UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Determinación del impacto de IGF2 en la comunicación entre trofoblasto y las células dNK

Valentina Guevara Prieto

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2024

Determinación del impacto de IGF2 en la comunicación entre trofoblasto y las células dNK

Valentina Guevara Prieto

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias, Bioquímica

Directora:

Doctora Yadi Adriana Umaña Pérez

Línea de Investigación:

Trofoblasto como modelo predictivo de progresión tumoral

Grupo de Investigación en Hormonas (GIH)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2024

Encontré la vida lejos de las personas y cerca a mis perros.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

_____

Valentina Guevara Prieto

CC 1026299928

Fecha 30/01/2024

Agradecimientos

A la doctora Adriana Umaña Pérez por su incansable dedicación, escucha y acompañamiento, sin su apoyo y voto de confianza este proyecto no habría podido realizarse. Gracias infinitas por ser tutora y amiga, por acompañar cada paso del proceso y por confiar en mi incluso cuándo pensé que no lo lograría. A la Universidad Nacional de Colombia por recibirme desde siempre con los brazos abiertos, por formarme y verme crecer como profesional y persona. Al Ministerio de Ciencias por la financiación parcial de este trabajo enmarcado en el proyecto “Trofoblasto como modelo de progresión tumoral” y a la dirección nacional de investigación y laboratorios (DNIL) por la financiación de este trabajo enmarcado en el proyecto “Comunicación celular materno-fetal elemento clave en la salud reproductiva”. A la profesora Nohora Vega y al profesor Alejandro Ondo por permitirnos el uso de equipos a su cargo para el desarrollo de este trabajo.

A mis padres por confiar en mi al embarcarme en este proceso, por su amor incondicional y su apoyo moral. Su confianza en mí ha sido el pilar de este logro. A mi hermano Pedro por apoyarme en la distancia. A mi hermana Ivonne por estar en cada paso, por darme fuerzas y creer en mi aun cuando yo no creí, gracias por ser luz e inspiración. A mis amigos por ser fortaleza y ánimo. A ti por estar aún en los momentos en los que ninguno quería estar.

Resumen

Determinación del impacto de IGF2 en la comunicación entre trofoblasto y las células dNK

En el proceso de implantación blastocística debe existir una comunicación continua entre las células de trofoblasto, las células dNK y otras poblaciones inmunes. Esta comunicación se centra en ejercer control inmunológico para mantener la receptividad materna. El aumento en la concentración de factores como el IGF2 se ha asociado a un incremento en la invasividad de las células trofoblásticas, siendo relevante estudiar los mecanismos que modulan la comunicación entre las células de trofoblasto y las células dNK en presencia de IGF2. Para esto se planteó un modelo *in vitro*, en el que se diferenciaron células pNK hacia un fenotipo tolerogénico similar a las células dNK (i-dNK) para co-cultivarlas con células HTR-8/SVneo. Se recogieron los medios condicionados de i-dNK (MidNK) para evaluar su efecto en la proliferación, invasión y migración de las células de trofoblasto estimuladas con IGF2 y los de células de HTR-8/SVneo estimuladas con IGF2 (MHIGF) para determinar los cambios en la expresión de marcadores de diferenciación en las células i-dNK. El análisis de los medios MHIGF muestra un incremento en la expresión de citoquinas relacionadas con la tolerogenia. Este efecto es suprimido en los medios de los co-cultivos, sugiriendo que la comunicación intercelular puede estar activando el papel regulador de las células dNK. Este resultado concuerda con los cambios en expresión génica y en cambios fenotípicos, que muestran la capacidad de las células i-dNK de ejercer regulación sobre las células de trofoblasto en respuesta al estímulo con IGF2.

Palabras clave: Natural killer, decidua, embarazo, comunicación materno-fetal

Abstract

IGF2 impact in the communication between trophoblast and dNK cells

In the process of blastocyst implantation there must be continuous communication between trophoblast cells, dNK cells and other immune populations at the maternal interphase. This communication focuses on exerting immunological control to maintain maternal receptivity. The increase in the concentration of factors such as IGF2 has been associated with an increase in the invasiveness of trophoblast cells. As a result, it is important to study the mechanisms that modulate the communication between trophoblast cells and dNK cells in the presence of IGF2. For this, an *in vitro* model was proposed, in which pNK cells were differentiated towards a tolerogenic phenotype similar to dNK cells (i-dNK) to co-culture them with HTR-8/SVneo cells. Conditioned media from i-dNK (MidNK) were collected to evaluate its effect on the proliferation, invasion and migration of trophoblast cells stimulated with IGF2 and those of HTR-8/SVneo cells stimulated with IGF2 (MHIGF2) to determine changes in the expression of differentiation markers in i-dNK cells. Analysis of MHIGF media shows an increase in the expression of cytokines related to tolerance. This effect is suppressed in the co-culture media, suggesting that intercellular communication may be activating the regulatory role of dNK cells. This result is consistent with the changes in gene expression and phenotypic changes, which show the ability of i-dNK cells to exert regulation on trophoblast cells in response to IGF2 stimulation.

Keywords: Natural killer, decidua, pregnancy, maternal-fetal communication

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XIII**

Lista de abreviaturas ..... **XV**

Introducción **1**

1. Estado del arte **3**
1.1 Establecimiento del embarazo 3
1.2 Células dNK 4
1.3 Células de trofoblasto 5
1.4 Comunicación trofoblasto-dNK 6
1.5 Sistema IGF 6

2. Objetivos **9**
2.1 Objetivo general 9
2.2 Objetivos específicos 9

3. Hipótesis **11**

4. Metodología **13**
4.1 Cultivo celular 13
4.2 Caracterización funcional de las células de trofoblasto 15
4.2.1 Ensayo de Boyden 15
4.2.2 Ensayo de herida 15
4.2.3 Ensayo de migración 16
4.2.4 Ensayo de proliferación 16
4.3 Análisis de expresión génica 17
4.3.1 Extracción de RNA 17
4.3.2 RT-qPCR 17

4.4 Análisis por citometría de flujo 18
4.4.1 Análisis de expresión de marcadores de diferenciación 18
4.4.2 Análisis de expresión de citoquinas 19
4.5 Análisis estadístico 19

5. Resultados y discusión 21
5.1 Establecimiento de un modelo de células con fenotipo similar a las células dNK a partir de células natural killer periféricas 21
5.2 Cambios en la expresión de marcadores de diferenciación de células i-dNK estimuladas con medios condicionados de células HTR-8/SVneo estimuladas con IGF2 25
5.3 Cambios en la expresión de citoquinas en medios de células i-dNK o HTR-8/SVneo estimuladas con medios condicionados o co-cultivadas 27
5.4 Cambio en el fenotipo de células HTR-8/SVneo estimuladas con medios condicionados o co-cultivadas con células i-dNK 30

6. Conclusiones 39
6.1 Conclusiones 39

A. Anexo: 41

B. Anexo: Estrategia de gating 42

C. Anexo: Viabilidad celular NK 43

Bibliografía 45

Lista de figuras

Pág.

Figura 1. Cambios en la expresión de CD56 y CD16 de células pNK.. 21
Figura 2. Expresión de CD49a, CD158a, CD94 y CD62L en células pNK y células i-dNK..... 22
Figura 3. Expresión génica diferencial en células pNK e i-dNK..... 23
Figura 4. Expresión de citoquinas en medios de células pNK estimuladas 24
Figura 5. Expresión de CD56 y CD16 en células i-dNK estimuladas con MHIGF2... 25
Figura 6. Expresión de marcadores de diferenciación de células i-dNK cultivadas con MHIGF2. 26
Figura 7. Cambio en la expresión de genes en células i-dNK estimuladas con MHIGF2..... 26
Figura 8. Expresión de citoquinas en medios condicionados de células i-dNK y HTR-8/SVneo. 28
Figura 9. Cambio en la expresión de genes relacionados con apoptosis en HTR-8/SVneo estimulada con medios condicionados de células i-dNK..... 31
Figura 10. Cambios en la proliferación de células HTR-8/SVneo estimuladas con medios condicionados de i-dNK. 33
Figura 11. Cambios en la invasión de células HTR-8/SVneo estimuladas con medios condicionados o co-cultivadas con células i-dNK..... 34
Figura 12. Cambios en la migración de células HTR-8/SVneo estimuladas con medios condicionados o co-cultivadas con células i-dNK 36

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
Arg	Arginasa
CAS3	Caspasa 3
CAS8	Caspasa 8
CAS9	Caspasa 9
dNK	Células natural killer de la decidua
GMCSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HIF1A	Factor inducible de hipoxia
i-dNK	Células similares a natural killer de la decidua
IFNγ	Interferón γ
IGF2	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2
MHIGF2	Medio condicionado de HTR-8/SVneo estimuladas con IGF2
MidNK	Medio condicionado de i-dNK
MMP2	Metaloproteasa de la matriz extracelular tipo 2
MMP9	Metaloproteasa de la matriz extracelular tipo 9
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
pNK	Células natural killer de sangre periférica
TARC	Quimioquina ligando 17
TGFβ	Factor de crecimiento
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
VEGFA	Factor de crecimiento vascular endotelial

Introducción

Durante los inicios del embarazo una comunicación adecuada entre las células de trofoblasto y las células dNK es primordial para el crecimiento y desarrollo fetal. La implantación blastocística se caracteriza por la remodelación de la decidua materna mediada por las señales generadas por las células de trofoblasto, de origen fetal, las células de la decidua materna y las células del sistema inmune de la madre, que además deben adquirir un perfil tolerogénico que le permita al feto, como presentador de antígenos alogénicos, alojarse dentro de la madre y obtener nutrientes que permitan su adecuado desarrollo. Las células dNK tienen un rol esencial en el establecimiento de un perfil tolerogénico por su capacidad de controlar otras poblaciones celulares presentes en la decidua materna por medio de la comunicación mediada por citoquinas. Estas células son capaces de vigilar la proporción de células inmunes dentro de la decidua, manteniendo un perfil tolerogénico que permite el desarrollo fetal mientras se protege la integridad inmunológica de la madre.

Desde antes de la fecundación las células *Natural Killer* (NK) existentes en el útero materno comienzan a presentar variaciones fenotípicas relacionadas con una adaptación al ambiente hormonal Estas transformaciones son precursoras al fenotipo tolerogénico que presentan las células NK de la decidua (dNK). Este subtipo celular produce una variedad de citoquinas y quimioquinas que están implicadas en el correcto desarrollo de procesos del trofoblasto extravelloso en la cama placental, entre ellos su correcta migración, invasión y proliferación (Liu et al., 2017). De hecho, la presencia de células dNK en la vecindad de las células de trofoblasto y las arterias espirales sugiere que tienen un rol activo en la regulación de la invasión del trofoblasto y la remodelación vascular. Además, su comunicación continua con otras poblaciones inmunológicas en la decidua materna, como las células dendríticas inmaduras y las células T, mantiene un ambiente propicio para la formación placental y el establecimiento del embarazo.

Su rol esencial en la preservación de un ambiente tolerogénico a lo largo del embarazo, y específicamente en el inicio de este, ha puesto un foco de luz sobre las células dNK. Se ha observado que la interacción de las células dNK con el trofoblasto extravelloso, y su posición en el espacio y el tiempo en la proximidad de las arterias maternas, crea un microambiente equilibrado que favorece el desarrollo y el funcionamiento óptimo de la placenta. Asimismo, varios estudios muestran que un desbalance en las poblaciones inmunológicas de la decidua está directamente relacionado con enfermedades gestacionales como la preeclampsia y la perdida recurrente del embarazo, sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen este fenómeno aún son inciertos.

Otro factor importante para una implantación blastocística adecuada, son los factores de crecimiento que inducen un perfil proliferativo, migratorio e invasivo en las células de trofoblasto. Dado que el desarrollo del embarazo depende de una activación de estos procesos en el trofoblasto extravelloso en el primer trimestre, resulta de gran interés estudiar el efecto de IGF2 en esa subpoblación celular. Sin embargo, existe divergencia en el efecto de este péptido en la invasión del citotrofoblasto velloso (VCT) y del citotrofoblasto extravelloso (EVCT), por lo que es imperativo examinar a fondo el mecanismo molecular activado por IGF2 en el modelo de trofoblasto para comprender el proceso invasivo de manera más completa.

Este trabajo plantea un modelo de estudio que permite determinar cambios en la expresión génica y proteica de diferentes factores esenciales en la dinámica comunicativa entre las células de trofoblasto y las células dNK. Se muestra, además, que el cambio fenotípico que se observa en modelos estudiados anteriormente puede ser revertido por la acción de las células dNK, capaces de controlar la capacidad invasiva, migratoria y proliferativa de las células trofoblásticas.

1. Estado del arte

1.1 Establecimiento del embarazo

A lo largo del ciclo menstrual los cambios hormonales se encuentran acompañados por variaciones importantes en las proporciones de células inmunológicas que se encuentran en el útero. Entre estas poblaciones, se destacan las células natural killer uterinas que son células de vida corta, completamente diferenciadas, que alcanzan un 20% de la población de células estromales en la fase secretora. Luego de la fecundación, esta proporción se mantiene e incluso aumenta al haber un importante flujo entrante de células NK de sangre periférica (pNK), población que posteriormente se diferenciará hacia un fenotipo tolerogénico. Este proceso es clave para un correcto establecimiento del embarazo, pues las células diferenciadas, ahora dNK, se comunican de forma continua con otras poblaciones inmunológicas manteniéndolas bajo control.

Este control es esencial por la naturaleza semialogénica de las células fetales, que en condiciones diferentes serían rechazadas por el sistema inmune materno. Gracias a esto, luego de entrar en contacto con la decidua, el blastocisto puede comenzar un proceso de invasión para posteriormente formar la estructura placentaria. Este proceso está fuertemente modulado por las células dNK, que regulan la invasividad de las células de trofoblasto y secretan citoquinas que ayudan en el proceso de vascularización.

Además, las células dNK son capaces de regular la actividad citotóxica de otras células inmunológicas maternas. Entre sus funciones más importantes se reconoce su capacidad de impedir la maduración de las células dendríticas de la decidua, y su comunicación continua con las células T reguladoras para controlar la actividad citotóxica de las células T ayudadoras. Estos procesos ayudan a mantener un ambiente decidual propicio que permita la vascularización placental y por ende un inicio exitoso del embarazo.

1.2 Células dNK

Las células del sistema inmunológico constituyen hasta el 50% de las células de la decidua, siendo un 70% de ellas células dNK. Este porcentaje se alcanza durante la implantación y permanece constante durante el segundo trimestre, disminuyendo hacia la mitad de la gestación y llegando a ser prácticamente indetectable al final del embarazo (Ku et al., 2021). La función principal de las células dNK consiste en establecer un entorno tolerante que favorezca el adecuado desarrollo de la estructura placentaria mientras se mantiene la competencia inmunológica materna. Para lograr esto, las células dNK generan diversas citoquinas que regulan la actividad de otras poblaciones inmunes, como las células T ayudadoras y las células T reguladoras (Lissauer et al., 2015; Wegmann et al., 1993), manteniendo así un entorno antiinflamatorio durante el primer y segundo trimestre del embarazo (Ander et al., 2019).

Las células dNK se caracterizan por ser $CD56^{brillantes}$ pero difieren de la subpoblación que se encuentra en la sangre periférica tanto en términos fenotípicos como funcionales. Mientras que las dNK muestran un aumento en la expresión del receptor HLA-E y de los receptores inhibidores tipo inmunoglobulina o KIR, rasgo de inhibición de la respuesta inmunológica (Lash et al., 2010; Manaster et al., 2008), las células $CD56^{brillantes}$ circulantes no expresan receptores regulatorios como los KIR o ILT2, y muestran una alta respuesta en presencia de factores como IL2 o IL15 (Poli et al., 2009). Las células dNK expresan marcadores de residencia en tejido como CD69, CD49a, CD9 e integrina β7(King et al., 1997), y también expresan CD158a y CD94, que son receptores inhibitorios de la respuesta citotóxica de las células natural killer. En comparación con sus contrapartes circulantes, las dNK no expresan CD62L (Cerdeira et al., 2013).

Además, las dNK desempeñan un papel regulador en la respuesta inmune materna al producir una variedad de citoquinas y quimioquinas, así como factores proangiogénicos, que modulan la invasión y proliferación de las células trofoblásticas(Hanna et al., 2006; Koopman et al., 2003). Varios autores reportan que células pNK son precursoras de las células dNK, hipótesis respaldada porque los estrógenos y la progesterona inducen la secreción de quimioquinas CXCL10 y CXCL8 por parte de las células estromales y las células endoteliales de la decidua, factores importantes para reclutar células pNK. Además,

varios estudios han mostrado que las células pNK se vuelven menos citotóxicas en presencia de factores como el TGF-β, IL15, hCG, Aza e hipoxia, lo que resulta en células promotoras de la invasión de las células de trofoblasto (Allan et al., 2010; Cerdeira et al., 2013; Keskin et al., 2007; Wang et al., 2017). También se ha observado que células producidas con estos estímulos son fenotípica y funcionalmente similares a células dNK, y presentan una expresión alta de factores promotores del crecimiento y factores proangiogénicos, promoviendo el crecimiento fetal y mejorando el flujo de sangre uterina en modelos murinos (Du et al., 2022).

1.3 Células de trofoblasto

El trofoblasto constituye un conjunto de células que conforman la capa externa del blastocisto, que tras contacto con la decidua materna se transforman para convertirse en la principal fracción que constituye la placenta. Después de que el blastocisto entra en contacto con la decidua, las células del trofoblasto se diferencian a través de dos vías principales, en la vía vellosa, las células del citotrofoblasto se fusionan para formar células multinucleadas del sincitiotrofoblasto, estas células facilitan la implantación mediante la producción de enzimas para la lisis de las células endometriales y la secreción de factores proapoptóticos (James et al., 2005). En cambio, en la vía extravellosa, las células del citotrofoblasto adquieren un fenotipo invasivo y se diferencian en trofoblasto extravelloso intersticial (iEVT), responsable de la invasión de la decidua y una porción del miometrio, y trofoblasto extravelloso endovascular (eEVT), encargado de la remodelación de la vasculatura materna. La invasión del trofoblasto es un proceso crucial en el desarrollo de un embarazo exitoso (Du et al., 2022; Lunghi et al., 2007).

Las células de iEVT migran a través del estroma decidual hacia las arterias espirales maternas, mostrando una morfología pleomórfica y alargada, con múltiples núcleos y evidentes cambios en la senescencia (Velicky et al., 2018). Este grupo celular invade hasta el tercio proximal del miometrio, donde se fusiona para formar las células del lecho placentario. Simultáneamente, las células de eEVT se desplazan hacia el interior de las arterias espirales para facilitar su remodelación, secretando factores angiogénicos de la mano de las células dNK (Pijnenborg et al., 2006). La capacidad invasiva de las células de trofoblasto extravelloso depende de una comunicación continua con la decidua materna y la mediación tolerogénica de las células del sistema inmune presentes en esa región.

Aunque los mecanismos regulatorios específicos aún no están completamente esclarecidos, se sabe que diversos factores de crecimiento, proteínas de unión a factores de crecimiento, proteoglicanos y citoquinas participan en la proliferación, migración e invasión del trofoblasto (Chakraborty et al., 2002; Staun-Ram & Shalev, 2005). En términos generales, algunas de las moléculas más importantes en la regulación de estos procesos incluyen las metaloproteasas de la matriz extracelular, sus inhibidores tisulares (TIMPs), el factor de crecimiento transformante TGF-β, los factores de crecimiento similares a la insulina IGF, algunas quimioquinas como CXCL8 y CXCL10, y ciertas citoquinas como IL8, TNF-α e IFN-γ (Pollheimer et al., 2018).

1.4 Comunicación trofoblasto-dNK

El crecimiento y desarrollo normales de un feto y su placenta están fuertemente influenciados por la interacción entre factores fetales y maternos (Resnik, 2002).Para que el desarrollo se lleve a cabo adecuadamente, es crucial establecer una comunicación que permita la implantación de las células trofoblásticas, al mismo tiempo que se mantiene una protección inmunológica, creando así una condición tolerogénica (Vacca et al., 2011).

La comunicación continua entre las células dNK y las células de trofoblasto, es esencial para la adecuada progresión de los procesos de invasión, proliferación y migración del trofoblasto, permitiendo la formación de la placenta y con ello un embarazo exitoso (Wallace et al., 2012). El desbalance en esta comunicación está asociado a la pérdida del feto durante el primer trimestre, o al desarrollo de patologías cómo la preeclampsia (Fraser et al., 2012; Wallace et al., 2013). Estudios previos han mostrado que cambios en los perfiles de expresión de proteínas de las células dNK están asociados con pérdida recurrente del embarazo (Habets et al., 2022) al igual que cambios en la producción de vesículas extracelulares que contengan HLA-E (Jiang et al., 2021).

1.5 Sistema IGF

El sistema de factores de crecimiento similares a la insulina está constituido por los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF, de insulin-like growth factors) que son péptidos estructuralmente relacionados con la insulina, tienen acción estimuladora del crecimiento,

potencian la acción de la insulina y regulan la proliferación celular (Staun-Ram & Shalev, 2005); sus receptores IGF1R, IR-A, sus híbridos e IGF2R y finalmente las proteínas de unión o IGF-BP que regulan su biodisponibilidad. Los péptidos IGF1 e IGF2 exhiben actividad metabólica, mitogénica y de diferenciación a nivel fisiológico. Estos regulan procesos cruciales como el incremento de la síntesis proteica, la inhibición de la proteólisis, la captación de glucosa y, por consiguiente, influyen en el crecimiento, la migración y la diferenciación celular (Forbes et al., 2008; Livingstone, 2013) actuando de forma endocrina, paracrina y autocrina (Talia et al., 2021). En el ambiente extracelular, la mayoría de los IGFs se encuentran ligados a las proteínas IGF-BPs, ya que su afinidad por estas es superior a su afinidad por sus receptores. Este fenómeno facilita el transporte de estos péptidos a lo largo del cuerpo (Ranke & Wit, 2018). Las proteínas IGF-BPs son sometidas a la acción de proteasas específicas, lo que permite la liberación y acción de IGF1 e IGF2 en las células objetivo (Bach, 2018; Clemmons, 2018).

En humanos la concentración de IGF2 es 5 a 6 veces mayor que la de IGF1 en el feto siendo el factor de crecimiento más importante durante el desarrollo fetal, con un aumento progresivo durante los tres primeros meses del embarazo cumpliendo un rol esencial en el proceso de implantación blastocística (Dattani & Gevers, 2016). Hay evidencia que sugiere que IGF2 y su receptor IGF2R desempeñan un papel crucial en la regulación del crecimiento fetoplacentario al estimular la migración/invasión del trofoblasto extravelloso (Lunghi et al., 2007). En la línea celular HTR-8/SVneo, se ha observado que IGF2 promueve la migración del trofoblasto, activando la señalización del receptor IGF2R de manera independiente del IGF1R. Este proceso implica la participación de proteínas G inhibitorias y la activación de la vía MAPK(Staun-Ram & Shalev, 2005).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Establecer cómo IGF2 modula la comunicación entre las células dNK y el trofoblasto.

2.2 Objetivos específicos

1. Generar células con fenotipo similar a las células dNK a partir de células natural killer periféricas.
2. Establecer si existen cambios en el fenotipo tolerogénico de las células dNK producto del contacto con medios condicionados o co-cultivo con células de HTR-8/SVneo estimuladas con IGF2
3. Determinar si existen cambios en el perfil de citoquinas de las células dNK producto del contacto con medios condicionados o co-cultivo con células de HTR-8/SVneo estimuladas con IGF2.
4. Evaluar los cambios en la migración, proliferación e invasión de células HTR-8/SVneo co-cultivadas con células dNK o estimuladas con medios condicionados de cultivo de células dNK.

3. Hipótesis

La comunicación continua entre las células de trofoblasto y las células dNK es esencial para un correcto establecimiento del embarazo. Además, estudios previos muestran que IGF2 aumenta la invasión, migración y proliferación de células de trofoblasto por lo que en este trabajo se plantea como hipótesis que:

La activación de las vías de señalización del sistema IGF mediadas por IGF2 es capaz de modular la comunicación entre las células dNK y las células de trofoblasto, cambiando el perfil de citoquinas que en condiciones normales permite la implantación del blastocisto.

4. Metodología

4.1 Cultivo celular

Para determinar el efecto de IGF2 en la comunicación entre las células dNK y las células de trofoblasto fue necesario establecer un modelo *in vitro* que permitiera evaluar en diferentes etapas la comunicación celular.

4.1.1. Extracción de células NK

La sangre extraída de una mujer entre los 20 y los 50 años se sometió a un gradiente de Percoll® (Cat P1644 Sigma-Aldrich®) de 1,08 g/mL para extraer la capa leucocitaria. Se procuró la disminución de glóbulos rojos contaminantes por lisis con Buffer RBC 1X (Cat 501129751 Invitrogen). Posterior a esto se realizó conteo celular y se tomaron 5 x 10^7 células pata separar las células pNK por selección negativa usando el kit MojoSort™ Human NK Cell Isolation Kit de Biolegend (Cat 480053).

4.1.2. Estimulación de células NK

Las células pNK se cultivaron en medio RPMI 1640, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Cat 16140 Gibco™),10ng/mL de IL15 y 10ng/mL de IL2. Se mantuvieron a 37°C en atmósfera húmeda y CO_2 al 5%. Siguiendo reportes previos (Cerdeira et al., 2013; Du et al., 2022) estas células se estimularon con TGFβ 2ng/mL o TGFβ 5ng/mL y Aza 2μM, y se mantuvieron bajo condiciones de 1% de O_2 para obtener un fenotipo tolerogénico similar al observado en células dNK, estas células se denominaron células i-dNK. Al cuarto día de cultivo se adicionó a las células medio fresco con los factores estimulantes descritos. Tras siete días de estímulo se colectaron los medios de cultivo y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento. Además, se

determinaron los cambios en el fenotipo de estas células a nivel de marcadores de diferenciación celular mediante citometría de flujo.

4.1.3. Cultivo de células HTR-8/SVneo

La línea celular HTR-8/SVneo (Cat CRL-3271™, ATCC) se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10%. Se mantuvieron a 37°C en atmósfera húmeda y CO_2 al 5%. Se sembraron 1 x 10^6 células en platos cultivo de 60mm en medio con SFB al 10%, se permitió que llegaran a una confluencia del 80%, luego de lo cual se incubaron por 4 horas con medio libre de suero. Posteriormente estas células se incubaron con o sin IGF2 en BSA al 0,5% por 24 horas. Se colectó el medio de estimulación y se filtró por una membrana de 0.22µm para retirar células y debris celular. Este medio se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.1.4. Estimulación de células HTR-8/SVneo con medios condicionados de células i-dNK

Se sembraron 1 x 10^6 células de trofoblasto en platos cultivo de 60mm en medio con SFB al 10%, se permitió que llegaran a una confluencia del 80% luego de lo cual se incubaron por 4 horas con medio libre de suero. Luego de este tiempo se cambió el medio a medio recolectado de las células i-dNK que previamente fue filtrado con una membrana de 0,22µm y con una dilución de 4 veces para posteriormente adicionarlo a las células de trofoblasto en presencia o ausencia de IGF2.

4.1.5. Estimulación de células i-dNK con medio condicionado de células HTR-8/SVneo

El medio condicionado de células HTR-8/SVneo estimuladas con IGF2 (MHIGF2) se adicionó a 2,5 x 10^6 células i-dNK y se permitió su incubación por 24h. Posterior a esto se recolectaron las células para evaluar por citometría de flujo la expresión de marcadores de diferenciación y se recolectó el medio de cultivo y se almacenaron a -20°C hasta su uso en la evaluación de la expresión de citoquinas.

4.1.6. Co-cultivos células HTR-8/SVneo e i-dNK

Se sembraron 2 x 10^5 células por pozo en una placa de 12 pozos y se permitió su adhesión por 24h en medio de mantenimiento. Luego de este tiempo sobre cada pozo se colocó un compartimento Transwell™ (Cat 3414 Corning) con un tamaño de poro de 4µm y sobre este se sembraron 1 x 10^5 células dNK por pozo. Al medio se adicionó IGF2 o medio sin estímulo y se permitió su incubación por otras 24 horas. Posterior al tiempo de incubación se colectaron los medios de cultivo y se almacenaron a -20°C hasta su uso en la evaluación de la expresión de citoquinas.

4.2 Caracterización funcional de las células de trofoblasto

4.2.1 Ensayo de Boyden

En una placa de fondo plano de 24 pozos se acondicionaron 12 compartimentos superiores de un Transwell™ con 100 µL de Geltrex™ (Cat. A1413301 Gibco™) y se incubó en medio RPMI 1640 suplementado con SFB 5% o BSA 0,5% por 4 horas. Luego de este tiempo se sembraron 2 x 10^5 células HTR-8/SVneo estimuladas con los diferentes tratamientos sobre los compartimentos superiores. Las células se incubaron por 24 horas tiempo tras el cual se removieron las células que no invadieron y se fijaron las células que invadieron con solución de paraformaldehído 4% (SigmaChemicals). Luego se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0.5% y se lavaron hasta la remoción completa de cualquier tinción inespecífica. Los insertos con las células teñidas se dejaron por 40min en ácido acético al 10%. El líquido se recuperó y se leyó la absorbancia a 570nm. Los resultados se expresaron como el promedio de dos réplicas del índice de invasión que son las unidades de absorbancia de cada tratamiento normalizada respecto al control.

4.2.2 Ensayo de herida

Por otro lado, se sembraron 5x10^3 células HTR-8/SVneo estimuladas con los diferentes tratamientos por pozo en una placa de 96 y se cultivaron por 2 días en medio RPMI suplementado con SFB al 2%, hasta alcanzar una confluencia de 80%. Se utilizó una punta de micropipeta de 10 µL estéril para rasgar una

herida lineal en cada monocapa. Las células despegadas se removieron lavando con 1 mL de PBS. Después, se adicionó nuevo medio RPMI suplementado con SFB al 2% y se tomaron imágenes fotográficas para monitorear el cierre de la herida en un transcurso de 48 horas (Rodriguez et al., 2005)usando un microscopio Leica DM IL (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). El análisis de las imágenes se realizó usando el software ImageJ (Suarez-Arnedo et al., 2020) para medir el tamaño de la herida desde el primer día y progresivamente a las 24 y 48h. El porcentaje de cierre de herida se graficó para cada tratamiento a lo largo del tiempo. Cada valor se presenta como la media del porcentaje de herida abierta calculada en las tres réplicas experimentales.

4.2.3 Ensayo de migración

Se sembraron 2 x 10^5 células por pozo en el compartimiento superior de un Transwell™ y se incubaron en medio RPMI 1640 suplementado con SFB 5% o BSA 0.5% por 24 horas. Al final de la incubación, las células que no migraron se removieron mientras que las células que migraron se fijaron con solución de paraformaldehído 4% (Sigma Chemicals). Las células se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0.5%, luego se lavaron hasta la remoción completa de cualquier tinción inespecífica. Los insertos con las células teñidas se dejaron por 40min en ácido acético al 10% y se leyó la absorbancia a 570nm. Los resultados se expresaron como el promedio de dos réplicas del índice de invasión que son las unidades de absorbancia de cada tratamiento normalizada respecto al control.

4.2.4 Ensayo de proliferación

Por otro lado, se sembraron 2,5x10^3 células HTR-8/SVneo estimuladas con los diferentes tratamientos por pozo en una placa de 96 pozos en medio RPMI suplementado con SFB al 2%. Se permitió su adhesión por 24h luego de lo cual se cambió el medio de cultivo por RPMI+MTT 0,5mg/mL y se permitió su incubación por 5 horas. Transcurrido este tiempo el medio se retiró y los cristales de formazán se disolvieron en DMSO incubando a 37°C por 10min. Se leyeron las absorbancias a 570nm usando el lector de microplaca

FLUOstar® Omega. Cada valor se presenta como la media de unidades de absorbancia normalizada respecto al control calculada en las tres réplicas experimentales

4.3 Análisis de expresión génica

4.3.1 Extracción de RNA

El RNA total se extrajo del cultivo celular de las células HTR-8/SVneo, i-dNK o NK usando el estuche QIAgen RNAeasy Mini kit (Cat 74104 Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las indicaciones del fabricante, utilizando en la última elución 30 µL de agua libre de RNAsas. La cantidad del RNA se estimó por lectura de absorbancia a 260nm, 280nm y 320nm en el equipo SmartSpec™ Plus de Biorad. Se determinó la relación 260/280 para estimar la pureza del RNA extraído (Anexo A).

4.3.2 RT-qPCR

El cDNA se obtuvo por transcripción reversa de 1 µg de RNA por acción de la enzima SuperScript III (Cat 18080093 Thermo Fisher Scientific). El programa de amplificación se realizó según las especificaciones del fabricante. Con este cDNA se procedió a realizar el análisis de la expresión de los genes mostrados en la tabla 1, en relación con Ubiquinol citocromo C reductasa y β-Actina con temperatura de anillamiento de 56°C, de las células estimuladas y sus controles. Se evaluó la expresión de genes relacionados con la migración, invasión, proliferación y apoptosis celular en la línea celular HTR8/SVneo estimulada con Mi-dNK e IGF2. En las células i-dNK se evaluó la expresión génica de citoquinas y genes relacionados con hipoxia. Los primers se diseñaron con la herramienta primerBLAST de NIH y para la escogencia de los mejores primers se tuvo en cuenta un rango de temperaturas de 55 a 65°C, un %GC de 40 a 60% y un tamaño de amplicón inferior a 150 bp.

Las secuencias se evaluaron con la herramienta Sequence Manipulation Suit con el fin de evitar secuencias con auto-anillamiento o formación de estructuras secundarias. Para cada ensayo se utilizó la enzima SsoAdvance (Cat 18080093 Biorad), se siguió el protocolo de amplificación sugerido por el

fabricante y se determinó la curva de fusión del amplicón. Los ensayos se realizaron por triplicado a partir del material de las líneas celulares utilizando una dilución del cDNA 1:5 en un volumen de reacción de 3µL. Se determinó la eficiencia de la amplificación por análisis de curvas de dilución de los genes medidos. Teniendo esto en cuenta se realizó el análisis de expresión mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Gen	Temperatura de Anillamiento (°C)	Gen	Temperatura de Anillamiento (°C)
MMP2	56	BID	59,7
MMP9	56	BAX	65
RHO-A	59	BCL2	60,2
CXCR4	57	HIF-1A	61
CXCR7	57	VEGF-A	61
C-Myc	56	IL10	58,2
Ki67	59	IL8	61
RPTOR	58	TNFα	58,2
CAS3	61,4	TGFβ	60
CAS8	60	IFNγ	60
CAS9	58	GMCSF	58,2

Tabla 1. Temperatura de anillamiento para los primers de los genes evaluados por q-PCR.

4.4 Análisis por citometría de flujo

4.4.1 Análisis de expresión de marcadores de diferenciación

Las células NK que se colectaron después del proceso de diferenciación o estimulación se incubaron por 15 minutos en una solución de bloqueo de suero de ratón al 2% preparado en buffer de análisis PBS con BSA 0.5%, se lavaron con el buffer y se procedió a incubar con una solución de anticuerpos por 30 minutos. El marcaje de células estimuladas o sin estimular se realizó con: LIVE/DEAD™ Aqua (Invitrogen), FITC anti-human CD56 (NCAM) Clon HCD56, PE/Cyanine5 anti-human CD16 Clon 3G8, PE/Cyanine7 anti-human CD49a Clon TS2/7, PE anti-human CD158a (KIR2DL1) Clon HP-DM1, APC anti-human CD94 Clon DX22 y APC/Fire 810 anti-human CD62L Clon DREG-56 adquiridos de BioLegend. Luego de este tiempo las células se lavaron y se

suspendieron en 250µL de buffer para su lectura en citómetro. Las medidas se realizaron por servicio en el equipo Cytek™ Aurora (BD) de la Unidad de Investigación en Ciencias Biomédicas, Pontificia Universidad Javeriana. Para el análisis de los datos adquiridos se utilizó el programa FlowJo V10 y se siguió la estrategia de gating mostrada en el anexo B. Los datos se expresan como porcentaje de cada subpoblación de cada marcador o como intensidad media de fluorescencia.

4.4.2 Análisis de expresión de citoquinas

Se determinó la expresión de TGF-β1, IL23, Arg, IL10, IL4, IL6, TNF-α, CCL17 (TARC), IL12p40, IL1β, IFNγ y CXCL10 en los medios condicionados recolectados utilizando el kit LEGENDplex™ Human Macrophage/Microglia Panel (13-plex) (Cat 740502 Biolegend) según las instrucciones del fabricante. Las medidas se realizaron en el equipo Cytek™ Aurora (BD) de la Unidad de Investigación en Ciencias Biomédicas, Pontificia Universidad Javeriana. Para el análisis de los datos adquiridos se utilizó el programa LEGENDplex™ software.

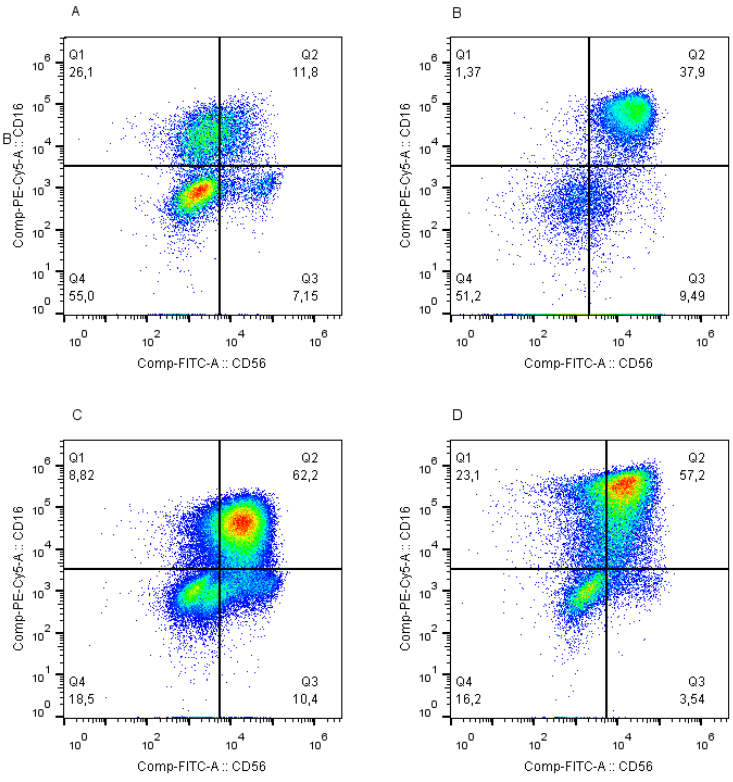
4.5 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software Prism (GraphPad Software Inc., Estados Unidos). Los parámetros se examinaron mediante un ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples o mediante un t-test. Se realizó un duplicado o un triplicado técnico para cada ensayo y un valor de confianza del 95% ($p<0,05$) se consideró estadísticamente significativo.

5. Resultados y discusión

5.1 Establecimiento de un modelo de células con fenotipo similar a las células dNK a partir de células natural killer periféricas

Las células pNK aisladas se incubaron con TGF-β1 y Aza en condiciones de hipoxia para poder establecer un modelo de células similares a dNK. Las células estimuladas mostraron cambios en los patrones de expresión de marcadores de diferenciación de células natural killer periféricas.



Células	A	B	C	D
%CD56$^-$ CD16$^+$	26,1	1,37	8,82	23,1
%CD56$^+$ CD16$^+$	11,8	37,9	62,2	57,2
%CD56$^+$ CD16$^-$	7,15	9,49	10,4	3,54
%CD56$^-$ CD16$^-$	55,0	51,2	18,5	16,2

Figura 1. Expresión de CD56 y CD16 de células pNK. Células pNK recién extraídas (A), cultivadas por 7 días en presencia de IL15 e IL2 en condiciones de normoxia (B) en presencia de IL15, IL2, Aza y TGFβ1 (2ng/ml) en condiciones de hipoxia (C) o en presencia de IL15, IL2, Aza y TGFβ1 (5ng/ml) en condiciones de hipoxia (D).

Las células pNK presentan inicialmente una expresión mixta de los marcadores de diferenciación CD56 y CD16, con un 26,1% de células $CD56^{-}CD16^{+}$; un 7,15% de células $CD56^{+}CD16^{-}$ y un 11,8% $CD56^{+}CD16^{+}$, tras una semana en cultivo celular en presencia de IL15 e IL2 el porcentaje de células $CD56^{+}CD16^{+}$ aumentó a un 37,9%. Por su parte, las células estimuladas con TGF-β1 y Aza en condiciones de hipoxia muestran un desplazamiento de la población hacía el cuartil $CD56^{+}CD16^{-}$ mostrando que hay un cambio fenotípico (Fig. 1). Adicionalmente, el aumento en la concentración de TGF-β1 aumentó la supervivencia celular (Anexo C). Esto viene acompañado de un aumento significativo en la expresión de marcadores de diferenciación claves en la tolerogenia como lo son CD49a, CD94 y CD158 y una disminución en la expresión de marcadores de citotoxicidad como CD62L en las poblaciones $CD56^{+}CD16^{+}$ y $CD56^{+}CD16^{-}$ (Fig. 2).

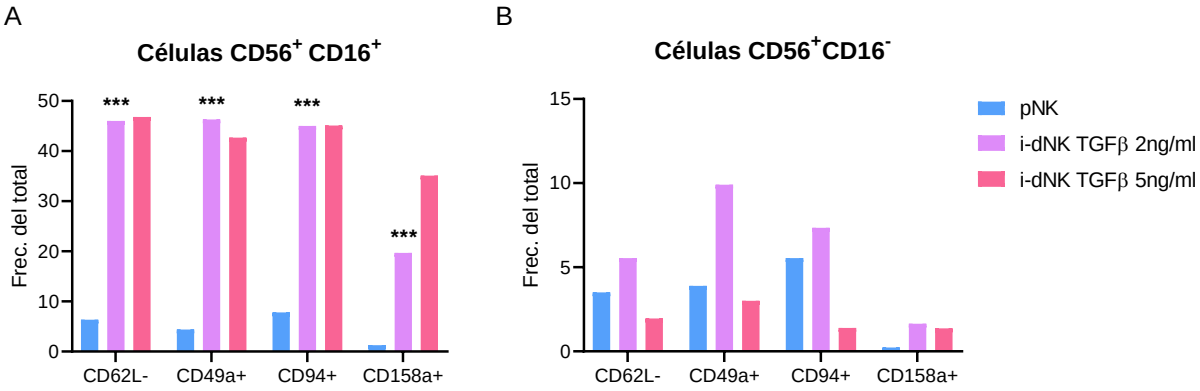


Figura 2. Expresión de CD49a, CD158a, CD94 y CD62L en células pNK y células i-dNK. Células $CD56^{+}CD16^{+}$ (A) y $CD56^{+}CD16^{-}$ (B) muestran cambios en la expresión de marcadores de diferenciación en comparación a células pNK. Los datos se presentan como número de células de las células vivas. (pNK vs i-dNK *** = $p < 0,001$)

El aumento en las poblaciones $CD49a^{+}$, $CD94^{+}$ y $CD158a^{+}$ en las células i-dNK (Fig. 2) muestra el cambio fenotípico hacia uno tolerogénico pues cada uno de estos marcadores es esencial en la señalización de supervivencia celular en las células NK (Cerdeira et al., 2013). CD94 es capaz de unirse a HLA-E, antígeno de histocompatibilidad expresado por las células de trofoblasto que permite su reconocimiento y por ende la modulación de la invasión, migración y proliferación en la decidua materna (Braud et al., 1998). Por su parte, el aumento en la población $CD62L^{-}$ es fundamental, dado que la expresión de este marcador en células NK está relacionado con una función citotóxica más agresiva (Juelke et al., 2010). Es importante resaltar que este aumento independiente de la dosis de TGFβ

es específico de la población $CD56^{+}CD16^{+}$. Sin embargo, para la población $CD56^{+}CD16^{-}$ hay una disminución en la frecuencia de la población $CD49a^{+}$, $CD94^{+}$, $CD158a^{+}$ y $CD62L^{-}$ que pueda deberse a la transformación de parte de esta población a una $CD16^{+}$ como muestra la proporción de las células previamente (Fig.1). Esto hizo necesario caracterizar un poco más las células estimuladas para determinar la expresión de moléculas de señalización relacionadas con la tolerogenia.

La evaluación de la expresión génica de las células i-dNK mostró un aumento significativo en la expresión de *HIF* y muy significativo en la expresión de *VEGF* con respecto a las células pNK (Fig. 3). El aumento en la expresión de *HIF* es producto de la exposición a una atmósfera con una concentración disminuida de oxígeno, por su rol como factor de transcripción es capaz de afectar y regular la expresión de otros genes como VEGFA (Ahluwalia & S. Tarnawski, 2012), propendiendo un fenotipo similar al de las células dNK.

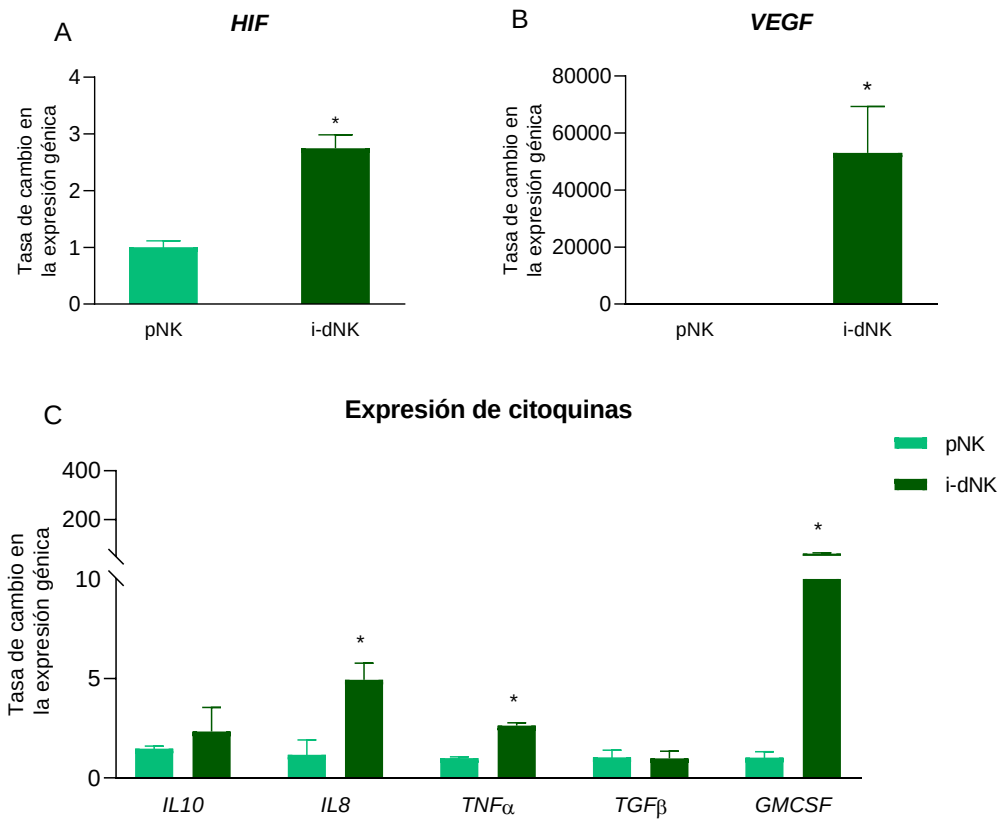


Figura 3. Expresión génica diferencial en células pNK e i-dNK Expresión de HIF1A (A) VEGFA (B) e IL10, IL8, TNFα, TGFβ y GMCSF (C). Los datos se presentan como la media ± SD de la tasa de cambio de expresión génica respecto a los genes de referencia. (pNK vs i-dNK * = $p < 0,05$)

Otro efecto resultante del estímulo de las células pNK es un cambio en el perfil de expresión génica de citoquinas, se observa un aumento significativo de *IL8, TNFα y GMCSF*, patrones de expresión característicos de las células dNK (Fig. 3). IL8 es un factor esencial que contribuye a la receptividad endometrial (Lash et al., 2010; Riley & Yokoyama, 2008) y participa en el dialogo materno-fetal y al igual que GMSCF aumenta de forma significativa en el inicio del embarazo. Su incremento en las células estimuladas es muestra de la diferenciación hacia un fenotipo similar al de las células dNK (i-dNK).

También se determinaron cambios en la producción de citoquinas solubles, encontrando un aumento en la abundancia de TNFα, IL6, IL1RA, IFNγ, IP10, IL10 e IL4 (Fig. 4). La disminución en la expresión de la quimioquina ligando 17 (TARC) sugiere que las células obtenidas tras la estimulación tienen un fenotipo similar a las células dNK, teniendo en cuenta que esta citoquina actúa como un quimioatrayente selectivo de las células T, población que es constantemente regulada en el microambiente decidual.

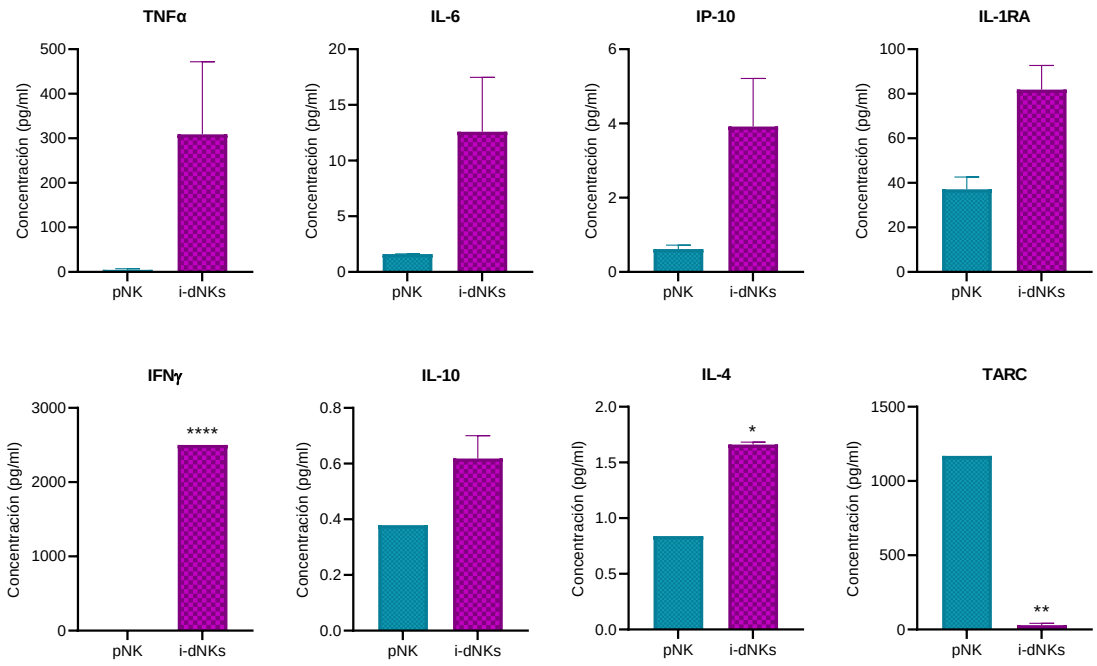


Figura 4. Abundancia proteica de citoquinas en medios de células pNK estimuladas Cambio en la producción de citoquinas de células pNK estimuladas con IL15 e IL2, Aza y TGF-β1 (5ng/ml) bajo condiciones de hipoxia. Los datos se presentan como la media ± SD de la concentración de citoquina soluble en pg/ml. La significancia se determinó por medio de una prueba T de student (pNK vs i-dNK * = $p < 0.05$, ** =$p<0.01$, **** <0.0001)

5.2 Cambios en la expresión de marcadores de diferenciación de células i-dNK estimuladas con medios condicionados de células HTR-8/SVneo estimuladas con IGF2

La comunicación continua entre las células de trofoblasto y las células dNK en la interfase materno fetal implica una conversación simultánea, en la que las citoquinas producidas por cada población afectan la respuesta de la otra. Para evidenciar el efecto de los medios condicionados de las células de trofoblasto en las células i-dNK se evaluaron los cambios en la expresión de los marcadores de diferenciación de las células dNK. Es posible observar un aumento en la proporción de células $CD56^{+}CD16^{+}$ y una disminución de la población $CD56^{-}CD16^{+}$ tras el estímulo con el medio condicionado (Fig. 5), esto se correlaciona con un aumento en la población $CD62L^{-}$, $CD49a^{+}$, $CD94^{+}$ y $CD158a^{+}$ (Fig. 6), mostrando que el estímulo con el medio resulta en un aumento de la población tolerogénica.

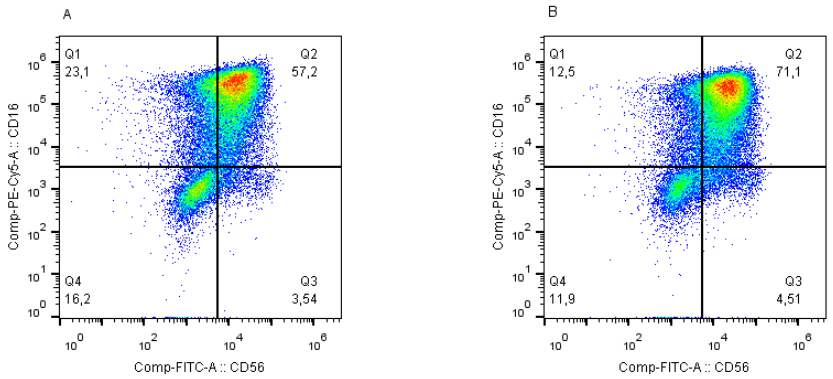


Figura 5. Expresión de CD56 y CD16 en células i-dNK estimuladas con MHIGF2 Células i-dNK cultivadas en ausencia (A) o presencia (B) de medio condicionado de HTR-8/SVneo previamente estimuladas con IGF2.

Este cambio en el fenotipo también se evidencia en las células $CD56^{+}CD16^{-}$ lo que puede implicar inicialmente que IGF2 es capaz de modular un ambiente tolerogénico para una invasión y migración sin restricción, pues estudios previos muestran que el estímulo con este factor de crecimiento se relaciona con un incremento en la capacidad proliferativa, invasiva y migratoria de las células de trofoblasto (Castro-Badilla, 2021)

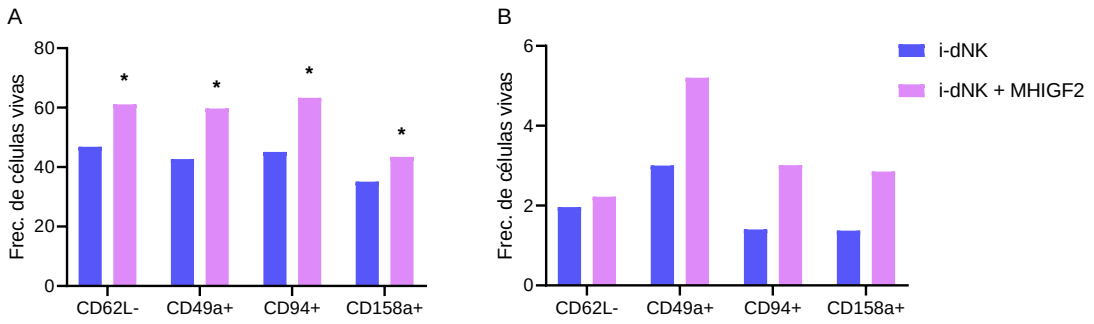


Figura 6. Expresión de marcadores de diferenciación de células i-dNK cultivadas con MHIGF2
Células $CD56^{+}CD16^{+}$ (A) y $CD56^{+}CD16^{-}$ (B) muestran cambios en la expresión de marcadores de diferenciación en comparación a células i-dNK. Los datos se presentan como número de células de las células vivas. (i-dNK vs i-dNK+medio HTR-8/SVneo IGF2* = $p < 0,05$).

Por otro lado, la evaluación de la expresión génica de las células i-dNK estimuladas con MHIGF2 mostró una disminución en la expresión de HIF1A (Fig. 7A) y VEGFA (Fig. 7B), además de un aumento de la expresión de TNFα y GMCSF y una disminución en la expresión de IL8 y TGFβ (Fig. 7C).

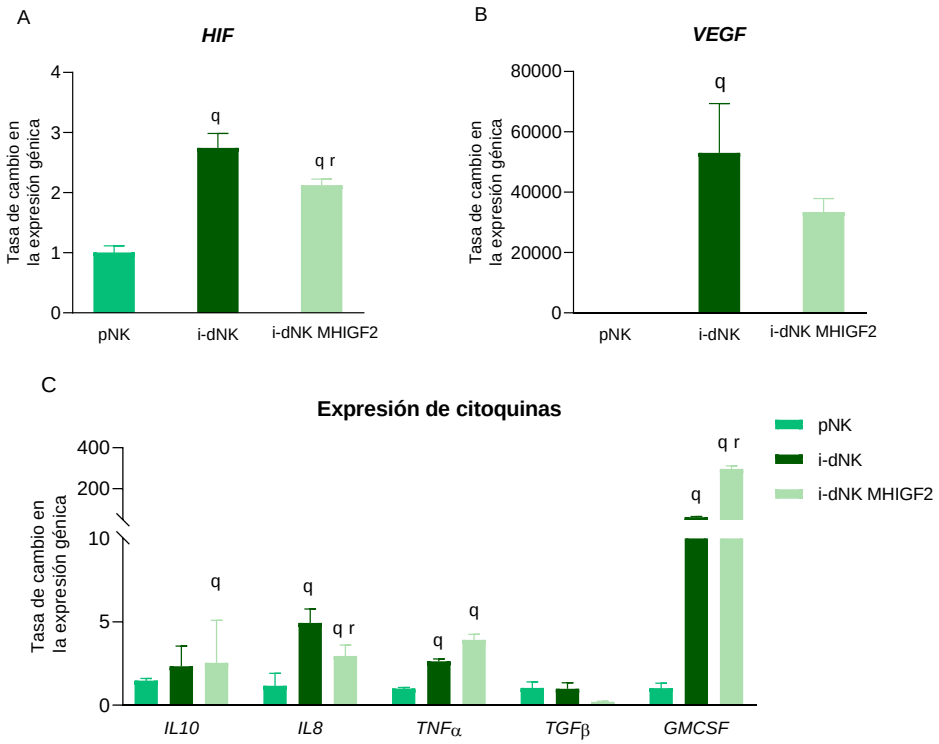


Figura 7. Cambio en la expresión de genes en células i-dNK estimuladas con MHIGF2
Expresión de HIF1A (A) VEGFA (B) e IL10, IL8, TNFα, TGFβ y GMCSF (C). Los datos se presentan como la media ± SD de la tasa de cambio de expresión génica respecto a los genes de referencia. (q: $p < 0,05$ vs pNK; r: $p<0,05$ vs i-dNK)

En contraste con lo observado en la expresión de marcadores de diferenciación, la evaluación de los cambios en la expresión de genes relacionados con la tolerogenia como HIF1A, VEGFA e IL8 sugieren el inicio de un programa regulatorio relacionado con las funciones de control que las células dNK deben cumplir en la interfase materno-fetal. Esto también se observa en un aumento de la expresión de TNFα y GMCSF que cumplen un papel importante en la regulación inmunológica decidual (Jabrane-Ferrat, 2019).

5.3 Cambios en la expresión de citoquinas en medios de células i-dNK o HTR-8/SVneo estimuladas con medios condicionados o co-cultivadas

Se determinó el efecto en la expresión de citoquinas de los medios de células i-dNK sobre las células HTR-8/SVneo en presencia de IGF2. También, se evaluó la comunicación intercelular por medio de co-cultivos de las dos poblaciones celulares (Fig. 7). Se evidencian cambios en la expresión de citoquinas de forma diferencial en cada tratamiento respecto a los medios control de células HTR-8/SVneo estimuladas o no con IGF2 y los medios condicionados de las células i-dNK. Hay un aumento significativo de la concentración de TNFα en el medio de las células i-dNK estimuladas con el MHIGF2, este aumento es igualmente importante en los co-cultivos. Es importante resaltar que esta citoquina tiene un rol dual en el embarazo, pues es capaz de modular la síntesis hormonal, la arquitectura placental y el desarrollo embrionario, siendo una pieza clave en la regulación de las otras poblaciones inmunológicas de la decidua materna (Siwetz et al., 2016). Además, su presencia en la interfase materno-fetal es clave en el mantenimiento de la integridad inmunológica materna, siendo un factor importante en la regulación de la migración de las células de trofoblasto en la decidua materna (You et al., 2021).

Es posible observar que las células HTR-8/SVneo muestran una expresión elevada de IL6 independiente de IGF2, sin embargo, al estimular estas células con Mi-dNK se observa una disminución significativa de la expresión de esta citoquina en comparación a las células de trofoblasto, lo cual sugiere que hay una intercomunicación continua entre las

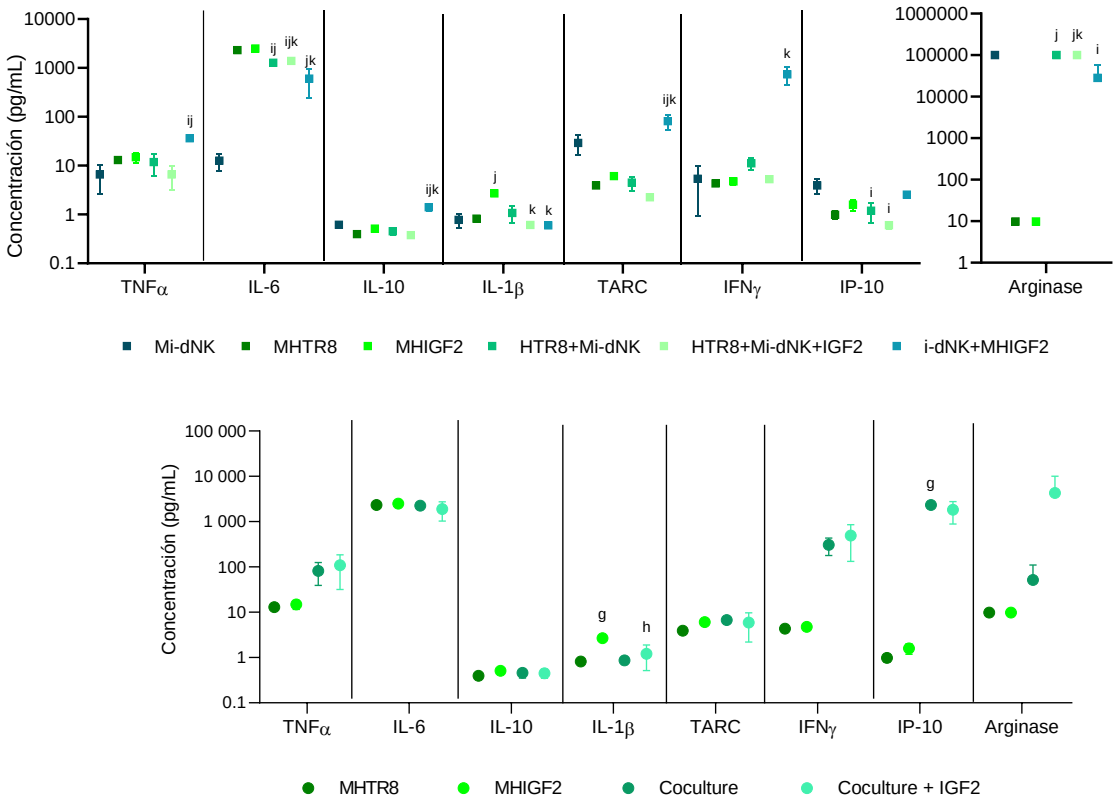


Figura 8. Expresión de citoquinas en medios condicionados de células i-dNK y HTR-8/SVneo. Células i-dNK y HTR-8/SVneo muestran cambios en la expresión de citoquinas. Los datos se presentan como la media ± SD de la concentración de las citoquinas en el medio de cultivo (i: $p<0,05$ vs Mi-dNKs; j: $p<0,05$ vs HTR-8/SVneo Control; k: $p<0,05$ vs HTR-8/SVneo + IGF2 Control; g: $p<0,05$ vs HTR-8/SVneo Control co-cultivos y h: g: $p<0,05$ vs HTR-8/SVneo +IGF2 Control co-cultivos).

células de trofoblasto y las células dNK, pues IL6 es un factor importante en la regulación de la actividad citotóxica de las células NK y estudios previos muestran que su presencia en sangre periférica reduce la expresión de perforina y granzima B (Vilotić et al., 2022). También se observa un aumento en la concentración de IL6 en los medios condicionados de células i-dNK estimuladas con MHIGF2 respecto a las células i-dNK sin estimular La diferencia que se observa en los niveles de esta citoquina entre el medio de i-dNK control y el de las células i-dNK estimuladas con el medio condicionado de HTR-8/SVneo sugiere que estos linfocitos están captando parte del IL6 producido por las células de trofoblasto. Por su parte, los niveles de IL6 en los medios de co-cultivos muestran niveles similares a los de las células de trofoblasto sin estimular, fenómeno observado por la comunicación continua que se estaría dando entre las dos poblaciones celulares co-cultivadas donde no habría acumulación de esta citoquina en los medios de cultivo.

La expresión de IL10 permanece constante en las diversas condiciones de estímulo a excepción de las células i-dNK estimuladas con MHIGF2 que muestran una expresión significativamente mayor de la citoquina en comparación con su contraparte no estimulada. Este resultado resalta, pues esta citoquina juega un rol vital en mantener la tolerancia inmunológica, siendo supresora de la inmunidad materna (Cheng & Sharma, 2014). Sin embargo, en los medios de los co-cultivos este cambio no se observa, lo que sugiere que esta respuesta inicial puede verse suprimida por la intercomunicación entre las células de trofoblasto y las células i-dNK.

Los niveles de IL1β son similares en los medios de las células i-dNK y de las células HTR-8/SVneo control y estimuladas con Mi-dNK. De forma interesante su concentración aumenta significativamente en respuesta al estímulo con IGF2, pero disminuye con el estímulo con Mi-dNK, indicando un control de la expresión de esta citoquina. Estudios previos muestran que IL1β promueve la movilidad de las células de trofoblasto (Prutsch et al., 2012), esta condición es autorregulada, por lo que resulta interesante que este incremento sea regulado hasta niveles normales por la influencia de las células i-dNK. Este fenómeno, que se observa también en los medios recolectados de los co-cultivos, sugiere que las células dNK son capaces de regular la movilidad de las células de trofoblasto.

Las células i-dNK muestran altos niveles de expresión de Arginasa que están relacionados con la capacidad inmunosupresora de esta proteína moduladora del estrés oxidativo (Oberlies et al., 2009). En los co-cultivos se observa una concentración mayor en presencia de IGF2, sugiriendo que este factor de crecimiento modula la actividad inmunosupresora de las células i-dNK. La concentración de IFNγ tiene niveles similares en los medios de las células i-dNK y las células HTR-8/SVneo con los diferentes estímulos, pero de forma interesante aumenta en el medio de las células i-dNK estimuladas con MHIGF2, al igual que en los co-cultivos de las dos poblaciones. Los niveles de IP10 tienen poca variación en los diferentes tratamientos con una ligera disminución por acción de IGF2 sobre las células de trofoblasto estimuladas con Mi-dNK. En contraste, en los co-cultivos se observa un aumento en los niveles de IP10. El incremento de estas dos citoquinas en los co-cultivos sugiere una activación de la expresión factores proangiogénicos relacionados con la vascularización del tejido placentario (Chen et al., 2015; Jarmund et al., 2021). La expresión de la quimioquina ligando 17 (TARC) en los medios de las células de trofoblasto

tiene poca variación, pero la expresión de esta citoquina es mayor en las células i-dNK, como lo evidencia el aumento en los medios de células i-dNK estimuladas con MHIGF2, y aunque este nivel es menor al de las células pNK, sugiriendo el mantenimiento del fenotipo tolerogénico. No obstante, es difícil determinar el efecto de este factor sobre la homeostasis inmunológica de la decidua materna con el modelo propuesto, pues esta citoquina tiene un rol quimioatrayente selectivo a células T (Imai et al., 1997).

5.4 Cambio en el fenotipo de células HTR-8/SVneo estimuladas con medios condicionados o co-cultivadas con células i-dNK

El efecto de los medios condicionados y los co-cultivos sobre el fenotipo de las células HTR-8/SVneo se vio reflejado en cambios en la expresión de genes relacionados con la supervivencia, proliferación, migración e invasión celular. Inicialmente se observaron cambios en la expresión de los genes de vías de señalización relacionados con apoptosis celular que sugieren que el efecto de IGF2 sobre las células de trofoblasto se anula por la señalización iniciada por los factores producidos por las células i-dNK (Fig. 9), (CAS8), caspasa 3 (CAS3), proteína BID y caspasa 9 (CAS9). Por otro lado, se observa un aumento en la expresión de BCL2 y BAX de las células estimuladas con Mi-dNK en comparación con las células estimuladas únicamente con IGF2.

Es importante destacar que estudios previos han mostrado que las células de trofoblasto tienen un recambio poblacional importante mediado por procesos de autofagia (Sharp et al., 2010; Straszewski-Chavez et al., 2005). Esto concuerda con los resultados observados en la expresión de CAS9, en los que IGF2, un factor relacionado con la proliferación celular aumenta la expresión de esta caspasa de manera significativa lo que estaría correlacionado con un recambio poblacional mayor. Esto contrasta con la disminución en los niveles de transcrito de este gen en las células tratadas con Mi-dNK e IGF2, alcanzando niveles similares a los de las células control. Es posible concluir que las células no están encaminadas a una apoptosis tardía porque no hay un cambio relevante en la expresión de CAS3 para ninguno de los tratamientos, y resulta interesante ver que el medio

condicionado de las células i-dNK parece tener un rol regulatorio en la expresión de genes relacionados con la apoptosis.

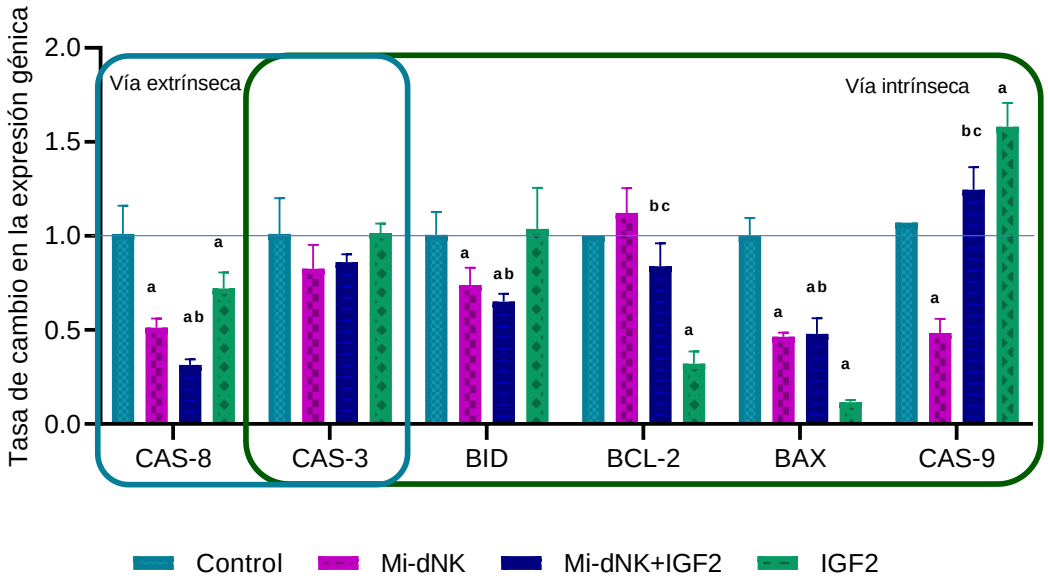


Figura 9. Cambio en la expresión de genes relacionados con apoptosis en HTR-8/SVneo estimulada con medios condicionados de células i-dNK Expresión de CAS-8, CAS-3, BID, BCL-2, BAX y CAS-9 en células HTR-8/SVneo. Los datos se presentan como la media ± SD de la tasa de cambio de expresión génica respecto a los genes de referencia. (a: p<0,001 vs Control, b: p<0,001 vs IGF2, c: p<0,001 vs Mi-dNK). Dentro de la caja azul se encuentran los genes apoptóticos regulados por la vía extrínseca y dentro de la caja verde aquellos regulados por la vía intrínseca. observándose una disminución significativa en la expresión de los genes de caspasa 8

Teniendo en cuenta que la regulación mediada por los factores producidos por las células i-dNK no mostró cambios hacia un fenotipo apoptótico, se evaluaron los cambios a nivel de expresión génica y por ensayos funcionales para determinar el efecto de estos medios en la proliferación, invasión, y migración de las células de trofoblasto.

El estímulo con IGF2 aumentó significativamente la expresión de Ki67 (Fig. 10A), indicando que las células encendieron un programa proliferativo, sin embargo, este efecto disminuye drásticamente por acción del medio condicionado de las células i-dNK, mostrando que estas células ejercen una capacidad reguladora sobre el cultivo trofoblástico. Dentro del microambiente decidual las células dNK, junto con otras poblaciones inmunológicas maternas, están encargadas de controlar la proliferación de las células de trofoblasto regulando la formación placental (Jabrane-Ferrat, 2019), para hacerlo liberan una serie de citoquinas que inhiben la proliferación descontrolada, por lo que lo observado con las

células estimuladas sugiere que a pesar del estímulo con IGF2, las células i-dNK producen citoquinas que cumplen un rol regulatorio sobre la proliferación trofoblástica. Este cambio también se observa en la expresión de cMYC, factor de transcripción relacionado con la regulación de la expresión de marcadores de proliferación.

En contraste, el gen RPTOR se regulo a la baja en estimulo con IGF2, sin diferencia en los demás tratamientos. RPTOR es un gen involucrado en la señalización del complejo mTORC1, respondiendo a la condición nutricional para mediar el crecimiento y la supervivencia celular (Tang et al., 2023). Resultados previos muestran que la expresión de este gen aumenta de forma significativa tras 60 minutos de estímulo con IGF2, y luego de este tiempo vuelve a caer, mostrando que este factor modula en tiempos cortos la expresión génica de RPTOR. La disminución significativa de la expresión de este gen sugiere una activación más temprana de esta vía que estaría relacionada con un aumento en la proliferación. Efecto que no se observa en las células estimuladas con Mi-dNK que muestran una expresión mantenida de este gen, sugiriendo que los factores presentes en el medio condicionado son capaces de regular la capacidad proliferativa y migratoria de las células de trofoblasto.

Ensayos funcionales mostraron que IGF2 promueve de forma significativa la proliferación de las células HTR-8/SVneo en una tasa cercana al doble respecto a la condición basal a las 24h (Lopez-Gonzalez, 2021). Este incremento se revierte por acción de los medios condicionados de células i-dNK (Fig. 10B). No obstante, se observa que la actividad proliferativa se recupera a las 72h posterior al estímulo, lo que puede sugerir que la regulación por parte de las células i-dNK debe ser continua para contrarrestar el efecto de IGF2, una vez más haciendo énfasis en el rol vigilante de las células inmunológicas de la decidua.

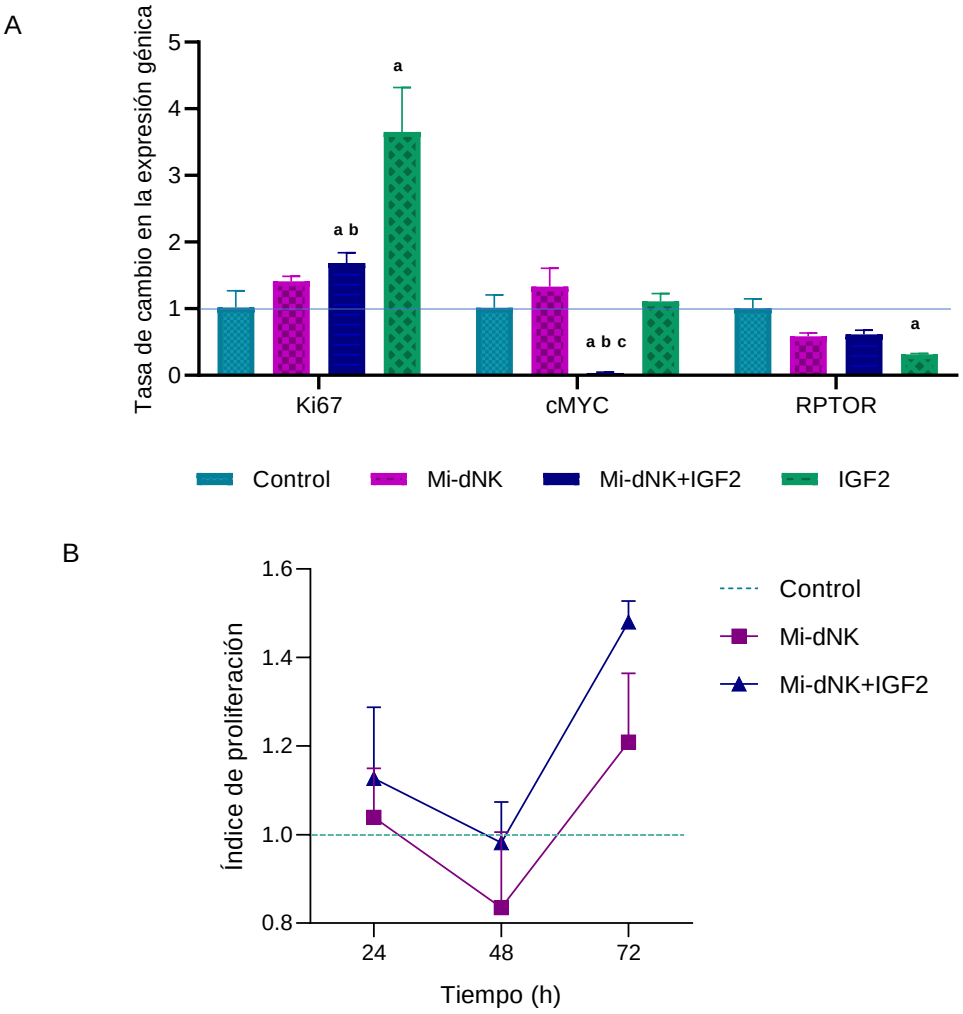


Figura 10. Cambios en la proliferación de células HTR-8/SVneo estimuladas con medios condicionados de i-dNK Expresión génica de Ki67, cMYC y RPTOR (A) en células HTR-8/SVneo en presencia de medios condicionados. Los datos se presentan como la media ± SD de la tasa de cambio de expresión génica respecto a los genes de referencia (a: p<0,001 vs Control, b: p<0,001 vs IGF2, c: p<0,001 vs Mi-dNK). Seguimiento de actividad metabólica de células HTR-8/SVneo por ensayo de MTT (B). Los datos se muestran como media ± SD de la absorbancia.

Las metaloproteasas son un elemento clave en la invasión celular, por tal motivo se determinó el cambio en la expresión génica de las proteasas MMP2 y MMP9. Se observó un incremento significativo en el transcrito de MMP2 en respuesta al medio condicionado por i-dNK y en presencia de IGF2. Por su parte la expresión de RHO y MMP9 tiene variaciones pequeñas con disminuciones de menor significancia en las células estimuladas con Mi-dNK e IGF2 (Fig. 11A).

Este cambio en la expresión de MMP2 correlaciona con el aumento en la expresión de HIF1A, pues este factor de transcripción activa la expresión de esta metaloproteasa (Chowdhury et al., 2008), sin embargo, no es posible observar diferencias significativas en la invasividad de las células de trofoblasto estimuladas con los medios condicionados ni en los co-cultivos (Fig.11B) en contraste con el incremento que previamente se ha reportado en el grupo de investigación (Castro-Badilla, 2021; Lopez-Gonzalez, 2021). En este orden de ideas, la invasión promovida por efecto de IGF2 sobre las células de trofoblasto es restringida por acción de las células i-dNK.

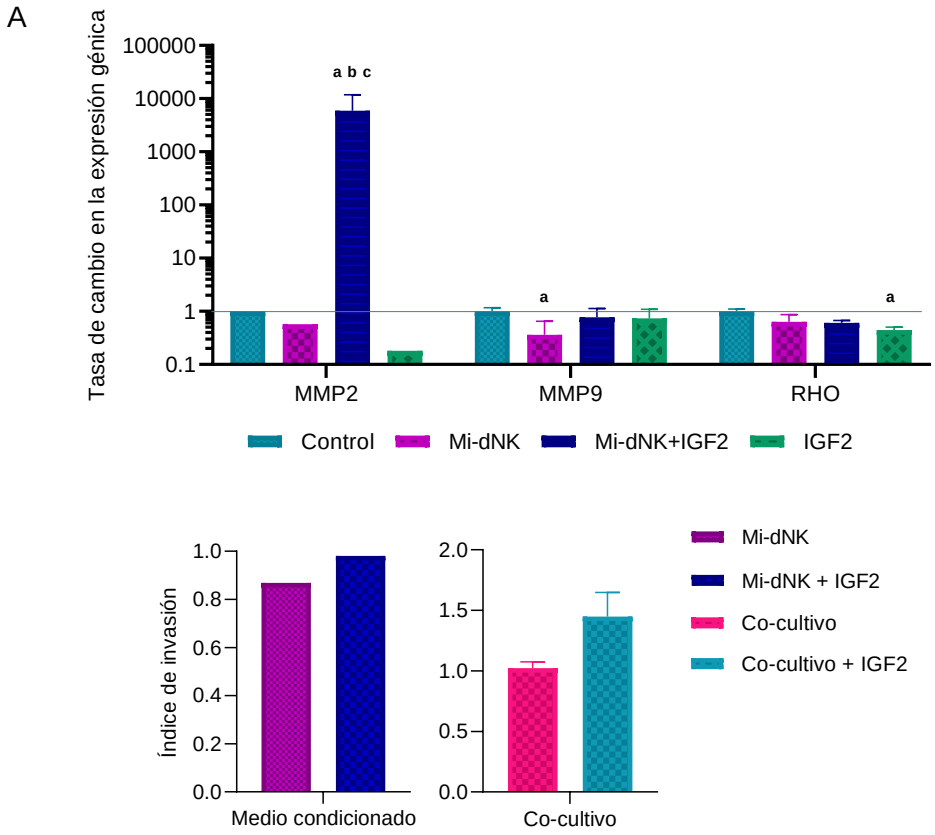


Figura 11. Cambios en la invasión de células HTR-8/SVneo estimuladas con medios condicionados o co-cultivadas con células i-dNK Expresión de MMP2, MMP9 y RHO en células HTR-8/SVneo (A) Los datos se presentan como la media ± SD de la tasa de cambio de expresión génica respecto a los genes de referencia. (a: p<0,001 vs Control, b: p<0,001 vs IGF2, c: p<0,001 vs Mi-dNK). Invasividad de las células HTR-8/SVneo tras estímulo con medios condicionados o co-cultivos con células i-dNK. Los datos se presentan como la media ± SD de la absorbancia normalizada respecto al control

La evaluación de los cambios en la expresión de receptores de quimioquinas muestra una disminución en la expresión CXCR4 para los diferentes tratamientos con un efecto aditivo

del Mi-dNK e IGF2. Reportes previos muestran que las células de trofoblasto tienen una expresión constitutiva de este receptor que está correlacionada con su capacidad migratoria (Lu et al., 2016; Zhou et al., 2008), por lo que resulta interesante observar la disminución significativa en su expresión en respuesta a los estímulos. También fue posible observar que IGF2 aumenta significativamente la expresión de CXCR7 (Fig. 12A), correlacionando con la naturaleza inducible del receptor, esto disminuye en las células estimuladas con los medios condicionados sugiriendo que las células i-dNK cumplen un rol regulatorio en la migración de las células de trofoblasto. Además, aunque hay un aumento en la capacidad migratoria de las células en presencia y ausencia del IGF2 respecto a las células no estimuladas (Fig. 12B, 12C), este efecto es menor al previamente reportado (Lopez-Gonzalez, 2021) como resultado del estímulo del factor de crecimiento.

En este orden de ideas, los cambios en la expresión de marcadores de diferenciación y de citoquinas de las células pNK muestran que se obtuvo un modelo *in vitro* de células con un fenotipo similar al de las células dNK. Este modelo exhibe expresión de marcadores esenciales en el mantenimiento de un fenotipo tolerogénico y se utilizó para evaluar la capacidad de IGF2 de modular la comunicación entre las células dNK y las células de trofoblasto. Previamente se ha reportado el rol de IGF2 como factor importante en el aumento de la proliferación, migración e invasión de trofoblasto, mostrando una progresión similar a la observada en las células tumorales; sin embargo, no existían reportes sobre su efecto en la comunicación con las células inmunológicas de la decidua materna. Ensayos iniciales muestran que las células i-dNK mantienen un fenotipo tolerogénico cuando son estimuladas con medios condicionados de células de trofoblasto, sugiriendo que IGF2 es capaz de modular la comunicación entre HTR-8/SVneo y las células i-dNK y que estos mantengan un fenotipo no regulador.

Teniendo en cuenta que la comunicación intercelular es un proceso continuo, también se determinó el efecto sobre el fenotipo y la expresión génica de las células de trofoblasto y sobre los niveles de citoquinas en los medios condicionados. Este estudio sugiere el inicio de un programa regulatorio en el que la señalización iniciada por las células dNK sea capaz de contener el efecto de IGF2 y en caso de el inicio de una malignización de las células trofoblásticas las células i-dNK puedan ejercer control. Los resultados se respaldan por la

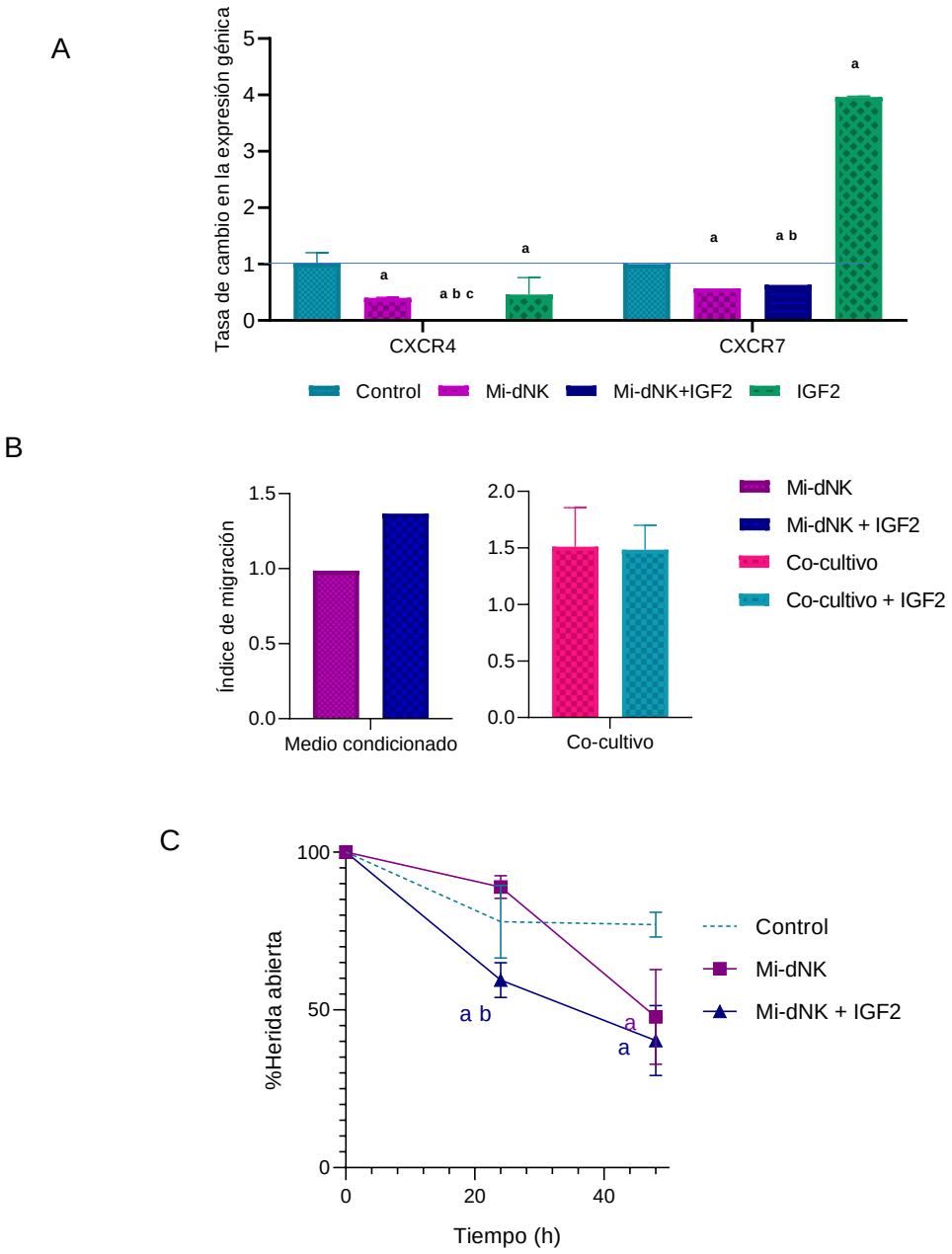


Figura 12. Cambios en la migración de células HTR-8/SVneo estimuladas con medios condicionados o co-cultivadas con células i-dNK Expresión de CXCR4 y CXCR7 en células HTR-8/SVneo (A) Los datos se presentan como la media ± SD de la tasa de cambio de expresión génica respecto a los genes de referencia. (a: p<0,001 vs Control, b: p<0,001 vs IGF2, c: p<0,001 Mi-dNK). Capacidad migratoria de las células HTR-8/SVneo tras estímulo con medios condicionados o co-cultivos con células i-dNK. Los datos se presentan como la media ± SD de la absorbancia normalizada respecto al control (B) o como la media ± SD del porcentaje de herida abierta determinado con 4 campos. (a: p<0,05 vs Control, b: p>0,05 vs Mi-dNK)

disminución en las características proliferativas, invasivas y migratorias de las células de trofoblasto en presencia de los medios condicionados de las células i-dNK, mostrando que la comunicación es bidireccional y temporal.

Estudios recientes son enfáticos en la importancia de la homeóstasis inmunológica en la decidua materna para el desarrollo correcto de la matriz placentaria. Durante el primer trimestre del embarazo las células dNK son esenciales en el control inmunológico en la decidua y en el control de la implantación blastocística, cumpliendo funciones fundamentales en el inicio del embarazo como la regulación en los procesos angiogénicos para la remodelación de las arterias espirales. Este trabajo muestra que esta población celular es capaz de regular la activación de la señalización mediada por IGF2 en las células de trofoblasto, haciendo énfasis en su rol esencial en la interfase materno-fetal durante el primer trimestre del embarazo.

6. Conclusiones

6.1 Conclusiones

Se estableció el modelo celular in-vitro i-dNK que presento marcadores esenciales en el mantenimiento de un fenotipo tolerogénico y características similares a las células natural killer de la decidua materna a partir de células NK periféricas.

La presencia de células i-dNK o del medio condicionado por estas células regula el aumento de la proliferación y la invasión de las células de trofoblasto extravelloso estimuladas por IGF2.

Se encontró que el factor de crecimiento IGF2 modula la comunicación entre las células de trofoblasto y las células i-dNK, propendiendo un fenotipo tolerogénico en el microambiente mientras las células i-dNK se mantienen vigilantes y controlan los cambios fenotípicos de las células de trofoblasto.

A. Anexo: Caracterización RNA extraído

Muestra	260 nm	280 nm	260/280	C (µg/µL)	RNA total (µg)
Células i-dNK	0,069	0,033	2,1	0,138	4,14
Células NK	0,046	0,019	2,4	0,092	2,76
Células i-dNK + MHIGF2	0,047	0,03	1,6	0,094	2,82
Células HTR8/SVneo	0,255	0,145	1,8	0,51	15,3
Células HTR8/SVneo + Mi-dNK	0,265	0,196	1,4	0,53	15,9
Células HTR8/SVneo + Mi-dNK + IGF2	0,289	0,193	1,5	0,578	17,34
Células HTR8/SVneo + IGF2	0,225	0,139	1,6	0,45	13,5

Tabla 1A. Cuantificación del mRNA extraído de diferentes muestras

B. Anexo: Estrategia de gating

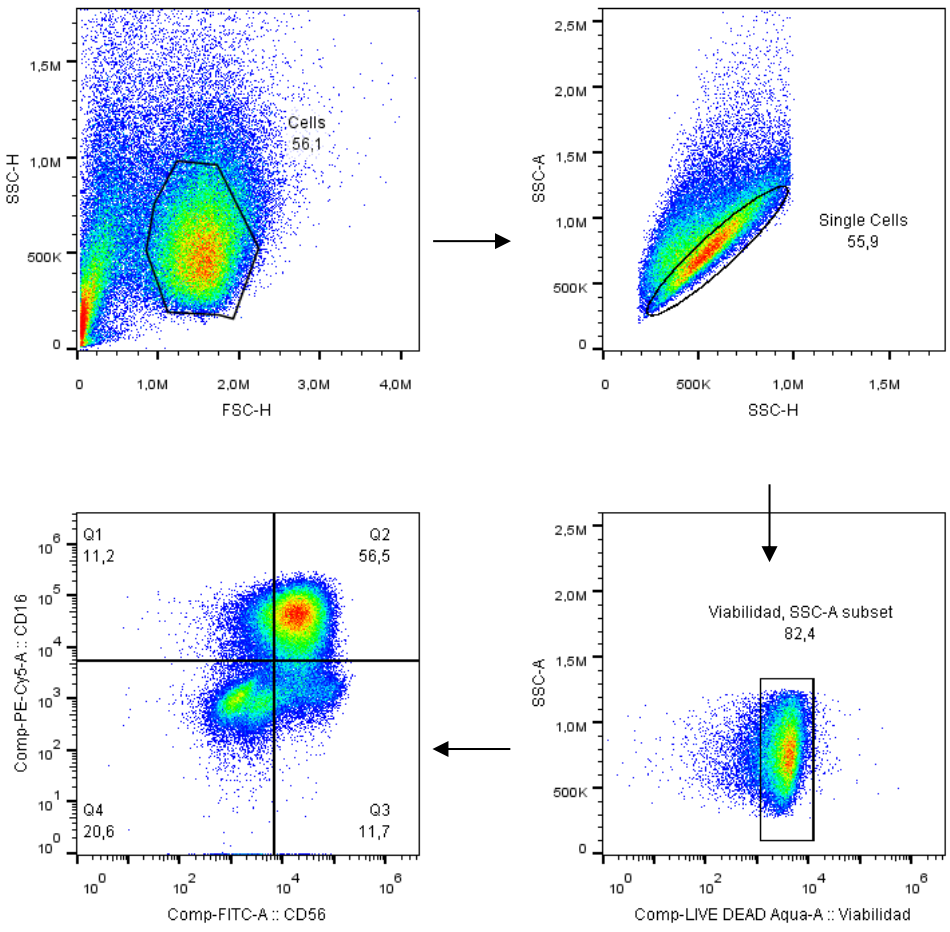


Figura 1A. Estrategia de gating de las células natural killer Los datos obtenidos por citometría de flujo de las células NK con sus diferentes estímulos fueron analizados con el software FlowJo V10. Se seleccionó la población correspondiente a las células y de esta se seleccionaron los eventos que son singletes. De estas células se seleccionó la población viva para determinar la expresión de los marcadores de diferenciación.

C. Anexo: Viabilidad celular NK

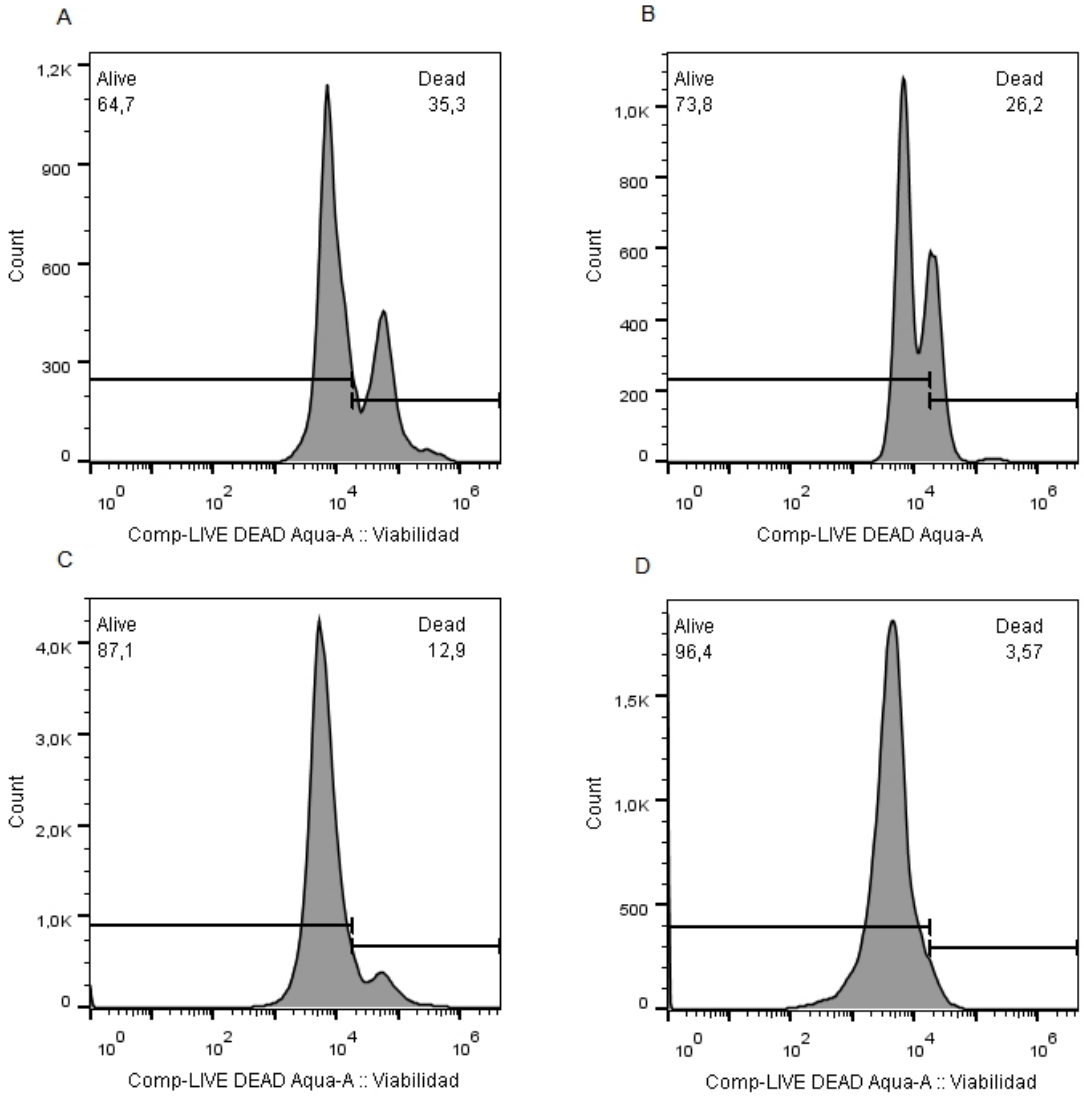


Figura 1B Cambios en la viabilidad celular por efecto del estímulo con TGFβ1 Células pNK recién extraídas (A), cultivadas por 7 días en presencia de IL15 e IL2 en condiciones de normoxia (B) en presencia de IL15, IL2, Aza y TGF-β1 (2ng/ml) en condiciones de hipoxia (C) o en presencia de IL15, IL2, Aza y TGF-β1 (5ng/ml) en condiciones de hipoxia (D).

Bibliografía

Ahluwalia, A., & S. Tarnawski, A. (2012). Critical role of hypoxia sensor--HIF-1α in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing. *Current Medicinal Chemistry*, *19*(1), 90–97. https://doi.org/10.2174/092986712803413944

Allan, D. S. J., Rybalov, B., Awong, G., Zúñiga-Pflücker, J. C., Kopcow, H. D., Carlyle, J. R., & Strominger, J. L. (2010). TGF-β affects development and differentiation of human natural killer cell subsets. *European Journal of Immunology*, *40*(8), 2289–2295. https://doi.org/10.1002/EJI.200939910

Ander, S. E., Diamond, M. S., & Coyne, C. B. (2019). Immune responses at the maternal-fetal interface. *Science Immunology*, *4*(31). https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.AAT6114

Bach, L. A. (2018). What Happened to the IGF Binding Proteins? *Endocrinology*, *159*(2), 570–578. https://doi.org/10.1210/EN.2017-00908

Braud, V. M., Allan, D. S. J., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., Lanler, L. L., & McMichael, A. J. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*, *391*(6669), 795–799. https://doi.org/10.1038/35869

Castro-Badilla, J.-J. (2021). *CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR MEDIADA POR IGF2R EN TROFOBLASTO HUMANO*. Universidad Nacional de Colombia.

Cerdeira, A. S., Rajakumar, A., Royle, C. M., Lo, A., Husain, Z., Thadhani, R. I., Sukhatme, V. P., Karumanchi, S. A., & Kopcow, H. D. (2013). Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *190*(8), 3939. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1202582

Chakraborty, C., Gleeson, L. M., McKinnon, T., Lala, P. K., Chakraborty, C., Gleeson, L., McKinnon, T., & Lala, P. (2002). Regulation of human trophoblast migration and invasiveness 1. *J. Physiol. Pharmacol*, *80*, 116–124. https://doi.org/10.1139/Y02-016

Chen, C.-P., Piao, L., Chen, X., Yu, J., Masch, R., Schatz, F., Lockwood, C. J., & Huang, S. J. (2015). Expression of Interferon g by Decidual Cells and Natural Killer Cells at

the Human Implantation Site: Implications for Preeclampsia, Spontaneous Abortion, and Intrauterine Growth Restriction. *Reproductive Sciences*. https://doi.org/10.1177/1933719115585148

Cheng, S.-B., & Sharma, S. (2014). Interleukin-10: A Pleiotropic Regulator in Pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. https://doi.org/10.1111/aji.12329

Chowdhury, R., Hardy, A., & Schofield, C. J. (2008). The human oxygen sensing machinery and its manipulation. *Chemical Society Reviews*, *37*(7). https://doi.org/10.1039/b701676j

Clemmons, D. R. (2018). 40 YEARS OF IGF1: Role of IGF-binding proteins in regulating IGF responses to changes in metabolism. *Journal of Molecular Endocrinology*, *61*(1), T139–T169. https://doi.org/10.1530/JME-18-0016

Dattani, M. T., & Gevers, E. F. (2016). Endocrinology of Fetal Development. *Williams Textbook of Endocrinology*, 849–892. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-29738-7.00022-8

Du, X., Zhu, H., Jiao, D., Nian, Z., Zhang, J., Zhou, Y., Zheng, X., Tong, X., Wei, H., & Fu, B. (2022). Human-Induced CD49a+ NK Cells Promote Fetal Growth. *Frontiers in Immunology*, *13*, 821542. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.821542/BIBTEX

Forbes, K., Westwood, M., Baker, P. N., & Aplin, J. D. (2008). Insulin-like growth factor I and II regulate the life cycle of trophoblast in the developing human placenta. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *294*(6). https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00035.2008

Fraser, R., Whitley, G. S., Johnstone, A. P., Host, A. J., Sebire, N. J., Thilaganathan, B., & Cartwright, J. E. (2012). Impaired decidual natural killer cell regulation of vascular remodelling in early human pregnancies with high uterine artery resistance. *The Journal of Pathology*, *228*(3), 322–332. https://doi.org/10.1002/PATH.4057

Habets, D. H. J., Schlütter, A., van Kuijk, S. M. J., Spaanderman, M. E. A., Al-Nasiry, S., & Wieten, L. (2022). Natural killer cell profiles in recurrent pregnancy loss: Increased expression and positive associations with TACTILE and LILRB1. *American Journal of Reproductive Immunology*, *88*(5). https://doi.org/10.1111/AJI.13612

Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Avraham, I., Greenfield, C., Natanson-Yaron, S., Prus, D., Cohen-Daniel, L., Arnon, T. I., Manaster, I., Gazit, R., Yutkin, V., Benharroch, D., Porgador, A., Keshet, E., Yagel, S., & Mandelboim, O. (2006). Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature Medicine 2006 12:9*, *12*(9), 1065–1074. https://doi.org/10.1038/nm1452

Imai, T., Baba, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., & Yoshie, O. (1997). The T Cell-directed CC Chemokine TARC Is a Highly Specific Biological Ligand for CC

Chemokine Receptor 4. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(23), 15036–15042. https://doi.org/10.1074/JBC.272.23.15036

Jabrane-Ferrat, N. (2019). Features of Human Decidual NK Cells in Healthy Pregnancy and During Viral Infection. *Frontiers in Immunology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01397

James, J. L., Stone, P. R., & Chamley, L. W. (2005). Cytotrophoblast differentiation in the first trimester of pregnancy: evidence for separate progenitors of extravillous trophoblasts and syncytiotrophoblast. *Reproduction (Cambridge, England)*, *130*(1), 95–103. https://doi.org/10.1530/REP.1.00723

Jarmund, A. H., Giskeødegård, G. F., Ryssdal, M., Steinkjer, B., Stokkeland, L. M. T., Madssen, T. S., Stafne, S. N., Stridsklev, S., Moholdt, T., Heimstad, R., Vanky, E., & Iversen, A. C. (2021). Cytokine Patterns in Maternal Serum From First Trimester to Term and Beyond. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.752660

Jiang, L., Fei, H., Jin, X., Liu, X., Yang, C., Li, C., Chen, J., Yang, A., Zhu, J., Wang, H., Fei, X., & Zhang, S. (2021). Extracellular Vesicle-Mediated Secretion of HLA-E by Trophoblasts Maintains Pregnancy by Regulating the Metabolism of Decidual NK Cells. *International Journal of Biological Sciences*, *17*(15), 4377. https://doi.org/10.7150/IJBS.63390

Juelke, K., Killig, M., Luetke-Eversloh, M., Parente, E., Gruen, J., Morandi, B., Ferlazzo, G., Thiel, A., Schmitt-Knosalla, I., & Romagnani, C. (2010). CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. *Blood*, *116*(8), 1299–1307. https://doi.org/10.1182/BLOOD-2009-11-253286

Keskin, D. B., Allan, D. S. J., Rybalov, B., Andzelm, M. M., Stern, J. N. H., Kopcow, H. D., Koopman, L. A., & Strominger, J. L. (2007). TGFβ promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16− NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(9), 3378–3383. https://doi.org/10.1073/PNAS.0611098104

King, A., Hiby, S. E., Verma, S., Burrows, T., Gardner, L., & Loke, Y. W. (1997). Uterine NK Cells and Trophoblast HLA Class I Molecules. *American Journal of Reproductive Immunology*, *37*, 459462. https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1997.tb00260.x

Koopman, L. A., Kopcow, H. D., Rybalov, B., Boyson, J. E., Orange, J. S., Schatz, F., Masch, R., Lockwood, C. J., Schachter, A. D., Park, P. J., & Strominger, J. L. (2003). Human Decidual Natural Killer Cells Are a Unique NK Cell Subset with Immunomodulatory Potential. *Journal of Experimental Medicine*, *198*(8), 1201–1212. https://doi.org/10.1084/JEM.20030305

Ku, C. W., Zhang, X., Zhang, V. R. Y., Allen, J. C., Tan, N. S., Østbye, T., & Tan, T. C. (2021). Gestational age-specific normative values and determinants of serum progesterone through the first trimester of pregnancy. *Scientific Reports 2021 11:1*, *11*(1), 1–8. https://doi.org/10.1038/s41598-021-83805-w

Lash, G. E., Otun, H. A., Innes, B. A., Percival, K., Searle, R. F., Robson, S. C., & Bulmer, J. N. (2010). Regulation of extravillous trophoblast invasion by uterine natural killer cells is dependent on gestational age. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *25*(5), 1137–1145. https://doi.org/10.1093/humrep/deq050

Lissauer, D., Eldershaw, S. A., Inman, C. F., Coomarasamy, A., Moss, P. A. H., & Kilby, M. D. (2015). Progesterone promotes maternal–fetal tolerance by reducing human maternal T-cell polyfunctionality and inducing a specific cytokine profile. *European Journal of Immunology*, *45*(10), 2858. https://doi.org/10.1002/EJI.201445404

Liu, S., Diao, L., Huang, C., Li, Y., Zeng, Y., & Kwak-Kim, J. Y. H. (2017). The role of decidual immune cells on human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*, *124*, 44–53. https://doi.org/10.1016/J.JRI.2017.10.045

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. *Methods*, *25*(4), 402–408. https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262

Livingstone, C. (2013). IGF2 and cancer. *Endocrine-Related Cancer*, *20*(6). https://doi.org/10.1530/ERC-13-0231

Lopez-Gonzalez, D.-A. (2021). *Efecto de IGF2 sobre el panorama de metilación del ADN y la expresión de ARNm asociada en la línea celular HTR-8/SVneo*. Universidad Nacional de Colombia.

Lu, J., Zhou, W. H., Ren, L., & Zhang, Y. Z. (2016). CXCR4, CXCR7, and CXCL12 are associated with trophoblastic cells apoptosis and linked to pathophysiology of severe preeclampsia. *Experimental and Molecular Pathology*, *100*(1), 184–191. https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.12.013

Lunghi, L., Ferretti, M. E., Medici, S., Biondi, C., & Vesce, F. (2007). Control of human trophoblast function. *Reproductive Biology and Endocrinology 2007 5:1*, *5*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/1477-7827-5-6

Manaster, I., Mizrahi, S., Goldman-Wohl, D., Sela, H. Y., Stern-Ginossar, N., Lankry, D., Gruda, R., Hurwitz, A., Bdolah, Y., Haimov-Kochman, R., Yagel, S., & Mandelboim, O. (2008). Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *181*(3), 1869–1876. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.1869

Oberlies, J., Watzl, C., Giese, T., Luckner, C., Kropf, P., Müller, I., Ho, A. D., & Munder, M. (2009). Regulation of NK Cell Function by Human Granulocyte Arginase. *The Journal of Immunology*, *182*(9), 5259–5267. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0803523

Pijnenborg, R., Vercruysse, L., & Hanssens, M. (2006). The Uterine Spiral Arteries In Human Pregnancy: Facts and Controversies. *Placenta*, *27*(9–10), 939–958. https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2005.12.006

Poli, A., Michel, T., Thérésine, M., Andrès, E., Hentges, F., & Zimmer, J. (2009). CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*, *126*(4), 458. https://doi.org/10.1111/J.1365-2567.2008.03027.X

Pollheimer, J., Vondra, S., Baltayeva, J., Beristain, A. G., & Knöfler, M. (2018). Regulation of placental extravillous trophoblasts by the maternal uterine environment. *Frontiers in Immunology*, *9*(NOV), 2597. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.02597/BIBTEX

Prutsch, N., Fock, V., Haslinger, P., Haider, S., Fiala, C., Pollheimer, J., & Knöfler, M. (2012). The role of interleukin-1β in human trophoblast motility. *Placenta*, *33*(9), 696–703. https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2012.05.008

Ranke, M. B., & Wit, J. M. (2018). Growth hormone — past, present and future. *Nature Reviews Endocrinology 2018 14:5*, *14*(5), 285–300. https://doi.org/10.1038/nrendo.2018.22

Resnik, R. (2002). Intrauterine growth restriction. *Obstetrics and Gynecology*, *99*(3), 490–496. https://doi.org/10.1016/S0029-7844(01)01780-X

Riley, J. K., & Yokoyama, W. M. (2008). NK cell tolerance and the maternal-fetal interface. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)*, *59*(5), 371–387. https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2008.00593.x

Rodriguez, L. G., Wu, X., & Guan, J. L. (2005). Wound-healing assay. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *294*, 23–29. https://doi.org/10.1385/1-59259-860-9:023/COVER

Sharp, A. N., Heazell, A. E. P., Crocker, I. P., & Mor, G. (2010). Placental Apoptosis in Health and Disease. *Am J Reprod Immunol*. https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00837.x

Siwetz, M., Blaschitz, A., El-Heliebi, A., Hiden, U., Desoye, G., Huppertz, B., & Gauster, M. (2016). TNF-α alters the inflammatory secretion profile of human first trimester placenta. *Laboratory Investigation*, *96*(4), 428–438. https://doi.org/10.1038/LABINVEST.2015.159

Staun-Ram, E., & Shalev, E. (2005). Human trophoblast function during the implantation process. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *3*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-56/METRICS

Straszewski-Chavez, S. L., Abrahams, V. M., & Mor, G. (2005). The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocrine Reviews*, *26*(7), 877–897. https://doi.org/10.1210/ER.2005-0003

Suarez-Arnedo, A., Figueroa, F. T., Clavijo, C., Arbeláez, P., Cruz, J. C., & Muñoz-Camargo, C. (2020). An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLoS ONE*, *15*(7). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0232565

Talia, C., Connolly, L., & Fowler, P. A. (2021). The insulin-like growth factor system: A target for endocrine disruptors? *Environment International*, *147*, 106311. https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.106311

Tang, J., Yang, L., Guan, F., Miller, H., Camara, N. O. S., James, L. K., Benlagha, K., Kubo, M., Heegaard, S., Lee, P., Lei, J., Zeng, H., He, C., Zhai, Z., & Liu, C. (2023). The role of Raptor in lymphocytes differentiation and function. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 14). https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1146628

Vacca, P., Moretta, L., Moretta, A., & Mingari, M. C. (2011). Origin, phenotype and function of human natural killer cells in pregnancy. *Trends in Immunology*, *32*(11), 517–523. https://doi.org/10.1016/J.IT.2011.06.013

Velicky, P., Meinhardt, G., Plessl, K., Vondra, S., Weiss, T., Haslinger, P., Lendl, T., Aumayr, K., Mairhofer, M., Zhu, X., Schütz, B., Hannibal, R. L., Lindau, R., Weil, B., Ernerudh, J., Neesen, J., Egger, G., Mikula, M., Röhrl, C., … Pollheimer, J. (2018). Genome amplification and cellular senescence are hallmarks of human placenta development. *PLOS Genetics*, *14*(10), e1007698. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1007698

Vilotić, A., Nacka-Aleksić, M., Pirković, A., Bojić-Trbojević, Ž., Dekanski, D., & Jovanović Krivokuća, M. (2022). IL-6 and IL-8: An Overview of Their Roles in Healthy and Pathological Pregnancies. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 23). MDPI. https://doi.org/10.3390/ijms232314574

Wallace, A. E., Fraser, R., & Cartwright, J. E. (2012). Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership Human Reproduction Update Advance Access Downloaded from. *Human Reproduction Update*, *0*(0), 1–14. https://doi.org/10.1093/humupd/dms015

Wallace, A. E., Host, A. J., Whitley, G. S., & Cartwright, J. E. (2013). Decidual Natural Killer Cell Interactions with Trophoblasts Are Impaired in Pregnancies at Increased

Risk of Preeclampsia. *The American Journal of Pathology*, *183*(6), 1853. https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2013.08.023

Wang, F., Zhu, H., Li, B., Liu, M., Liu, D., Deng, M., Wang, Y., Xia, X., Jiang, Q., & Chen, D. (2017). Effects of human chorionic gonadotropin, estradiol, and progesterone on interleukin-18 expression in human decidual tissues. *Http://Dx.Doi.Org/10.1080/09513590.2016.1212829*, *33*(4), 265–269. https://doi.org/10.1080/09513590.2016.1212829

Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L., & Mosmann, T. R. (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunology Today*, *14*(7), 353–356. https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90235-D

You, Y., Stelzl, P., Joseph, D. N., Aldo, P. B., Maxwell, A. J., Dekel, N., Liao, A., Whirledge, S., & Mor, G. (2021). TNF-α Regulated Endometrial Stroma Secretome Promotes Trophoblast Invasion. *Frontiers in Immunology*, *12*, 737401. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.737401/BIBTEX

Zhou, W. H., Du, M. R., Dong, L., Yu, J., & Li, D. J. (2008). Chemokine CXCL12 promotes the cross-talk between trophoblasts and decidual stromal cells in human first-trimester pregnancy. *Human Reproduction*, *23*(12), 2669–2679. https://doi.org/10.1093/humrep/den308