

## Trabajo Original

### Inmunomodulación por progesterona y VIP de la función trofoblástica

#### *Immunomodulation by progesterone and VIP of the trophoblast cell function*

Mariana Agüero, Laura Fraccaroli, Esteban Grasso, Daniel Papparini,  
Claudia Pérez Leirós, Rossana Ramborst

Laboratorio de Inmunofarmacología, Dpto. Química Biológica, FCEyN-UBA, IQUIBICEN-CONICET, Buenos Aires  
E-mail: rramborst@qb.fcen.uba.ar

#### Resumen

Desde el punto de vista inmunológico, el embarazo comprende una respuesta inflamatoria durante el período periimplantacional que posteriormente cambiará hacia una de tipo tolerogénica. Particularmente, el péptido intestinal vasoactivo (VIP) producido por células trofoblásticas gatilla múltiples mecanismos que llevan a la tolerancia de aloantígenos y otros antígenos inherentes a la gestación. Dado que la progesterona es crucial desde las primeras etapas del embarazo, evaluamos los efectos inmunomoduladores de la progesterona y del VIP en las funciones de las células trofoblásticas. Para ello utilizamos un modelo in vitro de cocultivo entre células trofoblásticas (línea celular Swan71) y células mononucleares totales (MNT) obtenidas de sangre periférica de mujeres fértiles. Observamos que el VIP junto con la progesterona disminuyen significativamente la expresión de mediadores inflamatorios, como la producción de nitritos, la actividad gelatinolítica de la metaloproteína 9 y la expresión de la enzima COX-2. Al mismo tiempo, la progesterona aumentó significativamente la expresión de los receptores VPAC1 y VPAC2. Más aún, la progesterona aumentó la fagocitosis de perlas de látex fluorescentes (esferocitosis) en forma específica, ya que su inhibidor RU486 previno dicho aumento. Finalmente, el VIP suprimió la respuesta T efectora materna en presencia de progesterona, acompañado por una reducción en la expresión del t-bet, un marcador de linfocitos Th1 asociado a respuestas deletéreas en la interfase materno-placentaria. Los presentes resultados sugieren que la progesterona contribuiría a mantener una respuesta tolerogénica durante el período periimplantacional, disminuyendo la expresión de mediadores inflamatorios, facilitando los efectos moduladores de VIP y la remoción fisiológica de cuerpos apoptóticos.

**Palabras clave:** progesterona, VIP, fagocitosis, tolerancia materna.

#### Abstract

*From the immunological point of view pregnancy implies a proinflammatory response during the im-*

*plantation that will be shifted toward a tolerogenic one. Particularly, the vasoactive intestinal peptide (VIP) is produced by trophoblast cells, among others, and displays multiple target circuits that allow the tolerance to alloantigens and other pregnancy-related antigens. Since progesterone is essential from the first stages of pregnancy, here we evaluated the immunomodulatory effects of progesterone and VIP on the trophoblast cell function. For that purpose we used an in vitro model based in the Swan71 cell line co-cultured or not with maternal mononuclear cells obtained from fertile women. We observed that VIP, together with progesterone, decreased the expression of inflammatory mediators as the nitrites production, COX-2 expression and the activity of metalloproteinase 9. At the same time, progesterone significantly increased the expression of VPAC1 and VPAC2 receptors. Moreover, progesterone specifically increased the phagocytosis of latex-beads conjugated with FITC (efferocytosis) since the inhibitor RU486 prevented this effect. Finally, VIP decreased the effector T cell maternal response in the presence of progesterone accompanied by a reduction in t-bet expression, a transcription factor associated with Th1 deleterious response at the maternal-placental interfase. The present results suggest that progesterone would contribute to a tolerogenic response during the periimplantation period decreasing the expression of inflammatory mediators, easing VIP modulatory effects and the remotion of apoptotic bodies.*

**Key words:** progesterone, VIP, phagocytosis, maternal tolerance.

#### Introducción

Una implantación embrionaria satisfactoria es el resultado final de complejas interacciones moleculares entre un útero preparado hormonalmente y un blastocisto maduro. Así, se genera un diálogo entre la madre y el feto en el que participan factores hormonales, de crecimiento y diferenciación placentarios e inmunológicos (1,2).

Desde el punto de vista inmunológico, el embarazo comprende tres fases distintas con procesos bio-

lógicos característicos. En la primera etapa (primer trimestre de embarazo), el embrión requiere una respuesta proinflamatoria intensa para poder implantarse en el endometrio. Este proceso implica la ruptura del epitelio uterino, la invasión de la decidua y el reemplazo de los vasos maternos para soportar la demanda de oxígeno. La segunda fase inmunológica es un período de crecimiento y desarrollo donde la madre y el feto son simbióticos en un microambiente antiinflamatorio (segundo y parte del tercer trimestre de embarazo). En la última fase, se genera nuevamente una respuesta proinflamatoria que llevará a la contracción del útero y, en consecuencia, al parto (3,4).

Estos cambios se encuentran regulados a través de distintos mecanismos clave, ya que las alteraciones en ellos se relacionan con distintas fallas reproductivas como los abortos recurrentes de causa inmunológica, la restricción del crecimiento intrauterino y la preeclampsia (5).

En este contexto, el VIP es producido por células del sistema inmune, entre otras, con un marcado efecto antiinflamatorio e inmunomodulador promoviendo respuestas tolerogénicas, como se ha demostrado en modelos murinos y procesos autoinmunes (6,7). El VIP pertenece a la familia de péptidos de glucagón-GRF-secretina y fue inicialmente descrito como neurotransmisor del sistema nervioso central y autónomo. Es un péptido pleiotrópico con efectos variados, entre ellos produce un potente efecto vasodilatador por acción sobre receptores VPAC en músculo liso vascular uterino induciendo la producción de óxido nítrico (8).

En la interfase materno-placentaria murina, los niveles de VIP aumentan con un pico entre los días 9 y 12 de la gestación, con mayor expresión en decidua (9,10). El VIP estimula la diferenciación neuronal en embriones de ratón, y el tratamiento de embriones de día E9 in vitro con el péptido promueve un aumento de su crecimiento (9). Las hembras heterocigotas para la expresión de VIP (VIP<sup>+/-</sup>) producen crías con menor peso al nacer y trastornos de aprendizaje comparadas con crías *wild type* (WT) de madres WT; mientras que no se informaron gestaciones de hembras homocigotas recesivas (VIP<sup>-/-</sup>) para VIP (10). Junto con la cinética de producción local de VIP, estas evidencias sugieren funciones tróficas o reguladoras de VIP en etapas tempranas de la gestación en ratones (11,12).

Más aún, en sistemas de cocultivos in vitro entre células mononucleares obtenidas de mujeres fértiles y células trofoblásticas humanas (línea celular Swan71) se observó que las células trofoblásticas producen VIP y este disminuiría la respuesta inflamatoria inicial de la implantación embrionaria regulando el balance de factores pro/antiinflamatorios, favoreciendo una respuesta tolerogénica materna. Particularmente, incrementa

la frecuencia de linfocitos T reguladores y citoquinas con efectos inmunosupresores como IL-10 (interleukina 10) y TGF- $\beta$  (transforming growth factor), las cuales inhibirían la expansión masiva de linfocitos maternos activados y potencialmente deletéreos para la gestación (13,14).

En ese sentido, la progesterona desempeña un papel fundamental durante toda la gestación. En etapas tempranas de la implantación embrionaria, su producción es mantenida por el cuerpo lúteo en respuesta al estímulo de la gonadotropina coriónica humana (hCG) producida por el trofoblasto y luego, entre la sexta y octava semana de gestación, la placenta se convierte en la principal fuente de dicha hormona (15). Sus efectos son muy diversos, es fundamental para la preparación del endometrio y su diferenciación a decidua para la implantación, y luego para el mantenimiento del embarazo, promoviendo el crecimiento uterino y suprimiendo la contractilidad del miometrio (15). Además controla la capacidad invasiva de las células trofoblásticas regulando la actividad de las metaloproteinasas (MMP), principalmente la MMP2 y la MMP9 con gran capacidad invasiva, y contribuye a la tolerancia de antígenos fetales, entre otros antígenos, actuando como un mediador antiinflamatorio (16).

La progesterona media su acción a través de la activación de sus receptores (PR) A y B (PRA y PRB). Estas isoformas pertenecen a la familia de receptores nucleares y si bien tienen idéntico dominio de pegado, gatillan actividades transcripcionales distintas (17). Es por esto que la progesterona regula diferencialmente la expresión de distintos sets de genes, según la isoforma de PR que expresan las células (16-18).

Si bien se ha descrito la capacidad del VIP para estimular la secreción de hCG y de progesterona en cultivos de células trofoblásticas humanas, particularmente en la línea celular trofoblástica del tercer trimestre JEG-3 (19), hasta el momento no hay evidencias de la modulación de los efectos del VIP por progesterona en células trofoblásticas.

Así, hipotetizamos que en condiciones normales de gestación, la progesterona producida en etapas tempranas del diálogo materno-fetal, a través de sus receptores nucleares, modularía la expresión de los receptores del VIP en células trofoblásticas, y junto con el VIP generarían efectos antiinflamatorios y tolerogénicos. Por lo tanto, nuestro objetivo general fue investigar el efecto modulador de la progesterona y del VIP en procesos clave que desempeñan las células trofoblásticas, como es la producción de mediadores antiinflamatorios, tolerogénicos y la fagocitosis de cuerpos apoptóticos.

## Materiales y métodos

- **Células trofoblásticas: línea celular Swan71:** se utilizaron células inmortalizadas humanas a partir de trofoblasto de primer trimestre de gestación, las cuales fueron obtenidas y caracterizadas en el laboratorio del Dr. Gil Mor (*Yale University*) (20).

- **Aislamiento de células mononucleares totales (MNT) de sangre periférica:** las MNT se obtuvieron a partir de sangre periférica anticoagulada proveniente de mujeres fértiles voluntarias, entre 25-42 años, con al menos un embarazo a término sin ningún aborto espontáneo en su historia clínica. 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  $\mu$ /ml.

- **Cocultivos de células Swan71 y células mononucleares de mujeres fértiles como modelo del diálogo materno-fetal:** las células trofoblásticas cultivadas en DMEM-F12 y suero fetal bovino 10%, en 70% de confluencia, se cocultivaron en presencia de células MNT de mujeres fértiles como se describió previamente (13,14,21). Las células y/o los sobrenadantes se recuperan según se indica en cada ensayo.

- **Cocultivos de células MNT maternas con células MNT paternas como modelo de la respuesta alogénica materna (cultivo mixto linfocitario):** se cuantificó la proliferación celular T materna en respuesta a aloantígenos presentes en células MNT paternas en presencia del VIP y de progesterona. Las MNT paternas fueron tratadas previamente con mitomicina C para lograr una respuesta unidireccional. Luego de 5 días de cocultivo, la proliferación se cuantifica por incorporación de timidina- $H^3$  como se describió previamente (13,14,21).

- **Zimografía:** la actividad enzimática de MMP9 se evidenció por SDS-PAGE con geles 10% de gelatina en presencia y ausencia de EDTA como control de especificidad. Luego del fraccionamiento por electroforesis, la digestión enzimática se reveló por tinción con Coomassie azul. La actividad gelatinolítica se determinó semicuantitativamente a través de las bandas de degradación (13).

- **RT-PCR:** luego de la obtención del ADN copia se realizó la reacción en cadena de polimerasa en un ciclador térmico PTC-100 MJ Research Inc. Se utilizaron *primers* diseñados para la detección de GAPDH (control de expresión), VPAC1, VPAC2 y COX-2.

- **Ensayos de Western Blot:** se realizó como se describió previamente (13). Brevemente, a partir de las células cultivadas bajo distintas condiciones, se obtuvieron

los correspondientes extractos proteicos y se sembraron en geles de poliacrilamida con SDS. Luego de la electroforesis y transferencia a membranas de nitrocelulosa, las proteínas separadas se incubaron en presencia del 1° Ac específico anti t-bet. Luego de lavar, se incubó con un 2° Ac conjugado con HRP y la detección se realizó por quimioluminiscencia (Amersham-Pharmacia). Las bandas inmunorreactivas se analizaron con el analizador de imágenes Fotodyne (Fotodyne, Inc) (22).

- **Producción de nitritos:** se cuantificó dicha producción por el método de Griess con NEDA y sulfonamida en los sobrenadantes obtenidos de cocultivos entre células Swan71 y MNT maternas (13).

- **Ensayo de fagocitosis y citometría de flujo:** las células trofoblásticas crecidas al 70% de confluencia se trataron con VIP, progesterona, RU486 (1 $\mu$ M) (Sigma) o PMA (acetato-miristato de forbol, control positivo de fagocitosis). Luego de 24 horas se incuban en ausencia/presencia de VIP durante 30 min. Finalmente se adicionan las perlas de látex de 1-2  $\mu$ m conjugadas con FITC (Sigma) en relación 1:50 durante 2 h. Las células trofoblásticas se recuperaron luego del ensayo de fagocitosis y se analizaron por citometría de flujo (FACS ARIAS-Becton Dickinson, FCEN, UBA). Los resultados obtenidos se analizaron con el programa FlowJo 7.6 y se expresaron como la intensidad de fluorescencia media (MIF).

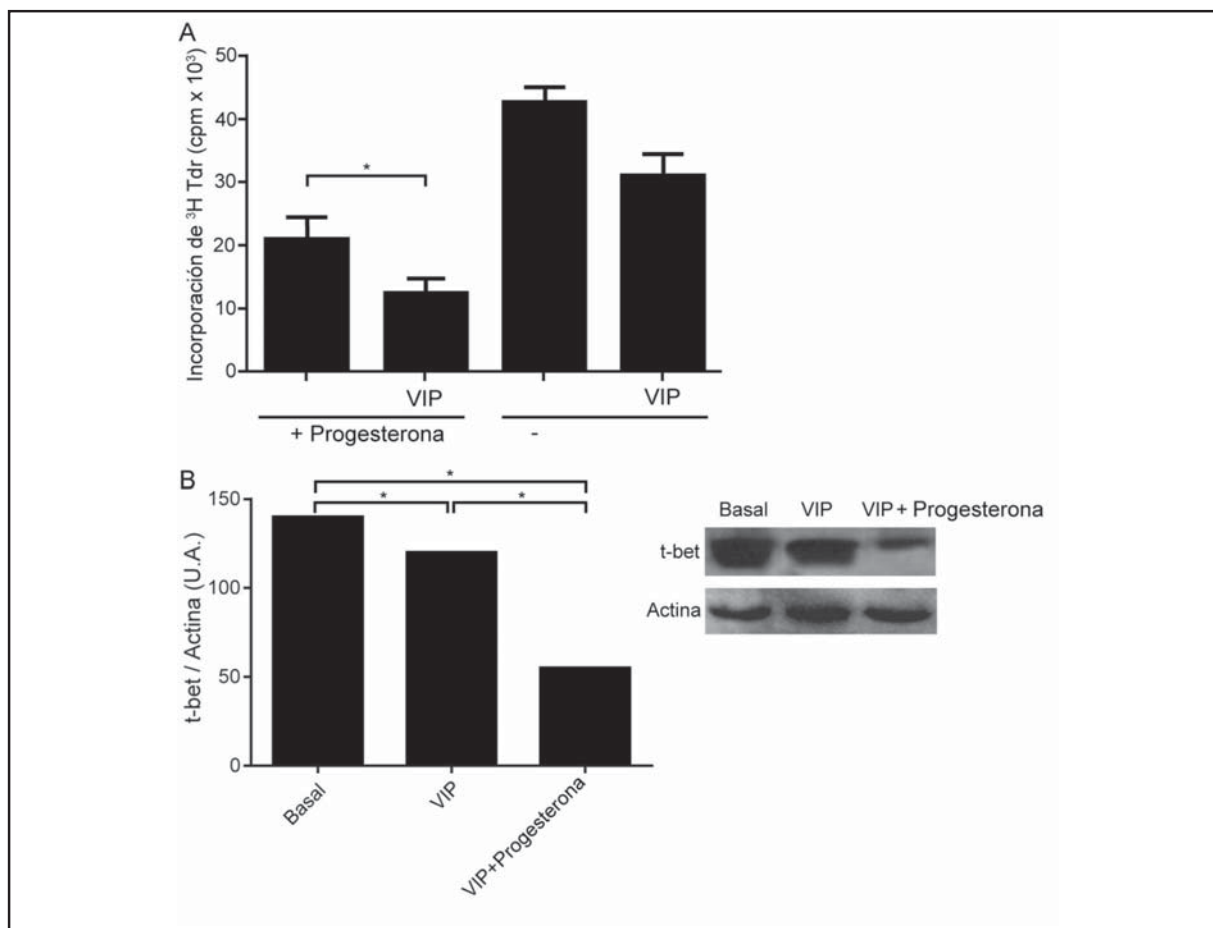
- **Análisis estadístico:** para la comparación entre medias se utilizó el test de Student para muestras paramétricas empleando el software GraphPad 6.0 (GraphPad, San Diego, CA).

## Resultados

### Efecto inmunosupresor de la respuesta alogénica de VIP en presencia de progesterona

Dados los efectos inmunomoduladores de VIP y de progesterona, investigamos la capacidad de ambos de suprimir la respuesta materna hacia aloantígenos paternos. Para ello se realizaron cocultivos de células MNT maternas con MNT paternas (estos últimos tratados con mitomicina C para lograr una respuesta unidireccional) en ausencia o presencia de VIP ( $10^{-7}$ M) y de progesterona ( $10^{-6}$ M) 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 1A** se observa que el VIP ( $10^{-7}$ M) fue capaz de suprimir significativamente la proliferación de linfocitos maternos aloactivados en presencia de progesterona.

Teniendo en cuenta que la respuesta alogénica se acompaña de una respuesta efectora de tipo Th1 potencialmente deletérea, seguidamente evaluamos la modulación del factor de transcripción t-bet característico



**FIGURA 1. Efecto inmunosupresor de la respuesta alógena de VIP en presencia de progesterona.** Las células mononucleares totales (MNT) maternas y paternas (tratadas con mitomicina **C**), se cocultivaron en ausencia/presencia de VIP y progesterona. Luego de 72 horas: **A**) se cuantificó la proliferación celular por incorporación de timidina tritiada; y **B**) la expresión del factor de transcripción t-bet, por Western Blot (T-test \*p<0,05).

de este tipo de respuesta por Western Blot. Como se observa en la **FIGURA 1B**, luego del cocultivo de las MNT maternas y paternas, la expresión t-bet disminuyó significativamente en presencia de VIP más progesterona.

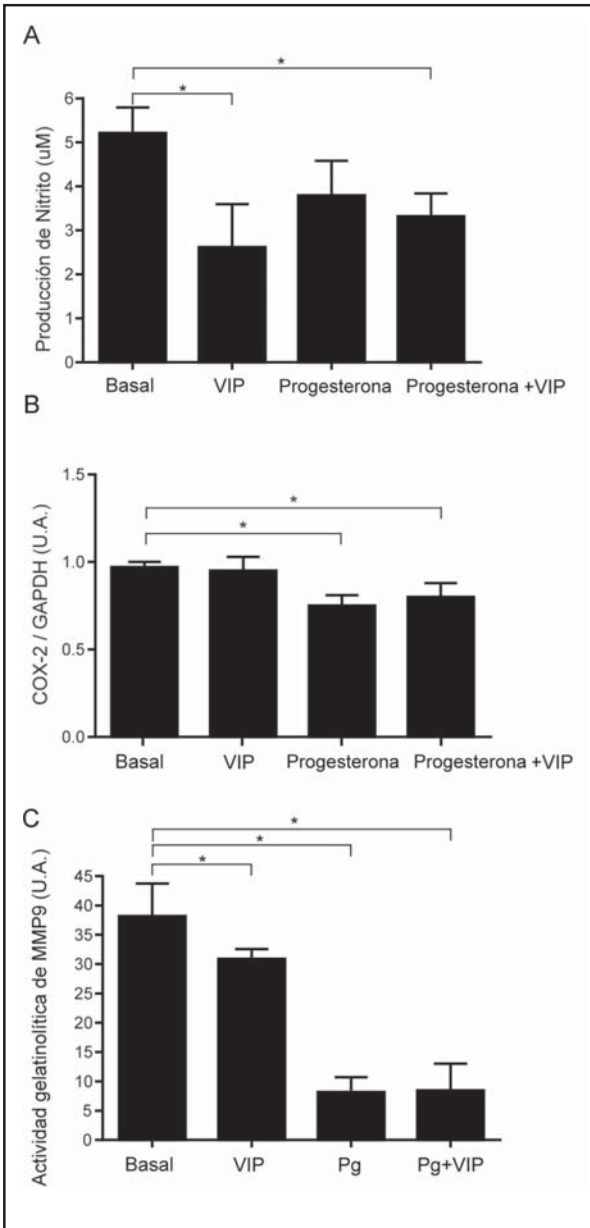
**VIP y progesterona modulan la producción de mediadores implantatorios en el diálogo materno-trofoblástico**

El VIP y la progesterona inducen la producción de mediadores tolerogénicos y por ello investigamos sus efectos en la modulación de marcadores inflamatorios en el diálogo entre leucocitos maternos y células trofoblásticas. Con tal motivo, células Swan71 fueron cultivadas en presencia de MNT maternas en ausencia o presencia de VIP y progesterona. Pudimos observar que el VIP junto con la progesterona fueron capaces de disminuir la producción de nitritos cuantificados por el método de Griess, la expresión de COX-2, cuantificado por RT-PCR y la actividad gelatinolítica de la MMP9 evaluada

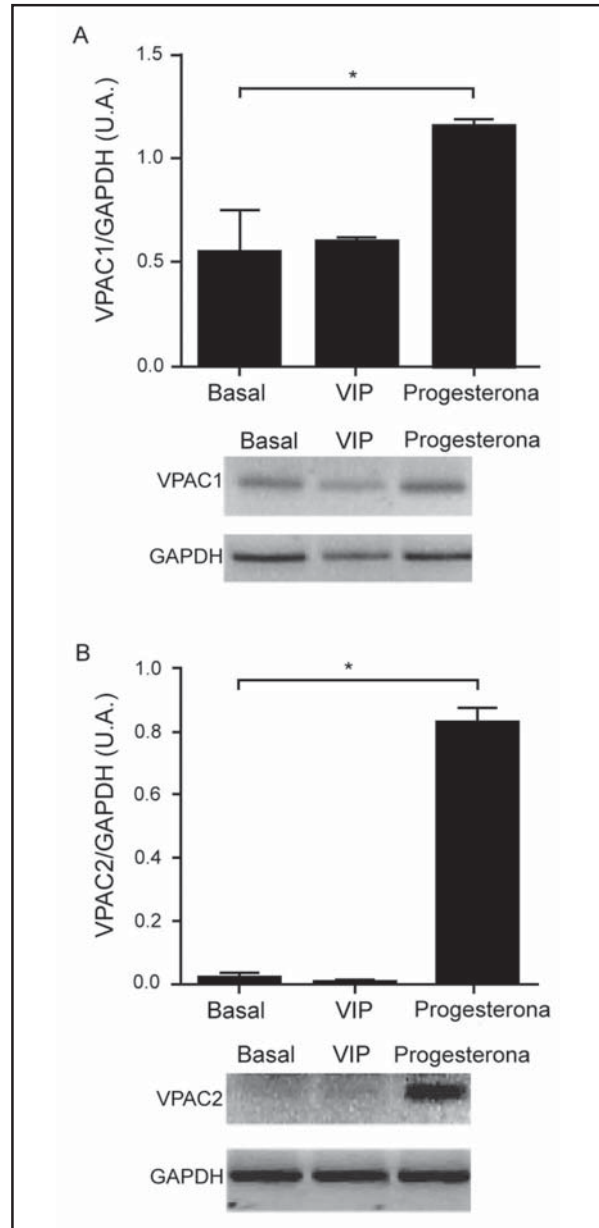
por zimografía (p<0,05 Test de Student, **FIGURA 2A, B y C**). Estas evidencias sugieren que el VIP y la progesterona modulan la producción de distintos mediadores inflamatorios involucrados en la implantación.

**La progesterona induce la expresión de los receptores de VIP en las células Swan71**

Con el objeto de investigar el efecto de la progesterona sobre el sistema VIP/VPAC en células trofoblásticas, evaluamos la expresión de los receptores VPAC1 y VPAC2 en la línea celular Swan71. La línea celular fue cultivada en presencia de progesterona (10<sup>-6</sup>M) y luego de 24 horas se evaluó la expresión de los receptores por RT-PCR. Como se observa en la **FIGURA 3**, la progesterona aumenta significativamente la expresión de ambos receptores. Estos resultados sugieren que la progesterona estimularía a las células trofoblásticas sensibilizándolas a los efectos del VIP, amplificando así el efecto tolerogénico del péptido.



**FIGURA 2. VIP y progesterona modulan la producción de mediadores en el diálogo materno-trofoblástico.** Las MNT maternas en ausencia/presencia de VIP y progesterona o combinadas se cocultivaron con células Swan-71 durante 48 horas. Seguidamente se analizó: **A)** la producción de nitritos (método de Griess); **B)** la expresión de COX-2 (RT-PCR); y **C)** la actividad gelatinolítica de MMP-9 (zimografía) (T-test \* $p < 0,05$ ).



**FIGURA 3. La progesterona induce la expresión de los receptores de VIP en las células Swan71.** Las células Swan-71 se cultivaron en presencia de progesterona ( $10^{-6}M$ ) durante 24 horas. Seguidamente se analizó la expresión VPAC1 y VPAC2 por RT-PCR (T-test \* $p < 0,05$ ).

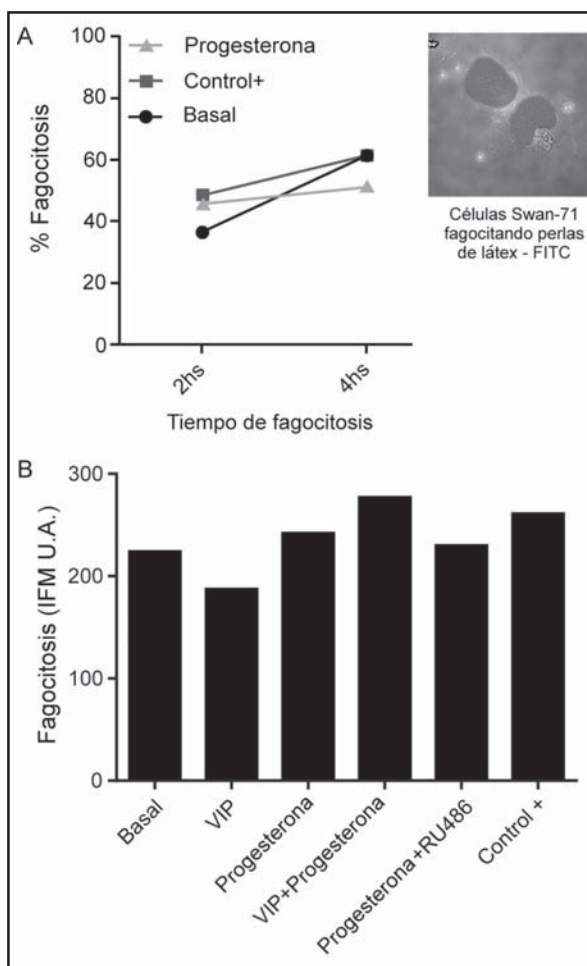
### La progesterona favorece la capacidad fagocítica de las células trofoblásticas

La generación de la interfase materno-placentaria involucra la remodelación tisular y de la vasculatura del entorno generando un gran número de células apoptóticas endoteliales y epiteliales. Estos cuerpos apoptóticos serán removidos rápidamente por células fagocíticas profesionales como los macrófagos o por células trofoblásticas, que adquieren esta capacidad durante su diferenciación (22,23). Este proceso permitirá, no solamente depurar los cuerpos apoptóticos generados, sino también inducir la producción de citoquinas antiinflamatorias contribuyendo a generar un microambiente tolerogénico. Dada la relevancia de la remoción de cuerpos apoptóticos y los efectos antiinflamatorios de la progesterona, investigamos si esta favorece el proceso de fagocitosis. Para ello, en un primer paso se realizaron ensayos de fagocitosis de perlas de látex (1-2  $\mu$ m) con las células Swan71, ya que dicho proceso de esferocitosis es similar a la remoción de cuerpos apoptóticos (24). Las células trofoblásticas se cultivaron en presencia de progesterona o de un control positivo de fagocitosis y 24 h después se adicionaron las perlas de látex conjugadas con FITC. Luego de 2 y 4 h de incubación, su fagocitosis se cuantificó por citometría de flujo. Como se observa en la **FIGURA 4A** panel superior, las células Swan71 aumentaron su capacidad fagocítica en presencia de progesterona luego de 2 horas de fagocitosis, lo que refleja su relevancia en eventos tempranos. La **FIGURA 4A** panel derecho muestra células Swan71 luego de la fagocitosis de perlas de látex.

Seguidamente, evaluamos la contribución de VIP y la especificidad del efecto de progesterona en la fagocitosis mediada por células trofoblásticas. Las células Swan71 se pretrataron con progesterona, VIP, con el control positivo o RU486 (antagonista competitivo de PR). Luego de 24 h, se incubaron en ausencia/presencia de VIP durante 30 minutos. Seguidamente se realizó el ensayo de fagocitosis durante 2 h y el análisis por citometría de flujo. Como se observa en la **FIGURA 4B**, VIP no modula la capacidad fagocítica de las células trofoblásticas. En cambio, si las células trofoblásticas estaban pretadas con progesterona, aumenta su capacidad fagocítica de perlas de látex. Por otra parte, RU486, el antagonista de progesterona previene dicho aumento, lo que sugiere el efecto directo de progesterona en la función fagocítica de las células trofoblásticas. La **FIGURA 4B** muestra un ejemplo representativo de 3 experimentos realizados en las mismas condiciones.

### Discusión

Durante el período de implantación es esencial que se genere una respuesta proinflamatoria asociada a



**FIGURA 4. La progesterona favorece la capacidad fagocítica de las células trofoblásticas. A)** las células Swan71 se cultivaron en presencia de progesterona del control positivo durante 24 horas. Seguidamente se adicionaron perlas de látex conjugadas con FITC durante 2 y 4 horas, y su fagocitosis se cuantificó por citometría de flujo; **B)** las células trofoblásticas se trataron con progesterona, RU486 o con control positivo durante 24 h. Luego se las incubó en ausencia o presencia de VIP durante 30 min., se realizó el ensayo de fagocitosis con perlas de látex y el análisis por citometría de flujo. La figura muestra un ejemplo representativo de 3 experimentos realizados en las mismas condiciones.

remodelación tisular y neoangiogénesis requerida para la formación de la interfase materno-placentaria. Esta respuesta inflamatoria fisiológica inicial debe ser controlada estrictamente a través de la activación de circuitos inmunes redundantes, hacia una respuesta materna tolerogénica. Dado que el VIP es un neuropéptido capaz de afectar múltiples circuitos inmunológicos induciendo efectos antiinflamatorios y tolerogénicos en varios modelos in vivo e in vitro y que la progesterona también presenta efectos tolerogénicos, en este trabajo nos preguntamos cómo ambos mediadores modulan la función de las células trofoblásticas.

Los resultados obtenidos indican que, por un lado, disminuye la producción de mediadores inflamatorios involucrados en la implantación embrionaria como nitritos, COX-2 y MMP9, y por el otro, incrementa la expresión de ambos receptores de VIP (VAPC1 y VPAC2). A su vez, el VIP regula el balance de mediadores pro/antiinflamatorios y de células T efectoras Th1/T reguladoras favoreciendo una respuesta tolerogénica (22). Estos resultados nos sugieren que, por un lado, la progesterona tiene efectos directos y, por el otro, indirectamente amplifica los efectos del VIP, así sus propiedades antiinflamatorias y tolerogénicas.

Uno de los procesos más relevantes durante el período periimplantatorio es la fagocitosis. Así el desarrollo y la función normal de la placenta dependen de la diferenciación e invasión del trofoblasto: sus células proliferan y se diferencian para formar la interfase entre la madre y el embrión; mientras que otras células trofoblásticas invaden la decidua remodelando los vasos de la pared uterina a arterias espiraladas para acomodar la expansión del tejido extraembrionario y aumentar el flujo sanguíneo (23). Un alto y permanente recambio o *turn-over* de células endoteliales y epiteliales que involucran procesos de apoptosis ocurre a medida que avanza la gestación. La remoción de cuerpos apoptóticos es crítica para prevenir el rechazo del feto y las células trofoblásticas como los macrófagos deciduales son las principales células que ejercen esa función fagocítica. Estos últimos adquieren un perfil de activación alternativo que lleva a que el proceso de fagocitosis sea antiinflamatorio (23).

La fagocitosis en sí misma es un proceso complejo que requiere señales específicas y lleva a diversos eventos como la endocitosis de distintas partículas, la muerte de microorganismos y la producción de inmunomoduladores de la respuesta inmune. La consecuencia del proceso de fagocitosis varía dependiendo el propósito: nutricional, remodelación o protección. La fagocitosis no solamente es una función primaria de células fagocíticas profesionales como células dendríticas, macrófagos y granulocitos, sino también otros tipos celulares, como las células trofoblásticas (24,25).

Particularmente el proceso de fagocitosis por células trofoblásticas es de gran relevancia ya que conecta e integra estos tres objetivos en procesos como la implantación embrionaria y la placentación.

La actividad fagocítica de las células trofoblásticas, no solamente contribuye a la invasión, sino que está implicada en la nutrición del embrión (alimentación histiotrófica) previamente a la placentación. Más allá de las limitaciones de la alimentación histiotrófica, la capacidad fagocítica de las células trofoblásticas durante la gestación es fundamental para la remoción de debris en

la interfase materno-fetal en varias especies. En humanos existen claras evidencias de la presencia de células deciduales necróticas en las vacuolas fagosomales en células citotrofoblásticas (25).

En este trabajo pudimos observar que la progesterona modula la esferositosis en células trofoblásticas, lo que sugiere que a nivel local, la progesterona no solamente contribuiría a modular la producción de mediadores inflamatorios y de los receptores del VIP, sino también a la remoción fisiológica de cuerpos apoptóticos y así a la homeostasis tisular.

#### Agradecimientos

El presente estudio fue realizado con fondos otorgados a RR (UBACyT 2012-2015), a CPL (UBACyT 2011-2014 y PICT 2011-0144 de ANPCyT), y a MA la beca de Maestría de UBA. También agradecemos al Dr. Gil Mor que gentilmente nos cedió la línea celular trofoblástica Swan-71.

#### Referencias

1. Mor G, Cardenas I. The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63:425-33.
2. Paria B, Reese J, Das S, Dey S. Deciphering the cross talk of implantation: advances and challenges. *Science.* 2002;296:2185-8.
3. Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Mor G. Inflammation and implantation. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63:17-24.
4. Koga K, Aldo PB, Mor G. Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response. *J Obstet Gynaecol Res.* 2009;35:191-202.
5. Weiss G, Goldsmith LT, Taylor RN, Bellet D, Taylor HS. Inflammation in reproductive disorders. *Reprod Sci.* 2009;16:216-29.
6. Couvineau A, Laburthe M. VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *Br J Pharmacol.* 2012;166:42-50.
7. Onoue S, Misaka S, Yamada S. Structure-activity relationship of vasoactive intestinal peptide (VIP): potent agonists and potential clinical applications. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2008;377:579-90.
8. Jovanovic S, Grbovic L, Jovanovic A. Pregnancy does not alter the response of uterine arteries to vasoactive intestinal polypeptide. *Mol Hum Reprod.* 2000;6:361-68.
9. Spong C, Lee S, Mcune S, Gibney G, Abebe D, Alvero R, Breneman E, Hill G. Maternal regulation of embryonic growth: the role of vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology.* 1999;140:917-24.

10. Lim MA, Stack CM, Cuasay K, Stone MM, McFarlane HG, Waschek JA, Hill JM. Regardless of genotype, offspring of VIP-deficient female mice exhibit developmental delays and deficits in social behavior. *Int J Dev Neurosci.* 2008;26:423-34.
11. Larocca L, Hauk V, Calafat M, Roca V, Fraccaroli L, Franchi A, Ramhorst R, Pérez Leiros C. Modulation of macrophage inflammatory profile in pregnant nonobese diabetic (NOD) mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;333:112-8.
12. Pérez Leirós C, Ramhorst R. Tolerance induction at the early maternal-placental interface through selective cell recruitment and targeting by immune polypeptides. *Am J Reprod Immunol.* 2013;69:359-68.
13. Fraccaroli L, Alfieri J, Larocca L, Calafat M, Roca V, Lombardi E, Ramhorst R, Leirós CP. VIP modulates the pro-inflammatory maternal response, inducing tolerance to trophoblast cells. *Br J Pharmacol.* 2009;156:116-26.
14. Fraccaroli L, Alfieri J, Larocca L, Calafat M, Mor G, Pérez Leirós C, Ramhorst R. A potential tolerogenic immune mechanism in a trophoblast cell line through the activation of chemokine-induced T cell death and regulatory T cell modulation. *Hum Reprod.* 2009;24:166-75.
15. Mesiano S, Wang Y, Norwitz ER. Progesterone Receptors in the Human Pregnancy Uterus: Do they Hold the Key to Birth Timing? *Reproductive Sciences.* 2005;18:6-19.
16. Bischof P, Irminger-Finger I. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:1-16.
17. Tuckey RC. Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta.* 2005;26:273-81.
18. Morelli MB, Barberi M, Gambardella A, Borini A, Ceconi S, Cotichio G, Canipari R. Characterization, Expression, and Functional Activity of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors in Human Granulosa-Luteal Cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:4924-32.
19. Marzioni D, Fiore G, Giordano A, Nabissi M, Florio P, Verdenelli F, Petraglia F, Castellucci M. Placental Expression of Substance P and Vasoactive Intestinal Peptide: Evidence for a Local Effect on Hormone Release. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2005;90:2378-83.
20. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Alvero A, Aldo PB, Ma Y, Mor G. The isolation and characterization of a novel telomerase immortalized first trimester trophoblast cell line, Swan 71. *Placenta.* 2009;30:939-48.
21. Fraccaroli L, Grasso E, Hauk V, Cortelezzi M, Calo G, Pérez Leirós C, Ramhorst R. Defects in the vasoactive intestinal peptide (VIP)/VPAC system during early stages of the placental-maternal leucocyte interaction impair the maternal tolerogenic response. *Clin Exp Immunol.* 2012;170:310-29.
22. Straszewski-Chavez S, Abrahams V, Mor G. The Role of Apoptosis in the Regulation of Trophoblast Survival and Differentiation during Pregnancy. *Endocrine Reviews.* 2005; 26:877-97.
23. Fest S, Aldo PB, Abrahams VM, Visintin I, Alvero A, Mor G. Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2007;57:55-66.
24. Bevilacqua E, Hoshida MS, Amarante-Paffaro A, Albieri-Borges A, Gomes SZ. Trophoblast phagocytic program: roles in different placental systems. *Int J Dev Biol.* 2010;54:495-505.
25. Hata T, Ohkawa K, Tomamita M, and Kishino M. Phagocytosis of human cytotrophoblast cell invading into decidual tissue in early stage of gestation. *Acta Obstet Gynaecol Jpn.* 1981;33:537-44.