity, acid extrathymic differentiation. *J. Immunol.*, **159**, 3266–3277.
- Montes, M.J., Tortosa, C.G., Borja, C. *et al.* (1995) Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **34**, 188–194.
- Montes, M.J., Alemán, P., Tortosa, C.G. *et al.* (1996) Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with haematopoietic cells. *J. Reprod. Immunol.*, **30**, 53–66.
- Nasu, K., Narahara, H., Matsui, N. *et al.* (1999) Platelet-activating factor stimulates cytokine production by human endometrial stromal cells. *Mol. Hum. Reprod.*, **5**, 548–553.
- Olivares, E.G., Montes, M.J., Oliver, C. *et al.* (1997) Cultured human decidual stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. *Biol. Reprod.*, **57**, 609–615.
- Oliver, C., Montes, M.J., Galindo, J.A. *et al.* (1999) Human decidual stromal cells express  $\alpha$ -smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum. Reprod.*, **14**, 1599–1605.
- Riddick, D.H. and Kusmik, W.F. (1977) Decidua: a possible source of amniotic fluid prolactin. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **127**, 187–190.
- Ruiz, C., Montes, M.J., Abadía-Molina, A.C. *et al.* (1997) Phagocytosis by fresh and cultured human decidual stromal cells: opposite effects of interleukin-1  $\alpha$  and progesterone. *J. Reprod. Immunol.*, **33**, 15–26.
- Shiokawa, S., Yoshimura, Y., Nagamatsu, S. *et al.* (1996) Expression of beta 1 integrins in human endometrial stromal and decidual cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **81**, 1533–1540.
- Simmons, P.J. and Torok-Storb, B. (1991a) Identification of stromal cell precursors in human bone-marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, **78**, 55–62.
- Simmons, P.J. and Torok-Storb, B. (1991b) CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood*, **78**, 2848–2853.
- Strauss, L.C., Rowley, S.D., LaRussa, V.F. *et al.* (1986) Antigenic analysis of hematopoiesis. V. Characterization of My-10 antigen expression by normal lympho-hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.*, **14**, 878–886.
- Tabanelli, S., Tang, B. and Gurpide, E. (1992) *In vitro* decidualization of human endometrial stromal cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **42**, 337–344.
- Tsunoda, R., Nakayama, M., Onozaki, K. *et al.* (1990) Isolation and long-term cultivation of human tonsil follicular dendritic cells. *Virchows Archiv. B. Cell. Pathol.*, **59**, 95–105.

Received on April 23, 2001; accepted on September 26, 2001

# Contractile Activity of Human Decidual Stromal Cells

MARÍA KIMATRAI, CARMEN OLIVER, ANA CLARA ABADÍA-MOLINA,  
JOSÉ MARCOS GARCÍA-PACHECO, AND ENRIQUE G. OLIVARES

*Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada (M.K., C.O., A.C.A.-M., E.G.O.), 18012 Granada, Spain; and Unidad de Inmunología y Biología Molecular, Hospital do Meixoeiro (J.M.-G.-P.), 36200 Vigo, Spain*

We previously demonstrated that human decidual stromal cells (DSC), the main cellular component of the decidua, are similar in antigen phenotype and structure to myofibroblasts, cells with contractile activity. In this work we isolated and maintained DSC in fibroblast medium, in which these cells show a stable phenotype similar to that of DSC *in vivo*. Flow cytometric observations showed that most DSC expressed  $\alpha$ -smooth muscle ( $\alpha$ -SM) actin, an intermediate filament that is considered a marker of myofibroblasts and is responsible for the contractile activity of these cells.  $\alpha$ -SM actin mRNA

was detected by RT-PCR in these cells. The contractile activity of DSC was determined by the gel contraction assay; we found that TGF $\beta$ 1 and platelet-derived-growth factor, cytokines that are known to be inducers of myofibroblast contractility, also induced contractility of DSC. IL-2, a Th1 cytokine-related with spontaneous abortion, also activated DSC contractility. Our results confirmed that DSC are phenotypically and functionally related with myofibroblast. (*J Clin Endocrinol Metab* 88: 844–849, 2003)

DECIDUAL TISSUE, THE maternal component of the maternal-fetal interface, is composed predominantly of typical stromal-type cells as well as glandular cells and leukocytes (1). Decidual stromal cells (DSC) constitute a distinctive cell class that originates from the proliferation and differentiation (decidualization) of a fibroblast-like stromal cell precursor (preDSC) already detected in the endometrium (2). During the luteal phase of the menstrual cycle or if pregnancy takes place, preDSC are induced to decidualize by progesterone (3). Decidualized cells become rounder, express desmin in their cytoplasm, and secrete PRL (4–6). Although their function, cell lineage, and origin are not fully understood, human and murine DSC or endometrial stromal cells (ESC), the DSC counterpart in nongestating endometrium, have been shown to be involved in different immune functions, such as the production of cytokines (7–10), antigen presentation (11), and phagocytosis (12). These cells also express antigens associated with hemopoietic cells (11, 13, 14). Furthermore, inflammatory and Th1 cytokines inhibit decidualization (15–17). The immune activities of DSC together with their bone marrow origin have led some researchers to propose that DSC might be true immune cells (18). Nevertheless, we have demonstrated in humans that DSC are related to the bone marrow stromal precursors rather than to the hemopoietic lineage (19), and their morphology and phenotype are similar to those of myofibroblasts (20), fibroblastic cells with contractile activity that are involved in wound retraction. Here we investigate the contractile activity of DSC to confirm the relationships of these cells with myofibroblasts. We also studied the effect of IL-2, a Th1 cytokine that blocks the decidualization of DSC

(17) and is related to spontaneous abortion (21), on DSC contractility.

## Materials and Methods

### Tissues

Eighteen samples from elective vaginal terminations of first trimester pregnancy (6–11 wk) from healthy patients, aged 20–30 yr, were used. In 14 patients this was their first pregnancy, and of the 4 patients who had prior pregnancies (1, 1, 3, and 3 pregnancies) only 1 had had one previous spontaneous abortion. We excluded women receiving any medication or with infectious, autoimmune, or other systemic or local diseases. None of the abortions was pharmacologically induced. The specimens were obtained by vaginal curettage at the Clínica El Sur (Málaga, Spain), Clínica los Cármenes (Granada, Spain), and Hospital Universitario de San Cecilio (Granada, Spain). Informed consent was obtained from each patient. This study was approved by the research and ethics committee of Hospital Universitario de San Cecilio.

### Fibroblast medium

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

### Isolation and culture of DSC

Decidual tissues were examined histologically to exclude the presence of infection or inflammatory infiltration. Samples of decidua from different patients were not mixed so as to avoid the induction of cytokine secretion as a result of the allogeneic reaction of leukocytes that initially contaminate DSC cultures. Tissues were thoroughly washed in PBS solution, and the decidua was carefully freed from the trophoblast. Decidual fragments were finely minced between two scalpels in a small volume of RPMI 1640 medium with 100 U/ml penicillin and 50  $\mu$ g/ml gentamicin, and put in a solution of 0.5% trypsin and 0.2% EDTA (Sigma-Aldrich) for 15 min at 37 C. The reaction was stopped by adding cold RPMI with 20% FCS (Life Technologies, Inc., Paisley, UK); the suspension was filtered through gauze and centrifuged at 425  $\times$  g for 10 min. The supernatant was discarded, and the cell pellet was suspended in RPMI and centrifuged on Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech,

Abbreviations: ALP, Alkaline phosphatase; DSC, decidual stromal cell; ESC, endometrial stromal cell; FCS, fetal calf serum; HLA, human leukocyte antigen; mAb, monoclonal antibody; PDGF, platelet-derived-growth factor; preDSC, decidual stromal cell precursor;  $\alpha$ -SM,  $\alpha$ -smooth muscle.



Uppsala, Sweden) for 20 min at  $600 \times g$ . Cells were collected from the interface, suspended in PBS, and washed. This suspension, containing mainly DSC and leukocytes, was incubated in culture flasks for 1 h in complete RPMI with 10% FCS to allow macrophages, granulocytes, and gland cells to adhere to the flask. The supernatant, containing DSC and lymphocytes, was washed and incubated in fibroblast medium with 100 U/ml penicillin and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamicin. After overnight incubation to allow DSC to adhere to the flask, lymphocytes in the supernatant were discarded. The remaining adherent cells were mainly DSC. Fibroblast medium was then replaced and changed twice a week, and after 2–4 wk, adherent cells covered the whole surface of the 25-cm<sup>2</sup> culture flask. Proliferating DSC overgrew other possible contaminant cells, thus further guaranteeing the purity of the cultures. Purity was further confirmed using flow cytometry to detect the coexpression of CD10 and CD13 and the lack of CD45 antigens by DSC (11–14, 19, 20, 23). In fibroblast medium, cells proliferated for 8–12 wk; during this period their antigen phenotype was stable (19). Supernatants from confluent cultures were collected, concentrated 10-fold in a Miniplus concentrator (Amicon, Beverly, MA), and analyzed for the presence of PRL with an electrochemiluminescence immunoassay (Roche, Indianapolis, IN).

### Monoclonal antibodies (mAb)

The mAb used in this study are shown in Table 1.

### Flow cytometry

Decidual stromal cells were detached from the culture flask by treatment with 0.04% EDTA at 37 C. Cells were centrifuged, the supernatant was discarded, and the pellet was suspended in PBS at  $10^6$  cells/ml. For direct staining, 100  $\mu\text{l}$  of the cell suspension was incubated with 10  $\mu\text{l}$  of the appropriate monoclonal antibody for 30 min at 4 C in the dark. Cells were washed, suspended in 1 ml PBS, and immediately analyzed in a flow cytometer (Ortho-Cyturon, Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ). To identify dead cells we incubated DSC with propidium iodide (Sigma-Aldrich). The percentage of cells that were antibody positive was calculated by comparison with the appropriate isotype control (Table 1). For double labeling, we followed the same procedure, except that a second mAb with a different fluorescent marker from the first mAb was also added. For indirect labeling, FITC-labeled goat antimouse immunoglobulin was added after the first mAb. For intracytoplasmic labeling, DSC were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at 4 C and permeabilized with cold acetone for 10 min before the mAb was added.

### PCR primers

Primers used in this study are shown in Table 2. They were designed according to sequences available from GenBank (<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/>) and synthesized by Genset (Paris, France). To prevent the amplification of contaminant genomic DNA, sense and antisense primers were designed, when possible, from sequences located far apart on different exons and tested in PCR reactions with RNA used in cDNA synthesis.

### RT-PCR

Total RNA from cells was extracted by the Ultraspec RNA isolation method according to the manufacturer's protocol (Biotecx Laboratories,

Inc., Houston, TX). A single-strand cDNA copy was made from total RNA using random hexamers (Pharmacia Biotech) and Moloney murine leukemia virus H<sup>-</sup> ribonuclease reverse transcriptase (Promega Corp., Madison, WI). After heating to 65 C for 5 min and quickly cooling to 4 C in a thermal cycler (Geneamp PCR System 9600, PerkinElmer/Cetus, Norwalk, CT) for denaturation, RT was performed for 1 h at 37 C. Starting with the equivalent of 75 ng RNA, amplification was carried out in a total volume of 12.5  $\mu\text{l}$  of the amplification mix, 10 mM Tris-Cl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin, 0.2 mM deoxy-NTPs, 5% glycerol, 0.25 mM of each primer, and 0.02 U/ml *Taq* DNA polymerase (Promega Corp.). After incubation for 5 min at 96 C, each cycle consisted of 94 C for 30 sec, 57 C for 30 sec, and 72 C for 30 sec, for a total of 32 cycles. One microliter of the first round product was used for the second 32-cycle round. The PCR products were size-separated on ethidium bromide-stained 2% agarose gels, and a 100-bp DNA ladder was included in each run.

### Cytokines

TGF $\beta$ 1, platelet-derived-growth factor BB (PDGF-BB) and IL-2 were purchased from Sigma.

### Gel contraction assay

Cellular collagen gel contraction assays were performed as previously described (22). A sterile solution of purified, pepsin-solubilized bovine dermal collagen (Vitrogen, Cohesion Technologies, Inc., Palo Alto, CA) was prepared according to the manufacturer's instructions and combined with  $25 \times 10^4$  DSC. The collagen/cell mixture (100  $\mu\text{l}$ /well) was dispensed into culture plates and allowed to polymerize at 37 C for 30 min. Immediately after polymerization, 2 ml fibroblast medium with or without the appropriate cytokine was added to each well. After incubation for 24 h, the height (h) and diameter (d) of each gel were measured with a microscope micrometer, and the volume (V) of each gel was calculated with the following formula:  $V = 1/24 \times \pi \times h \times (3 \times d^2 + h^2)$ . The mean of the measurements ( $n = 3$  for each sample) taken at each concentration point was used to estimate gel volume. The data are presented as the percent gel contraction of cytokine-treated DSC compared with that of cells cultured in the absence of cytokine calculated with the following formula: cell contractility (%) =  $100 \times (V \text{ with no}$

**TABLE 2.** Primer sequences used for RT-PCR

mRNA	Oligonucleotide primers	PCR product size (bp)
CD10	5'-AACATGGATGCCACCACTGAG-3'	525
	5'-CACATATGCTGTACAAGCCTC-3'	
CD13	5'-AAGCTCAACTACACCCTCAGC-3'	600
	5'-GGGTGTGTCATAATGACCAGC-3'	
$\alpha$ -SM actin	5'-ACTGTGTTATGTAGCTCTGGAC-3'	465
	5'-ACAATGGAAGGCCCGCTTC-3'	
ALP	5'-GGACAAGTTCCTTCGTGG-3'	362
	5'-GCATGAGCTGGTAGGCGATG-3'	
Prolactin	5'-GGGTTTCATTACCAAGGCCATC-3'	276
	5'-TTCAGGATGAACCTGGCTGAC-3'	
DR-B	5'-CCTACTGCAGACACAACACTACG-3'	154
	5'-TCAATGCTGCCTGGATAGAAAC-3'	

**TABLE 1.** mAb used in this study

mAb	Specificity	Ig subclass	Labeled with	Obtained from <sup>a</sup>
Isotype control		IgG1	FITC or PE	Sigma
Isotype control		IgG2a	FITC or PE	Sigma
Anti-CALLA	CD10	IgG1	PE	DAKO
CD13	CD13	IgG1	FITC	Caltag Laboratories, Inc.
CD45	CD45	IgG1	FITC	Sigma
OKDR	HLADR	IgG2a	FITC	Ortho-Diagnostic
Anti- $\alpha$ -SM actin	$\alpha$ -SM actin	IgG2a	FITC	Sigma
B4-78	Bone/liver/kidney isoenzyme of ALP	IgG1		DHSB

FITC, Fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin.

<sup>a</sup> Sigma (St. Louis, MO); DAKO (Glostrup, Denmark); Caltag Laboratories, Inc. (San Francisco, CA); Ortho-Diagnostic System (Raritan, NJ); DHSB (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA).

cytokine – V with cytokine)/V with no cytokine. As a negative control for cell contractility in gel, we used the Ramos cell B lymphoma line. These cells are unable to adhere to surfaces (plastic or gel). They are therefore unable to contract gels, because this activity depends on adhesion to the gel matrix. Ramos cells were cultured in RPMI 1640 medium with 100 U/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml gentamicin, and 10% FCS before the assay.

## Results

### DSC lines

DSC lines with fibroblast-like morphology (Fig. 1) were obtained in fibroblast medium 2–4 wk after the primary culture. With flow cytometry we observed that most DSC expressed CD10 and CD13, but lacked CD45 (Fig. 2). This matches the basic antigen phenotype of human ESC and DSC, as reported by several researchers (11–14, 19, 20, 23). Moreover, CD10 is considered a marker for these cells (24). These results confirmed the purity of the cultures and the absence of contaminant hemopoietic cells. Also, as previously reported (19), most cultured DSC were positive for alkaline phosphatase (ALP), and some lines expressed human leukocyte antigen DR (HLA-DR).  $\alpha$ -Smooth muscle ( $\alpha$ -SM) actin, a marker for myofibroblasts (25), was detected in most DSC (Fig. 2).

### Detection of $\alpha$ -SM actin mRNA in cultured DSC

The expression of  $\alpha$ -SM actin was confirmed by RT-PCR.  $\alpha$ -SM actin mRNA, together with CD10, CD13, ALP mRNAs, were detected in all DSC lines (Fig. 3). Because PRL is secreted by DSC only when they are cultured with progesterone (6), and our cultures lacked this hormone, we did not detect PRL in the supernatants (results not shown). Nevertheless, small amounts of PRL mRNA were detected in some lines. As found for HLA-DR expression detected by flow cytometry, some, but not all, DSC lines expressed HLA-DRB mRNA (Fig. 3). Although DSC cultured in fibroblast medium show a stable antigen phenotype equivalent to that displayed by these cells *in vivo* (11, 14, 19, 20, 23), and we did not observe any significant change in the expression of the antigens during this study, the detection of HLA-DR-positive

and HLA-DR-negative DSC lines may indicate that HLA-DR is modulated negatively in culture.

### Contractile activity of cultured DSC

To determine whether the expression of  $\alpha$ -SM actin by DSC correlated with a functional phenotype, we examined

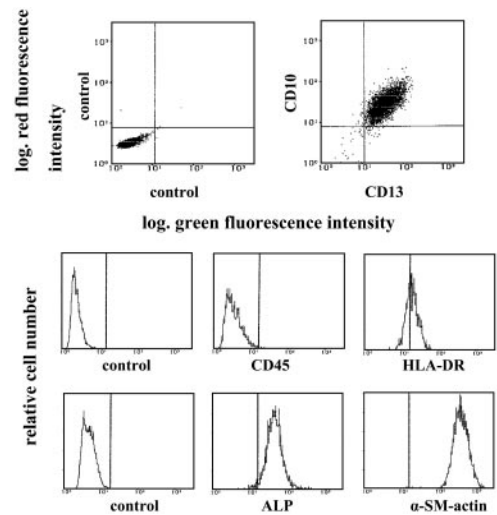


FIG. 2. Flow cytometric analysis of the antigens expressed by cultured DSC. Each mAb was matched with its respective isotype control.

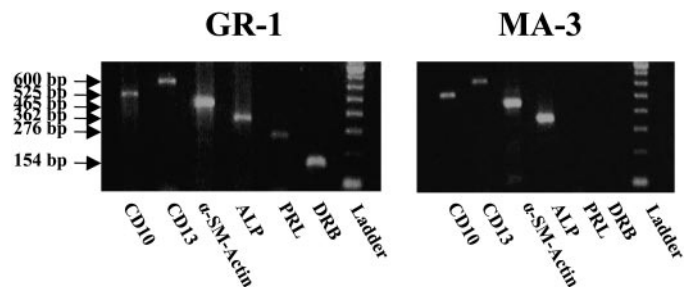
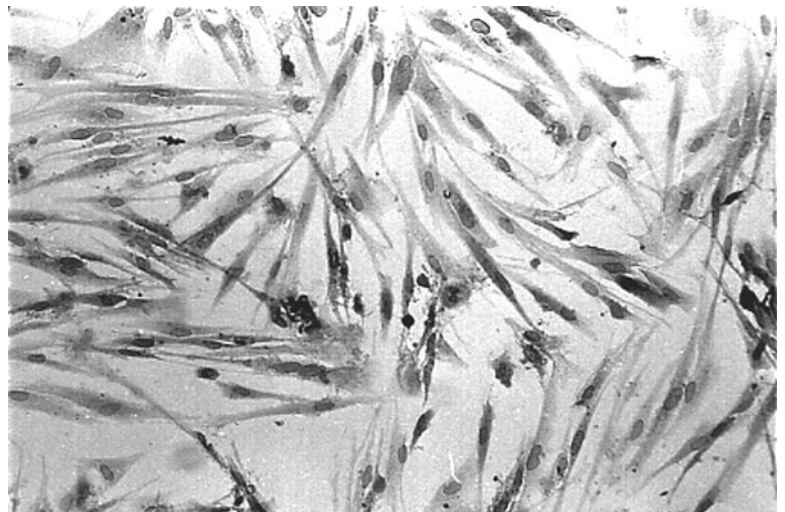


FIG. 3. Expression of CD10, CD13,  $\alpha$ -SM actin, ALP, PRL, and HLA-DRB mRNAs by two different lines of DSC (GR-1 and MA-3) examined by RT-PCR.

FIG. 1. DSC lines cultured in fibroblast medium showed fibroblast-like morphological features.



the effects of TGF- $\beta$ 1 and PDGF, two cytokines with the capacity to induce cell contractility in fibroblast cells (26), on DSC plated on collagen. Both cytokines induced cell contractility in DSC in a dose-response manner (Fig. 4). IL-2, a cytokine able to block decidualization (17) and related to spontaneous abortion (21), also induced cell contractility in cultured DSC. None of these cytokines, however, showed any effect in the Ramos cells used as a negative control (Fig. 4).

### Discussion

Although the many immune activities of DSC and their probable bone marrow origin led some researchers to propose that these cells belonged to the hemopoietic lineage (18), we recently demonstrated that human DSC are related to the bone marrow stromal precursors, multipotent stromal cells that differentiate into different types of mesenchymal cell (19). Furthermore, the cytoskeletal filament phenotype and ultrastructural morphology of DSC are similar to those of myofibroblasts (20). In this study we show that cultured DSC express  $\alpha$ -SM actin and mRNA for  $\alpha$ -SM actin, a microfilament that is considered a marker of myofibroblasts (25). Because DSC were able to contract collagen gel matrixes, we conclude that they are also functionally related to myofibroblast. Furthermore, like DSC, fibroblasts and myofibroblasts express antigens associated with hemopoietic cells (27, 28), secrete cytokines (29), costimulate T lymphocyte proliferation (30), and appear to be involved in transplant rejection (31). Under the regulation of local cytokines, both DSC and myofibroblasts produce matrix metalloproteinases, enzymes that degrade the interstitial matrix. In intestinal myofibroblasts, this degradation leads to the shedding and epithelial renewal of the intestinal mucosa (32); in the ESC, the process leads to the loss of integrity of blood vessels, destruction of the endometrial interstitial matrix, and the resultant bleeding characteristic of menstruation (33). The contractile activity of ESC may favor expulsion of the endometrium during menstruation.

TGF $\beta$ 1 and PDGF, two cytokines reported to induce contraction in myofibroblasts (26), also activated the contractility of DSC. The fact that these cytokines also inhibit decidualization (34) suggests that contractile activity is carried out mainly by preDSC. In this connection our cultured DSC are related to preDSC rather than to decidualized DSC (19). After primary culture, only DSC with the ability to proliferate are positively selected. In the absence of progesterone in the culture medium, these cells can be assumed to correspond to preDSC (5, 6, 19). In fact, like preDSC, DSC cultured in fibroblast medium did not secrete PRL (results not shown). The fact that preDSC are located around the vessels (35) suggests that these contractile cells may play a role in blood flow regulation.

TGF $\beta$ 1 and PDGF also stimulated DSC proliferation, probably by affecting preDSC, in view of the antidecidualizing effect of these cytokines (34). In humans, decidual tissue has been shown to express TGF $\beta$ 1 mRNA (36) and mRNA for PDGF-A and PDGF-B (37). PDGF receptors were found on both DSC (37) and ESC (38), and TGF type II receptor was detected on ESC (39). Furthermore, PDGF and TGF $\beta$ 1 have

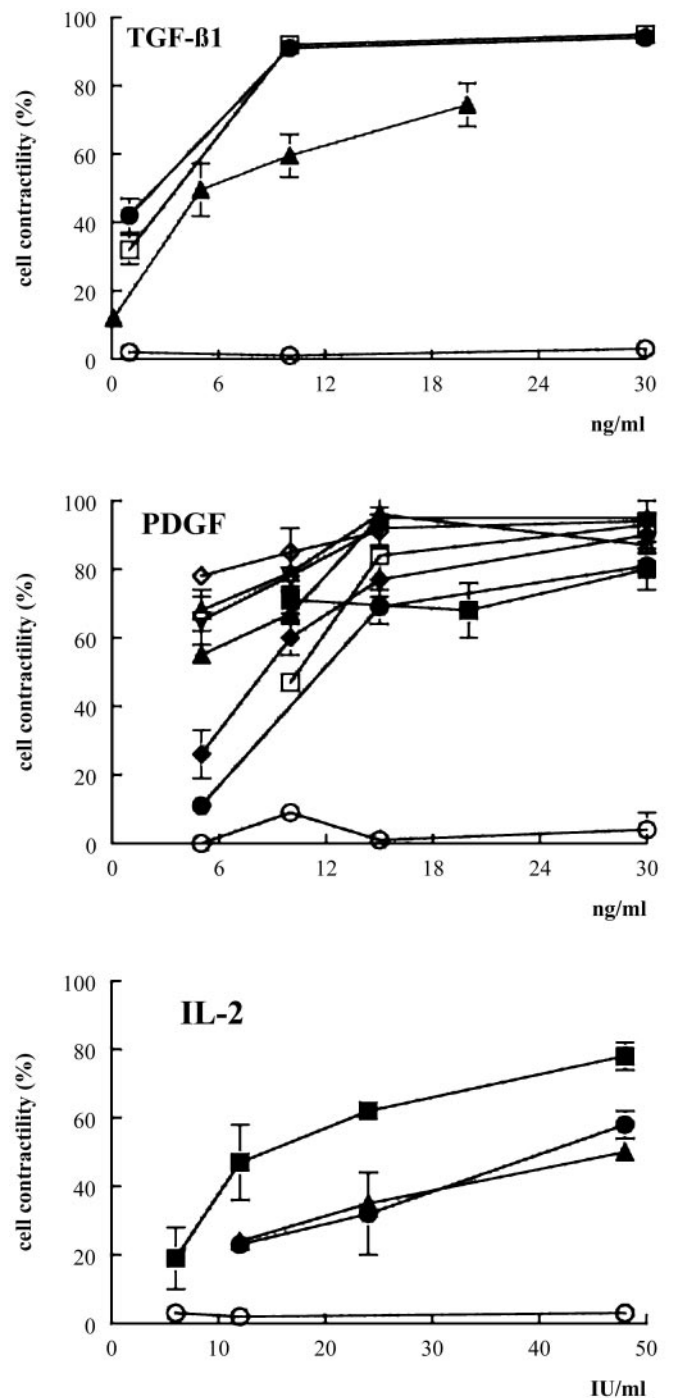


FIG. 4. Induction of contractility in lines of DSC by TGF $\beta$ 1, PDGF, and IL-2, determined by the collagen gel contraction assay. Each curve ( $\bullet$ ,  $\square$ ,  $\blacktriangle$ ,  $\diamond$ ,  $\triangle$ ,  $\nabla$ ,  $\blacksquare$ , and  $\blacklozenge$ ) represents the contractile activity of a different DSC line. As a negative control for gel contraction we used Ramos cells ( $\circ$ ). The mean of measurements ( $n = 3$  for each sample) taken at each concentration point was used to estimate contractility. The data are presented as the percent gel contraction  $\pm$  SD of cytokine-treated DSC compared with that of cells cultured in the absence of cytokine.

been detected in ESC (38, 39), and these cells were reported to be the source of these cytokines (40, 41), although TGF $\beta$ 1 is also produced by epithelial cells (41), suggesting that au-

ocrine and paracrine mechanisms take place in the induction of DSC or ESC contractility.

Another functional role of the contractile activity of DSC may be in trophoblast expulsion during spontaneous abortion. There is increasing evidence that the immune system is involved in normal pregnancy and abortion (42). In mice and humans, normal pregnancy is related to the local and peripheral production of Th2 cytokines (43), whereas abortion is associated with Th1 cytokine production (21, 43). Progesterone up-regulates the production of Th2 cytokines by lymphocytes (44) and inhibits the production of Th1 cytokines (45). Decidual stromal cells show membrane receptor for IL-2 (46), a Th1 cytokine. IL-2, like TGF $\beta$ 1 and PDGF, inhibited decidualization (17) and, as shown by our findings, also induced DSC contractility. Progesterone, the hormone that favors pregnancy, differentiates DSC to a progestation status and blocks their immune activities (7, 12), whereas cytokines such as TGF $\beta$ 1, PDGF, and IL-2 inhibit decidualization (17, 34) and favor the contractile activity of DSC, which may lead to expulsion of the trophoblast. The fact that levels of IL-2 (21) and TGF $\beta$ 1 (47) are elevated in spontaneous abortion supports this view and suggests the existence of an immunological-endocrinological cross-talk involving DSC, which may lead to either normal pregnancy or spontaneous abortion.

### Acknowledgments

We are grateful to Drs. S. Jordán and C. Sánchez from the Clínica el Sur (Málaga) for providing us with decidual specimens. We thank K. Shashok for improving our use of English in this manuscript.

Received August 2, 2002. Accepted November 18, 2002.

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

This work was supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (Spanish Ministry of Health).

### References

- Bulmer JN 1995 Immune cells in decidua. In: Kurpisz M, Fernandez N, eds. Immunology of human reproduction. Oxford: BIOS Scientific; 313–334
- Richards RG, Brar AK, Frank GR, Hartman SM, Jikihara H 1995 Fibroblast cells from term human decidua closely resemble endometrial stromal cells: induction of prolactin and insulin-like growth factor binding protein-1 expression. *Biol Reprod* 52:609–615
- Bulmer D, Peel S 1974 An autoradiographic study of cellular proliferation in the uterus and placenta of the pregnant rat. *J Anat* 117:433–441
- Riddick DH, Kusmik WF 1977 Decidua: a possible source of amniotic fluid prolactin. *Am J Obstet Gynecol* 127:187–190
- Glasser SR, Julian J 1986 Intermediate filament protein as a marker of uterine stromal cell decidualization. *Biol Reprod* 35:463–474
- Tabanelli S, Tang B, Gurpide E 1992 In vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42:337–344
- Montes MJ, Tortosa CG, Borja C, Abadía AC, González-Gomez F, Ruiz C, Olivares EG 1995 Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am J Reprod Immunol* 34:188–194
- Nasu K, Narahara H, Matsui N, Kawano Y, Tanaka Y, Miyakawa I 1999 Platelet-activating factor stimulates cytokine production by human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 5:548–553
- Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Nagano Y, Yoshida S, Tanikawa M, Terakawa N 2000 Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression. *J Clin Endocrinol Metab* 85:824–829
- Kai K, Nasu K, Nakamura S, Fukuda J, Nishida M, Miyakawa I 2002 Expression of interferon- $\gamma$ -inducible protein-10 in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 8:176–180
- Olivares EG, Montes MJ, Oliver C, Galindo JA, Ruiz C 1997 Cultured human decidual stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. *Biol Reprod* 57:609–615
- Ruiz C, Montes MJ, Abadía-Molina AC, Olivares EG 1997 Phagocytosis by fresh and cultured human decidual stromal cells. Opposite effects of interleukin-1 $\alpha$  and progesterone. *J Reprod Immunol* 33:15–26
- Imai K, Maeda M, Fujiwara H, Okamoto N, Kariya M, Emi N, Takakura K, Kanzaki H, Mori T 1992 Human endometrial stromal cells and decidual cells express cluster of differentiation (CD) 13 antigen/aminopeptidase N and CD10 antigen/neutral endopeptidase. *Biol Reprod* 46:328–334
- Montes MJ, Alemán P, Tortosa CG, Borja C, Ruiz C, Olivares EG 1996 Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with hematopoietic cells. *J Reprod Immunol* 30:53–66
- Kariya M, Kanzaki H, Takakura K, Imai K, Okamoto N, Emi N, Kariya Y, Mori T 1991 Interleukin-1 inhibits *in vitro* decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 73:1170–1174
- Jikihara H, Handwerger S 1994 Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits the synthesis and release of human decidual prolactin. *Endocrinology* 134:353–357
- Kanda Y, Jikihara H, Markoff E, Handwerger S 1999 Interleukin-2 inhibits the synthesis and release of prolactin from human decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab* 84:677–681
- Lysiak JJ, Lala PK 1992 In situ localization and characterization of bone-marrow derived cells in the decidua of normal murine pregnancy. *Biol Reprod* 47:603–613
- García-Pacheco JM, Oliver C, Kimatrai M, Blanco FJ, Olivares EG 2001 Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related with bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod* 7:151–157
- Oliver C, Montes MJ, Galindo JA, Ruiz C, Olivares EG 1999 Human decidual stromal cells express  $\alpha$ -smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum Reprod* 14:1599–1605
- Raghupathy R 1997 Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 18:478–482
- Kleinman H, McGoodwin EB, Rennard SI, Martin GR 1979 Preparation of collagen substrates for cell attachment: effect of collagen concentration and phosphate buffer. *Anal Biochem* 94:308–313
- Oliver C, Cowdrey C, Abadía-Molina AC, Olivares EG 1999 Antigen phenotype of cultured decidual stromal cells of human term decidua. *J Reprod Immunol* 45:19–30
- Sumathi VP, McCluggage WG 2002 CD10 is useful in demonstrating endometrial stroma at ectopic sites and in confirming a diagnosis of endometriosis. *J Clin Pathol* 55:391–392
- Foo IT, Naylor IL, Timmons MJ, Trejdosiewicz LK 1992 Intracellular actin as a marker for myofibroblasts in vitro. *Lab Invest* 67:727–733
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown R 2002 Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:349–363
- Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A 1994 Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1:71–81
- Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN 2001 Peripheral blood fibrocytes: Differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 166:7556–7562
- Chesney J, Metz C, Stavitsky AB, Bacher M, Bucala R 1998 Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol* 160:419–425
- Chesney J, Bacher M, Bender A, Bucala R 1997 The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6307–6312
- Pedagogos E, Hewitson TD, Walker RG, Nicholis KM, Becker GJ 1997 Myofibroblast involvement in chronic transplant rejection. *Transplantation* 64:1192–1197
- MacDonald TT, Bajaj-Elliott M, Pender SLF 1999 T cells orchestrate intestinal mucosal shape and integrity. *Immunol Today* 20:505–510
- Chitchley HOD, Kelly RW, Brenner RN, Baird DT 2001 The endocrinology of the menstruation: a role for the immune system. *Clin Endocrinol (Oxf)* 55:701–710
- Vicovac LM, Starkey PM, Aplin JD 1994 Effect of cytokines on prolactin production by human stromal cells in culture: studies using cells freed from bone marrow contaminants. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1877–1882
- Ferenczy A, Guralnick M 1983 Endometrial microstructure: structure-function relationships throughout the menstrual cycle. *Semin Reprod Endocrinol* 1:205–212
- Kauma S, Matt D, Storm S, Eierman D, Tuner T 1990 Interleukin-1 $\beta$ , human leukocyte antigen HLA-DR $\alpha$ , and transforming growth factor-beta expression in endometrium, placenta, and placental membranes. *Am J Obstet Gynecol* 163:1430–1437
- Saji M, Taga M, Matsui H, Suyama K, Kurogi K, Minaguchi H 1997 Gene expression and specific binding of platelet-derived growth factor and its effect in DNA synthesis in human decidual cells. *Mol Cell Endocrinol* 132:73–80
- Chegini N, Rossi MJ, Masterson BJ 1992 Platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), and EGF and PDGF  $\beta$ -receptors in

- human endometrial tissue: localization and *in vitro* action. *Endocrinology* 130:2373–2385
39. **Chegini N, Zhao Y, Williams RS, Flanders KC** 1994 Human uterine tissue throughout the menstrual cycle expresses transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1), TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3, and TGF $\beta$  type II receptor messenger ribonucleic acid and protein and contains [<sup>125</sup>I]TGF $\beta$ 1-binding sites. *Endocrinology* 135:429–449
  40. **Giudice LC** 1994 Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil Steril* 61:1–17
  41. **Tang XM, Zhao Y, Rossi MJ, Abu-rustum RS, Ksander GA, Chegini N** 1994 Expression of transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) isoforms and TGF $\beta$  type II receptor messenger ribonucleic acid and protein, and the effect of TGF $\beta$ s on endometrial stromal cell growth and protein degradation *in vitro*. *Endocrinology* 135:450–459
  42. **Olivares EG, Muñoz R, Tejerizo G, Montes MJ, Gómez-Molina F, Abadía-Molina AC** 2002 Decidual lymphocytes of human spontaneous abortions induce apoptosis but not necrosis in JEG-3 extravillous trophoblast cells. *Biol Reprod* 67:1211–1217
  43. **Marzi M, Viganò A, Trabattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, Clerici M** 1996 Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 106:127–133
  44. **Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C, Romagnani S, Maggi E** 1995 Progesterone favours the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol* 155:128–133
  45. **Choi BC, Polgar K, Xiao L, Hill JA** 2000 Progesterone inhibits *in vitro* embryotoxic Th1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 15:46–59
  46. **Starkey PM** 1991 Expression on cells of early human pregnancy, of the p75, IL-2 and p145, IL-4 receptor proteins. *Immunology* 73:64–70
  47. **Ogasawara MS, Aoki K, Aoyama T, Katano K, Inuma Y, Ozaki Y, Suzumori K** 2000 Elevation of transforming growth factor- $\beta$ 1 is associated with recurrent miscarriage. *J Clin Immunol* 20:453–457

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Patients and Methods

### Tissues

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

### Fibroblast medium

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

### Isolation and culture of DSC

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

First Published Online August 16, 2005

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

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

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

### Reagents

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

### Collagen gel contraction assay

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

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

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

### Western immunoblotting

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

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

### Immunofluorescence microscopy

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

### IL-10 assay

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

### Statistical analysis

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

## Results

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

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

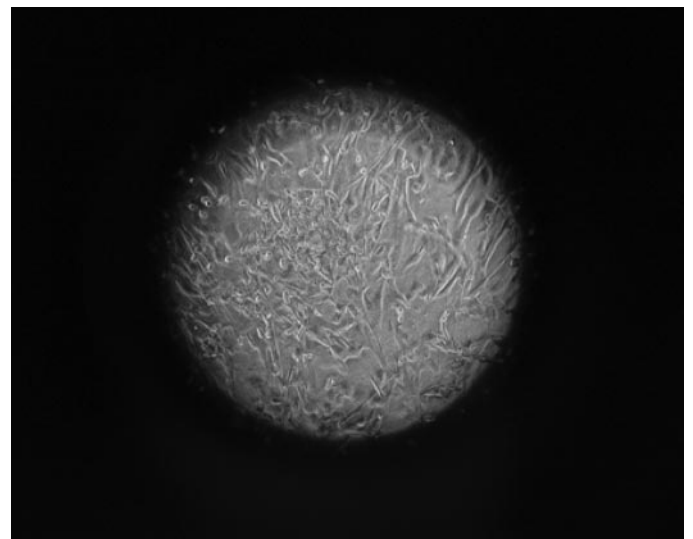


FIG. 1. Collagen gel matrix containing DSC ( $\times 40$  magnification).

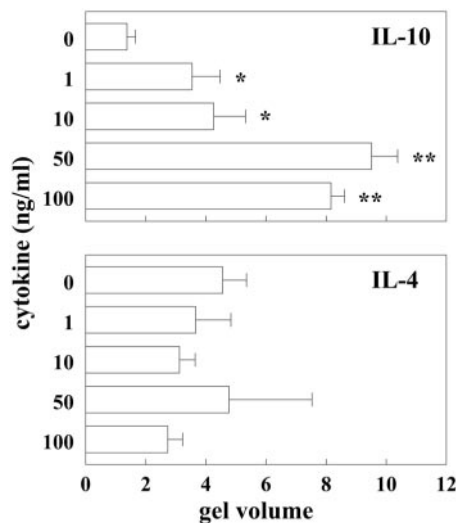


FIG. 2. Effect of IL-10 and IL-4 on the volume of collagen gel matrixes containing DSC. DSC were cultured in collagen gel matrixes for 48 h in the absence of cytokines or in the presence of increasing amounts of IL-10 or IL-4. The mean number of measurements ( $n = 6$ ) taken at each concentration *bar*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

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

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

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

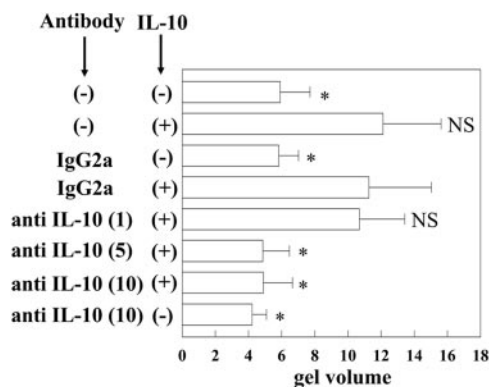


FIG. 3. Blocking activity of the neutralizing antihuman IL-10 monoclonal antibody (JES3-19F1) on the effect of IL-10. Decidual stromal cells were cultured in collagen gel matrixes for 48 h in the absence or in the presence of 50 ng/ml IL-10, without or with increasing amounts (in parentheses; 1, 5, or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

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

#### Cultured DSC secrete IL-10

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

#### Discussion

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

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

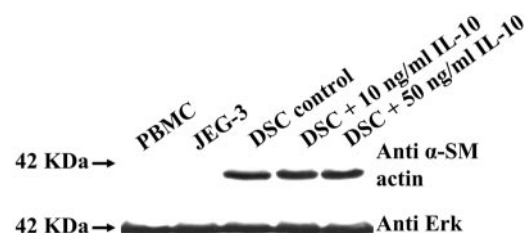
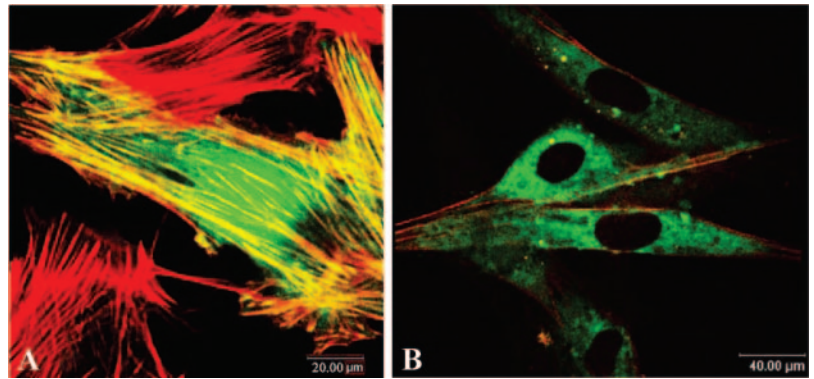


FIG. 4. Detection of  $\alpha$ -SM actin in DSC cultured without or with IL-10 for 48 h. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and the tumor cell line JEG-3 were used as negative controls for the expression of  $\alpha$ -SM actin. MAPK ERK was used as the loading control. Results are shown from one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



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



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

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

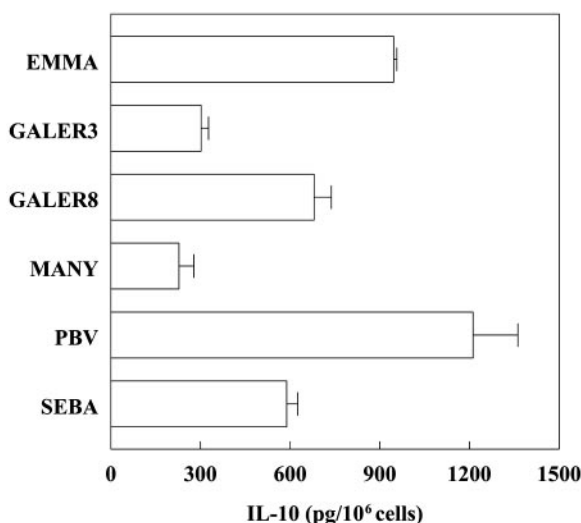


FIG. 6. Concentrations of IL-10 in the supernatants of six different DSC lines.

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

### Acknowledgments

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

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

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

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

### References

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

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

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