

---

## PREMIO GINECOLOGÍA PROF. DR. ARMANDO MENDIZABAL

### VIP: UN NEUROPEPTIDO CAPAZ DE MODULAR LA RESPUESTA INFLAMATORIA IMPLANTATORIA Y LA ALORESPUESTA MATERNA Una mirada inmune-neuroendocrina de la implantación fetal

Fraccaroli Laura<sup>1</sup>, Julio Alfieri<sup>1</sup>, Luciana Larocca<sup>1</sup>, Valeria Roca<sup>1</sup>, Eduardo Lombardi<sup>3</sup>,  
Claudia Pérez Leirós<sup>1</sup> y Rosanna Ramborst<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunofarmacología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, CONICET

<sup>2</sup>Cátedra de Microbiología, Facultad e Medicina, Universidad de Buenos Aires

<sup>3</sup>IFER, Instituto de Ginecología y Fertilidad

#### Introducción

La reproducción humana es un proceso biológico relativamente ineficiente. Sólo el 50 al 60% de todas las concepciones superan las 20 semanas de gestación, siendo las fallas en la implantación responsables de aproximadamente 75% de estas pérdidas <sup>(1,2)</sup>. Una implantación satisfactoria es el resultado final de complejas interacciones moleculares entre un útero preparado hormonalmente y un blastocisto maduro. Así, se generaría un dialogo entre la madre y el feto en el que participarían factores hormonales, de crecimiento y diferenciación placentarios interconectando los sistemas inmune, nervioso y endocrino.

Hasta la década de los 90, el dogma inmunológico para mantener un embarazo exitoso sostenía la generación de una respuesta inmune anti-inflamatoria

con la consiguiente producción de citoquinas (respuesta inmune tipo Th2 asociadas a respuestas humorales) y factores de crecimiento que promueven la diferenciación y desarrollo de células trofoblásticas, así como también controlan su camino invasivo <sup>(3-6)</sup>. Sin embargo, ciertas citoquinas asociadas a respuestas celulares y pro-inflamatorias (respuesta inmune tipo Th1), potencialmente deletéreas, están presentes en sitios peri-implantacionales normales <sup>(7-9)</sup>. Una paradoja clásica es la del IFN $\gamma$ , que en alta dosis en el endometrio uterino presenta efectos pro-abortivos, sin embargo en baja dosis contribuiría a la remodelación tisular e implantación exitosa. **Por lo tanto, las citoquinas no solamente tienen un rol inmunológico sino también participan en la remodelación tisular y en la angiogénesis <sup>(8,9)</sup>.**

En etapas tempranas del embarazo se generaría una respuesta inflamatoria y un perfil de citoquinas tipo Th1 que permitirían la implantación embrionaria. Seguidamente, se inducirían factores inmunoreguladores, que controlarían la respuesta celular potencialmente dañina e inducirían un "cambio" hacia un perfil tipo Th2, asociado con una etapa de crecimiento fetal.

El conjunto de estas evidencias, sumado al hecho de que la implantación involucra un proceso inflamatorio, cuestionan el dogma “Th2 = embarazo exitoso” y “Th1 = aborto espontáneo” y permiten formular una **nueva hipótesis**:

De acuerdo con esta hipótesis, la necesidad de citoquinas tipo Th1 en etapas tempranas, y de tipo Th2 más tardíamente implica un “switch” o cambio finamente regulado<sup>(8-11)</sup>. De esto se desprende que la imposibilidad de controlar la respuesta inflamatoria inicial podría generar un aborto espontáneo (ARE) o incluso la ocurrencia de reiteradas fallas implantatorias.

El ARE es una entidad clínica que afecta entre el 2 y 5 % de las mujeres con abortos espontáneos<sup>(3)</sup>. Si bien la frecuencia de esta patología es baja, hasta el momento no se ha determinado la causa de los mismos, ni existen marcadores con valor diagnóstico o pronóstico.

En este contexto, el **VIP (péptido intestinal vasoactivo), un neuropéptido producido por células linfoideas y neuronales, con una potente capacidad anti-inflamatoria, regula el balance de mediadores pro/anti inflamatorios re-dirigiendo la respuesta inmune hacia un perfil tipo Th2**<sup>(15-16)</sup>. VIP se expresa en neuronas en distintas áreas del sistema nervioso central y periférico y por lactotrofos de la pituitaria y páncreas<sup>(17,18)</sup>.

Frente a cualquier estímulo inflamatorio como por ejemplo bacterias o productos de ellas, los macrófagos se activan y en consecuencia producen citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, moléculas de adhesión y modulan la expresión de moléculas asociadas con la

presentación antigénica. **Las propiedades anti-inflamatorias de VIP se basan en su habilidad de inhibir funciones del macrófago, así como también la migración leucocitaria y la proliferación de células T**<sup>(15,21-23)</sup>.

Recientemente, Chorny y colaboradores demostraron que monocitos diferenciados a células dendríticas (células con capacidad de iniciar la respuesta adaptativa) en presencia de **VIP**, protegen del rechazo agudo característico de la enfermedad injerto contra huésped (GVHD) en el modelo murino de trasplante de médula ósea alogénica. Pudieron determinar que **VIP** les brindaba a estas células la capacidad de **inhibir la respuesta alogénica, ya que inducían linfocitos T regulatorios, suprimiendo así la expansión masiva de linfocitos T aloreactivos efectores**<sup>(30)</sup>.

En el contexto de tolerancia materno-fetal, VIP se visualizó por inmunocitoquímica en la formación de la placenta, y regularía la embriogénesis en etapas tardías de la implantación (entre días 9 y 11 en el modelo murino)<sup>(31)</sup>. El mecanismo por el cual VIP regula la embriogénesis es aun desconocido, sin embargo, presenta varias funciones como por ejemplo estimular la liberación de factores neurotróficos y citoquinas<sup>(32)</sup>. **El hecho de que VIP actúe durante un periodo limitado entre la implantación y la placentación, período de suma vulnerabilidad**<sup>(33)</sup>, **sumado a la capacidad de VIP de suprimir la respuesta alogénica, lo postulan como un factor fundamental en la inducción y mantenimiento de la tolerancia materna.**

Hipótesis del trabajo: En la fase final de la implantación y el comienzo de la placentación VIP sería capaz de frenar la respuesta pro-inflamatoria, induciendo la producción de citoquinas y quimioquinas asociadas a un patrón tipo Th2 y células T regulatorias. Estas últimas, junto con citoquinas supresoras, inhibirían la expansión masiva de linfocitos maternos activados por antígenos fetales. Este circuito estaría potenciado en presencia de progesterona.

**OBJETIVO GENERAL:** Teniendo en cuenta que la ventana de implantación es considerada un proceso inflamatorio y que un embarazo exitoso depende de su control, *el objetivo de este trabajo fue estudiar la participación de VIP como un factor anti-inflamatorio crítico en el diálogo materno fetal entre células trofoblásticas y leucocitos maternos. Así también, estudiar posibles alteraciones en su producción y función que podrían tener lugar en el aborto recurrente a repetición.*

Para el desarrollo del presente se utilizaron como *modelos in vitro*:

- Co-cultivos de células trofoblásticas y células mononucleares de sangre periférica materna representando el dialogo en la interfase materno-fetal.
- Co-cultivos de linfocitos maternos y paternos representando la respuesta alogénica materna.

## Población y Modelos Experimentales

### 1- Células trofoblásticas: Línea celular Swan71

Se utilizaron células inmortalizadas a partir de trofoblasto de primer trimestre las cuales fueron obtenidas y caracterizadas en el laboratorio del Dr. Gil Mor (Yale, University).

### 2- Pacientes y grupo control

### -Pacientes con síndrome de Aborto Recurrente

**Espontáneo:** Se seleccionaron pacientes que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

- 1- Mujeres con 3 ó más abortos consecutivos ocurridos antes de las 12 semanas de gestación y con el mismo patrón de pérdida, sin causas anatómicas, genéticas, infecciosas, endocrinológicas o autoinmunes.

2- Edad materna entre 25 y 42 años

3- Ausencia de actividad bloqueante evaluada en el Cultivo Mixto Linfocitario (CML)

**- Mujeres Fértiles: Grupo control**

Se estudiaron mujeres fértiles:

Edad entre 25-42 años

Que tengan 2 o más embarazos a término y que no hayan sufrido pérdida de ningún embarazo en su historia clínica.

**3- Diseño de co-cultivos in vitro**

**- Co-cultivos de líneas celulares y células mononucleares de mujeres fértiles o pacientes como reflejo del diálogo materno-fetal**

Las células trofoblásticas Swan-71 fueron cultivadas en medio (DMEM High glucosa, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) con suero fetal bovino (Gibco) 10% hasta alcanzar el 60% de confluencia. Luego se co-cultivaron en presencia de células MNT (mononucleares totales) de sangre periférica de pacientes con ARE o de mujeres fértiles previamente purificados ( $2 \times 10^6$  células por cada botella de  $25\text{cm}^3$ ). Las células recuperadas y/o los sobrenadantes se evaluaron según se detalla a continuación.

**- Co-cultivos de células mononucleares de mujeres fértiles o pacientes con ARE con células paternas como reflejo de la respuesta alógena in vivo hacia antígenos fetales. (Cultivo Mixto Linfocitario)**

Esta técnica consiste en la medición de la proliferación celular T en respuesta a aloantígenos presentes en células MNT de un individuo no relacionado. Las células MNT se resuspenden en medio completo RPMI-1640 ( $1 \times 10^5$  células por pocillo) y se enfrentan con células estimuladoras previamente tratadas con mitomicina C ( $1 \times 10^5$  células por pocillo) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). La mezcla de células respondedoras y estimuladoras se cocultivan en distintas combinaciones durante 5 días en placas de poliestireno de 96 pocillos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) a  $37^\circ\text{C}$  en estufa con 5%  $\text{CO}_2$ . Como controles se utiliza la respuesta autóloga de cada individuo (respuesta basal) y la respuesta hacia un tercer dador no relacionado. Luego de los correspondientes períodos indicados de cultivo se agrega un pulso de  $^3\text{H}$ -timidina (NEN, Boston, MA) de  $1 \mu\text{Ci}$ / pocillo y se continua la incubación por 18 hs más para permitir su incorporación al ADN. Finalmente las células se cosechan en papel de fibra de vidrio (Whatman, Maidstone, UK) utilizando un cosechador celular (Packard Instruments, LaGrange, IL). La incorporación de radioactividad se cuantificó utilizando un contador de centelleo líquido (Packard Instruments, LaGrange, IL).

**Material y Métodos**

**1- Aislamiento de células MNT:** Las MNT se obtuvieron a partir de sangre periférica anticoagulada proveniente de mujeres fértiles y de pacientes con ARE. Luego de realizar un gradiente de densidad utilizando Ficoll-HyPaque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), el halo correspondiente a las MNT se recuperó, se lavó con solución fisiológica y se resuspendió en medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suplementado con 10% de suero AB humano, 2 mM glutamina (Life Technologies, UK) y gentamicina  $20 \mu\text{g/ml}$ .

**2- Marcaciones por Inmunofluorescencia:** Se realizaron marcaciones directas, indirectas, de superficie e intracitoplasmáticas utilizando distintos Acs. monoclonales conjugados con distintos fluorocromos, entre ellos: IgG1 de ratón PE (control de isotipo) y anti-LIF PE (Becton Dickinson, San José, CA). Para determinar la población de células T regulatorias se realizaron triples marcaciones incluyendo los marcadores CD4 y CD25 de superficie e intranuclear para Foxp-3. Todas las muestras se analizaron en un Citómetro de Flujo Facstar plus analyzer (Becton Dickinson, CA), se adquieren 10.000 eventos. Los resultados se interpretaron utilizando el programa WinMDI® versión 2.8 y se expresaron como porcentajes de células positivas usando los correspondientes controles para determinar en cada caso el cuadrante o punto de corte.

**3- Ensayos de Western Blot:** Las células cultivadas bajo distintas condiciones se lavaron con PBS a temperatura ambiente. Luego los botones celulares se mezclaron con 1 ml de solución fría, conteniendo 5 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 142.5 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES, pH 7.2, junto con un *cocktail* de inhibidores de proteasas (0.2 mM PMSF, 0.1% aprotinina,  $0.7 \mu\text{g/ml}$  pepstatina y  $1 \mu\text{g/ml}$  leupeptina) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y se incubaron por 30 min. en hielo. Las muestras se centrifugaron a  $15,000 \times g$  por 20 min. a  $4^\circ\text{C}$  y los sobrenadantes, representando el lisado celular total, se almacenaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su uso. La concentración de proteínas se estimó utilizando el equipo de microBCATM (Pierce, Rockford, IL).

Los geles de poliacrilamida con SDS se corren en un aparato de electroforesis Miniprotean II (Bio Rad, Richmond, CA). Cantidades iguales de proteínas ( $30 \mu\text{g}$  por cada calle) se diluyeron en buffer de siembra y se resolvieron en un gel de poliacrilamida 10% para Foxp-3 y T-bet y 15% para LIF. Luego de la electroforesis, las proteínas separadas y transferidas a membranas de nitrocelulosa se incubaron en presencia del correspondiente 1<sup>er</sup> Ac. policlonal. Luego de realizar 2 lavados con buffer TBE, se incubaron con un 2<sup>do</sup> Ac. conjugado con HRP y las bandas se detectaron por reacción de quimioluminiscencia (ECL)

según indicaciones del fabricante (Amersham, Uppsala, Suecia). La carga equivalente de proteínas en cada calle y la ausencia de degradación de proteínas se verificó realizando una tinción con Ponceau S (Sigma, St. Louis, MO) e incubando con un Ac. monoclonal anti- $\mu$ -tubulina (DM1A). El marcador de peso molecular de proteínas utilizado fue de Bio-Rad (Richmond, CA). Las bandas inmunoreactivas se analizaron con el analizador de imágenes Fotodyne (Fotodyne, Inc., Hartland, WI) y el área de las bandas fue cuantificada utilizando: "NIH Image 1.59 software" (disponible en el sitio [Http://rsb.info.nih.gov/nih-image](http://rsb.info.nih.gov/nih-image) de la Word Wide Web).

#### 4- ELISA para citoquinas y quimioquinas:

Para la cuantificación de IL-6, IL-10 y MCP-1 presentes en sobrenadantes de cultivos, se utilizaron equipos de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D System, Minneapolis, USA). Consiste en un ELISA sandwich en donde el Ac. específico para cada citoquina esta adsorbido a la placa. Los estándares provistos por los equipos y las muestras se incuban en el soporte sólido durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se agrega el Ac. policlonal conjugado con HRP para cada quimioquina en la dilución correspondiente durante 1 hora. Finalmente se agrega el sustrato (peróxido de hidrógeno y tetrametilbenzidina) durante 20 min. y luego  $H_2SO_4$  4N para detener la reacción. La densidad óptica se leyó a 450 nm mediante un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS) y los resultados se expresaron en pg/ml.

#### 5- Síntesis del ADN complementario y reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR)

La obtención de la cadena complementaria y del ADN copia (ADNc) de células trofoblásticas (Swan-71) y neuronales SH-SY5Y utilizadas como control positivo se realizará utilizando un equipo Clontech (Palo Alto, CA). La reacción de polimerasa en cadena se realizó en un ciclador térmico PTC-100 MJ Research Inc. El programa de amplificación consiste en 35 ciclos, cada uno de los cuales incluye desnaturalización por 1 min. a 94°C, hibridación 30 seg a 55°C y extensión a 72°C por 1 min. Cada PCR se realizó en un volumen final de 50  $\mu$ l, conteniendo 36.6  $\mu$ l de agua (DEPC), 3  $\mu$ l del ADNc, 5  $\mu$ l del buffer de reacción 10x (Promega Inc.), 0.5  $\mu$ l de mezcla de 2'-deoxynucleosidos 5'-trifosfatos (2.5 mM de cada uno), 4  $\mu$ l de Mg (50mM, Promega Inc.), 1  $\mu$ l de cebadores (*primers*) 3' y 5' correspondientes (Sigma Genosys) y 1 U de Taq ADN polimerasa (Promega Inc.). Los cebadores utilizados para la amplificación de VIP se diseñaron con el programa Oligo 3. Después de realizada la amplificación por RT-PCR, se analizaron 10  $\mu$ l de cada producto en un gel de agarosa al 2% conteniendo 0.5% de bromuro de etidio en buffer Tris-Borate-EDTA (TBE). Se utiliza una escala de peso molecular de 1-kb de ADN (Promega Inc.)

como marcador de peso molecular. La electroforesis se realiza en TBE a 100 V por 20 min.

**6- Análisis estadístico:** Para la comparación entre medias se utilizaron los tests de Student, y para el análisis de muestras pareadas el test Mann Whitney empleando el software GraphPad (GraphPad, San Diego, CA).

## Resultados

### *VIP induce proliferación y marcadores pro-implantatorios en células trofoblásticas*

En un primer paso estudiamos el efecto de VIP directamente sobre células trofoblásticas (línea celular Swan-71, células de citotrofoblasto de primer trimestre inmortalizadas). Para ello, las células trofoblásticas fueron cultivadas en presencia de VIP ( $10^{-7}$ M) y luego de 24 horas se cuantificó la producción de citoquinas que contribuyen a la implantación como IL-6 y LIF (factor inhibidor de leucemias). Además se cuantificó la respuesta proliferativa de las células trofoblásticas a través de la incorporación de timidina tritiada luego de 72 horas de cultivo.

La cuantificación a través de la técnica de ELISA mostró que VIP fue capaz de incrementar significativamente la secreción de IL-6 (Figura 1A).

Por otra parte, LIF es un factor clave en la implantación humana y su expresión se induce a través de la presencia de citoquinas pro-inflamatorias (en etapas tempranas de la implantación). Observamos que VIP aumentó la expresión de LIF en las células trofoblásticas, evidenciado por Western Blot y confirmado por marcación y análisis por citometría de flujo (Figura 1B). Finalmente, VIP incrementó significativamente la proliferación de células trofoblásticas ( $p < 0.05$  Test de Student) (Figura 1C). *El conjunto de estos resultados sugieren que VIP podría actuar como un factor fisiológico capaz de inducir marcadores pro-implantatorios en células trofoblásticas y promover su crecimiento contribuyendo con una implantación embrionaria exitosa.*

### *VIP modula el balance de marcadores pro/anti inflamatorios durante el dialogo entre células trofoblásticas y leucocitos maternos*

VIP está asociado clásicamente con un tipo de respuesta inmune anti-inflamatoria, por ello investigamos su efecto en la modulación de marcadores pro y anti-inflamatorios en el dialogo materno-fetal. Con tal motivo, células Swan-71 fueron cultivadas en presencia de MNT maternos (de mujeres fértiles o con ARE) en ausencia o presencia de VIP y LPS (lipopolisacárido como potencial disparador de la respuesta inflamatoria inicial en la ventana implantacional). Pudimos observar que VIP fue capaz de disminuir significativamente los niveles de IL-6 y MCP-1 (quimioquina atrayente de ma-

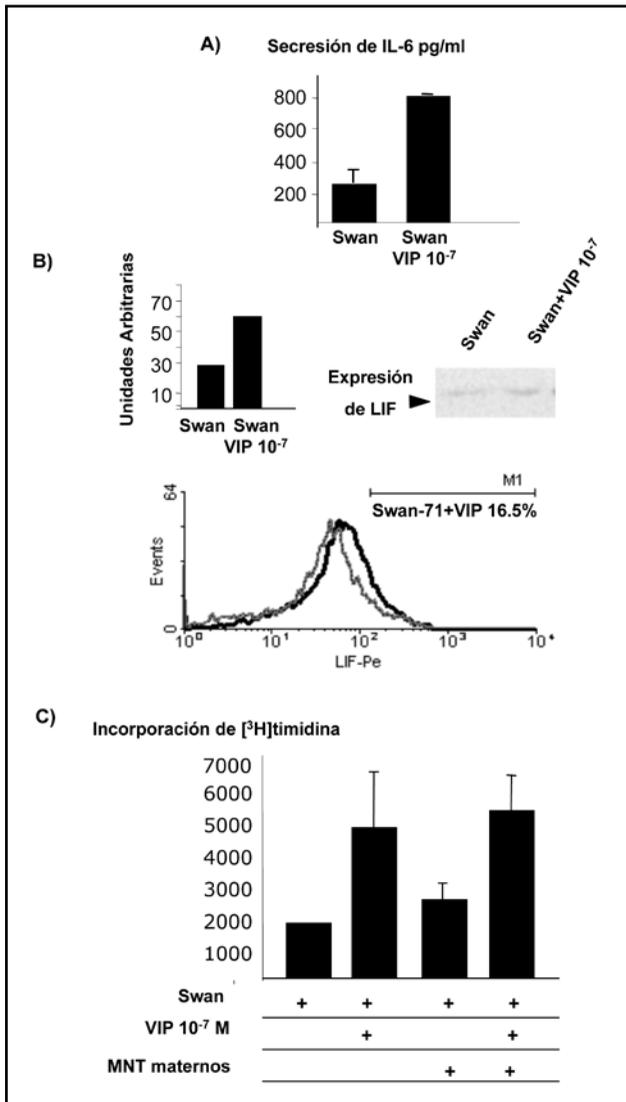


Figura 1:

crófaos) en ambos grupos en estudio ( $p < 0.01$  Test de Student, Figuras 2A y B). Asimismo, VIP incrementó significativamente la producción de IL-10 en el diálogo materno-fetal aún en presencia de LPS ( $p < 0.05$  Test de Student, Figura 2C). *Estas evidencias sugieren que VIP puede inmunomodular el dialogo materno-fetal disminuyendo marcadores pro-inflamatorios y aumentando la producción de IL-10, principal citoquina con función inmunosupresora, contribuyendo a generar una respuesta tolerogénica materna*

**VIP modula el balance de células T regulatorias y efectoras durante el dialogo entre células trofoblásticas y leucocitos maternos.**

Los linfocitos T regulatorios (Treg) tienen un rol crítico en el mantenimiento de la homeostasis de la respuesta inmune, así como también en la reproducción humana. La deficiencia, ya sea en número o en función

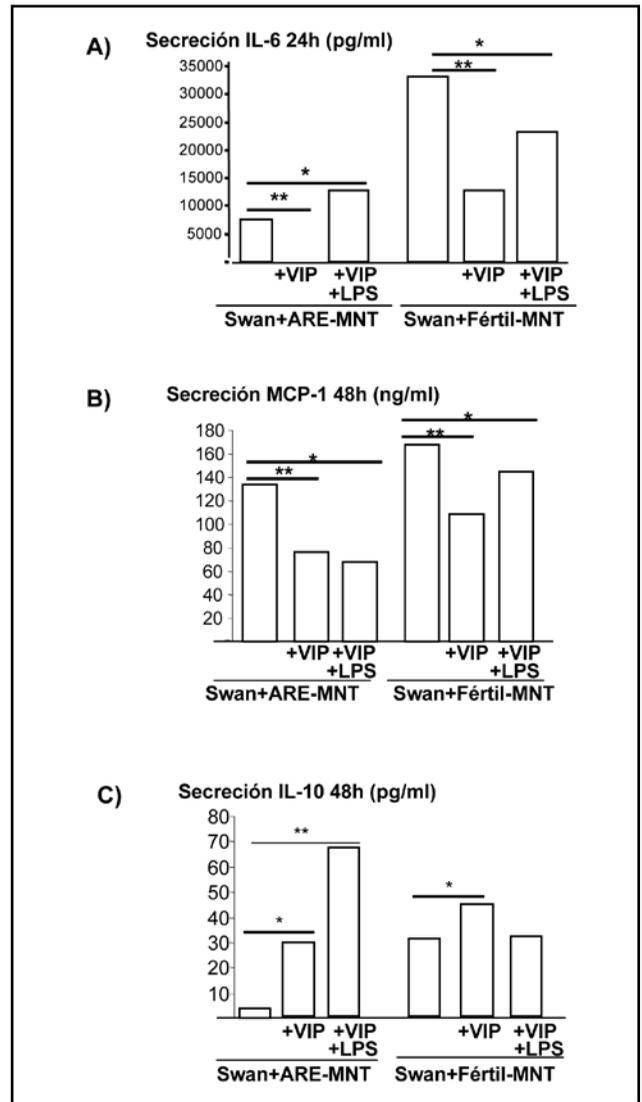
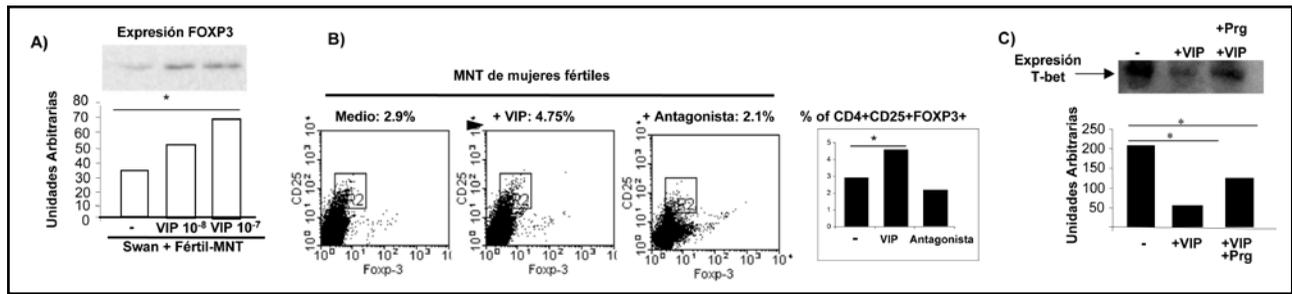


Figura 2:

de los mismos, está relacionada con la generación de enfermedades autoinmunes y ruptura de tolerancia. Su función puede mediarse a través del contacto célula-célula o través de la producción de IL-10, y pueden suprimir células efectoras e, incluso, la generación de las mismas. Con el objeto de estudiar la contribución de VIP en la respuesta tolerogénica materna, investigamos la expresión de Foxp-3 (factor de transcripción nuclear y marcador de Treg naturales) y T-bet (factor de transcripción asociado a células efectoras tipo Th1) en los co-cultivos entre células trofoblásticas y MNT maternos. El análisis por Western Blot reveló que VIP incrementa la expresión de Foxp-3 luego de 48 hs de co-cultivo de células trofoblásticas y MNT de mujeres fértiles, en forma dependiente de la dosis (Figura 3A). El incremento de los linfocitos Treg mediado por VIP, también fue confirmado a través de triples marcaciones (CD4 y CD25 de superficie e intranuclear para Foxp-3) y análisis por citometría de flujo, confirmándose un aumento de la



**Figura 3:**

población Treg en mujeres fértiles en presencia de VIP ( $p < 0.05$  Test de Student). El efecto modulador de VIP fue específico ya que su antagonista revirtió estos porcentajes, sin embargo, la reversión observada fue parcial sugiriendo la participación de otros inmunomoduladores en el dialogo materno-fetal (Figura 3B).

Asimismo, VIP disminuye significativamente la expresión de T-bet en MNT de mujeres fértiles luego de 48 hs de co-cultivo con células trofoblásticas, tanto en ausencia como en presencia de progesterona. La Figura 3D muestra las bandas inmunoreactivas de la expresión de T-bet analizadas por Western blot.

*El conjunto de estos resultados sugieren que VIP en el dialogo materno-fetal aumentaría los linfocitos T reguladores y disminuiría los T efectores, promoviendo así una respuesta materna tolerogénica. El efecto inmunomodulador de VIP en las poblaciones de linfocitos T reguladores y efectores se asocia temporalmente con la disminución de marcadores pro-inflamatorios descritos en el punto previo.*

***VIP es producido por células trofoblásticas y suprime la respuesta alógena materna en presencia de progesterona***

Dado que VIP modula la respuesta efectora Th1, investigamos la capacidad de VIP de suprimir la respuesta materna hacia aloantígenos paternos. Para ello se realizaron co-cultivos de células MNT maternas con MNT paternas (estos últimos tratados con mitomicina C para lograr una respuesta unidireccional), en ausencia o presencia de VIP y de progesterona en concentraciones fisiológicas en la interfase materno-fetal. Luego de 72 horas de cultivo, se cuantificó la proliferación por incorporación de timidina tritiada. En la Figura 4A se observa que VIP ( $10^{-7}M$ ) fue capaz de suprimir significativamente la proliferación de linfocitos maternos aloactivados en presencia de progesterona. Asimismo, los cultivos realizados con las pacientes con ARE mostraron el mismo comportamiento (Figura 4B). *La habilidad de VIP de suprimir la respuesta alógena en presencia de progesterona sugiere su participación como factor supresor en la interfase materno-fetal.*

Dado que VIP actuaría como un factor inmunoregulador de la respuesta materna, investigamos la capacidad de las células trofoblásticas de producir VIP. Para ello a partir de células trofoblásticas Swan-71 en 70% de confluencia se obtuvo ARN mensajero, el correspondiente ADN copia y se evaluó la expresión de VIP por PCR. Como se muestra en la Figura 5A, *las células trofoblásticas expresan VIP* al igual que las células SH-SY5Y (línea celular neuronal) utilizadas como control positivo.

Finalmente para estudiar la contribución de VIP fisiológico producido por las células trofoblásticas a la supresión de la respuesta alógena, obtuvimos medios condicionados (MC) libres de suero de las células Swan-71. Los mismos se adicionaron a linfocitos maternos aloestimulados en distintas diluciones. Observamos que el MC es capaz de suprimir la respuesta alógena materna significativamente ( $p < 0.005$  dil 1:10 y 1:50 Test de Student) (Figura 5B). Más aún, este efecto fue específico ya que el péptido antagonista de VIP fue capaz de prevenir la supresión de la alorespuesta (Figura 5C), *confirmando así que las células trofoblásticas son capaces de producir VIP, lo que apoya su relevancia fisiológica.* En presencia de progesterona se mantiene el efecto supresor del medio condicionado.

**Discusión**

La presencia de factores solubles capaces de inducir tolerancia en órganos de inmunoprivilegio, resalta la necesidad de establecer su relevancia en el eje embrio-endometrial en humanos. Asimismo, establecer una relación directa causa-efecto entre las células que producen una respuesta tolerogénica y la producción de factores solubles en respuesta hacia antígenos fetales, y la predicción del éxito o fracaso de un embarazo, tendría gran valor predictivo, tanto para pacientes que padecen ARE así como también para aquellas con reiteradas fallas en las fertilizaciones *in vitro*.

La interfase materno-fetal está constituida por una intrincada red que involucra elementos, ya sean células o factores solubles del sistema inmune, endocrino y neurológico. Se han caracterizado una gran variedad de

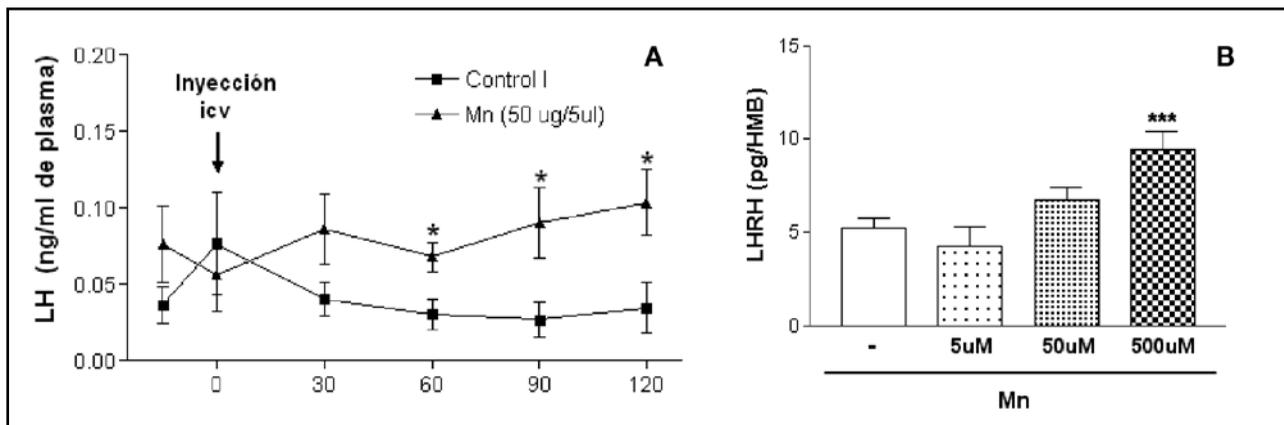


Figura 4:

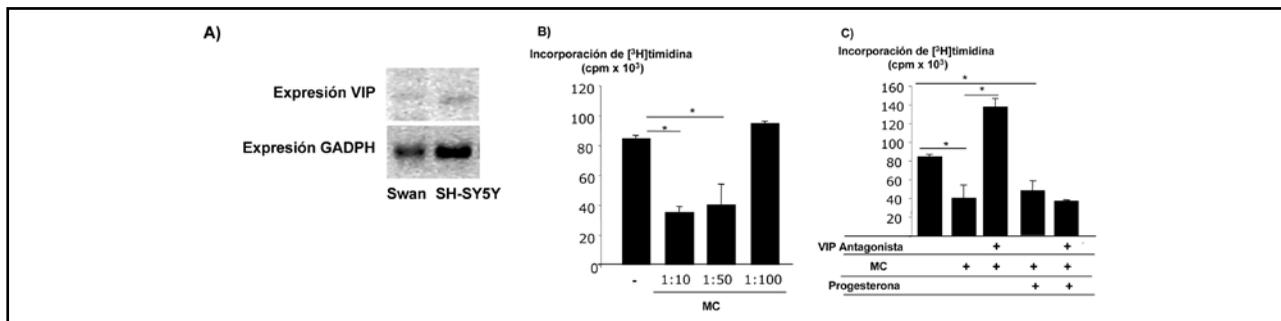


Figura 5:

factores solubles como citoquinas, quimioquinas, hormonas y neuropéptidos capaces de influenciar la diferenciación y funciones efectoras de la respuesta inmune. Particularmente los neuropéptidos pueden tener efecto en forma endocrina o paracrina, y varios estudios mostraron que la inervación por neuropéptidos constituye un componente importante en el microambiente del tejido linfoide. Por lo tanto, células del sistema inmune están expuestas a neuropéptidos secretados a través de las terminales nerviosas, o incluso por los propios leucocitos.

En particular, el neuropéptido VIP tiene efectos anti-inflamatorios, ya que modula el balance de mediadores pro y anti-inflamatorios. Evidencias previas muestran que VIP es capaz de prevenir el efecto deletéreo en el modelo experimental de artritis reumatoidea, y este candidato prometedor se ha propuesto como tratamiento alternativo de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas autoinmunes como artritis reumatoidea, esclerosis múltiple y diabetes, enfermedad de Crohn y shock séptico, que involucran respuestas celulares exacerbadas.

Así también, VIP es capaz de prevenir la enfermedad de injerto vs. huésped, la cual es la mayor causa de morbilidad y mortalidad en pacientes que recibieron trasplante de médula ósea como tratamiento para leucemias u otras enfermedades de tipo inmunológico. El hecho de que VIP esté presente en la interfase materno-fetal, sumado a su capacidad de reducir respuestas alógenicas

deletéreas, hace pensar que VIP podría actuar como un factor fisiológico tolerogénico controlando la respuesta alógenica materna hacia antígenos fetales.

Por otra parte, en los últimos años se ha determinado que la implantación en humanos puede considerarse un proceso de tipo inflamatorio que rápidamente debe ser controlado para evitar un aborto espontáneo. Este cambio o "switch" es finamente regulado por distintas poblaciones celulares y factores que las mismas producen en la interfase materno-fetal. El conjunto de estas evidencias nos llevó a investigar el efecto de VIP en el proceso de implantación, y las posibles alteraciones funcionales que confluyen para limitar o condicionar el éxito gestacional en parejas con historia de aborto recurrente.

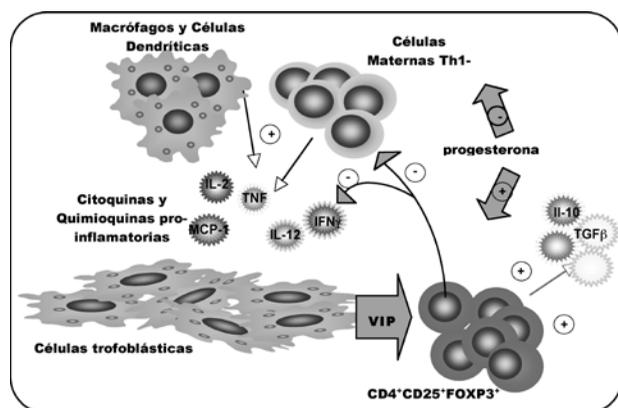
## Conclusiones

Las evidencias mostradas en este trabajo sugieren que VIP podría ser capaz de disminuir esta respuesta inflamatoria inicial regulando el balance de factores pro/anti-inflamatorios, suprimiendo potencialmente la respuesta celular, disminuyendo la respuesta Th1 efectora, incrementando la población de células T regulatorias y la producción de IL-10, contribuyendo así a la generación de la tolerancia materno-fetal. Asimismo, VIP es capaz de suprimir la respuesta alógenica materna en presencia de progesterona, reflejando su efecto supresor

en condiciones fisiológicas en la interfase materno-fetal en presencia de altas concentraciones de progesterona. Finalmente comprobamos por RT-PCR que las células trofoblásticas expresan VIP y lo secretan, ya que los medios condicionados de las mismas tienen capacidad supresora que se revierte en presencia del antagonista de VIP. Por lo tanto, la capacidad de las células trofoblásticas de secretar VIP en el diálogo materno fetal y de suprimir específicamente la respuesta alógena materna, aporta evidencias acerca de la relevancia del mismo como factor crucial en el “cross-talk” materno fetal.

## Bibliografía

1. Sargent IL, Wilkins T, Redman CW. Maternal immune responses to the fetus in early pregnancy and recurrent miscarriage. *Lancet* 1988;2:1099-104
2. Saito S. Cytokine network at feto-maternal interface. *J Reprod Immunol* 2000;47:87-103
3. 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 Op Immunol* 2000;12:731-7
4. Coulam C. Epidemiology of recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 1991;26:23-7
5. Chaouat G, Assal-Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliot J, Mosmann T, Wegmann TG. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBAxDBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of INF $\gamma$ . *J Immunol* 1995;154:4261-8
6. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 1997;18:478-82
7. Jenkins C, Roberts J, Wilson R, MacLean MA, Shllito J, Walker JJ. Evidence of a Th1 type response associated with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2000;23:1206-8



La siguiente figura representa el modelo propuesto de los efectos inmunomoduladores de VIP en la interfase materno fetal (Reproducido con permiso de M.L. Ribeiro).

8. Chauat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, Matral J. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-fetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol* 2002;53:241-53
9. 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
10. Abrahams V, Visitin I, Aldo P, Guller S, Romero R, Mor G. A role for TLRs in the regulation of immune cell migration by first trimester trophoblast cells. *J Immunol* 2005;175:8096-104
11. Ma Y, Mor G, Abrahams V, Buhimschi IA, Buhimschi CS, Guller S. Alterations in syncytiotrophoblast cytokine expression following treatment with lipopolysaccharide. *Am J Reprod Immunol* 2006;55:12-8
12. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 1997;18:478-82
13. Szekeres-Bartho J, Autran B, Debre P, Andreu G, Denver L, Chaouat G. Immunoregulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction. *Cell Immunol* 1989;122:281-94
14. Ogando D, Farina M, Ribeiro ML, Perez Martinez S, Cella M, Rettori V, Franchi A. Steroid hormones augment nitric oxide synthase activity and expression in rat uterus. *Reprod Fertil Dev* 2003;15:269-74
15. Delgado M, Abad C, Martinez C, Juarranz MG. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. *J Mol Med* 2002;80:16-24
16. Rosignoli F, Torraoba M, Juarranz J, Garcia-Gomez M, Martinez C, Gomariz RP, Perez-Leiros C, Leceta J. VIP and tolerance induction in autoimmunity. *Ann NY Sci* 2006;1070:525-30

17. Gomariz R, Lorenzo MJ, Cacicedo L, Vicente A, Zapata A. Demonstration of immunoreactive vasoactive intestinal peptide (IR-VIP) and somatostatin (IR-SOM) in rat thymus. *Brain Behav Immun* 1990;4:151-61
18. Gomariz R, Leceta J, Garrido E, Garrido T, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA expression in rat T and B lymphocytes. *Regul Pept* 1994;50:177-84
19. Covineau A, Rouyer-Fessard C, Darmoul D, Maoiret JJ, Carrero I, Ogier-Denis E, Laburthe M. Human intestinal VIP receptor: cloning and functional expression of two cDNA encoding proteins with different N-terminal domains. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;200:769-76

20. Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockert J, Seeburg PH, Journot L. Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 1993;365:170-5
21. De la Fuente M, Delgado M, Gomariz RP. VIP modulation of immune cell function. *Adv Neuroimmunol* 1996;6:75-91
22. Delgado M, Pozo D, Martinez C, Leceta J, Calvo JR, Ganea D, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit endotoxin-induced TNF- $\alpha$  production by macrophages: in vitro and in vivo studies. *J Immunol* 1999;162:2358-67
23. Delgado M, Muñoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies. *J Immunol* 1999;162:1707-16
24. Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide inhibit IL-12 transcription by regulating nuclear factor  $\kappa$ B and Ets activation. *J Biol Chem* 1999;274:31930-40
25. Delgado M, Ganea D. Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activation activating polypeptide: in vitro and in vivo. *J Immunol* 2001;167:996-75
26. Feldman M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann Rev Immunol* 1996;14:397-440
27. Mauri C, Williams RO, Walmsley M, Feldmann M. Relationship between Th1/Th2 cytokine patterns and arthritogenic response in collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 1996;26:1511-20
28. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;5:2145-54
29. Gomariz RP, Martinez C, Abadd C, Leceta J, Delgado M. Immunology of VIP: a review and therapeutical perspectives. *Curr Pharm Des* 2001;7:89-111
30. Chorny A, Gonzalez Rey E, Fernandez Martin A, Ganea D, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells that prevent acute graft-versus-host disease while maintaining the graft-versus-tumor response. *Blood* 2006;107:3787-94
31. Spong CY, Lee SJ, McCune SK, Gibney G, Abebe DT, Alvero R, Brenneman DE, Hill JM. Maternal regulation of embryonic growth: the role of vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 1999;140:917-24
32. Brenneman DE, Hill JM, Glazner GW, Gozes I, Phillips TW. Interleukin 1 alpha and vasoactive intestinal peptide enigmatic regulation of neuronal survival. *Int J Dev Neurosci* 1995;13:187-200
33. Bulmer JN, Sunderland C. Immunological characterization of lymphoid cell populations in the early human placental bed. *Immunol* 1984;52:349-57
34. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995;270:1811-5
35. Ramhorst RE, García VE, Corigliano A, Rabinovich GA, Fainboim L. Identification of RANTES as a novel immunomodulator of the maternal allogeneic response. *Clinical Immunol* 2004;110:71-80
36. Nakamura T, Sonoda K, Faunce D, Gumperz J, Yamamura T, Miyake S, Stein-Streilein J. CD4+ NKT cells, but not conventional CD4+ T cells, are required to generate efferent CD8+ T regulatory cells following antigen inoculation in an immune-privileged site. *J Immunol* 2003;171:1266-71
37. Faunce D, Stein-Streilein J. NKT Cell-derived RANTES recruits APCs and CD8+ T cells to the spleen during the generation of regulatory T cells in tolerance. *J Immunol* 2001;169:31-8
38. Ramhorst RE, Patel R, Corigliano A, Etcheparebor-da JJ, Fainboim L, Schust D. Induction of maternal tolerance to fetal alloantigens by RANTES production. *Am J Reprod Immunol* 2006;56:302-11
39. Ramhorst R, Gutierrez G, Corigliano A, Junovich G, Fainboim L. Implication of RANTES in the Modulation of Alloimmune Response By Progesterone During Pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2007;57:147-52
40. Hournung D, Bentzein F, Wallwiener D, Kiesel D, Taylor RN. Chemokine bioactivity of RANTES in endometriotic and normal stromal cells and peritoneal fluid. *Mol Hum Reprod* 2001;7:163-8
41. Wallach E. Chemokines and human reproduction. *Fertil Steril* 1999;71:983-93
42. Gentao L, Hiushan N, Yasuharu A, Xiangpeng Y, Moneeb Ehtesham D, Keith L, Josh S. Small idulation of IL-10 human monocyte-derived dendritic cells enhances the Th1 response. *Eur J Immunol* 2004;34:1680-7
43. Shi Y. Mammalian RNAi for the masses. *Trends Genet* 2003;19:9-12
44. Zupan V, Nehlig A, Evarrd P, Greesens R. Prenatal Blockade of Vasoactive Intestinal Peptide alters cell death and synaptic equipment in the murine neocortex. *Pediatric Res* 2000;47:53-63
45. Roca V, Larocca L, Calafat M, Aisember J, Meiss R, Franchi A, Perez Leiros C. Reduced NO synthase and cyclo-oxygenase activity in the uterus of non-obese diabetic mice. *Reproduction* 2006;132:931-8