



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de
linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la
gestación: Potencial implicancia en la protección del parto
prematuro***

Tesista: Valeff, Natalin

Director/a: Jensen, Federico

Codirector/a: Docena, Guillermo

Año: 2021

Agradecimientos

Como dijo el célebre pensador Sergio Valeff al obtener el premio de la Sociedad Médica de La Plata en su tan extenso y hermoso discurso, parado frente a la multitud expectante, esbozó un sincero:

“Realmente, gracias”

Y se fue...

En este momento, voy a ser un poquito más extensa que mi padre.

Me sobran las palabras de agradecimiento para toda la gente linda que me acompañó durante este difícil y a la vez muy feliz camino. Voy a resumir agradeciendo por bulk y en orden pues no puede ser de otra manera:

En primer lugar, a los que me enseñaron, pusieron su esfuerzo y dedicación en darme una mano, para que hoy pueda llegar a enviar esta Tesis: Mi director y mis compañeros del CEFYBO.

A los que me bancaron por las noches llegando tarde con una birra en la mano para alivianar esos experimentos fallidos: Mis amigos, la familia que elijo todos los días.

Mención especial entre ellos: a mi compa del doctorado, de trenes, de mates, de subtes, de charlas y noches de citómetro. La que siempre tenía la respuesta o mil posibles formas de averiguarla, a Mari, mi luz y referente en este camino de ciencia.

A mi familia, que sin ellos yo no sería quién soy. Sin su ayuda, no hubiese y experimentado todas las cosas lindas que me pasaron estos últimos años. Gracias, SON TODO.

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata fue realizado en el Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO, UBA-CONICET) bajo la dirección del Dr. Federico Jensen y la codirección del Dr. Guillermo Docena. El presente trabajo de Tesis se ha llevado a cabo gracias al financiamiento nacional PRH-2014-0011; PIP2012-2014:11220110100061, PICT 2016 N°201-0151.

PUBLICACIONES

Splenic B1 B cells acquire a proliferative and anti-inflammatory profile during pregnancy in mice. Natalin Jimena Valeff, María S Ventimiglia, Marcos Dibo, Udo Rudolf Markert and Federico Jensen. *Front Immunol.* 2021 Dec 7. In revision.

B cells acquire a unique and differential transcriptomic profile during pregnancy. Valeff N, Muzzio DO, Matzner F, Dibo M, Golchert J, Homuth G, Abba MC, Zygmunt M, Jensen F. *Genomics.* 2021 Jul;113(4):2614-2622. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.06.016. Epub 2021 Jun 9. PMID: 34118379.

Expression of IL-33 Receptor Is Significantly Up-Regulated in B Cells During Pregnancy and in the Acute Phase of Preterm Birth in Mice. Valeff N, Juriol L, Quadrana F, Muzzio DO, Zygmunt M, Quiroga MF, Ventimiglia MS, Jensen F. *Front Immunol.* 2020 Mar 27; 11:446. doi: 10.3389/fimmu.2020.00446. PMID: 32292403; PMCID: PMC7118206.

Probiotic Lactobacillus kefir prevents endotoxin-induced preterm birth and stillbirth in mice. Silvia Ventimiglia M, **Jimena Valeff N**, Pozo Albán M, Manuel Paturlanne J, Juriol L, Quadrana F, Cecotti M, Malamud M, Javier Dibo M, de Los Ángeles Serradell M, Jensen F. *Reproduction.* 2021 May 10;161(6):657-667. doi: 10.1530/REP-20-0642. PMID: 33835045.

Characterization of murine amniotic fluid B cells in normal pregnancy and in preterm birth. Bommer I, Juriol L, Muzzio D, **Valeff N**, Ehrhardt J, Matzner F, Ziegler K, Malinowsky K, Ventimiglia MS, Zygmunt M, Jensen F. *Reproduction.* 2019 Oct;158(4):369-376. doi: 10.1530/REP-19-0150. PMID: 31454783.

CONTRIBUCIONES A CONFERENCIAS CIENTÍFICAS

B cells acquire a unique and differential transcriptomic profile during pregnancy in mice (e-Poster). Annual Meeting of the Argentine Immunology Society (SAI), 2020. Argentina.

Is B Cell Receptor signaling pathway affected during pregnancy in mice? A transcriptomic response (Poster). LVII Annual Meeting of the Argentine Immunology Society, 2019. Tucuman, Argentina.

Differential gene expression of the B Cell Receptor (BCR) signaling pathway during pregnancy in mice (Poster). IMMUNOLOGY 2019, AAI annual Meeting, 2019. San Diego, California, United States.

B cells expressing il-33 receptor are expanded in the acute phase of preterm birth (Poster). Annual Meeting of the Argentine Society of Immunology (SAI), 2018. Mar del Plata-Buenos Aires, Argentina.

o IL-33 receptor (ST2) expression on B cells during pregnancy and preterm birth (Poster). 5th European Congress of Immunology 2018, Amsterdam, Holland.

o IL-33 receptor expression is significantly up-regulated on B cells during pregnancy (Poster). II Joint Meeting of Bioscience Societies, 2017. Buenos Aires, Argentina.

o Amniotic fluid contains fetal immature B-lymphocytes capable to give rise in vitro to fully competent B cells (Poster). LXI Annual Meeting of the Argentine Society of Clinical Investigation (SAIC), LXIV Annual Meeting of the Argentine Society of Immunology (SAI) and the XLVIII Annual Meeting of the Argentine Society of Experimental Pharmacology (SAFE), 2016. Mar del Plata-Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Durante la preñez en los mamíferos, el sistema inmune materno enfrenta un doble dilema: debe ser capaz de, simultáneamente tolerar la presencia del feto semialogénico, generando mecanismos que eviten su rechazo, al tiempo que conserva capacidad de activación para enfrentar agentes infecciosos. Esto requiere el desarrollo de adaptaciones inmunológicas temporales y finamente reguladas que involucran tanto al sistema inmune innato como adaptativo. En este sentido se conoce que el compartimento de los linfocitos B (LB) experimenta profundas modificaciones durante la gestación, que involucran tanto cambios en su ontogenia como en la distribución de las principales poblaciones y funciones de estas. Con el fin de mejorar nuestra comprensión acerca de los mecanismos moleculares que regulan estas modificaciones transitorias descritas en LB durante la gestación, se evaluó en profundidad, por medio de un gene-array, el perfil transcriptómico completo de LB aislados de bazo de ratones hembra preñados P (P) y no preñados (NP). El análisis *in silico* demostró que 1136 genes presentan una expresión diferencial (ED) (625 regulados al alza y 511 regulados a la baja) en LB de ratones P respecto a ratones control NP. De modo de entender el significado biológico de la expresión diferencial de genes (EDGs) observada, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional, el cual mostró que la mayoría de los genes regulados a la baja pertenecían a vías de señalización que regulan la activación de los LB a través de su receptor (BCR); el procesamiento/presentación de antígenos y la activación independiente de LT a través de segundas señales (TLRs, BAFFR). Por otro lado, se observó también en los LB de ratones hembra P un patrón de expresión de genes (factores de transcripción) idénticos al descrito como potenciales marcadores de LB

reguladores, una población de LB con fuerte capacidad inmunosupresora. Los resultados del análisis del gene-array sugirieron que los LB de ratones P adquieren una menor capacidad de activación que los LB de ratones NP, por lo cual a continuación evaluamos la producción de citoquinas pro y anti-inflamatorias por parte de LB provenientes de ambos grupos estimulados in vitro con lipopolisacárido (LPS). Observamos que LB de ratones P producen niveles significativamente menores de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), citoquina pro-inflamatoria, frente al desafío con LPS comparado a LB de ratones NP. Así mismo, se observó un aumento en la producción de la citoquina anti-inflamatoria interleuquina 10 (IL-10), el cual se ve reflejado únicamente en la población linfocitaria de la zona marginal del bazo (MZ). Estos resultados acompañan a los anteriores en la suposición de que, durante la preñez, los LB adquieren un perfil inmunosupresor, reaccionando de manera anti-inflamatoria ante un estímulo inflamatorio como lo es el LPS.

Por otro lado, el análisis funcional, adicionalmente mostró un aumento en la expresión de ARNm de genes que corresponden a vías relacionadas con el ciclo celular y la replicación del ADN. Estudios de citometría de flujo en LB esplénicos confirmaron un aumento del marcador de proliferación ki-67, en la población celular de Linfocitos B1 (LB1) del bazo de ratones P respecto de ratones NP. Así mismo, se observó una mayor proporción de LB1 esplénicos acompañados de una menor producción de TNF- α y mayor producción de IL-10 por parte de estos, en ratones P. Al mismo tiempo, esta población presentó una menor expresión en su superficie del marcador CD1d en ratones P, el cual se relaciona con una mayor producción de anticuerpos naturales por parte de LB, respecto de ratones NP. La producción de anticuerpos sin aparente estímulo antigénico ha sido un tema de constante estudio en el contexto del embarazo. Previamente se ha

demostrado que existe un aumento de la producción de anticuerpos naturales por parte de LB durante la preñez, así como de anticuerpos asimétricos, cuya función es el bloqueo de aloantígenos fetales. En este sentido, se ha relacionado fuertemente la acción del factor bloqueante inducido por progesterona (PIBF) en la producción de estos anticuerpos, esenciales para la preñez y cuyos niveles se ven afectados en gestaciones que no llegan a término. Más aún, se ha demostrado recientemente, en un modelo murino de parto prematuro (PP), que la mucosa uterina libera interleuquina IL-33 (IL-33) ante un estímulo inflamatorio la cual induce la producción de PIBF por parte de LB presentes en la interface materno fetal, restaurando de este modo la homeostasis inmunológica y evitando el desencadenamiento del PP. La interleuquina-33 (IL-33) es una alamina asociada a las mucosas, que pertenece a la familia de citoquinas IL-1. En situaciones de estrés, la misma desempeña un rol clave tanto en la inmunidad innata como adaptativa, contribuyendo a mantener la homeostasis de los tejidos. Además, se conoce que funciona como un regulador positivo que inicia y mantiene una respuesta inmune de tipo Th2. La IL-33 actúa a través de su receptor (ST2) el cual, dentro del compartimento de LB, se expresa preponderantemente en la sub-población de LB1. De manera interesante, nuestro análisis del gene-array mostró un aumento significativo en los niveles de ARNm del receptor de IL-33 (*Il1rl1*) en LB de ratones P comparado a NP, los cuales fueron confirmados a nivel proteico (ST2). Un análisis más profundo mostró que la expresión de ST2 se encuentra significativamente aumentada en LB1 esplénicos y de la cavidad peritoneal de ratones P respecto de ratones NP. Adicionalmente, observamos que los LB1 provenientes de ambos tejidos, exhiben una cinética particular de expresión de este receptor, durante distintas etapas de la gestación. Se observó un marcado aumento de la expresión de ST2 en LB1 esplénicos, en los días 12 y 14 de la

gestación, y luego disminuye hacia el final de la gestación a los niveles observados en animales no gestantes. No se observó una relación directa en la modulación de la expresión de ST2 en LB respecto a factores hormonales (estrógeno y progesterona), aunque sí se ve afectada su expresión en LB por la presencia de aloantígenos paternos. Finalmente, utilizando un modelo murino de PP inducido por LPS puesto a punto durante mi trabajo de tesis doctoral, observamos que los niveles de LB1 esplénicos que expresan ST2 aumentan significativamente durante la fase aguda del PP, comparado con ratones hembra con gestaciones normales. Se demostró, además, que los LB1-ST2⁺ esplénicos presentan una respuesta anti-inflamatoria en respuesta al LPS, demostrada por una mayor producción de IL-10 y menor producción de TNF- α analizados por citometría de flujo. De manera interesante, se observó también un aumento significativo del número de LB deciduales que expresan ST2⁺ durante la fase aguda de inducción del PP.

En resumen, nuestros resultados sugieren que los LB de ratones P adquieren un perfil tolerogénico e hiporreactivo. Es razonable pensar que estos cambios son inducidos en el compartimento de LB de modo de facilitar la tolerancia de los aloantígenos presentes en el feto. Sin embargo, nos permiten también entender mejor y explicar desde un punto de vista inmunológico la mayor susceptibilidad a ciertas infecciones características de las mujeres gestantes. Adicionalmente, buscamos enfatizar el rol fundamental de los LB1-ST2⁺ en la protección de la gestación. La caracterización de esta población en un modelo de preñez, así como en el PP, refuerzan su especial importancia como componentes necesarios para una preñez exitosa.

ABREVIATURAS

<i>ADN</i>	<i>ácido desoxirribonucleico</i>
<i>ADNc</i>	<i>ADN complementario</i>
<i>ALO</i>	<i>apareamiento alogénico</i>
<i>ARNm</i>	<i>ácido ribonucleico mensajero</i>
<i>Bregs</i>	<i>linfocitos B reguladores</i>
<i>dpg</i>	<i>día post-gestación</i>
<i>EtOH</i>	<i>Etanol</i>
<i>IL-10</i>	<i>interleuquina 10</i>
<i>IL-17</i>	<i>interleuquina 17</i>
<i>IL-33</i>	<i>interleuquina 33</i>
<i>LB</i>	<i>linfocitos B</i>
<i>LB FO</i>	<i>linfocitos B foliculares</i>
<i>LB MZ</i>	<i>linfocitos B de la zona marginal del bazo</i>
<i>LB1</i>	<i>linfocitos B1</i>
<i>LPS</i>	<i>Lipopolisacárido</i>
<i>LT</i>	<i>linfocitos T</i>
<i>MO</i>	<i>médula ósea</i>
<i>NP</i>	<i>ratones hembra no preñados</i>
<i>NTC</i>	<i>non-template controls</i>
<i>P</i>	<i>ratones hembra preñados</i>
<i>pb</i>	<i>pares de bases</i>
<i>PBS</i>	<i>buffer fosfato salino</i>
<i>PFA</i>	<i>para-formaldehído</i>
<i>PIBF</i>	<i>factor bloqueante inducido por progesterona</i>
<i>PN</i>	<i>parto normal</i>
<i>PP</i>	<i>parto prematuro</i>

INDICE

Parte I

1	Introducción I	1
1.1	Inmunología de la preñez.....	1
1.2	Linfocitos B	4
1.2.1	Linfocitos B1	4
1.2.2	Linfocitos B2	6
1.2.3	Linfocitos B reguladores.....	7
1.2.4	Mecanismos de activación de LB.....	8
1.2.4.1	Activación de los LB a través de su receptor (BCR)	9
1.2.5	LB como células presentadoras de antígeno.....	11
1.2.1	LB como células productoras de citoquinas	14
1.3	LB y preñez.....	15
1.3.1	LB2 y preñez.....	16
1.3.2	LB1 y preñez.....	18
1.3.3	Bregs y preñez.....	19
2	Hipótesis I.....	22
3	Objetivos I	23
3.1	Objetivo general:	23
3.1.1	Estudiar el perfil transcriptómico de los LB en la preñez de ratón	23
3.2	Objetivos específicos	23
3.2.1	Determinar el perfil transcriptómico y las modificaciones en ARNm en ratones preñados, respecto de ratones no preñados.....	23

3.2.2	<i>Evaluar el impacto de las modificaciones transcripcionales sobre la capacidad de respuesta inmune y la activación de los LB en ratones preñados, respecto de ratones no preñados.....</i>	23
4	<i>Resultados I.....</i>	24
4.1	<i>Análisis transcriptómico en LB.....</i>	24
4.1.1	<i>Expresión diferencial de ARNm en LB durante la preñez.....</i>	24
4.1.2	<i>Análisis de Ontología Génica y vías de señalización enriquecidas</i>	25
4.1.3	<i>Análisis de los transcritos regulados a la baja</i>	26
4.1.4	<i>Análisis de la expresión relativa de ARNm por qPCR de genes seleccionados</i>	35
4.1.5	<i>Análisis de los transcritos regulados al alza en LB de ratones preñados</i>	37
4.1.6	<i>Análisis del estado proliferativo de LB</i>	43
4.1.6.1	<i>Ciclo celular con IP.....</i>	43
4.1.6.2	<i>Análisis de la distribución de las principales poblaciones de LB en el bazo de ratones preñados</i>	45
4.1.6.3	<i>Expresión de Ki-67</i>	47
4.1.7	<i>Expresión del marcador CD1d en LB1</i>	51
4.1.8	<i>Análisis de activación de LB esplénicos durante la preñez: producción de citoquinas.....</i>	52
4.1.9	<i>Bregs</i>	57
4.1.9.1	<i>Producción de IL-10 por subpoblaciones de linfocitos B</i>	59
5	<i>Discusión I.....</i>	62

Parte II

1	Introducción	69
1.1	Regulación de la respuesta inmune materna durante la preñez (hormonas y aloantígenos)	69
1.2	Parto prematuro	70
1.3	Acción de la señalización a través del receptor de IL-33 en respuesta a infecciones/inflamación durante el embarazo	72
2	Hipótesis	75
3	Objetivo.....	76
3.1	Objetivos específicos:	76
3.1.1	Caracterizar la expresión del receptor de IL-33 (ST2) en LB en ratones P comparado con ratones NP.	76
3.1.2	Investigar los potenciales mecanismos que regulan la expresión del receptor de IL-33 (ST2) durante la preñez en LB.....	76
3.1.3	Caracterizar la expresión del receptor de IL-33 (ST2) en LB provenientes de un modelo murino de parto prematuro.	76
4	Resultados.....	77
4.1	Expresión del receptor de IL-33 (ST2) en LB de ratones P comparado con ratones NP.	77
4.1.1	Niveles de expresión relativa de ARNm de <i>Il1rl1</i> en LB de ratones P comparado con ratones NP	77
4.1.2	Expresión del receptor de IL-33 (ST2) en LB de ratones P comparado con ratones NP por citometría de flujo.....	78
4.1.3	Sub-poblaciones de LB esplénicos que expresan el receptor de IL-33	82

4.1.4	<i>Expresión de ST2 en LB de la cavidad peritoneal.....</i>	<i>86</i>
4.1.5	<i>Expresión de ST2 en LB provenientes de ganglios para-aórticos</i>	<i>90</i>
4.2	<i>Cinética de expresión del receptor de IL-33 durante distintas etapas de la gestación</i>	<i>92</i>
4.2.1	<i>Cinética de expresión del receptor de IL-33 en LB1 esplénicos</i>	<i>93</i>
4.2.2	<i>Cinética de expresión del receptor de IL-33 en LB1 peritoneales.....</i>	<i>94</i>
4.3	<i>Mecanismos que regulan la expresión del receptor de IL-33 durante la preñez</i>	<i>94</i>
4.3.1	<i>Rol de las hormonas sexuales femeninas, estradiol y progesterona, en la regulación diferencial de la expresión del receptor de IL-33 en LB.....</i>	<i>95</i>
4.3.2	<i>Incidencia de los aloantígenos presentes en el feto sobre la expresión del receptor de IL-33 en LB.....</i>	<i>96</i>
4.4	<i>Caracterización del receptor de IL-33 en los LB en un modelo murino de parto prematuro.....</i>	<i>100</i>
4.4.1	<i>Modelo murino de parto prematuro:</i>	<i>100</i>
4.4.1.1	<i>Características macroscópicas.....</i>	<i>103</i>
4.4.1.2	<i>Modificaciones celulares en PP</i>	<i>104</i>
4.4.2	<i>Expresión del receptor ST2+ en LB1 esplénicos durante la fase aguda del parto prematuro.....</i>	<i>106</i>
4.4.3	<i>Expresión del receptor ST2+ en LB1 de la cavidad peritoneal durante la fase aguda del parto prematuro</i>	<i>107</i>

4.4.4	<i>Expresión del receptor ST2+ en LB provenientes de ganglios para-aórticos durante la fase aguda del parto prematuro.....</i>	<i>108</i>
4.4.5	<i>Expresión del receptor ST2+ en LB deciduales durante la fase aguda del parto prematuro.....</i>	<i>109</i>
4.4.6	<i>Características funcionales de los LB que expresan el recetor de IL-33 (ST2+)</i>	<i>111</i>
5	<i>Discusión.....</i>	<i>114</i>
6	<i>Materiales y métodos.....</i>	<i>118</i>
6.1	<i>Modelos animales:.....</i>	<i>118</i>
6.1.1	<i>Modelo de Preñez Alogénica (ALO):</i>	<i>119</i>
6.1.2	<i>Correcto desarrollo de la preñez:.....</i>	<i>119</i>
6.2	<i>Aislamiento magnético de LB a partir de Bazo:</i>	<i>120</i>
6.2.1	<i>Pureza de los linfocitos los LB obtenidas por aislamiento magnético</i>	<i>121</i>
6.3	<i>Aislamiento de ARN total</i>	<i>122</i>
6.4	<i>Procesamiento del gene-array</i>	<i>122</i>
6.5	<i>Procesamiento de datos del gene-array y análisis estadístico.....</i>	<i>123</i>
6.6	<i>Enriquecimiento funcional e interpretación biológica</i>	<i>124</i>
6.7	<i>Diseño de primers:</i>	<i>124</i>
6.8	<i>Aislamiento de ARN y síntesis de ADN complementario.....</i>	<i>127</i>
6.9	<i>Cuantificación de la expresión relativa de ARNm mediante qPCR.....</i>	<i>127</i>
6.10	<i>Aislamiento de esplenocitos totales.....</i>	<i>128</i>
6.11	<i>Análisis de fases del ciclo celular por citometría de flujo</i>	<i>128</i>

6.12	<i>Análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo en Bazo</i>	129
6.13	<i>Análisis de proliferación en subpoblaciones de LB mediante la inmuno marcación con Ki-67.....</i>	130
6.14	<i>Análisis de la producción de citoquinas por las poblaciones celulares B ...</i>	131
6.15	<i>Análisis del marcador CD1d en subpoblaciones de LB de bazo:</i>	131
6.16	<i>Análisis de la expresión del receptor de IL-33 por citometría de flujo en Bazo</i>	132
6.17	<i>Aislamiento e inmuno marcación de células del ganglio linfático para-aórtico</i>	133
6.18	<i>Aislamiento e inmuno marcación de células del peritoneo.....</i>	134
6.19	<i>Capacidad de las hormonas sexuales femeninas, estradiol (E2) y progesterona (P4), de modular la expresión del receptor de IL-33 en LB.</i>	134
6.20	<i>Incidencia de los antígenos semi-alogénicos presentes en el feto sobre la expresión del receptor de IL-33 en LB durante la gestación.....</i>	135
6.21	<i>Modelo de Parto Prematuro (PP).....</i>	136
6.22	<i>Determinación de la expresión del receptor de IL-33 en LB en un modelo de parto prematuro</i>	136
6.23	<i>Aislamiento e inmuno marcación de leucocitos deciduales</i>	137
6.24	<i>Determinación del perfil inmunológico de LB que expresan el receptor de IL-33</i>	138
6.25	<i>Análisis estadístico</i>	139
7	<i>Bibliografía.....</i>	140

8	<i>Anexo 1</i>	151
---	----------------------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Parte I

<i>Figura 4.1.1.1 Heatmap mostrando genes expresados de manera diferencial (DEGs) en linfocitos B aislados de ratones hembras preñados (P) y no-preñados (NP).</i>	25
<i>Figura 4.1.2.1. Análisis GO-ORA: procesos biológicos.</i>	26
<i>Figura 4.1.3.1. GO-ORA. Procesos biológicos asociados con la respuesta inmune en células B de ratones P en comparación con animales NP.</i>	27
<i>Figura 4.1.3.2 PA-ORA. Vías de señalización asociadas con la respuesta inmune.</i>	29
<i>Figura 4.1.4.1. Niveles de expresión relativa de ARNm de genes involucrados en la señalización a través del receptor de linfocitos B (BCR). Expresión relativa de ARNm de genes seleccionados evaluados por RT-qPCR en linfocitos B de ratones preñados (P) y no-preñados (NP).</i>	36
<i>Figura 4.1.4.2. Análisis de correlación de Pearson entre los datos de array y qPCR.</i>	37
<i>Figura 4.1.5.1 GO-ORA. Procesos biológicos sobre-representados en transcritos regulados al alza en ratones P comparado con ratones NP.</i>	38
<i>Figura 4.1.5.2 PA-ORA. Vías de señalización sobre-representadas en transcritos regulados al alza en ratones P comparado con ratones NP.</i>	40
<i>Figura 4.1.6.1.1 Estrategia de gating utilizada determinar las fases del ciclo celular en LB esplénicos de ratones P comparado con ratones NP.</i>	44
<i>Figura 4.1.6.1.2 Análisis estadístico de las fases de ciclo celular.</i>	45
<i>Figura 4.1.6.2.1 Estrategia de gating utilizada determinar las poblaciones de LB esplénicos de ratones P comparado con ratones NP.</i>	46

<i>Figura 4.1.6.2.2 Porcentaje de LB1 (CD19+B220low/neg) y LB2 (CD19+B220high) esplénicos de ratones P comparado con ratones NP.</i>	47
<i>Figura 4.1.6.3.1 Estrategia de gating utilizada determinar la expresión de ki-67 en las poblaciones celulares B.</i>	49
<i>Figura 4.1.6.3.2 Análisis estadístico de la expresión de ki-67 sobre las subpoblaciones de LB (B220+) durante la preñez.</i>	50
<i>Figura 4.1.6.3.3 Análisis estadístico del porcentaje de LB1 (B220lowCD23-CD21-) durante la preñez.</i>	51
<i>Figura 4.1.7.1. Análisis estadístico del porcentaje de expresión (A) y MFI (B) de CD1d en LB1.</i>	52
<i>Figura 4.1.8.1 Análisis estadístico de la producción de TNF-α en los LB totales (B220+) esplénicos de ratones P comparado a ratones NP.</i>	54
<i>Figura 4.1.8.2 Análisis estadístico de la producción de IL-17 en los LB totales (B220+) durante la preñez.</i>	55
<i>Figura 4.1.8.3 Análisis estadístico de la producción de TNF-α en subpoblaciones de LB esplénicos de ratones P y NP, estimulados con LPS.</i>	56
<i>Figura 4.1.8.4 Análisis estadístico de la producción de IL-17 en subpoblaciones de LB esplénicos provenientes de ratones P y NP, estimulados in vitro con LPS.</i>	57
<i>Figura 4.1.9.1.1 Análisis estadístico de la producción de IL-10 en los LB totales (B220+) durante la preñez.</i>	60
<i>Figura 4.1.9.1.2 Análisis estadístico de la producción de IL-10 en subpoblaciones de LB esplénicos de ratones P y NP, estimulados con LPS.</i>	61

Parte II

Ilustración 1.3.1 Modelo propuesto de protección mediada por células B

coriodesciduales contra PP a través de la expresión de PIBF1 inducida por IL-33... 74

Figura 4.1.1.1. Niveles de expresión relativa de ARNm de Il1r1 en LB..... 78

Figura 4.1.2.1 Estrategia de gating de la expresión de ST2 en LB totales. 79

Figura 4.1.2.2. Análisis de la expresión de ST2 en LB esplénicos de ratones P comparado con ratones NP. 80

Figura 4.1.2.3 Histograma representativo de la medida de intensidad de fluorescencia del marcador de ST2 en LB (B220+). 81

Figura 4.1.2.4. Análisis estadístico del MFI de ST2 en LB esplénicos. 81

Figura 4.1.3.1 Estrategia de gating utilizada para cuantificar el porcentaje de LB Foliculares (FO), de la zona marginal del bazo (MZ) y LB1 que expresan ST2 en su superficie celular. 83

Figura 4.1.3.2 Análisis estadístico de la expresión de ST2 sobre las subpoblaciones de LB (B220+) durante la preñez. 85

Figura 4.1.3.3. Análisis estadístico de la expresión de ST2 sobre las subpoblaciones de LB (B220+) de ratones P comparado con ratones NP. 86

Figura 4.1.4.1. Estrategia de gating utilizada para evaluar la expresión de ST2 en LB (CD19+) peritoneales de ratones P comparado con ratones NP. 87

Figura 4.1.4.2. Análisis de la expresión de ST2 en LB (CD19+) peritoneales de ratones P comparado con ratones NP. 88

Figura 4.1.4.3. Estrategia de gating utilizada para evaluar la expresión de ST2 en LB1 (CD19+CD5+) de ratones P comparado con ratones NP. 89

<i>Figura 4.1.4.4. Análisis de la expresión de ST2 en LB1 peritoneales de ratones P comparado con ratones NP.</i>	90
<i>Figura 4.1.5.1. Estrategia de gating utilizada para evaluar la expresión de ST2 en LB2 provenientes de ganglios para-aórticos durante la gestación.</i>	91
<i>Figura 4.1.5.2. Análisis del porcentaje de la expresión de ST2 en LB provenientes de ganglios para-aórticos, de ratones P comparado con ratones NP.</i>	92
<i>Figura 4.2.1.1. Análisis de la cinética de expresión de ST2 en subpoblaciones de LB esplénicos en diferentes días gestacionales.</i>	93
<i>Figura 4.2.2.1 Análisis del porcentaje de LB1 provenientes de la cavidad peritoneal, que expresan el receptor de IL-33 (ST2) en diferentes días gestacionales.</i>	94
<i>Figura 4.3.1.1. Influencia de las hormonas sexuales femeninas sobre la expresión de ST2 en LB1 esplénicos. A. Porcentaje de LB1 (CD19+B220^{low}) que expresan ST2 ante la estimulación con E2</i>	96
<i>Figura 4.3.2.1. Influencia de la presencia de aloantígenos sobre LB1 esplénicos.</i>	97
<i>Figura 4.3.2.2 Análisis del porcentaje de LB1 esplénicos que expresan el receptor de IL-33 (ST2) en diferentes días gestacionales. P</i>	98
<i>Figura 4.3.2.3 Influencia de la presencia de aloantígenos sobre de LB peritoneales.</i>	99
<i>Figura 4.3.2.4 Influencia de la presencia de aloantígenos sobre de LB de ganglios para-aórticos. A.</i>	99
<i>Ilustración 4.4.1.1. Esquema del modelo murino de parto prematuro.</i>	101
<i>Figura 4.4.1.1.1. Características macroscópicas.</i>	103
<i>Figura 4.4.1.2.1 Análisis estadístico del peso de bazo de ratones hembra PN comparado con ratones hembra PP.</i>	104

<i>Figura 4.4.1.2.2 A. Análisis del número total de células en tejidos estudiados durante PP.....</i>	<i>105</i>
<i>Figura 4.4.2.1 Análisis del porcentaje de subpoblaciones de LB1-ST2 esplénicos durante el PP.</i>	<i>106</i>
<i>Figura 4.4.3.1 Análisis del porcentaje de LB1 peritoneales que expresan ST2 durante el PP.....</i>	<i>107</i>
<i>Figura 4.4.4.1 Análisis del porcentaje de LB totales que expresan el receptor de ST2 provenientes de ganglios para-aórticos durante el PP.</i>	<i>108</i>
<i>Figura 4.4.5.1 Estrategia de gating utilizada para cuantificar el porcentaje de LB deciduales que expresan el receptor de IL-33 en su superficie celular (B-ST2+)...</i>	<i>110</i>
<i>Figura 4.4.5.2 Análisis de la expresión de ST2 en LB totales provenientes de decidua durante el PP.</i>	<i>111</i>
<i>Figura 4.4.6.1.</i>	<i>112</i>
<i>Figura 4.4.6.2. Porcentaje de LB-totales ST2+ productores de citoquinas pro y anti-inflamatorias durante la gestación.</i>	<i>113</i>
<i>Figura 4.4.6.3. Porcentaje de LB1-ST2+ productores de citoquinas pro y anti-inflamatorias durante la gestación.</i>	<i>114</i>
<i>Figura 6.2.1.1 Estrategia de gating utilizada para cuantificar la pureza de los LB obtenidos a partir del aislamiento magnético a partir de esplenocitos totales. ...</i>	<i>121</i>

ÍNDICE DE TABLAS

Parte I

<i>Tabla 4.1.3.1. Análisis GO-ORA.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabla 4.1.3.2. Análisis de enriquecimiento de vías de señalización.</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 4.1.3.3. Lista detallada de los genes pertenecientes a la vía de señalización del receptor de linfocitos B.</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 4.1.3.4. Lista detallada de genes significativamente modificados en linfocitos B de ratones preñados (P) comparado a ratones no-preñados (NP) involucrados en la activación y presentación antigénica</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 4.1.6.1 Análisis GO-ORA. Lista detallada de los procesos biológicos sobrerrepresentados en transcritos regulados al alza en ratones P comparado con ratones NP..</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 4.1.9.1. Genes específicos regulados en B_{regs} de ratón.....</i>	<i>58</i>

Parte II

<i>Tabla 4.4.1.1. Dosis de LPS utilizadas en la inducción del parto prematuro.</i>	<i>102</i>
---	------------

Materiales y Métodos

<u><i>Tabla 6.2.1.1. Secuencia de primers.....</i></u>	<u><i>126</i></u>
--	-------------------

Parte I

***“Estudio transcriptómico de linfocitos B en ratones
preñados”***

1 *Introducción I*

1.1 *Inmunología de la preñez*

La gestación en los mamíferos representa una paradoja inmunológica, ya que los mecanismos clásicos de protección frente a antígenos extraños deberían generar el rechazo del embrión semialogénico. Sin embargo, el sistema inmune materno sufre adaptaciones que le permiten tolerar los aloantígenos paternos presentes en el feto, sin perder su capacidad de respuesta frente a infecciones. En 1953 Sir Peter Medawar y Ruppert Billingham (1,2) postularon una serie de hipótesis destinadas a explicar este fenómeno:

- El sistema inmune materno es inerte y el útero es un sitio inmunológicamente privilegiado.
- La placenta representa una barrera anatómica entre la madre y el feto.
- El embrión no es inmunogénico.

Los mismos iniciaron el camino del conocimiento hacia lo que hoy representa la inmunología de la gestación. Actualmente se conoce que diferentes componentes celulares del sistema inmune materno reaccionan ante el encuentro con péptidos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) paterno, lo que desestima el postulado de un sistema inmune materno inerte. En este sentido, luego del coito e incluso antes de que el proceso de fertilización tenga lugar, células presentadoras de antígenos (CPA)

maternas presentes en el tracto reproductor femenino inferior, reconocen, fagocitan y procesan antígenos paternos presentes en el eyaculado y migran hacia los órganos linfáticos donde presentan estos antígenos a los linfocitos T (LT) vírgenes, los cuales adoptan un perfil regulador (T_{regs}) (3). Así mismo, y en contraposición a lo postulado, el útero alberga una gran cantidad de células inmunes (NK, macrófagos, granulocitos), esenciales para los procesos de implantación y placentación (4,5). La producción de citoquinas, factores de crecimiento, así como de otras moléculas por parte de las mismas, regulan la invasión del trofoblasto, el remodelado de las arterias espiraladas uterinas y la consecuente formación de la placenta (6–8). Durante este proceso se establece un contacto directo entre células trofoblásticas extravelosas fetales (EVT), células del sistema inmune materno y células del estroma decidual (células endometriales especializadas), modificando el preconcepto de la placenta como una barrera anatómica. Más aún, en este sitio de contacto estrecho entre la circulación materna y fetal, especializado en el intercambio de nutrientes y gases, se desencadenan mecanismos de tolerancia inmune (7). El citotrofoblasto expresa en su superficie dos moléculas del MHC de clase Ib no clásicas (HLA-E y HLA-G) que difieren de las encontradas en la superficie de la mayoría de las células (MHC de clase Ia)(9), así como proteínas reguladoras del complemento (CD46, CD55, CD59), demostrando ser inmunogénico (10–12). Las mismas generan inmunosupresión, disminuyendo la citotoxicidad de células asesinas naturales (NK) y LT CD8⁺ e induciendo la diferenciación a fenotipos reguladores de diferentes tipos celulares maternos como células dendríticas tolerogénicas (CD_t), Bregs, Tregs y macrófagos (M2) (13,14). Sumado a esto, el tejido

placentario expresa moléculas tales como Indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), el ligando de muerte programada (PD-L1), el factor de crecimiento transformante (TGF- β) y el factor bloqueante inducido por progesterona (PIBF), las cuales suprimen la acción del sistema inmune materno, contribuyendo al cambio desde un perfil Th1 hacia un perfil Th2. Estos factores en su conjunto, inducen la producción de citoquinas inhibitorias como la interleuquina 10 (IL-10), por parte de los linfocitos B y T, responsables de la tolerancia periférica hacia el feto (15,16). Un embarazo exitoso, se asocia a una polarización hacia un perfil anti-inflamatorio del tipo Th2 que domina casi la totalidad de la gestación (17–20). En cambio, la prevalencia de fenotipos pro-inflamatorios tipo Th1 y Th17, así como la presencia de niveles elevados de IL-17 o TNF- α están asociados a diferentes patologías del embarazo, como abortos recurrentes (21,22), retraso de crecimiento intrauterino (23) , pre-eclampsia (24,25) y parto prematuro (26). Si bien los mecanismos de respuesta modulados por el sistema inmune materno favorecen la tolerancia fetal, pueden exponer a la madre a contraer ciertas infecciones (27). De hecho, las mujeres embarazadas se ven más gravemente afectadas por infecciones con ciertos patógenos en comparación con mujeres no embarazadas (28,29). En este sentido, siendo los linfocitos B (LB) componentes responsables de la respuesta humoral serán objeto de estudio en toda esta tesis.

1.2 Linfocitos B

Los LB son componentes esenciales del sistema inmune adaptativo cuya función más reconocida es mediar la respuesta inmune humoral. Esta respuesta es llevada a cabo a través de la producción de anticuerpos por parte de células especializadas (células plasmáticas y plasmoblastos), desarrolladas a partir de la activación y diferenciación de LB maduros (30). Por otra parte, los LB cumplen un rol fundamental en el desarrollo de la respuesta inmune celular. En diferentes contextos, son capaces de captar, procesar y presentar antígenos a LT, permitiendo así la posterior activación y diferenciación de los mismos (31–33). Sumado a esto, producen una amplia gama de citoquinas, función dependiente de su estado de activación, diferenciación, así como el microambiente inmune circundante (34). Estas características les permiten orquestar y modular la magnitud de la respuesta inmune e incluso inducir la tolerancia inmunológica.

Los LB representan una población celular heterogénea que puede ser dividida, según su ontogenia y localización anatómica, en dos grupos: los LB1 y los LB2 (30).

1.2.1 Linfocitos B1

Los LB1 se originan principalmente durante el desarrollo embrionario, a partir de precursores presentes en el saco vitelino y posteriormente en el hígado fetal (35–37).

En la vida adulta, su número se mantiene por proliferación celular. Recientemente se ha postulado que también es posible, si bien en menor escala, la generación *de novo* de LB1, a partir de precursores que se mantienen en la médula ósea (38). En ratón, residen mayoritariamente en las cavidades peritoneal y pleural (39,40), aunque existe un porcentaje pequeño de los mismos que se alojan en el bazo (41). Los LB1 presentan características de células activadas y un fenotipo particular, con baja expresión del receptor CD45, marcador celular pan-B (CD45R o B220) y la ausencia del receptor de baja afinidad para IgE (CD23). En base a la expresión del marcador de superficie CD5 se pueden distinguir dos sub-poblaciones de LB1: los LB1-a, los cuales expresan CD5 (B220^{lo}CD23⁻CD5⁺), y los LB1-b que carecen de la expresión de este marcador (B220^{lo}CD23⁻CD5⁻) (39,42). La expresión de CD5 en este grupo celular confiere la capacidad de auto renovarse mediante un mecanismo dependiente de la producción autócrina de IL-10 (43,44). En cuanto a su funcionalidad, se ha descrito que los LB1-a producen naturalmente IgM, IgA e IgG3 sin necesidad de un estímulo antigénico, los llamados "anticuerpos naturales" (ANs) (45). Estos anticuerpos pueden dirigir la neutralización de patógenos, inducir activación del complemento, la citotoxicidad mediada por células NK y la eliminación de células apoptóticas. A pesar de que los mecanismos responsables de la producción natural de anticuerpos por parte de LB1 no están completamente dilucidados, recientemente se ha demostrado que estaría asociado a una disminución en la expresión de la molécula CD1d en LB1, la cuál es responsable de la presentación de antígenos lipídicos a células NKT, y que actúa como represora de la producción de ANs (46). Los LB1 cumplen un papel fundamental en la

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

homeostasis tisular, gracias a su capacidad de reconocer y asociarse a diversos epítomos bacterianos, así como de eliminar de células apoptóticas, evitando el desarrollo de un proceso inflamatorio.

1.2.2 Linfocitos B2

A diferencia de los LB1, los LB2 son producidos exclusivamente durante la vida postnatal, a partir de precursores presentes en la médula ósea y posteriormente migran al bazo donde continúan su maduración. En el bazo los estadios transicionales inmaduros T1-T2 se diferencian a dos poblaciones con función, localización y fenotipo diferente: los LB foliculares (FO) y de la zona marginal del bazo (MZ) (47–49). En general, los LB FO son importantes para las respuestas T-dependientes, mientras que se cree que los LB MZ tienen un papel predominantemente en las respuestas independientes de LT y la presentación de antígenos lipídicos a las LT asesinas naturales invariantes (iNKT). Los LB MZ se caracterizan fenotípicamente por la expresión en su superficie de los receptores del complemento (CD21 y CD35) y la molécula CD1d similar al MHC de clase 1. Estas características definen el fenotipo específico de las células MZ: B220⁺CD23^{low/neg}CD21^{high}CD1d^{high}. De manera similar a los LB1, los linfocitos MZ reconocen antígenos de carbohidratos y fosfolípidos, y expresan altos niveles de receptores de tipo Toll (50). Finalmente, los LB foliculares (FO: B220⁺CD23⁺CD21^{low/neg}CD1d^{mid}) están involucrados en la respuesta humoral T-

dependiente clásica y presentan un repertorio de inmunoglobulinas más diverso. Los mismos reconocen una amplia variedad de antígenos proteicos y orquestan una respuesta inmune altamente específica mediante procesos estrictamente controlados (50). La interacción de los LB FO con los LT colaboradores foliculares puede generar la diferenciación a células plasmáticas de vida corta, una respuesta extrafolicular o la entrada al centro germinal (CG), dependiendo de la concentración del antígeno y la avidéz del BCR por el mismo, así como el microambiente inmune circundante. Una vez en el centro germinal, experimentan sucesivos ciclos de proliferación y maduración de la afinidad, cambio de isotipo de Ig e hipermutación somática, diferenciándose hacia células plasmáticas de larga vida, responsables de la producción de anticuerpos específicos y/o LB de memoria, cruciales en la protección frente a posteriores infecciones (51).

1.2.3 *Linfocitos B reguladores*

En los últimos años se ha descrito la existencia de una nueva población de LB con características fenotípicas y funcionales particulares, los denominados LB reguladores (B_{regs}). A pesar de que se han descrito varios fenotipos, tanto en humano como en ratón, la característica diferencial de esta población es la producción de IL-10. Los B_{regs} son capaces de regular la acción de las LT NK, monocitos y LTh1/Th17 mediante la producción de interleuquina-10 (IL-10), interleuquina-35 (IL-35) y el factor de

crecimiento transformante β (TGF- β)(52). Son capaces de promover el desarrollo de LT reguladores (T_{regs}), de suprimir la diferenciación de LT vírgenes hacia perfiles efectores: $CD8^+$ y $CD4^+$, así como de inhibir la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IFN- γ , TNF- α and IL-17) por parte de estos últimos (34,53). Se conoce también, que desempeñan un papel fundamental en ciertas enfermedades autoinmunes (esclerosis múltiple, artritis reumatoide o lupus eritematoso), infecciones, así como en la tolerancia frente a trasplante de órganos sólidos (34,54,55). Más recientemente se ha descrito su participación en los mecanismos tolerogénicos esenciales para el correcto desarrollo de la preñez (56–59).

1.2.4 Mecanismos de activación de LB

El desarrollo, la supervivencia y la activación de los LB están gobernados por señales recibidas a través de su receptor de membrana (BCR). La unión del antígeno al BCR promueve dos procesos fundamentales: la señalización intracelular y la internalización, procesamiento y presentación antigénica (60). La señalización a través del BCR desencadena diferentes procesos como la producción de anticuerpos, proliferación, producción de citoquinas y colaboración B-T. La activación de los LB genera diferentes tipos de respuesta según la naturaleza del antígeno. Antígenos proteicos inducen una respuesta B dependiente de la colaboración con LT colaboradores foliculares (LT_{hf}). Esta respuesta está caracterizada por la producción de anticuerpos específicos con cambio

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

de isotipo, por parte de células plasmáticas y la diferenciación a LB de memoria. Por otro lado, la activación de los LB sin la cooperación de los LT_{HF} se denomina independiente de los LT (TI). Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como polisacáridos o lipopolisacárido (LPS), son responsables de este tipo de respuesta. Unidades de epítipo repetitivas, permiten el entrecruzamiento de múltiples BCR, proporcionando la primera señal de activación TI. Debido a que los LT no están involucrados, la segunda señal debe provenir de otras fuentes, como interacciones de receptores tipo Toll (TLRs) con PAMPs, la activación del receptor BAFF (BAFFR) o interacciones con factores del sistema del complemento. La activación B de tipo TI está caracterizada por una respuesta corta, donde los LB experimentan una proliferación clonal y las células hijas se diferencian en células plasmáticas productoras de IgM.

1.2.4.1 Activación de los LB a través de su receptor (BCR)

El BCR es una estructura molecular compleja formada por cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina (Ig) de membrana, unidas a un heterodímero de (CD79): $Ig\alpha\beta$ (61). Existen varias teorías sobre el mecanismo mediante el cual el BCR es activado posterior a la unión con el antígeno y es un tema que sigue en constante estudio. Se postula como primer modelo que existe un reordenamiento y las moléculas de BCR se agrupan en la superficie celular permitiendo la posterior cascada de señalización. Por otro lado, se postula que los multímeros de BCR ya existen como tales y que la unión con el antígeno

permite la disociación de estos, lo que inicia la señalización transmembrana Ilustración 1.2.1 (60,62–65). En ambos modelos se propone que el reordenamiento de los multímeros de BCR, expone los motivos de activación de tirosina (ITAMs) de la $Ig\alpha\beta$ intracelular, que logran ser fosforilados por quinasas específicas de las familias Src y Syk, la tirosina quinasa de bazo (Syk: spleen tyrosine kinase) (66). Una vez activada Syk induce la fosforilación de la proteína de unión a LB (Blnk: B cell linker protein), que actúa como un adaptador central en el ensamblado de múltiples moléculas de señalización (Btk, Grb2, Vav1), incluida la fosfolipasa C gamma 2 (PLC- γ 2) y CD19, iniciando la formación del signalosoma (67–70). Específicamente, la PLC- γ -2 modula la activación de vías río abajo del BCR mediante la formación de segundos mensajeros: Inositol-3-fosfato (IP3) y diacil-glicerol (DAG) (70,71). Por un lado, la producción de IP3 desencadena la movilización de calcio intracelular, a través del canal IP3R y las proteínas STIM, así como la entrada de calcio a través de los canales de membrana activados por Ca^{+2} : ORAI1 y CRAC (72–74). La entrada de calcio permite la activación del complejo CAM1-Calcineurim-NFAT e induce la translocación nuclear de NFAT1c, responsable de la producción de citoquinas y la proliferación de los LB (75–77). La producción de DAG dependiente de la activación de PLC γ 2 induce la activación de la proteína quinasa C (PKC), con la consecuente formación del signalosoma CBM: CARD11-BCL10-MALT 1, responsable de la activación de las vías NF- κ B. Las cascadas de señalización río abajo la formación del signalosoma, así como las vías de señalización de NF- κ B, NFAT y MAPK/ERK son puntos de control críticos que determinan el destino de los LB; así como

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

su estado de activación, proliferación y la consecuente producción de citoquinas y moléculas co-estimuladoras (78–81).

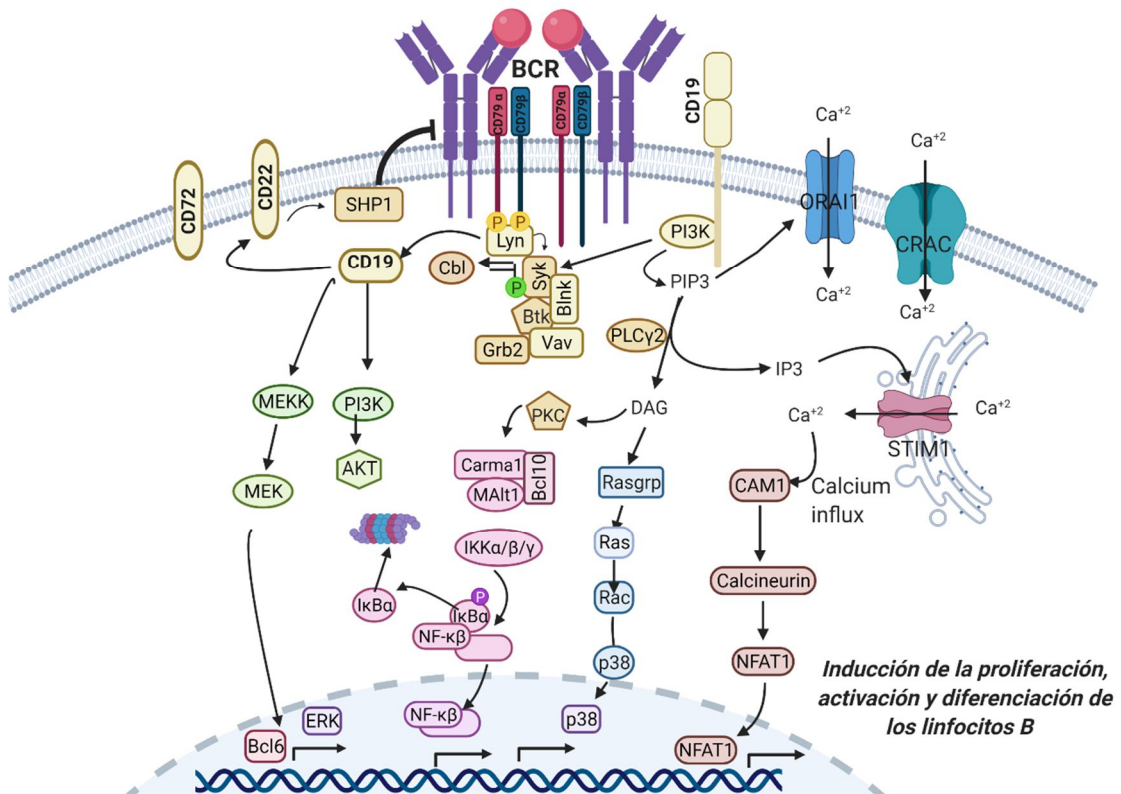


Ilustración 1.2.1. Vía de señalización del BCR (creado con biorender.com)

1.2.5 LB como células presentadoras de antígeno

La presentación de antígenos por parte de los LB requiere una maquinaria intracelular bien controlada, a menudo regulada por los efectos combinados de varios eventos moleculares. Los LB como células presentadoras de antígenos (CPA) pueden afectar la

función de los LT tanto de manera positiva como negativa, lo que lleva a la activación o tolerancia de las células T (31,82). La migración de los LB2 al folículo durante las primeras etapas de activación clásica está regulada por quimioquinas expresadas en la superficie celular B como CCR7 y por EB12, también conocido como receptor 183 acoplado a proteína G (32). Una vez ubicados en el borde B-T del folículo, los LB son capaces de presentar antígenos específicos a LT y de esta manera modular la activación de ambos tipos celulares (83). Los LB2 utilizan la vía de presentación del antígeno del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHCII), para presentar péptidos a los LT CD4⁺ activados (84,85). En esta vía participan proteínas especializadas (HLA-DO, HLA-DM) en procesar antígenos proteicos que son internalizados una vez unidos al BCR de manera específica (85). Segundas señales como ser la expresión en la superficie de los T colaboradores foliculares (Thf) de CD40L e ICOS, así como por producción de IL-10, IL-4 e IL-21 por parte de estos, permiten la activación completa de los LB (32). En este sentido, LB específicos para un antígeno actúan de manera eficiente como CPAs para conseguir, mediante la colaboración con los LT, una activación completa. A su vez, la presentación antigénica constante por parte de los LB es necesaria para el mantenimiento del CG y la supervivencia de los LTfh (86). Curiosamente, un BCR no funcional da como resultado un defecto en la activación de los LB2, así como también provoca fallas en la respuesta de las células T CD4⁺ de memoria(87). Se ha descrito el rol como CPA de los LB inmaduros, B1 o MZ con una menor eficiencia respecto a LB2, debido a la inespecificidad antigénica de los primeros(88). Sumado a esto, LB1 fallan en activarse a través del BCR posterior al encuentro con el antígeno, como un mecanismo

desarrollado evolutivamente, para mantener a los LB1 en un estado anérgico, evitando la auto reactividad (89–91). Sin embargo, en el contexto de determinadas infecciones, señales fuertes transitorias a través de TLRs y CD40 permiten a los LB1 ser activados (92). La estimulación de los TLR en las células B1 impacta en la respuesta de las células T a través no solo de la secreción de diversas citoquinas, sino también del aumento de la expresión del MHC-II, así como de varias moléculas coestimuladoras involucradas en la interacción de las células T-B: CD40, CD80, CD86. En este sentido, se demostró en determinadas condiciones, los LB1 tienen la capacidad de activar células T polarizándolas hacia fenotipos Th1/Th17, e incluso fallan en generar fenotipos de LT reguladores (93). Estas características de los LB1 son cruciales en el desarrollo de ciertas enfermedades autoinmunes, en las cuales presentan autoantígenos a los LT. Sin embargo, se ha demostrado que la presentación antigénica sostenida por parte de los LB1 de autoantígenos a los LT, genera en los últimos una polarización hacia perfiles tolerogénicos (88). Es importante destacar que sumado a la activación clásica en la cual los LB presentan antígenos a LT activados o de memoria, en los últimos años se ha descrito la acción de los LB como CPAs en ciertas infecciones, incluso ante la ausencia de CDs. En este sentido, se ha demostrado que los LB tienen la capacidad de activar células T CD4⁺ naive, actuando como CPA profesionales, incluso con una mayor efectividad que las CDs frente a ciertos patógenos como ser influenza A o *Plasmodium* (33). Este novedoso rol de los LB como CPA permite ampliar el panorama de pensamiento a la hora de enfocar el estudio de los LB en condiciones inmunológicas tan

intrincadas como lo son las enfermedades autoinmunes o el embarazo, e incluso abre nuevos interrogantes a la hora de pensar en el desarrollo de vacunas.

1.2.1 *LB como células productoras de citoquinas*

Finalmente, la plasticidad de los LB les permite actuar como células efectoras del sistema inmune, función que ha sido un campo de creciente estudio. Los mismos una vez activados, son capaces de producir y liberar un amplio rango de citoquinas pro y anti inflamatorias las cuáles, a su vez, modulan el desarrollo y curso de una respuesta inmune (94). El perfil de citoquinas secretadas dependerá de las características de la estimulación antigénica, pudiendo identificarse dos tipos de LB efectoras (LB_{ef}). Los LB_{ef1} inducen una respuesta de tipo Th1, liberando citoquinas pro-inflamatorias, entre ellas TNF- α , al ser estimulados a través del BCR y CD40 (95). Ante el encuentro con el antígeno, componentes bacterianos activan la vía canónica de NF- κ B, induciendo la producción de TNF- α por parte de los LB. La secreción de esta citoquina promueve la activación y proliferación de LT *naive*, la diferenciación de células primarias y de memoria Th1, así como el aumento de la producción de INF- γ por parte de LT CD4⁺ (96). En contraposición, la estimulación únicamente a través de CD40, induce la diferenciación hacia LB_{ef2} con la consecuente producción de citoquinas, de un perfil Th2, entre ellas IL-10 la potente citoquina anti-inflamatoria (97). Esta citoquina, con una

fuerte función inmuno-supresora, ha ganado importancia en los últimos años en el estudio de enfermedades autoinmunes, así como en la inmunología de la preñez.

Adicionalmente, ciertos LB ante la presencia de patógenos como ser *Trypanosoma cruzi*, se diferencian en células productoras de IL-17, con una producción de IL-17 incluso en mayor que las mismas células Th17, siendo esta una potente citoquina pro-inflamatoria (98).

En resumen, las células B pueden activarse y polarizarse en su función de producción de citoquinas de modo de ejercer un efecto pro o anti-inflamatorio, desempeñando un papel fundamental en el control de las respuestas inmunitarias del huésped.

1.3 LB y preñez

Durante el embarazo, los LB sufren profundos cambios en su ontogenia, distribución y función. Se ha demostrado que mujeres embarazadas presentan disminución del número de LB en sangre periférica (99). En modelos murinos, se demostró que existe una disminución de la linfopoyesis de LB en médula ósea (MO), regulada por la modificación en la concentración de estrógenos durante la gestación (100,101), y que afecta a la distribución de las principales poblaciones celulares B en la periferia. Recientemente, un estudio transcriptómico de las células inmunes provenientes de sangre periférica de mujeres embarazadas, ha demostrado que los LB presentan una

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

disminución moderada en la expresión de ARNm determinando un perfil transcriptómico único en el embarazo (102). Las modificaciones transcriptómicas observadas en los LB evidencian importantes cambios evolutivos. Forzado a tolerar los aloantígenos presentes en el feto, el sistema inmune materno desarrolla mecanismos de respuesta alternativos, a fin de asegurar la progenie.

1.3.1 LB2 y preñez

EL desarrollo de los LB2 sufre diversas modificaciones durante la gestación, las cuales comienzan en etapas tempranas. Se ha descrito una disminución gradual durante la gestación del número de precursores pre/pro B, así como de LB inmaduros presentes en médula ósea (MO) (100,101,103). En las etapas iniciales del desarrollo, los LB inmaduros se someten a un proceso de selección, a fin de prevenir el desarrollo posterior de células autorreactivas. Durante la gestación, aquellos clones de LB en MO cuyos receptores reconocen antígenos fetales, son eliminados mediante apoptosis (104). Adicionalmente, la disminución de la linfopoyesis en MO se traduce en una modificación de las poblaciones celulares B en la periferia. Durante su desarrollo, los LB inmaduros egresan de la MO hacia el torrente sanguíneo y al bazo donde culminan su maduración. Estudios en mujeres embarazadas demostraron que la gestación está asociada a una disminución en el número de LB totales en sangre periférica, que se traduce en una disminución de la población de LB transicionales (99). Una vez que arriban al bazo, los LB transicionales

(LB T1, T2) se diferencian principalmente hacia LB FO o MZ. Muzzio y col demostraron que en ratón, la gestación se ve asociada, además, a una disminución del número de LB esplénicos, reflejada en una disminución de los LB inmaduros que ingresan al bazo y de LB FO; mientras que el número de LB MZ se ve inalterada o aumentada (103,105). Adicionalmente, se observó una disminución en suero de los niveles de BAFF/Blys, factor esencial para el desarrollo de células B, así como también para la supervivencia de poblaciones transicionales B (T1) (105). Los LB FO no sólo permanecen en el bazo, sino que migran hacia diferentes tejidos donde al ser activados pueden diferenciarse en células plasmáticas de vida larga, así como en LB de memoria que posteriormente recirculan por el torrente sanguíneo. Estudios en humanos no mostraron una disminución en el porcentaje de LB naive, células plasmáticas o LB de memoria en sangre periférica de mujeres embarazadas, ni en su estado de activación (99,106). Sin embargo, existe durante la gestación un aumento de anticuerpos protectores, dirigidos contra los antígenos paternos, así como de anticuerpos asimétricos en suero (107–110). La producción de los mismos, necesarios para el correcto desarrollo de la gestación, estaría a cargo de LB provenientes de la interfase materno-fetal (111,112). En este sentido, estudios en ratón demostraron que la gestación induce una redistribución de las poblaciones B2, caracterizada por un aumento del número de LB en ganglios linfáticos que drenan el útero así como en decidua (103,113). De manera interesante, los LB encontrados en decidua presentan un fenotipo de memoria y de células plasmáticas cuyas características funcionales difieren completamente respecto de sus pares presentes en sangre periférica (113). Adicionalmente, se observa durante la

gestación un aumento transitorio de la producción de anticuerpos naturales (IgM, IgA, IgG₃) en suero

1.3.2 LB1 y preñez

Los LB1 han demostrado tener un rol dual en el contexto del embarazo. Por un lado, se ha descrito la participación fundamental de esta población celular en la fisiopatología de la pre-eclampsia, uno de los trastornos más recurrentes de la gestación. En este sentido, se observó que no solamente el número de LB1 se encuentra aumentado, sino que los mismos producen un auto-anticuerpo contra el receptor de tipo 1 de angiotensina II, el cual al unirse a su receptor, altamente expresado en la placenta, induce la liberación de factores anti-angiogénicos, que se relacionan con el comienzo de la enfermedad (114). Por otro lado, se conoce la capacidad de los LB1a de inducir la diferenciación de LT *naive* hacia perfiles pro-inflamatorios (Th1/Th17) y la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de los mismos (93,115). En este sentido, estudios en gestaciones normales de ratón han demostrado que existe un aumento en el porcentaje de LB1 provenientes de la cavidad peritoneal, los cuales no ponen en juego la estabilidad de la misma (103). Más aún, se ha demostrado que los LB1a, presentan además un perfil tolerogénico durante la gestación en ratón, siendo capaces de inhibir la diferenciación de LT *naive* hacia fenotipos inflamatorios Th17 o Th1 a través de un mecanismo que involucra la disminución en la expresión de la molécula co-estimuladora

CD86 (116). La activación y diferenciación T luego de la presentación antigénica, requiere una adecuada interacción de CD28 expresado en LT, con moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86) expresadas en la superficie de la CPA. Respecto a esto, una preñez normal se ve acompañada de una disminución en la expresión de CD86 en LB de ratón. En contraposición, alteraciones en la preñez están asociadas a una fuerte capacidad de los LB1a de inducir la diferenciación de LT *naive* hacia fenotipos pro inflamatorios (Th1/Th17), así como la producción de citoquinas pro inflamatorias (IL-2, TNF- α , INF- γ) por parte de los mismos(116).

Por otro lado, la gestación tanto en humanos como en ratón, está acompañada de un aumento en los niveles séricos de anticuerpos naturales del tipo IgA, IgM, IgG1 e IgG3 (103,106); y como se mencionó anteriormente, los linfocitos B1 son la fuente principal de los mismos. Adicionalmente, se demostró en un modelo murino de fallas en la gestación que existe una disminución de los niveles de ANs en suero respecto de preñeces normales (105). Los ANs, así como los LB1 resultan fundamentales para el correcto desarrollo de la gestación, ya que permiten resolver rápidamente un posible proceso inflamatorio que podría poner en riesgo la misma.

1.3.3 *Bregs y preñez*

Como se mencionó anteriormente, los linfocitos B reguladores (Bregs) se caracterizan por la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10. En el proceso del embarazo, ,

se ha demostrado un aumento tanto en el porcentaje de Bregs (CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺) como de los niveles séricos de IL-10 en mujeres que cursan gestaciones normales en el primer trimestre comparado a mujeres no gestantes o mujeres con abortos espontáneos (57). De acuerdo con esto, uno de los mecanismos de protección orquestados por los Bregs durante la gestación es crear un ambiente tolerogénico mediante la inhibición de células pro-inflamatorias, así como la disminución de la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de estas. En este sentido, se demostró que LB totales aislados de mujeres con embarazos normales estimulados in vitro con o sin CD40L/CpG, inductores de la producción de IL-10, suprimen la producción de TNF- α por parte de LT CD4⁺ activados, de la misma manera que los Bregs (CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺). En contraposición, LB aislados de sangre periférica de mujeres no embarazadas, fueron incapaces de inhibir la producción de TNF- α por parte de LT CD4⁺ activados, aun ante el estímulo de CD40L/CpG. Más aún, estudios a nivel local, han demostrado que los LB aislados de tejidos de la interfase materno-fetal (decidua) de mujeres cursando el primer y segundo trimestre de gestación adquieren la capacidad de producir grandes cantidades de IL-10, mayores que los LBregs obtenidos de sangre periférica e incluso sin estimulación previa. Los LB Bregs residentes de la decidua muestran un fenotipo único, pre-activado, específico de este tejido, debido a la interacción con las células fetales al comienzo de la gestación (113).

Por otro lado, utilizando un modelo murino de fallas en la preñez se ha demostrado que el número de Bregs se encuentra aumentado en el bazo de ratones hembra cursando preñeces normales, comparado con ratones hembra no preñadas y animales con fallas

en la preñez. Más aún, la transferencia adoptiva de células Bregs provenientes de ratones con preñeces normales en ratones con fallas en la preñez, es capaz de revertir este fenotipo a través de un mecanismo que involucra la producción de IL-10 (56). Adicionalmente, se ha demostrado el rol esencial de las Bregs en la protección contra el parto prematuro. Estudios en un modelo de parto prematuro en ratones deficientes de LB, demostraron que la transferencia adoptiva de Bregs y no así de LB deficientes de IL-10, es capaz de evita el desencadenamiento del parto prematuro inducido por LPS. En este modelo, la presencia de Bregs productoras de IL-10 en la decidua disminuye la producción de IL-17 e IL-6 e induce la diferenciación de LT hacia un fenotipo regulador (Tregs), lo que permite restaurar el balance inmune en la interfase materno-fetal (117).

2 Hipótesis I

Los LB se pueden considerar como células pleiotrópicas, cuyas funciones se extienden más allá de la presentación antigénica y la producción de anticuerpos. Actualmente, gracias a su capacidad de secretar diversas citoquinas y presentar antígenos a LT, han ganado importancia como moduladoras de la respuesta inmune. El embarazo representa un desafío para el sistema inmune materno, tanto en su rama innata como adaptativa. En este contexto, las modificaciones que sufren las diferentes subpoblaciones de LB durante este período resultan fundamentales para el correcto desarrollo de la gestación. Sin embargo, además de promover la tolerancia fetal, las modificaciones inmunitarias de la madre durante el embarazo pueden potencialmente comprometer la capacidad de defensa contra patógenos. En este sentido, hipotetizamos que deben de existir modificaciones transcripcionales que permitan explicar los cambios observados en las diferentes poblaciones de LB durante la preñez.

3 Objetivos I

3.1 Objetivo general:

3.1.1 Estudiar el perfil transcriptómico de los LB en la preñez de ratón

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Determinar el perfil transcriptómico y las modificaciones en ARNm en ratones preñados, respecto de ratones no preñados

3.2.2 Evaluar el impacto de las modificaciones transcripcionales sobre la capacidad de respuesta inmune y la activación de los LB en ratones preñados, respecto de ratones no preñados

4 Resultados I

4.1 Análisis transcriptómico en LB

Con el objetivo de evaluar la existencia de modificaciones transcripcionales en los LB en la preñez se realizó un gene-array en LB totales aislados de bazo (**Metodología 6.2; 6.3; 6.4**) de ratones P (**Metodología 6.1.1**) comparados con LB esplénicos de ratones NP.

4.1.1 Expresión diferencial de ARNm en LB durante la preñez

Los niveles de expresión de ARNm de cada uno de los transcritos reconocidos en el gene-array fueron analizados utilizando el paquete de R “limma” (eBayes, $p\text{-adj} < 0,01$; $FC > 1,5$) a partir del cual se determinaron los genes expresados de manera diferencial (DEGs) en ratones P comparado con ratones NP (**Metodología 6.5**).

A partir del análisis informático de los datos fue posible detectar 1136 transcritos específicos de genes expresados de manera diferencial en los LB de los ratones P en comparación con los ratones de control NP (**Figura 4.1.1.1**). De los mismos, 625 mostraron una expresión significativamente aumentada y 511 mostraron niveles disminuidos de expresión en ratones P respecto de ratones NP.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

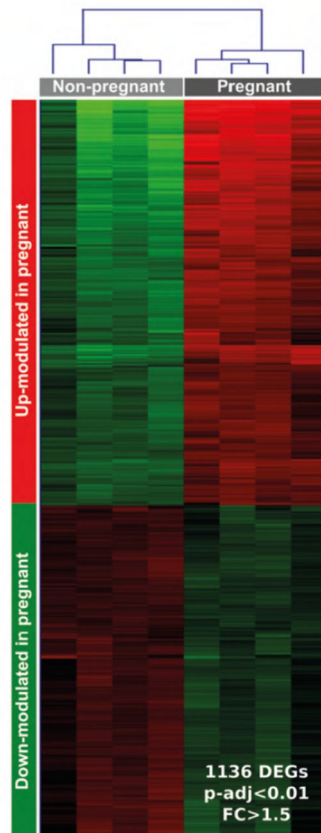


Figura 4.1.1.1 Heatmap mostrando genes expresados de manera diferencial (DEGs) en linfocitos B aislados de ratones hembra preñados (P) y no-preñados (NP). El análisis *in silico* mostró que existen 1136 genes expresados de manera diferencial en ratones preñados (P, n=4) comparado con ratones no-preñados (NP, n=4) controles (FC≈1.5, Limma eBayes test, p<0.0001, n=4).

4.1.2 Análisis de Ontología Génica y vías de señalización enriquecidas

Para comprender en mayor profundidad la importancia biológica de la expresión diferencial de ARNm observados en LB durante la preñez, se realizó un análisis de sobre-representación de ontología génica (GO-ORA) (**Metodología 6.6**). En un primer análisis se observó que existen procesos biológicos modulados, tanto al alza como a la baja, en LB de ratones P comparados con ratones NP como se muestra en la (**Figura 4.1.2.1**).

Dentro de los procesos biológicos que muestran un índice de cambio positivo durante la preñez, encontramos el ciclo celular y la replicación del ADN. De manera contraria, se observó que procesos involucrados en la respuesta inmune y traducción de señales muestran una modulación negativa durante la preñez.

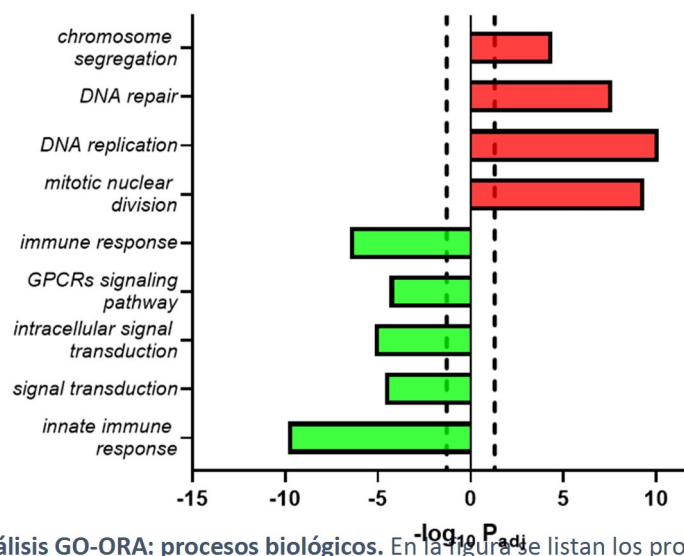


Figura 4.1.2.1. Análisis GO-ORA: procesos biológicos. En la figura se listan los procesos biológicos sobre-representados ($-\log_{10} P_{adj}$ -valor > 1.3) en LB de ratones preñados (P) comparado a ratones no-preñados (NP) (algoritmo hipergeométrico: FC > 1.5; corrección de prueba múltiple de BH, FDR < 0.05, n = 1136).

4.1.3 Análisis de los transcritos regulados a la baja

Posteriormente, se realizó un segundo análisis utilizando únicamente los genes regulados a la baja, implicados dentro de los procesos biológicos asociados a la respuesta inmune (**Metodología 6.6**). Tal como se muestra en la **Figura 4.1.3.1**, se observó una modulación negativa de procesos biológicos claves asociados con la funcionalidad de los LB como la diferenciación (GO: 0030183), activación (GO: 0042113)

y proliferación (GO: 0030890) en ratones P comparado con NP. Sumado a esto, como se observa en la **Figura 4.1.3.1**, procesos río abajo a la activación del BCR como ser la regulación positiva de la señalización I κ B/NF- κ B (GO:0043123), la regulación de la cascada de señalización de PIK3 (GO:0014068), el transporte de calcio (GO:0006816), también se mostraron disminuidos durante la preñez. Los genes implicados en cada una de las vías se muestran en la **Tabla 4.1.3.1**.

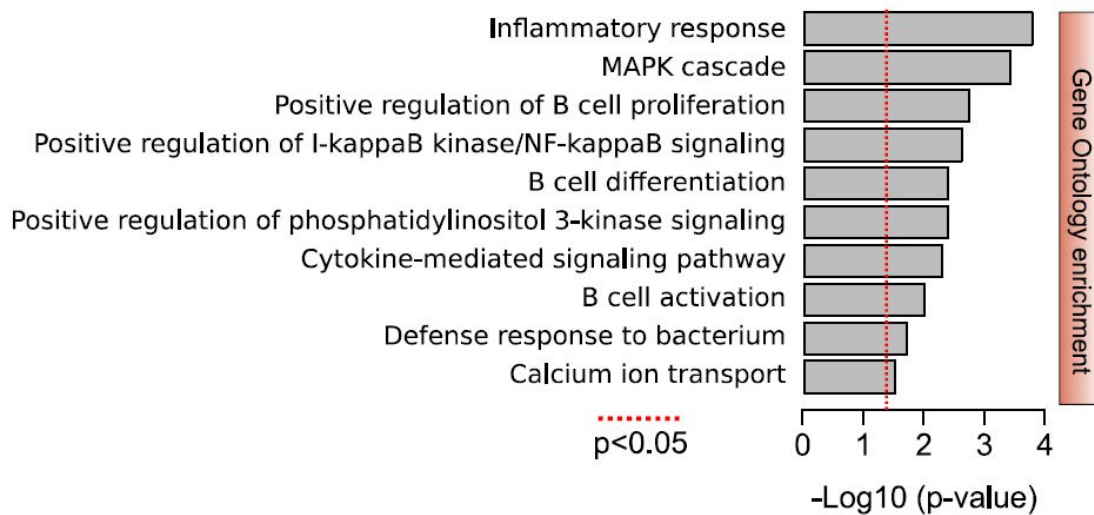


Figura 4.1.3.1. GO-ORA. Procesos biológicos asociados con la respuesta inmune en células B de ratones P en comparación con animales NP. Los procesos biológicos más significativos que mostraron una modulación negativa se ordenan por significancia estadística utilizando el valor de p $-\log_{10}$ (BH $p < 0,05$, cambios de veces (FC) $> 1,5$).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

Gene Enrichment	Ontology	GO Id	Source	$-\log_{10}(p)$	Gene Symbols
Inflammatory response		GO:0006954	biological process	3,7643	Aim2; Bcl6; Camk1d; Ccl5; Ccr7; Cela1; Ciita; Hck; Hdac9; Kit; Ncf1; Ndst1; NF-κBid; Pik3cd; Pxx; Themis2; Tlr1; Tlr9;
MAPK cascade		GO:0000165	biological process	3,4033	Ccl5; Itpkb; Lrrk2; Map3k3; Map3k8; Map4k1; Map4k2; Mapk11; Ndst1; Ptk2b;
Positive regulation of B cell proliferation		GO:0030890	biological process	2,7184	Bcl2; Bcl6; Card11; Cd38; Clcf1; Gpr183; Sash3; Tnfrsf13c;
positive regulation of I-kappaB kinase / NF-kappaB signaling		GO:0043123	biological process	2,6000	Card11; Cxxc5; Ect2; Flna; Gja1; MaLT 1; Map3k3; Nod1; Prkcb; Prkce; Rel; Sharpin; Shisa5; Slc44a2;
B cell differentiation		GO:0030183	biological process	2,3768	Bcl2; Bcl6; Clcf1; Gimap1; Hdac9; Hhex; Plcg2;
Positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling		GO:0014068	biological process	2,3768	Agap2; Cbl; Ccl5; Hcls1; Pik3ap1; Ptpn6; Sema4d;
Cytokine-mediated signaling pathway		GO:0019221	biological process	2,2889	Il10ra; Il10rb; Il21r; Il4ra; Il5ra; Irak3; Kit; Klf6; Ptpn6; Stat6;
B cell activation		GO:0042113	biological process	1,9891	Blnk; Cxcr5; Gapt; Hdac9; Hspd1; Ikzf3; MaLT 1; Pik3cd; Prkcb;
Defense response to bacterium		GO:0042742	biological process	1,6944	Elane; H2-M3; Irf8; Ncf1; Nod1; Prkcd; Syk; Tlr9;
Calcium ion transport	ion	GO:0006816	biological process	1,5129	Anxa6; Atp2a3; Atp2b4; Ccl5; Coro1a; Itpr3; Kcnn4; Nfatc1; Ppp3ca; Prkcb;

Tabla 4.1.3.1. Análisis GO-ORA. Lista detallada de procesos biológicos significativamente enriquecidos que mostraron un desequilibrio negativo en la expresión génica en LB de ratones preñados (P) comparado con ratones controles no-preñados (NP) (BH $p < 0,05$, (FC) $> 1,5$). El símbolo genético define los genes expresados diferencialmente involucrados en cada proceso biológico y el valor $-\log p$ se usa para clasificar por significancia estadística.

El análisis de sobre-representación de vías de señalización (PA ORA) mostró una sobre-representación en vías vinculadas a la respuesta humoral, moduladas de manera negativa, en los LB durante la preñez. De manera consistente con el análisis de GO-ORA, el PA-ORA demostró una regulación negativa en la vía de señalización del BCR y eventos

río abajo a la activación de esta (KEGG:790, REACTOME:19848) en ratones P comparado con ratones NP. Adicionalmente, las vías de procesamiento y presentación de antígenos (KEGG: 687), la señalización mediante citoquinas (REACTOME: 17370, KEGG 604) y las vías de receptores de tipo Toll (REACTOME: 18742) también se identificaron como moduladas de forma negativa en ratones P en comparación con controles NP (**Figura 4.1.3.2, Tabla 4.1.3.2**).

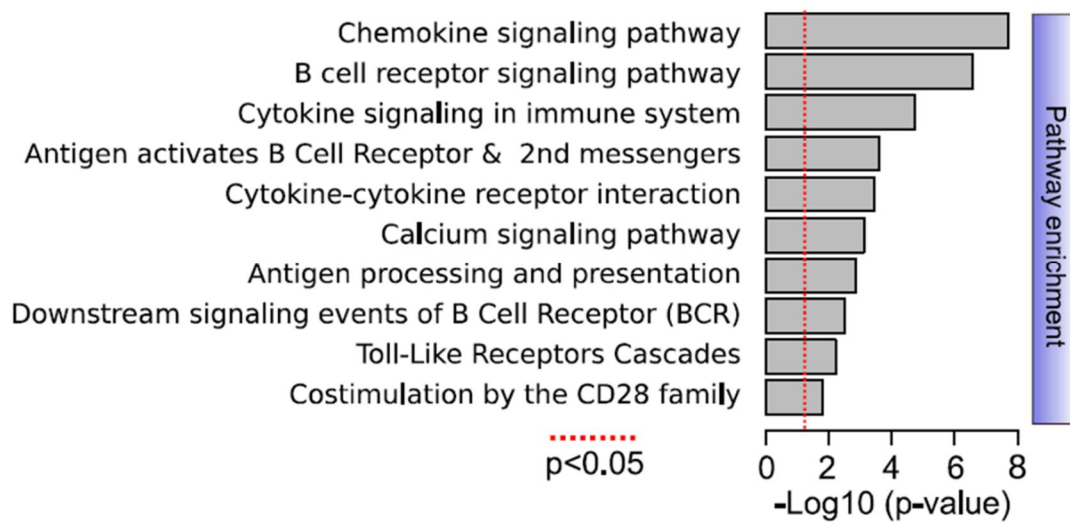


Figura 4.1.3.2 PA-ORA. Vías de señalización asociadas con la respuesta inmune. Las vías de señalización que mostraron una modulación significativamente menor en LB de ratones linfocitos B de ratones preñados (P) en comparación con animales no-preñados (NP) se ordenan por significancia estadística utilizando el valor de p $-\log_{10}$ (BH $p < 0,05$, FC $> 1,5$).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

Pathway Enrichment	Pathway Id	Source	$-\log_{10}(p)$	Gene Symbols
B cell receptor signaling pathway	790	KEGG	6,57193561	Blnk; Card11; Cd19; Cd22; Cd72; Ikbkb; MaLT 1; Nfatc1; NF- κ Bie; Pik3ap1; Pik3cd; Pik3r5; Plcg2; Ppp3ca; Prkcb; Ptpn6; Syk; Vav1;
Cytokine Signaling in Immune system	17370	REACTO ME	4,73953638	Blnk; Cbl; Cdk1; Ciita; H2-Ab1; H2-D1; Ikbkb; Il5ra; Irak3; Irf5; Irf8; Map3k3; Map3k8; Mt2; NF- κ B2; Nod1; Pik3cd; Prkcd; Ptk2b; Ptpn6; Syk; Ube2l6; Vav1;
Antigen activates B Cell Receptor (BCR) leading to generation of second messengers	16813	REACTO ME	3,60830961	Blk; Blnk; Cbl; Cd19; Itpr3; Pik3ap1; Pik3cd; Plcg2; Syk; Vav1;
Cytokine-cytokine receptor interaction	604	KEGG	3,44148689	Ccl5; Ccr6; Ccr7; Clcf1; Cxcr5; Epor; Il10ra; Il10rb; Il17ra; Il21r; Il4ra; Il5ra; Kit; LT b; Tgfbr2; Tnfrsf13c;
Calcium signaling pathway	667	KEGG	3,12799481	Atp2a3; Atp2b4; Cacna1i; Cd38; Itpkb; Itpr3; Orai2; Plcb2; Plcg2; Ppp3ca; Prkca; Prkcb; Prkx; Ptk2b; Vdac1;
Antigen processing and presentation	687	KEGG	2,87827049	Ciita; H2-Ab1; H2-D1; H2-DMA; H2-DMb2; H2-M3; H2-Ob; H2-Q6;
Downstream signaling events of B Cell Receptor (BCR)	19848	REACTO ME	2,51579515	Card11; Cd19; Cdkn1b; Foxo1; Gab1; Ikbkb; Kit; MaLT 1; NF- κ Bie; Pik3cd; Prkcb; Rasgrp1; Vav1;
Toll-Like Receptors Cascades	18742	REACTO ME	2,2182395	Cdk1; Dusp3; Ikbkb; Irak3; Mapk11; NF- κ B2; Nod1; Plcg2; Ppp2r1b; Tlr9; Ube2d1; Unc93b1;
Costimulation by the CD28 family	18551	REACTO ME	1,81862746	Csk; Grap2; H2-Ab1; Icosl; Map3k8; Ppp2r1b; Ptpn6; Vav1;

Tabla 4.1.3.2. Análisis de enriquecimiento de vías de señalización. Lista detallada de las vías de señalización sobrerrepresentados, significativas, que mostraron un desequilibrio negativo de la expresión génica en LB linfocitos B de ratones preados (P) comparado con ratones controles no-preñados (NP) (BH $p < 0,05$, (FC) $> 1,5$). El símbolo genético define los genes expresados diferencialmente involucrados en cada proceso biológico y el valor $-\log p$ se usa para clasificar por significancia estadística.

Al examinar en mayor profundidad la modulación de los genes estudiados, se observó que todos los genes modulados asociados a la vía de señalización del BCR mostraron un índice de cambio negativo (FC $< -1,5$). Se observó una disminución en la expresión del ARNm que codifica para la proteína SYK (Syk), esencial para el inicio de la respuesta a

través del BCR, en ratones P comparados con ratones control NP, Así mismo, se observó un índice de cambio negativo en los mensajeros que codifican proteínas responsables de la formación del signalosoma (Blnk, Vav1, Grap2, Cd19,). Adicionalmente, ratones P mostraron una disminución en el ARNm que codifica para la fosfolipasa gamma 2 (Plcg2) y las subunidades de la fosfatidil-inositol kinasa 3 (Pik3ap1, Pik3cd, Pik3r5) comparado a ratones NP. Las mismas son responsables de la formación de los segundos mensajeros: inositol-3-fosfato (IP₃) y diacil-glicerol (DAG) a partir de PIP₃, y la consecuente movilización de Ca⁺². La producción de IP₃ genera la activación de las vías NFAT (Card11, Malt1, Ppp3ca, Nfat1c). Por otro lado, la producción de DAG activa la proteína quinasa C (Prkca, Prkcb) y la consecuente inducción de la vía de señalización de NF-κB (Ikkba, Nfkbie). En este sentido, ratones P mostraron niveles disminuidos de ARNm, codificante de proteínas involucradas en las vías anteriormente mencionadas, con respecto a ratones NP (**Tabla 4.1.3.3**).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

<i>Gene accession</i>	<i>Gene Name</i>	<i>Description</i>	<i>Fold Change</i>
NM_008528	Blnk	B cell linker	-1,52001784
NM_175362	Card11	caspase recruitment domain family, member 11	-1,72849993
NM_007619	Cbl	Casitas B-lineage lymphoma	-1,51304456
NM_001033238	CbLB	Casitas B-lineage lymphoma b	-1,64299583
NM_009844	Cd19	chemokine (C-C motif) receptor 7	-1,75546527
NM_001043317	Cd22	CD200 antigen	-1,63235289
NM_001110320	Cd72	CD69 antigen	-1,64031816
NM_001289442	Grap2	GRB2-related adaptor protein	-1,61147352
NM_013542	Gzmb	granzyme A	-1,70607145
NM_010380	H2-D1	H2A histone family, member Z	-1,50081086
NM_010546	Ikkkb	immunoglobulin kappa variable 4-69	-1,51220747
NM_001253872	Itgal	interferon-stimulated protein	-1,56045978
NM_172833	MaLT 1	mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1	-1,58734844
NM_007746	Map3k8	mitogen-activated protein kinase 8	-1,53836009
NM_011161	Mapk11	mitogen-activated protein kinase 11	-1,96850812
NM_010746	Ncr1	natural cytotoxicity triggering receptor 1	-1,93763871
NM_001164109	Nfatc1	nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 1	-1,64267251
NM_008690	Nfkbie	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, epsilon	-1,61233934
NM_031376	Pik3ap1	phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1	-1,5650281
NM_001029837	Pik3cd	phosphatidylinositol 3-kinase catalytic deLT a polypeptide	-1,57345994
NM_177320	Pik3r5	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5, p101	-1,54642651
NM_172285	Plcg2	phospholipase C, gamma 2	-1,61322185
NM_001293622	Ppp3ca	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform	-1,51329054
NM_011101	Prkca	protein kinase C, alpha	-1,54072217
NM_008855	Prkcb	protein kinase C, beta	-1,76296048
NM_001162365	Ptk2b	PTK2 protein tyrosine kinase 2 beta	-1,62022134
NM_001077705	Ptpn6	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	-1,52950765
NM_011246	Rasgrp1	RAS guanyl releasing protein 1	-1,60456414
NM_001145858	Sh3bp2	SH3-domain binding protein 2	-1,58680029

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

NM_001198977	Syk	spleen tyrosine kinase	-1,58995112
NM_001163815	Vav1	vav 1 oncogene	-1,54165169

Tabla 4.1.3.3. Lista detallada de los genes pertenecientes a la vía de señalización del receptor de linfocitos B. Todos los genes modificados en la vía se encuentran significativamente down-regulados en linfocitos B de ratones preñados (P) en comparación con ratones no-preñados (NP). (n=4, p-adj. <0,01, Fold Change (FC) <-1,5).

Con respecto a la vía de procesamiento y presentación de antígenos, se observó una expresión significativamente menor de transcritos que codifican moléculas MHCII (H2-Ab1, H2-DMb2, H2-Dma y H2-Ob) en LB de ratones P comparado con ratones NP. Más importante aún, encontramos también que los niveles de expresión del mensajero del gen *Ciita*, un co-activador que no se une al ADN que sirve como el "factor de control maestro" para la expresión de MHCII (118) fue significativamente menor en las LB de ratones P en comparación con ratones NP.

Así mismo, genes involucrados en la activación de las LB dependiente de LT, como ser el receptor de quimiocinas CCR7 (*Ccr7*), (*Gpr183*), ICOSL (*Icosl*), mostraron niveles disminuidos en ratones P comparado a ratones NP. De la misma manera, se observó una disminución en el ARNm codificante de los receptores de citoquinas *il10ra*, *il10rb*, *il4r*, *il21r*, necesarias como co-señales en el proceso de activación TD, en LB aislados de hembras P comparadas con hembras control NP (**Tabla 4.1.3.4**).

Por otro lado, se observó una expresión significativamente menor de ARNm que codifican proteínas involucradas en la activación de LB por mecanismos independientes de LT como ser los transcritos que codifican para BAFFR (*Tnfrsf13c*), TLR9 (*Tlr9*, FC=-

1.75) y TLR1 (Tlr1, FC=-1,57), además de proteínas activadas río abajo de los mismos, en ratones P comparado con ratones NP (Tabla 4.1.3.4).

Gene accession	Gene Name	Description	Fold Change
NM_007719	Ccr7	chemokine (C-C motif) receptor 7	-1,717488174
NM_183031	Gpr183	G protein-coupled receptor 183	-1,549284364
NM_015790	Icosl	Icos ligand	-1,645090896
NM_008348	Il10ra	interleukin 10 receptor, alpha	-1,649813445
NM_008349	Il10rb	interleukin 10 receptor, beta	-1,502207924
NM_016671	Il4r	interleukin 4 receptor	-1,686168168
NM_021887	Il21r	interleukin 21 receptor	-1,596536426
NM_028075	Tnfrsf13c	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13c	-1,587705765
NM_031178	Tlr9	toll-like receptor 9	-1,758354926
NM_001276445	Tlr1	toll-like receptor 1	-1,576863565
NM_207105	H2-Ab1	histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1	-1,501584135
NM_010388	H2-DMb2	histocompatibility 2, class II, locus Mb2	-1,544492339
NM_010386	H2-DMa	histocompatibility 2, class II, locus Dma	-1,593817743
NM_010389	H2-Ob	histocompatibility 2, M region locus 3	-1,661189618
NM_001243760	Ciita,	class II transactivator	-1,677478604

Tabla 4.1.3.4. Lista detallada de genes significativamente modificados en linfocitos B de ratones preñados (P) comparado a ratones no-preñados (NP) involucrados en la activación y presentación antigénica (p-adj. <0,01, veces cambios (FC)> 1,5).

4.1.4 Análisis de la expresión relativa de ARNm por qPCR de genes seleccionados

A continuación, se seleccionaron genes representativos de las vías modificadas mencionadas previamente y se procedió a confirmar la expresión de estos mediante RT-qPCR. Para ello, se realizó el aislamiento magnético de LB de Bazo de ratones hembra C57BL/6 vírgenes y ratones hembra C57BL/6 en el día 14 de la gestación (**Metodología 6.2**). Posteriormente, se aisló de RNA total (**Metodología 6.3**), se generó la primera hebra de ADNc (**Metodología 6.8**) y se llevó a cabo la PCR semicuantitativa (**Metodología 6.9**). Observamos que los niveles de expresión del ARNm de los genes seleccionados (*Blnk, Card11, Cbl, Cd19, Cd72, Malt1, Nfatc1, Nfkbie, Pik3ap1, Pik3cd, Plcg2, Ppp3ca, Prkca, Ptk2b, Syk, Vav1*) fue significativamente menor en LB aislados de ratones P comparado a NP (**Figura 4.1.4.1**). Así mismo, se realizó un análisis de correlación de Pearson, el cual mostró una correlación positiva entre los datos obtenidos a partir del gene-array y los datos obtenidos por qPCR (**Figura 4.1.4.2**)

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

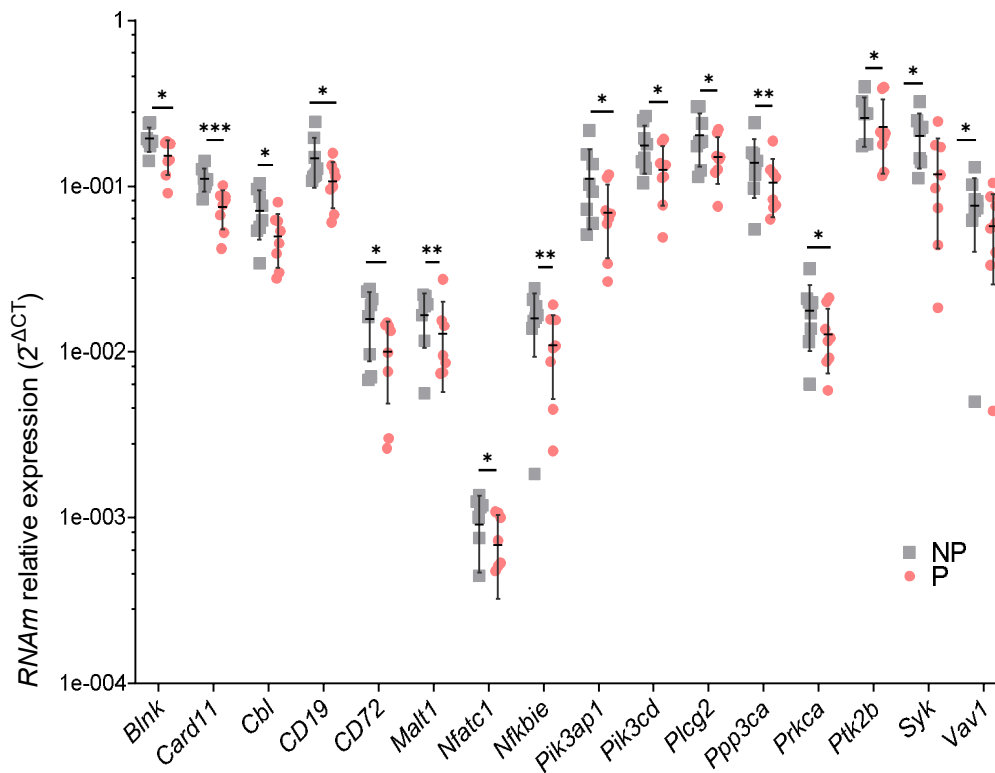


Figura 4.1.4.1. Niveles de expresión relativa de ARNm de genes involucrados en la señalización a través del receptor de linfocitos B (BCR). Expresión relativa de ARNm de genes seleccionados evaluados por RT-qPCR en linfocitos B de ratones preñados (P) y no-preñados (NP). La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana normal, confirmada por un test de Shapiro-Wilk (nivel de confianza $\alpha=0.05$), un test de Student desapareado, paramétrico, de una cola con un ($P<0.05$). Las medias de cada grupo (M) y su error estándar (SEM) están representadas mediante un gráfico de puntos donde diferencias significativas se expresan como * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

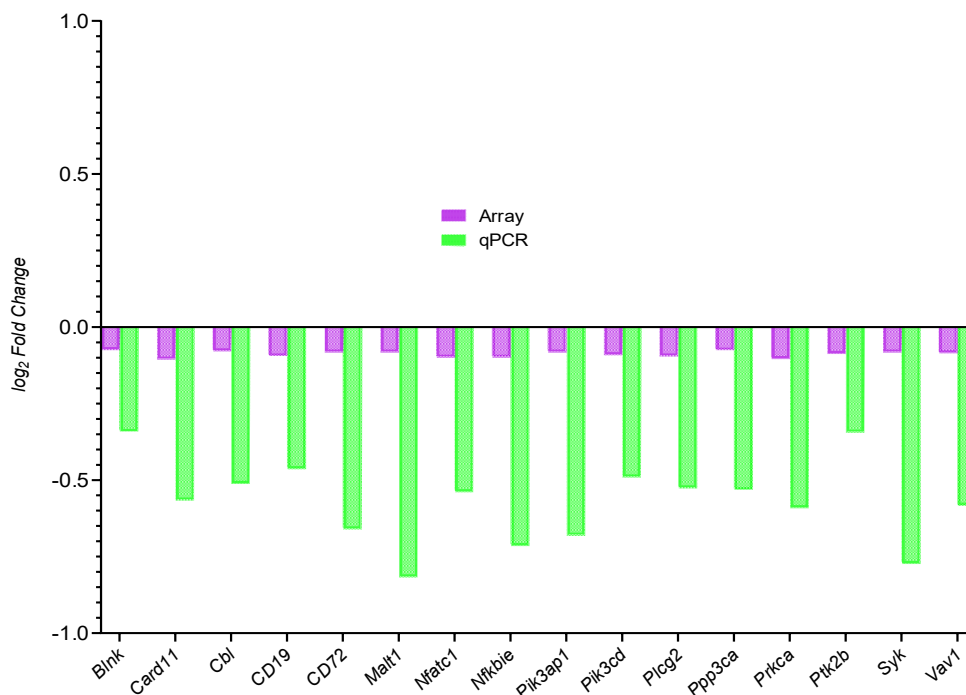


Figura 4.1.4.2. Análisis de correlación de Pearson entre los datos de array y qPCR. Los niveles de expresión de ARNm obtenidos a través del gene-array (\log_2 Fold Change, $n = 4$) mostraron una correlación positiva (prueba de correlación de Pearson, $r = 0,037$) con los niveles de expresión relativa de ARNm obtenidos por qPCR (\log_2 Fold Change, $n = 8$).

4.1.5 Análisis de los transcritos regulados al alza en LB de ratones preñados

Como se mencionó anteriormente, dentro de los procesos biológicos modificados de manera positiva en ratones P comparado con ratones NP, encontramos el ciclo celular y la replicación del ADN. Posteriormente, se realizó un segundo análisis de enriquecimiento de procesos biológicos utilizando únicamente los transcritos regulados al alza en LB de ratones P comparado con ratones NP (**Metodología 6.6**). Tal como se muestra en la **Figura 4.1.5.1**, se observó una modulación positiva de procesos biológicos claves asociados con la proliferación de los LB como ser: la replicación del

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

ADN (GO: 0006260), la división nuclear mitótica (GO:0007067) y la segregación de los cromosomas (GO: 0007059), entre otros, en LB de ratones P comparado con NP. El p-valor y los transcritos asociados a cada proceso biológico se listan en la **Tabla 4.1.5.1**.

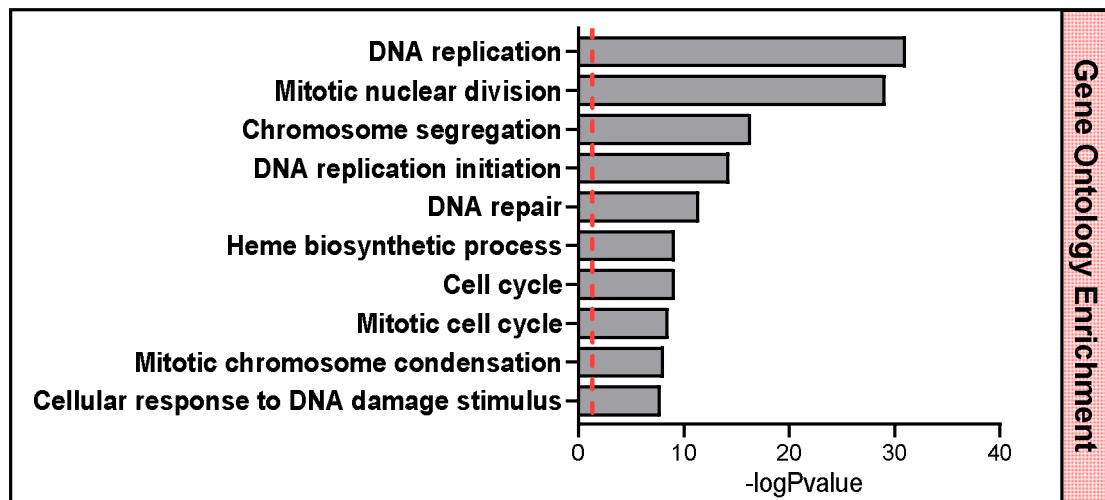


Figura 4.1.5.1 GO-ORA. Procesos biológicos sobre-representados en transcritos regulados al alza en ratones P comparado con ratones NP. Los procesos biológicos que mostraron una regulación significativamente mayor en LB de ratones de ratones P en comparación con animales NP se ordenan por significancia estadística utilizando el valor de p $-\log_{10}$ (BH $p < 0,05$, cambios de veces (FC) $> 1,5$).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

Gene Ontology	GO Id	$-\log_{10}(p)$	Source	Gene Symbols
DNA replication	0006260	31,0555267	biological process	2810417H13Rik; Blm; Brca1; Cdc6; Chaf1b; Cinp; Dbf4; Dna2; Dscc1; Dtl; Fen1; Gins1; Lig1; Mcm10; Mcm2; Mcm3; Mcm4; Mcm5; Mcm6; Mcm7; Mcm8; Nasp; Nfia; Nfix; Orc1; Orc2; Orc6; Pola1; Pole; Pole2; Polq; Rfc4; Rpa3; Rrm1; Rrm2; Ticrr; Tk1;
Mitotic nuclear division	0007067	29,1193844	biological process	Anln; Aspm; Aurka; Birc5; Bora; Casc5; Ccna2; Ccnb2; Ccnf; Cdc20; Cdc25c; Cdc6; Cdca2; Cdca3; Cdca5; Cdca8; Cdk1; Cenph; Cenpn; Cenpv; Cenpw; Fbxo5; Hells; Incenp; Kif18b; Kif20b; Kif2c; Kntc1; Mastl; Mis18bp1; Ncapd2; Ncapg2; Nuf2; Nup37; Oip5; Plk1; Ran; Sgol1; Ska1; Ska3; Spc24; Spc25; Tipin; Tpx2; Wee1; Zwilch;
Chromosome segregation	0007059	16,3540572	biological process	Birc5; Bub1; Casc5; Cenpf; Cenph; Cenpn; Cenpw; D2Ert750e; Esco2; Hjurp; Incenp; Kif2c; Nek2; Nup37; Sgol1; Ska1; Ska3; Spag5; Spc25; Top2a;
DNA replication initiation	0006270	14,3282318	biological process	Ccne1; Ccne2; Cdc45; Mcm2; Mcm3; Mcm4; Mcm5; Mcm6; Mcm7; Pola1;
DNA repair	0006281	11,4651049	biological process	Bard1; Blm; Brca1; Brca2; Brip1; Chaf1b; Chek1; Cinp; Clspn; Eef1e1; Eme1; Exo1; Fancd2; Fanci; Fen1; Figl1; Gen1; Kif22; Lig1; Neil3; Parpbp; Polq; Rad51; Rad51ap1; Rpa3; Rps27l; Ticrr; Uhrf1;
Heme biosynthetic process	0006783	9,1540179	biological process	Alad; Alas2; Atp1f1; Cpox; Fech; Slc11a2; Tmem14c; Urod;
Cell cycle	0007049	9,12208963	biological process	Ccnb1; Cdc45; Chaf1b; Cinp; Cks1b; Cks2; Dbf4; Erh; Esco2; Fanci; Gmnn; Mcm2; Mcm3; Mcm4; Mcm6; Mcm7; Mcm8; Melk; Nasp; Sept8; Steap3; Tfdp1; Tfdp2; Tipin; Uhrf1;
Mitotic cell cycle	0000278	8,53879305	biological process	Aurka; Ccnb1; Cdk1; Cenpf; Cenpw; Kif18b; Rrm1; Tfdp1; Tfdp2;
Mitotic chromosome condensation	0007076	8,10296764	biological process	Cdca5; Ncapd2; Ncapd3; Ncapg; Ncaph; Nusap1; Smc2;
Cellular response to DNA damage stimulus	0006974	7,80271097	biological process	2810417H13Rik; 4632434I11Rik; Atad5; Blm; Brca1; Brca2; Casp3; Chek1; Chek2; Dtl; Fancd2; Mastl; Mcm7; Mcm8; Rad51; Rad54l; Rps27l; Stxbp4; Tipin; Top2a;

Tabla 4.1.5.1 Análisis GO-ORA. Lista detallada de los procesos biológicos sobrerrepresentados en transcritos regulados al alza en ratones P comparado con ratones NP. El símbolo genético define los genes expresados diferencialmente en LB de P en comparación con ratones NP involucrados en cada proceso biológico y el valor $-\log p$ se usa para clasificar por significancia estadística (BH $p < 0,05$, (FC) $> 1,5$).

Adicionalmente, el análisis de enriquecimiento de las vías biológicas en LB de ratones P comparado con NP, mostró una sobre-representación de las vías asociadas con el ciclo celular (REACTOMA: 17635), el ciclo celular mitótico (REACTOMA: 16819), así como en las fases y puntos de control asociados a los mismos (REACTOME: 18604, 18178, 18725, 18128, 17726) como se muestra en la **Figura 4.1.5.2**. El p-valor y los transcritos asociados a cada vía biológica se muestran en la **Tabla 4.1.5.2**.

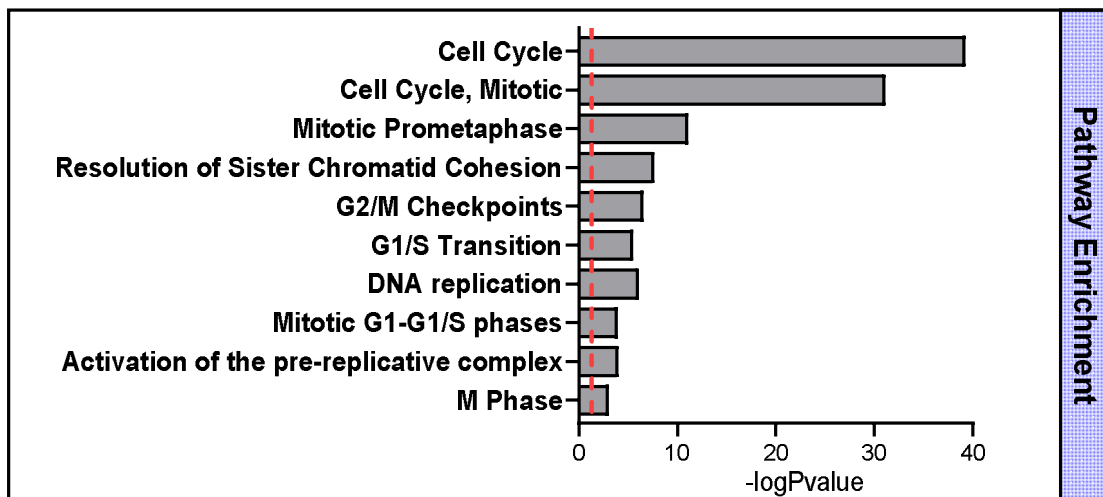


Figura 4.1.5.2 PA-ORA. Vías de señalización sobre-representadas en transcritos regulados al alza en ratones P comparado con ratones NP. Las vías de señalización que mostraron una modulación significativamente mayor en LB de ratones P en comparación con animales NP se ordenan por significancia estadística utilizando el valor de p $-\log_{10}$ (BH $p < 0,05$, FC $> 1,5$).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

Pathway Name	Pathway Id	$-\log_{10}(p)$	Source Name	Gene Symbols
Cell Cycle	17635	39,2	REACTOME	Alms1; Aurka; Birc5; Blm; Bora; Brca1; Brca2; Bub1b; Casc5; Ccna2; Ccnb1; Ccnb2; Ccne1; Ccne2; Cdc20; Cdc25c; Cdc45; Cdc6; Cdca5; Cdca8; Cdk1; Cenpa; Cenph; Cenpi; Cenpk; Cenpl; Cenpm; Cenpn; Cenpp; Cep290; Cep70; Cep76; Chek1; Chek2; Cks1b; Clspn; Dbf4; Dhfr; Dna2; Esco2; Fbxo5; Gins1; Gmnn; H2afz; Hist1h2ak; Hist1h2bb; Hist1h2bh; Hist1h2bm; Hist2h2bb; Hist3h2ba; Incenp; Kif18a; Kif20a; Kif23; Kif2c; Kntc1; Mad2l1; Mastl; Mcm10; Mcm2; Mcm3; Mcm4; Mcm6; Mcm7; Mcm8; Mis18bp1; Mlf1ip; Mybl2; Ncapd2; Ncapg2; Ncaph; Nek2; Nuf2; Nup37; Oip5; Orc1; Orc2; Pcna; Plk1; Plk4; Pola1; Pole; Pole2; Ppp2r1b; Prim1; Prkar2b; Rad51; Rfc4; Rpa3; Rrm2; Sgol1; Sgol2; Ska1; Smc2; Spc24; Spc25; Syce2; Tfdp1; Top2a; Tyms; Ube2c; Wee1; Zwilch; Zwint;
Cell Cycle, Mitotic	16819	31,1	REACTOME	Alms1; Aurka; Birc5; Bora; Bub1b; Casc5; Ccna2; Ccnb1; Ccnb2; Ccne1; Ccne2; Cdc20; Cdc25c; Cdc45; Cdc6; Cdca5; Cdca8; Cdk1; Cenpa; Cenph; Cenpi; Cenpk; Cenpl; Cenpm; Cenpn; Cenpp; Cep290; Cep70; Cep76; Cks1b; Dbf4; Dhfr; Dna2; Esco2; Fbxo5; Gins1; Gmnn; H2afz; Hist1h2ak; Incenp; Kif18a; Kif20a; Kif23; Kif2c; Kntc1; Mad2l1; Mastl; Mcm10; Mcm2; Mcm3; Mcm4; Mcm6; Mcm7; Mcm8; Mlf1ip; Mybl2; Ncapd2; Ncapg2; Ncaph; Nek2; Nuf2; Nup37; Orc1; Orc2; Pcna; Plk1; Plk4; Pola1; Pole; Pole2; Ppp2r1b; Prim1; Prkar2b; Rfc4; Rpa3; Rrm2; Sgol1; Sgol2; Ska1; Smc2; Spc24; Spc25; Tfdp1; Top2a; Tyms; Ube2c; Wee1; Zwilch; Zwint;
Mitotic Prometaphase	18604	11,1	REACTOME	Birc5; Bub1b; Casc5; Ccnb1; Ccnb2; Cdc20; Cdca5; Cdca8; Cdk1; Cenpa; Cenph; Cenpi; Cenpk; Cenpl; Cenpm; Cenpn; Cenpp; Incenp; Kif18a; Kif2c; Kntc1; Mad2l1; Mlf1ip; Ncapd2; Ncaph; Nuf2; Nup37; Plk1; Ppp2r1b; Sgol1; Sgol2; Ska1; Smc2; Spc24; Spc25; Zwilch; Zwint;

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

<i>Resolution of Sister Chromatid Cohesion</i>	17085	7,63	REACTOME	Birc5; Bub1b; Casc5; Ccnb1; Ccnb2; Cdc20; Cdca5; Cdca8; Cdk1; Cenpa; Cenph; Cenpi; Cenpk; Cenpl; Cenpm; Cenpn; Cenpp; Incenp; Kif18a; Kif2c; Kntc1; Mad2l1; Mlf1ip; Nuf2; Nup37; Plk1; Ppp2r1b; Sgol1; Sgol2; Ska1; Spc24; Spc25; Zwilch; Zwint;
<i>G2/M Checkpoints</i>	18178	6,56	REACTOME	Ccnb1; Ccnb2; Cdc25c; Cdc45; Cdc6; Cdk1; Chek1; Chek2; Clspn; Dbf4; Mcm10; Mcm2; Mcm3; Mcm4; Mcm6; Mcm7; Mcm8; Orc1; Orc2; Rfc4; Rpa3; Wee1;
<i>DNA Replication</i>	17107	6,09	REACTOME	Ccna2; Cdc45; Cdc6; Dbf4; Dna2; Gins1; Gmnn; Mcm10; Mcm2; Mcm3; Mcm4; Mcm6; Mcm7; Mcm8; Orc1; Orc2; PcnA; Pola1; Pole; Pole2; Prim1; Rfc4; Rpa3;
<i>G1/S Transition</i>	18725	5,49	REACTOME	Ccna2; Ccnb1; Ccne1; Ccne2; Cdc45; Cdc6; Cdk1; Cks1b; Dbf4; Dhfr; Fbxo5; Mcm10; Mcm2; Mcm3; Mcm4; Mcm6; Mcm7; Mcm8; Orc1; Orc2; PcnA; Pola1; Pole; Pole2; Ppp2r1b; Prim1; Rpa3; Rrm2; Tfdp1; Tyms; Wee1;
<i>Mitotic G1-G1/S phases</i>	18886	4,03	REACTOME	Ccna2; Ccnb1; Ccne1; Ccne2; Cdc45; Cdc6; Cdk1; Cks1b; Dbf4; Dhfr; Fbxo5; Mcm10; Mcm2; Mcm3; Mcm4; Mcm6; Mcm7; Mcm8; Mybl2; Orc1; Orc2; PcnA; Pola1; Pole; Pole2; Ppp2r1b; Prim1; Rpa3; Rrm2; Tfdp1; Top2a; Tyms; Wee1;
<i>Activation of the pre-replicative complex</i>	18128	3,93	REACTOME	Cdc45; Cdc6; Dbf4; Mcm10; Mcm2; Mcm3; Mcm4; Mcm6; Mcm7; Mcm8; Orc1; Orc2; Pola1; Pole; Pole2; Prim1; Rpa3;
<i>M Phase</i>	17726	3,06	REACTOME	Birc5; Bub1b; Casc5; Ccnb1; Ccnb2; Cdc20; Cdca5; Cdca8; Cdk1; Cenpa; Cenph; Cenpi; Cenpk; Cenpl; Cenpm; Cenpn; Cenpp; Fbxo5; H2afz; Hist1h2ak; Incenp; Kif18a; Kif20a; Kif23; Kif2c; Kntc1; Mad2l1; Mastl; Mlf1ip; Ncapd2; Ncapg2; Ncaph; Nuf2; Nup37; Plk1; Ppp2r1b; Sgol1; Sgol2; Ska1; Smc2; Spc24; Spc25; Ube2c; Zwilch; Zwint;

Tabla 4.1.5.2. Análisis PA-ORA. Lista detallada de las vías de señalización sobrerrepresentadas en transcritos regulados al alza en ratones P comparado con ratones NP. El símbolo genético define los genes expresados diferencialmente en LB de P en comparación con ratones NP involucrados en cada proceso biológico y el valor $-\log p$ se usa para clasificar por significancia estadística (BH $p < 0,05$, (FC) $> 1,5$).

4.1.6 *Análisis del estado proliferativo de LB*

Teniendo en cuenta que los análisis *in silico* de los datos obtenidos a partir del enriquecimiento funcional de los transcritos regulados al alza mostraron una sobre-representación de vías asociadas con la proliferación y el ciclo celular, se buscó evaluar estos procesos mediante citometría de flujo en LB de ratones P y ratones NP.

4.1.6.1 *Ciclo celular con IP*

Se aislaron esplenocitos totales a partir de bazo de ratones P y ratones NP como control, los cuales fueron teñidos con Ioduro de propidio (IP) y CD19 (**Metodología 6.11**). Se determinó mediante citometría de flujo las fases del ciclo celular utilizando el MFI de Ioduro de propidio (IP) en LB CD19⁺. La estrategia de gating utilizada se detalla en la **Figura 4.1.6.1.1**.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

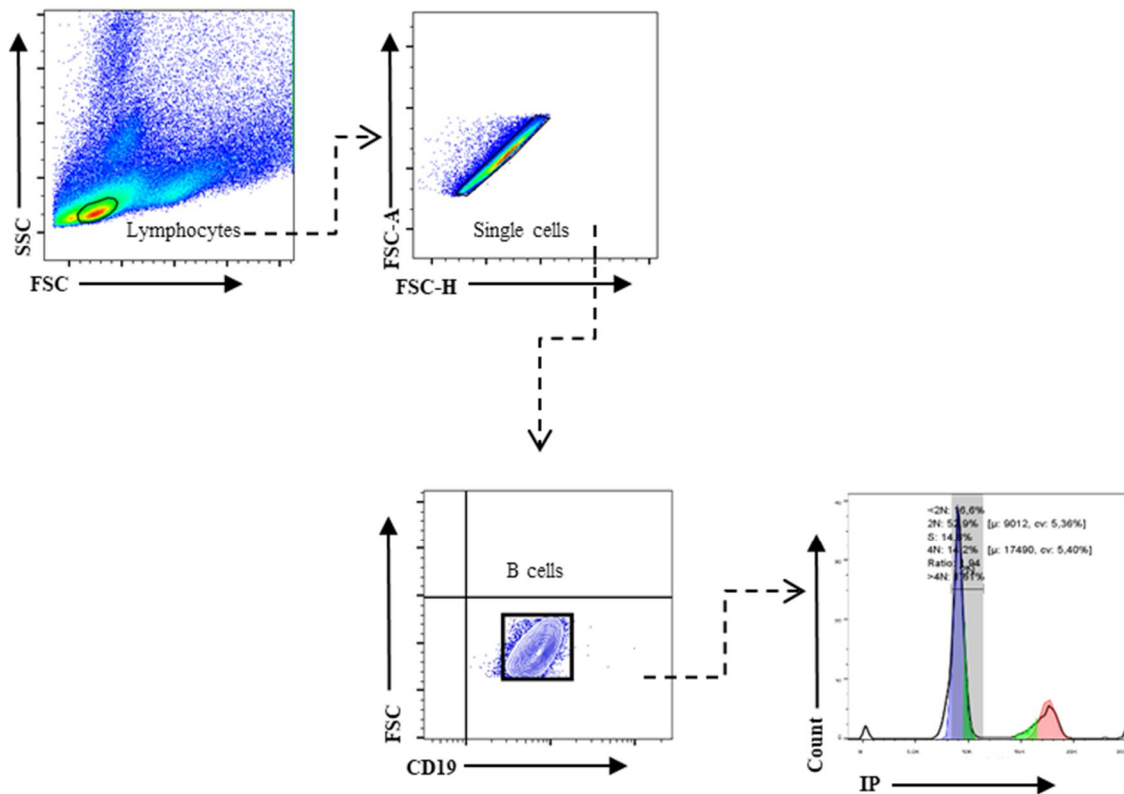


Figura 4.1.6.1.1 Estrategia de gating utilizada determinar las fases del ciclo celular en LB esplénicos de ratones P comparado con ratones NP. De manera representativa, gráficos en pseudocolor y contorno muestran la estrategia de gating utilizada para cuantificar los LB totales. A partir del tamaño (FSC) y granularidad (SSC) se determinó la población correspondiente a los linfocitos. Se eliminaron dobletes y se utilizó CD19 (marcador de superficie Pan B celular) para definir la población total de LB en el bazo. Sobre esta población se determinaron las fases del ciclo celular mediante el MFI de IP determinando los picos correspondientes a las fases G0/G1 (azul), la fase S (verde), G2/M (rojo). Los datos fueron analizados con FlowJo_V10.

El análisis estadístico no arrojó diferencias significativas en cuanto al porcentaje de células CD19⁺ que se distribuyen en cada una de las fases del ciclo celular. Se observó una tendencia, que no llegó a ser estadísticamente significativa, de aumento de las fases S ($p=0,2714$) y G2/M ($p=0,1914$), así como una disminución de la fase G0/G1 ($p=0,1845$) en LB provenientes de bazo de ratones P comparado con ratones controles NP (Figura

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

4.1.6.1.2). Estos resultados no son concluyentes en cuanto al estado proliferativo de los LB durante la preñez.

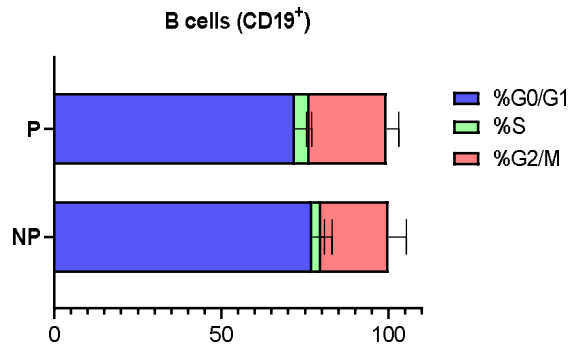


Figura 4.1.6.1.2 Análisis estadístico de las fases de ciclo celular. El estudio de las fases de ciclo celular en LB esplénicos de ratones P con respecto de ratones NP, no mostró diferencias significativas en cuanto a las fases A. G0/G1 (P:72,8±6; NP:77,3±3,5; n=5), B. S (P:4,4±0,5; NP: 2,6±0,9; n=5) y C. G2/M (P: 22,8±3,7; NP: 20±3,1; n=5), respectivamente. La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana normal, confirmada por un test de Shapiro-Wilk (nivel de confianza $\alpha=0.05$), por lo que se analizaron mediante un test de Two-way ANOVA ($P<0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias no significativas se expresan como ns.

4.1.6.2 Análisis de la distribución de las principales poblaciones de LB en el bazo de ratones preñados

En vista de que las poblaciones de LB presentes en el bazo presentan características diferenciales en cuanto a su activación y su perfil proliferativo, se buscó determinar los porcentajes de las principales poblaciones de LB, por citometría de flujo. Para ello, esplenocitos totales provenientes de ratones P y NP fueron inmuno-marcados con CD19 y B220 (Metodología 6.10) para determinar los porcentajes de LB1 (CD19⁺ B220^{low/neg}) y LB2 (CD19⁺ B220^{high}) como se muestra en la **Figura 4.1.6.2.1.**

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

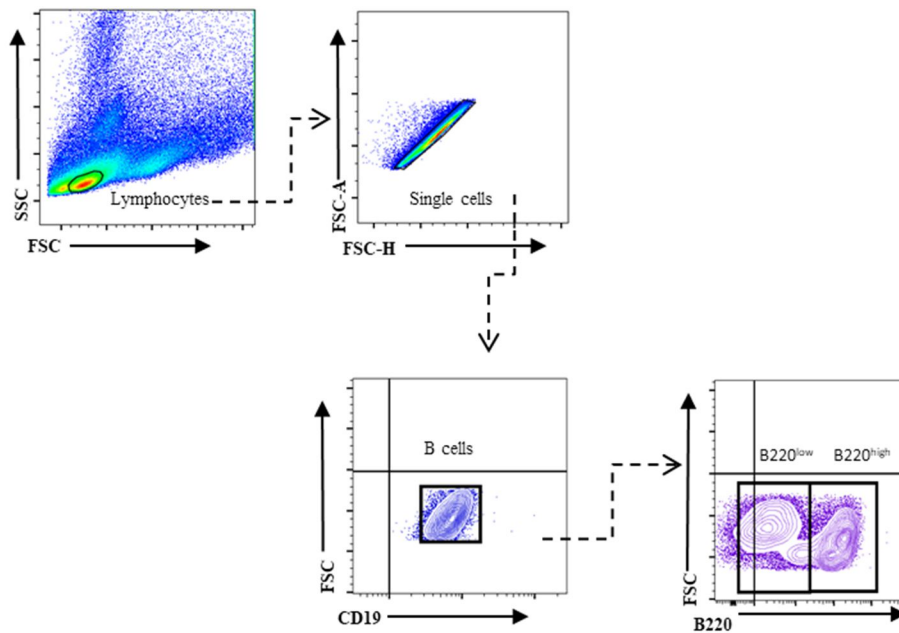


Figura 4.1.6.2.1 Estrategia de gating utilizada determinar las poblaciones de LB esplénicos de ratones P comparado con ratones NP. De manera representativa, gráficos en pseudocolor y contorno muestran la estrategia de gating utilizada para cuantificar los LB totales. A partir del tamaño (FSC) y granularidad (SSC) se determinó la población correspondiente a los linfocitos. Se eliminaron dobletes y se utilizó CD19 (marcador de superficie Pan B celular) para definir la población total de LB en el bazo. Sobre esta población se diferenciaron dos poblaciones de LB según la expresión del marcador B220 como: LB1 (CD19⁺ B220^{low/neg}) y LB2 (CD19⁺ B220^{high}). Los datos fueron analizados con FlowJo_V10.

El análisis estadístico de los datos mostró un aumento significativo en el porcentaje de LB1 (CD19⁺B220^{low/neg}) de ratones P respecto de ratones NP (p=0,0022). En contraposición, se observó una disminución significativa del porcentaje de LB2 (CD19⁺ B220^{high}) en ratones P respecto de ratones NP (p= 0,0271) (**Figura 4.1.6.2.2**).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

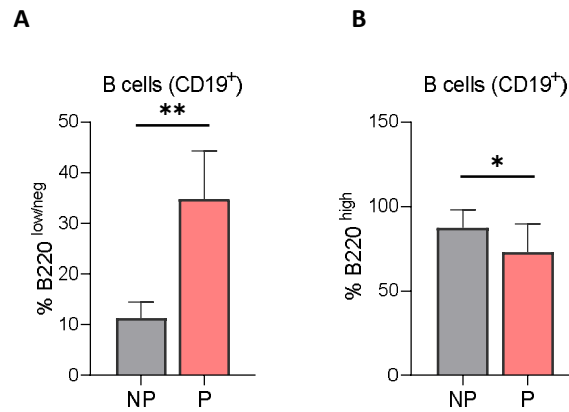
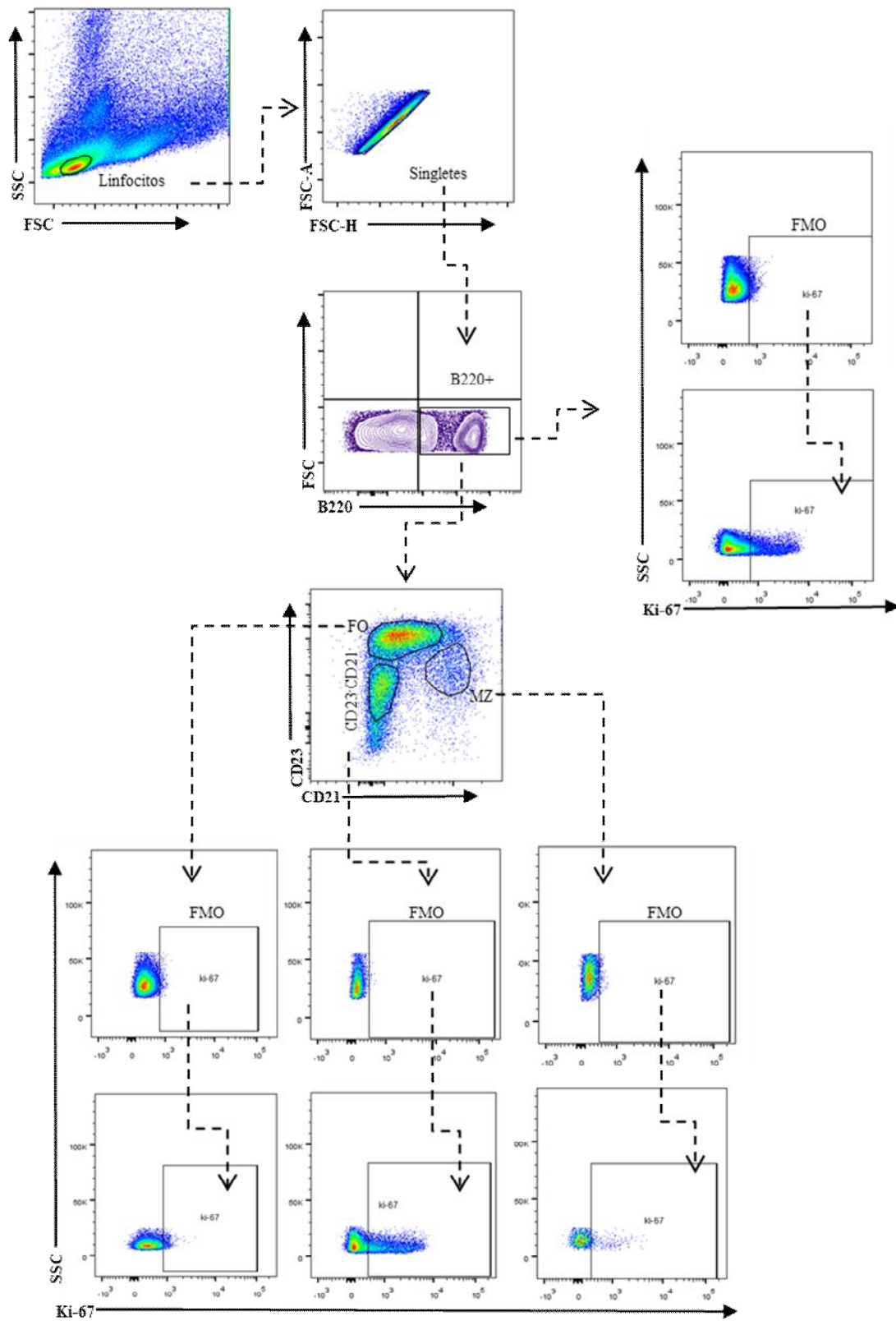


Figura 4.1.6.2.2 Porcentaje de LB1 (CD19+B220low/neg) y LB2 (CD19+B220high) esplénicos de ratones P comparado con ratones NP. A. Análisis estadístico del porcentaje de LB1 esplénicos de ratones NP (11.35 ± 1.6 ; $n=4$) comparado con ratones P (34.8 ± 4.3 ; $n=5$). B. Análisis estadístico del porcentaje de LB2 esplénicos de ratones NP (87.5 ± 3.9 ; $n=7$) comparado con ratones P (72.8 ± 6.4 ; $n=7$). La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana normal, confirmada por los test de Shapiro-Wilk (nivel de confianza $\alpha=0.05$), por lo que fueron analizados con un test de Student desapareado, paramétrico, de una cola con un ($P < 0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ y ns=no significativo.

4.1.6.3 Expresión de Ki-67

A continuación, se evaluó la expresión del marcador de proliferación: ki-67 en LB totales (B220⁺), así como en las distintas subpoblaciones de LB en ratones P y NP. Brevemente, esplenocitos totales fueron teñidos con anticuerpos específicos y analizados por citometría de flujo como se explica en la metodología (**Metodología 6.13**). La estrategia de gating utilizada para evaluar la expresión de KI-67 en las distintas subpoblaciones de LB como se muestra en la **Figura 4.1.6.3.1**.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro



Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

Figura 4.1.6.3.1 Estrategia de gating utilizada determinar la expresión de ki-67 en las poblaciones celulares B. De manera representativa, gráficos en pseudocolor y contorno muestran la estrategia de gating utilizada para cuantificar la expresión de KI-67 en de LB totales y subpoblaciones celulares B de bazo. A partir del tamaño (FSC) y granularidad (SSC) se determinó la población correspondiente a los linfocitos. Se eliminaron dobletes y se utilizó B220 (marcador de superficie característico de LB en ratón) para definir la población total de LB en el bazo. Se utilizaron adicionalmente los marcadores de superficie CD23 y CD21 que nos permiten diferenciar las distintas subpoblaciones de LB de la siguiente manera: LB de la zona marginal del bazo (MZ: B220+CD23-CD21^{hi}), los LB foliculares (FO: B220+CD23+CD21⁻) y la población (B220+CD23-CD21⁻). Sobre estas poblaciones se determinaron las células positivas para el marcador de proliferación ki-67, utilizando como control el FMO (del inglés fluorescence minus one). Los datos fueron analizados con FlowJo_V10.

El análisis estadístico de los datos mostró una expresión aumentada del marcador ki-67 expresada como MFI (media de intensidad de fluorescencia, $p=0.0012$) en LB totales de ratones P respecto de ratones NP. Este aumento se ve reflejado en la población celular (B220⁺CD23⁻CD21⁻, $p<0,0001$), no así en LB2 (FO: B220⁺CD23⁺CD21^{-low/neg} $p=0,1690$ y MZ: B220⁺CD23^{low/neg}CD21^{high} $p=0,3837$) (**Figura 4.1.6.3.2**). Al analizar esta población celular de LB: B220⁺CD23⁻CD21⁻, pudimos observar que el 95% de las células que expresaban el marcador ki-67 además mostraron expresión de B220^{low}, fenotipo que corresponde a los LB1 (B220^{low}CD23^{low/-}CD21⁻) (119).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

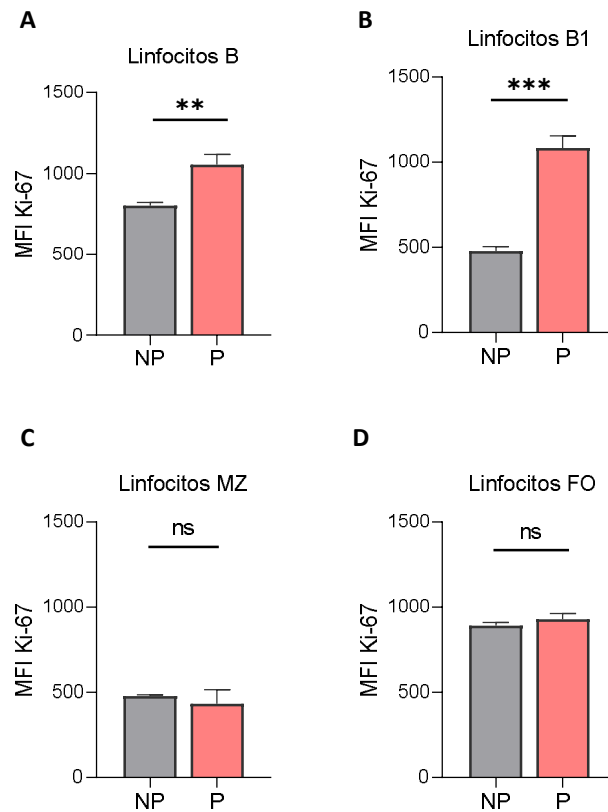


Figura 4.1.6.3.2 Análisis estadístico de la expresión de ki-67 sobre las subpoblaciones de LB (B220⁺) durante la preñez. Análisis estadístico de la medida de intensidad de fluorescencia del marcador KI-67 en LB totales (NP: 801±11,4; **P:1056±35,5, n=3), así como las subpoblaciones de LB MZ (NP: 478±3,1; P:430±49, n=3), FO (NP: 889,3±11,4; P: 928±20,3, n=3) Y B1 (NP: 476,3±14,6; ****P:1083±41,2, n=3) esplénicos provenientes de ratones P comparados con ratones NP, respectivamente. La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana normal, confirmada por los test de Shapiro-Wilk (nivel de confianza $\alpha=0.05$), por lo que fueron analizados con un test de Student despareado, paramétrico, de una cola con un ($P<0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ y ns=no significativo.

Adicionalmente, se observó un aumento significativo del porcentaje de LB1 (B220^{low}CD23⁻CD21⁻, $p=0,095$) del bazo de ratones P, comparado con ratones NP (**Figura 4.1.6.3.3**).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

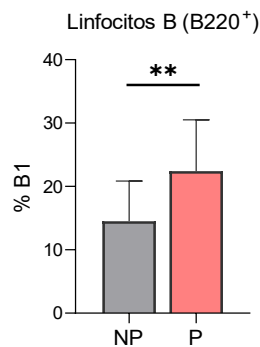


Figura 4.1.6.3.3 Análisis estadístico del porcentaje de LB1 (B220^{low}CD23^{low}CD21⁻) durante la preñez. Análisis estadístico del porcentaje del LB1 esplénicos provenientes de ratones P (**22,4±2,5; n=3), comparado con ratones NP (14,5±1,9; n=11), respectivamente. La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana normal, confirmada por los test de Shapiro-Wilk (nivel de confianza $\alpha=0.05$), por lo que fueron analizados con un test de Student desapareado, paramétrico, de una cola con un ($P<0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como; ** $P<0,01$.

4.1.7 Expresión del marcador CD1d en LB1

La disminución en la expresión de CD1d en LB1, se encuentra asociado a una mayor producción de anticuerpos naturales por parte de estas células en el bazo (46). Como se mencionó anteriormente, los LB1 son los principales productores de anticuerpos naturales (ANs). Teniendo en cuenta que durante la gestación existe un aumento en la producción de anticuerpos naturales, y en vista de los resultados previamente mencionados, se decidió evaluar la expresión de CD1d en LB1 de ratones P respecto de ratones NP mediante citometría de flujo (**Metodología 6.15**). Se utilizó la estrategia de gating detallada en la **Figura 4.1.6.3.1** para determinar la población de LB1 (B220^{low}CD23^{low}CD21⁻), sobre los cuales se evaluó el porcentaje de células positivas para el marcador CD1d, así como su MFI. El análisis estadístico de los datos mostró una

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

disminución significativa tanto del porcentaje de LB1 que expresan este receptor ($p < 0,0001$) como de la expresión de este (MFI) en ratones P comparados con ratones NP ($p < 0,0001$) (**Figura 4.1.7.1**).

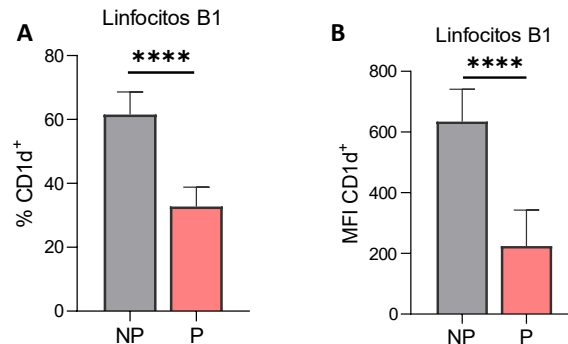


Figura 4.1.7.1. Análisis estadístico del porcentaje de expresión (A) y MFI (B) de CD1d en LB1. A. Análisis estadístico del porcentaje de producción de expresión de CD1d en LB1 esplénicos de ratones P comparado con ratones NP (NP: $61,6 \pm 3,1$; ****P: $37,8 \pm 2,4$; $n=5$). B. Análisis estadístico del MFI de CD1d en LB1 esplénicos de ratones P comparado con ratones NP (NP: $634,4 \pm 47,7$; P: 224 ± 42 ; $n=5$). La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana normal, confirmada por los test de Shapiro-Wilk (nivel de confianza $\alpha=0.05$), por lo que fueron analizados con un test de Student desapareado, paramétrico, con un ($P < 0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como **** $P < 0,0001$.

4.1.8 Análisis de activación de LB esplénicos durante la preñez: producción de citoquinas.

En vista de los cambios transcripcionales observados relacionados con la disminución de las vías de activación de LB y respuesta TD, así como TI, se buscó evaluar la capacidad de respuesta de estos ante un estímulo inflamatorio. Para lo cual, se evaluó la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de diferentes poblaciones de LB de ratones P respecto de ratones NP. Esplenocitos totales de ratones P y NP fueron

cultivados in vitro con y sin LPS durante 24h, posteriormente fueron inmuno-marcados con anticuerpos específicos (**Metodología 6.14**). Se evaluó la producción intracelular de TNF- α e IL-17 mediante citometría de flujo, utilizando la estrategia de gating mostrada en la **Figura 4.1.6.3.1**. Se observó un aumento significativo ($p=0,0007$) de la producción de TNF- α frente al estímulo con LPS en LB totales (B220⁺) de ratones NP. En contraposición, LB aislados de ratones P mostraron una disminución en la producción de TNF- α frente al estímulo inflamatorio ($p=0,0052$). Finalmente, cuando se comparó la producción de esta citoquina ante el estímulo con LPS, se observó una producción significativamente menor, por parte de LB de ratones P comparado con ratones NP ($p=0,0054$) (**Figura 4.1.8.1**).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

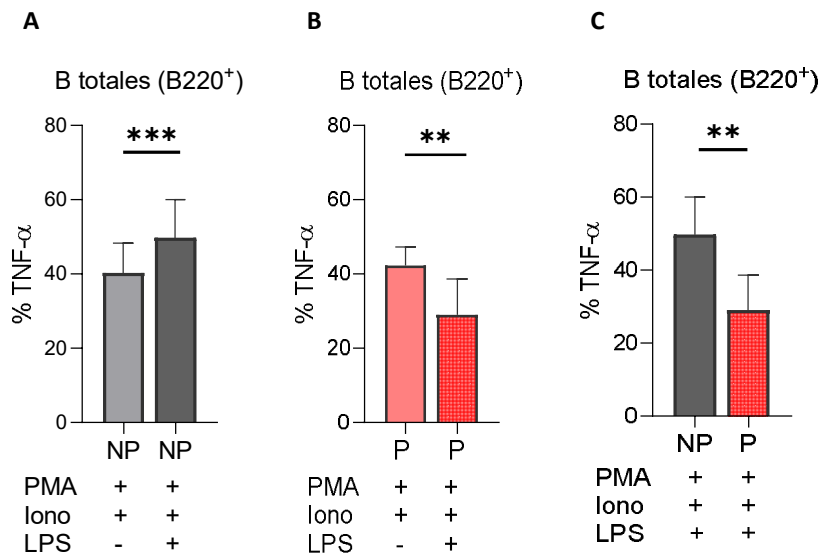


Figura 4.1.8.1 Análisis estadístico de la producción de TNF- α en los LB totales (B220+) esplénicos de ratones P comparado a ratones NP. A. Análisis estadístico del porcentaje de producción de TNF- α en LB totales esplénicos provenientes de ratones NP control y estimulados con LPS (C:40,2 \pm 3,6; *LPS:49,7 \pm 4,6; n=5). B. Análisis estadístico del porcentaje de producción de TNF- α en LB totales esplénicos provenientes de ratones P control y estimulados con LPS (C: 42,24 \pm 2,26; *LPS:28,94 \pm 4,31; n=5). C. Análisis estadístico del porcentaje de producción de TNF- α en LB totales esplénicos provenientes de ratones P comparados con ratones NP estimulados con LPS (NP: 49,7 \pm 4,6; P: 28,94 \pm 4,31; n=5). La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana normal, confirmada por los test de Shapiro-Wilk (nivel de confianza α =0.05), por lo que fueron analizados con un test de Student, paramétrico, con un (P <0.05). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001.

Adicionalmente, se observó un aumento significativo (p =0,0275) de la producción de IL-17 frente al estímulo con LPS en LB totales (B220+) de ratones NP. En contraposición, el LB aislados de ratones P no mostraron diferencias significativas en la producción de IL-17 frente al estímulo inflamatorio (p =0,4377). Finalmente, se observó una disminución significativa en la producción de esta citoquina ante el estímulo con LPS, por parte de LB de ratones P comparado con ratones NP (p =0,0050) (**Figura 4.1.8.2**).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

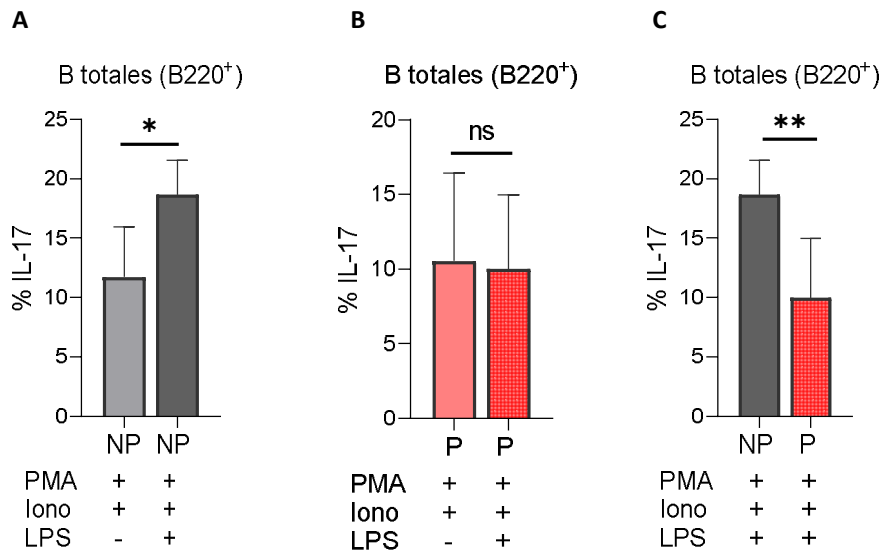


Figura 4.1.8.2 Análisis estadístico de la producción de IL-17 en los LB totales (B220⁺) durante la preñez.

A. Análisis estadístico del porcentaje de producción de IL-17 en LB totales esplénicos provenientes de ratones NP control y estimulados con LPS (C:11,71±1,9; *LPS:18,64 ± 1,3; n=5). B. Análisis estadístico del porcentaje de producción de IL-17 en LB totales esplénicos provenientes de ratones P control y estimulados con LPS (C: 10,54±2,64; LPS:10±2.26; n=5). C. Análisis estadístico del porcentaje de producción de IL-17 en LB totales esplénicos provenientes de ratones P comparados con ratones NP estimulados con LPS (NP: 18,64 ±1,2; **P: 10 ± 2,26; n=5). La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana normal, confirmada por los test de Shapiro-Wilk (nivel de confianza $\alpha=0.05$), por lo que fueron analizados con un test de Student, paramétrico, con un ($P<0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como * $P<0,05$; ** $P<0,01$ y ns=no significativo.

Debido a que los LB totales de bazo conforman un pool celular con características y funciones heterogéneas, se evaluó la producción de estas citoquinas por parte de las distintas sub-poblaciones B (FO, MZ, B1). Para tal fin, se utilizaron los marcadores celulares y la estrategia de gating mencionados en la **Figura 4.1.8.3.1**. Se observó una disminución significativa de la producción de TNF- α en las poblaciones FO ($p=0,030$) y B1 ($p=0,0265$) esplénicas provenientes de ratones P comparados con ratones NP ante el estímulo con LPS. No se observaron diferencias significativas en la población de LB MZ ($p=0,2269$) (**Figura 4.1.8.4**).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

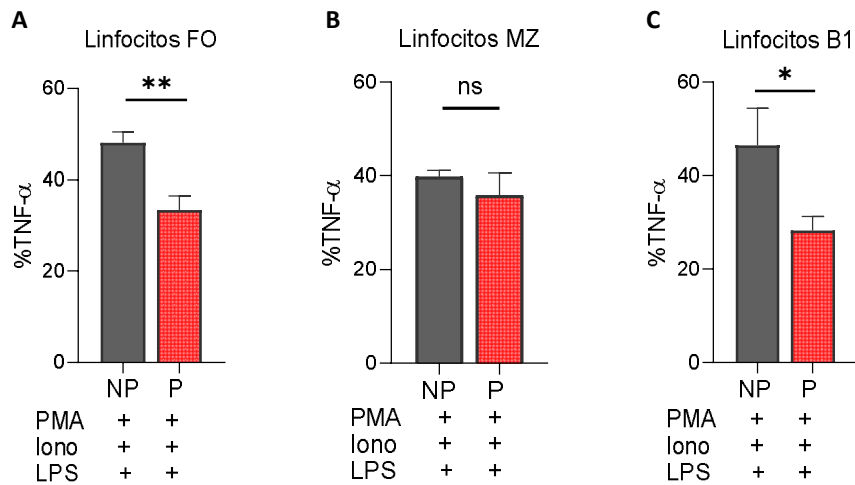


Figura 4.1.8.4 Análisis estadístico de la producción de TNF- α en subpoblaciones de LB esplénicos de ratones P y NP, estimulados con LPS. A. Análisis estadístico del porcentaje de producción de TNF- α en LB FO (NP:48,1 \pm 2,4; **P:33,4 \pm 3,1; n=5), B. LB MZ (NP: 39,8 \pm 1,4; P:35,8 \pm 4,9; n=5) y C. LB B1 (NP: 46,5 \pm 8,1; P: 28,2 \pm 3; n=5). La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana normal, confirmada por los test de Shapiro-Wilk (nivel de confianza α =0.05), por lo que fueron analizados con un test de Student desapareado, paramétrico, con un (P <0.05). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como * P <0,05; ** P <0,01 y ns=no significativo.

Al analizar la producción de IL-17 en las poblaciones de LB esplénicos, se observó una tendencia, que no llegó a ser estadísticamente significativa, de menor producción de IL-17 en las poblaciones FO (p =0,1682), B1 (p =0,1498) y MZ (p =0,1535) de LB esplénicos provenientes de ratones P comparados con ratones NP ante el estímulo con LPS (**Figura 4.1.8.5**).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

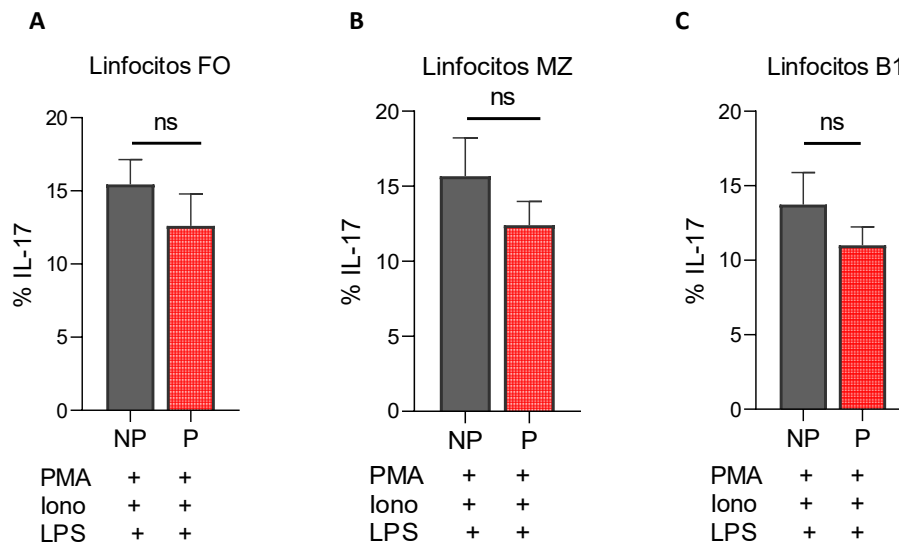


Figura 4.1.8.5 Análisis estadístico de la producción de IL-17 en subpoblaciones de LB esplénicos provenientes de ratones P y NP, estimulados in vitro con LPS. A. Análisis estadístico del porcentaje de producción intracelular de IL-17 en LB FO (NP: 15,44±1,7; P:12,61 ± 2,7; n=5), B. LB MZ (NP: 15,68±2,5; P:12,4 ±1,5; n=5) y C. LB B1 (NP: 13,75±2,15; P: 11 ± 1,2 n=5). La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana normal, confirmada por los test de Shapiro-Wilk (nivel de confianza $\alpha=0.05$), por lo que fueron analizados con un test de Student desapareado, paramétrico, con un ($P<0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias no significativas se expresan como ns.

4.1.9 Bregs

Recientemente Dubois y colaboradores realizaron un meta-análisis a partir de 6 diferentes gene-array de datos obtenidos a partir de LB reguladores provenientes de bazo de ratón y definieron un conjunto de genes cuya expresión permitiría definir la población LB reguladores (120). A partir de nuestro análisis de los DEGs en LB de ratones preñados, pudimos determinar que los mismos presentan un perfil de expresión de ARNm similar al perfil de expresión descrito por Dubois y colaboradores como específicos de Bregs. Específicamente, la expresión de tres factores de transcripción en

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

LB de ratones P (Klf2, Zfp318 y Bcl6), forman parte de los 6 transcritos descriptos como “firma” al momento de identificar a los linfocitos Bregs (**Tabla 4.1.9.1**).

Gene_accession	GeneName	Description	FoldChanges
NM_025831	Pxdc1	PX domain containing 1	-1,61995534
NM_008452	Klf2	Kruppel-like factor 2 (lung)	-1,95029929
NM_021346	Zfp318	zinc finger protein 318	-1,60244842
NM_012055	Asns	asparagine synthetase	7,13390056
NM_010016	Cd55	CD55 antigen	-1,5342819
NM_008630	Mt2	metallothionein 2	2,52755507
NM_011242	Rasgrp2	RAS, guanyl releasing protein 2	-1,77449778
NM_009744	Bcl6	B cell leukemia	-1,65577788
NM_001164099	Add3	adducin 3 (gamma)	-1,63620988
NM_178650	Tbc1d10c	TBC1 domain family, member 10c	-1,61725143
NM_001166388	Ptp4a3	protein tyrosine phosphatase 4a3	-1,672992
NM_133895	Slc15a4	solute carrier family 15, member 4	-1,60271799
NM_177646	Dgkd	diacylglycerol kinase, delta	-1,54780522
NM_026823	Arl8a	ADP-ribosylation factor-like 8A	-1,65860646
NM_001253737	Fcer2a	Fc receptor, IgE, low affinity II, alpha polypeptide	-1,77932333
NM_001178012	Sfxn3	sideroflexin 3	-1,54576389
ENSMUST00000126457	Clcf1	cardiotrophin-like cytokine factor 1	-1,61641647
NM_013602	Mt1	metallothionein 1	2,45451432
NM_027468	Cpm	carboxypeptidase M	-1,85692958
NM_010546	Ikkkb	inhibitor of kappaB kinase beta	-1,51220747
NM_001130150	Arhgef1	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	-1,69550372
ENSMUST00000163992	Slamf1	signaling lymphocytic activation molecule family member 1	-1,52609997

Tabla 4.1.9.1. Genes específicos regulados en B_{regs} de ratón. Se detallan en la tabla los genes analizados en nuestro gene-array que se corresponden con lo evaluado en bibliografía respecto de los genes característicos modulados en LB reguladoras de ratón (120). Marcados en rojo se encuentran los ARNm correspondientes a genes modulados que actúan a nivel transcripción.

4.1.9.1 Producción de IL-10 por subpoblaciones de linfocitos B

Como se mencionó anteriormente, a pesar de que no existen marcadores celulares específicos que permitan identificar a los LB_{regs}, la característica distintiva de estas células es la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10. Por lo cual, se buscó evaluar la producción de esta citoquina por las distintas sub-poblaciones celulares de LB esplénicos. Para ello, LB de ratones P y NP fueron cultivados durante 24h con y sin LPS. Posteriormente, se analizó la producción intracelular de IL-10 mediante citometría de flujo como se detalla en la **Metodología 6.14**. Se observó un aumento significativo en el porcentaje de LB totales productores de IL-10 provenientes de ratones P (**Figura 4.1.9.1.1 A**, $p=0,0249$), ante el estímulo con LPS; no así en los provenientes de ratones NP (**Figura 4.1.9.1.1 B**, $p=0,4372$). Al comparar ambos grupos estimulados se observó un aumento significativo en el porcentaje de LB totales productores de IL-10 provenientes de ratones P comparado con ratones NP (**Figura 4.1.9.1.1 C**, $p=0,030$).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

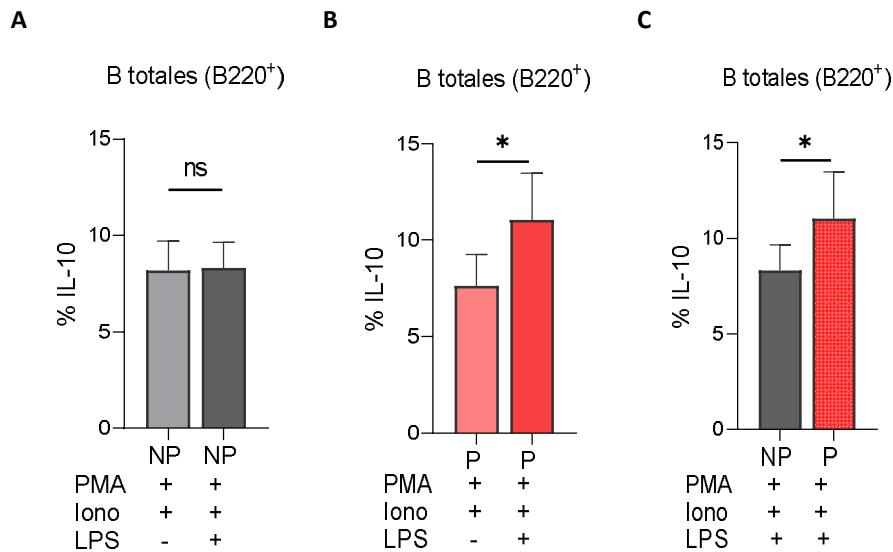


Figura 4.1.9.1.1 Análisis estadístico de la producción de IL-10 en los LB totales (B220⁺) durante la preñez.

A. Análisis estadístico del porcentaje de producción de IL-10 en LB totales esplénicos provenientes de ratones NP control y estimulados con LPS (C:8,2±0,7; *LPS:8,3 ± 0,6; n=5). **B.** Análisis estadístico del porcentaje de producción de IL-10 en LB totales esplénicos provenientes de ratones P control y estimulados con LPS (C: 7,6±0,8; *LPS:11,1±1,1; n=5). **C.** Análisis estadístico del porcentaje de producción de IL-10 en LB totales esplénicos provenientes de ratones P comparados con ratones NP estimulados con LPS (NP: 8,3 ± 0,6; *P: 11,1±1,1; n=5). La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana normal, confirmada por los test de Shapiro-Wilk (nivel de confianza $\alpha=0.05$), por lo que fueron analizados con un test de Student despareado, paramétrico, con un ($P<0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como * $P<0,05$ y ns=no significativo.

Adicionalmente, utilizando la estrategia de gating mencionada anteriormente (**Figura 4.1.6.3.2**) se determinó la producción intracelular de esta citoquina por parte de LB1 y LB2 FO, MZ. El aumento en el porcentaje de LB-IL-10⁺ se vio reflejado en la población de LB MZ (**Figura 4.1.9.1.2 A**, $p= 0,0003$) y LB1 (**Figura 4.1.9.1.2 C**, $p=0,0031$), pero no así en los LB FO (**Figura 4.1.9.1.2 B**, $p=0,4186$).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: Potencial implicancia en la protección del parto prematuro

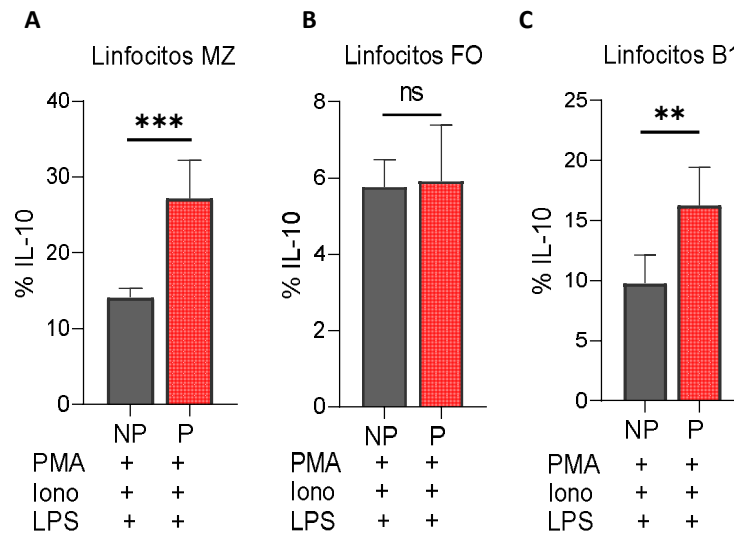


Figura 4.1.9.1.2 Análisis estadístico de la producción de IL-10 en subpoblaciones de LB esplénicos de ratones P y NP, estimulados con LPS. A. Análisis estadístico del porcentaje de producción intracelular de IL-10 en LB FO (NP: 5,6 ± 0,3; P: 5,92 ± 0,7; n=5), B. LB MZ (NP: 14,1 ± 0,6; P: 27,2 ± 2,3; n=5) y C (NP: 9,8 ± 1,1; *P: 16,3 ± 1,4; n=5). La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana normal, confirmada por los test de Shapiro-Wilk (nivel de confianza $\alpha=0.05$), por lo que fueron analizados con un test de Student desapareado, paramétrico, con un ($P<0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como *** $P<0,001$ y ns=no significativo.

5 *Discusión I*

Los resultados hasta aquí expuestos demuestran que los LB de ratones P adquieren un perfil transcriptómico único y diferencial comparado con ratones NP, caracterizado por la expresión disminuida de genes claves, asociados a la funcionalidad de estos, lo que sugiere fuertemente un estado de hipo-respuesta transitoria en la gestación.

Se observó en este trabajo una disminución de los genes involucrados en la vía de señalización del BCR, en ratones P comparado con ratones NP. Entre ellos, la quinasa Syk, así como del adaptador Blnk, cruciales para el desarrollo de la respuesta B tanto TD, así como TI. La deficiencia en estas proteínas afecta, además, la capacidad de los LB de proliferar, expresar marcadores de activación luego del entrecruzamiento del BCR, así como de diferenciarse a LB del CG y a células plasmáticas productoras de anticuerpos (66,121,122). De manera similar, se observaron niveles de expresión disminuidos para los mensajeros que codifican para proteínas PLC- γ 2 y PIK3, responsables del influjo y señalización por Ca^{+2} , así como también de mensajeros responsables de la activación de la vía CAM1-Calcineurim-NFAT dependiente de Ca^{+2} . La expresión de la PLC- γ 2, es requerida para inducir la activación a través del CG y la producción de LB de memoria(68,123,124). Así mismo, la activación de la vía NFAT, así como la translocación nuclear de NFAT1c, son mecanismos necesarios para la producción de citoquinas y la proliferación por parte de los LB (76). Incluso, se conoce que ratones con LB deficientes para NFatc1 resultan incapaces de proliferar y estimular a LT ante la presencia de un

antígeno (75). Más aún, se ha descrito que en este contexto, los LB se diferencian preponderantemente hacia un perfil regulador (B_{regs}) productores de IL-10, inhibiendo la producción de IL-2 y INF-gamma por parte de los LT (125) .

Adicionalmente, se identificaron disminuidos en ratones P comparado con ratones NP, transcritos que codifican receptores como BAFFR (*Tnfrsf13c*) y TLR9 (*Tlr9*), necesarios para la activación TI. Así mismo, mensajeros que codifican receptores de citoquinas (*Il4ra*, *Il21r*, *Il10ra*, *Il10rb*) que median la activación por segundas señales en el proceso de colaboración B-T mostraron niveles disminuidos en ratones P comparados con ratones NP. Previamente se mencionó que la linfopoyesis de linfocitos B se reduce drásticamente, así como los niveles de BAFF en suero, durante la gestación como una adaptación fisiológica para prevenir la aparición de LB autorreactivos, que podrían poner en riesgo el embarazo (103). Aquí, reforzamos esta hipótesis mostrando que, además, el embarazo parece disminuir la capacidad de activación de los linfocitos B a través de su receptor de forma dependiente e independiente de células T. Sumado a esto, se demostró que una respuesta específica en cuanto a la producción de citoquinas, ante la estimulación con LPS. Consistentemente, los LB totales del bazo de ratones P responden mediante una producción disminuida de citoquinas pro-inflamatorias (IL-17, TNF- α), comparado con ratones NP. Adicionalmente, esta disminución en la producción de TNF- α se ve relegada en todas las sub-poblaciones de LB del bazo de ratones P respecto de ratones NP. La producción de la citoquina inflamatoria TNF- α en LB, se produce en respuesta a la estimulación antigénica a través del BCR, activando vías de señalización intracelulares, entre ellas la vía de NF- κ B. La modulación negativa de los

mensajeros que codifican para proteínas como PKC, la formación del signalosoma CBM: CARD11-BCL10-MALT1 y proteínas responsables de la activación de la vía NF- κ B observadas en nuestro análisis, podrían explicar esta respuesta inflamatoria deficiente por parte de los linfocitos B de ratones gestantes. Además, está descripto que la deficiencia de PKC conduce a la supervivencia y desarrollo de un repertorio de LB aberrantes, autorreactivas e hiporreactivos ante la estimulación antigénica (126,127). Incluso, deficiencias en IKK β , cuyo mensajero se observó disminuido en LB de ratones P, están relacionadas con el desarrollo de infecciones recurrentes, debido a una respuesta deficiente a través de la vía de NF- κ B (128). Se conoce además que la deficiencia en las proteínas del signalosoma CBM, inducen una reducción en la diferenciación de LB maduras, una respuesta deficiente ante antígenos TI y T-dependientes y la producción de menores niveles de anticuerpos (Igs) (80,129,130). Sumado a su rol principal como productores de anticuerpos, los LB juegan un papel crítico como CPA a las células T, controlando así su activación y diferenciación hacia diferentes perfiles (Th1/Th17/Treg). Se observó a partir del análisis de enriquecimiento funcional que existe una disminución en la expresión de los mensajeros involucrados en la vía de presentación y procesamiento antigénico en LB de ratones P. En este sentido, el gene-array mostró niveles disminuidos de ARNm que codifican para proteínas que conforman el MHCII (*H2-DMb2*, *H2-DMA*, *H2-DMb*, *H2-Ob*), así como una menor expresión del factor de control maestro para la expresión del MHCII (*Ciita*) en LB de ratones P respecto de ratones NP. Cabe mencionar que la expresión de MHCII está regulada principalmente a nivel de transcriptómico (118). Así también, la carga eficaz de péptidos en el MHCII y la

presentación correcta de antígenos a las linfocitos T, se encuentra acoplada a la señalización a través del BCR (84). Respecto a esto, estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que LB de ratones P, actuando como APC, inhiben fuertemente la diferenciación de linfocitos T vírgenes hacia perfiles inflamatorios Th1 y Th17 in vitro (116). La disminución observada de estos mensajeros en nuestros resultados podría explicar la hipo-reactividad de los LB ante un estímulo infeccioso, así como su polarización hacia perfiles reguladores durante la gestación (B_{regs}). Reforzando esta idea, se observó un perfil transcriptómico diferencial similar al perfil característico previamente descrito para los LB_{regs}, en el cual se observa una modulación idéntica de factores que trabajan a nivel transcripción (*Bcl6*, *Zfp318*, *Klf2*) en ratones P comparado con ratones NP (120). Adicionalmente, en cuanto a la distribución de las poblaciones B, nuestros resultados muestran una disminución del mensajero que codifica para el gen *Nfkbie* en ratones P comparado con ratones NP, que se relaciona con una aumento de las poblaciones MZ y B1 de LB (130). Estos datos en su conjunto permitirían explicar la distribución de las principales poblaciones de LB descritas anteriormente durante la preñez, caracterizada por un aumento en las poblaciones MZ.

Finalmente, los datos del gene-array mostraron un aumento en los niveles de mensajeros asociados a procesos biológicos como la replicación del ADN y el ciclo celular, en LB de ratones P respecto de ratones NP. Estudios de citometría de flujo confirmaron un aumento en la proliferación de los LB1 y un aumento en el porcentaje de estas en ratones P comparado a ratones NP. Los LB1 se originan en el hígado fetal y luego en la edad adulta se mantienen mediante un mecanismo de renovación autócrina

(43,44). Se ubican predominantemente en la cavidad pleural y peritoneal, aunque existe un porcentaje pequeño de las mismos que se alojan en el bazo (41). Adicionalmente se observó un aumento en el porcentaje de LB1-IL10⁺ en ratones P, ante el estímulo con LPS, comparado con ratones NP. Se conoce que, ante un estímulo a través del TLR4, la proliferación de los LB1 peritoneales es inhibida por la producción autócrina de IL-10, fenómeno que no ocurre en LB1 esplénicos (131). De manera similar, se ha descrito que la producción autócrina de IL-10 por parte de los LB1-CD5⁺ (B1a) es un mecanismo de sobrevivencia que evita la muerte celular programada mediada por la activación fuerte a través del BCR (44,92). Una de las funciones más importantes de los LB1 Es la producción de anticuerpos naturales (ANs) (45). Estos anticuerpos ejercen un rol fundamental no sólo en la defensa contra agentes patógenos, sino también en la regulación de la homeostasis tisular al colaborar con la remoción de células apoptóticas evitando el desarrollo de procesos inflamatorios. Como se mencionó anteriormente, si bien los mecanismos que regulan la producción de ANs no están completamente dilucidados, recientemente se demostró que la presencia de CD1d, un componente del MHC I que presenta fosfolípidos a células NKi, inhibe los mecanismos de producción de ANs por parte de LB1 esplénicos (46). En este trabajo, demostramos una disminución en la expresión del receptor CD1d en LB1 esplénicos de ratones P respecto de ratones NP. Se conoce que durante la preñez existe un aumento de anticuerpos naturales (IgM, IgG3 e IgA), tendientes a proveer protección tanto a la madre como al feto frente a infecciones. Las modificaciones observadas en cuanto al aumento en el porcentaje de LB1 esplénicos, su perfil de proliferación activa, el aumento en la producción de IL-10, así como la

adquisición de una mayor capacidad de producción de ANs durante este periodo, podrían indicar un rol activo y preponderante de esta población celular B en la protección de la gestación.

Las modificaciones transitorias observadas aquí en cuanto al perfil transcriptómico de los LB en ratones P comparado con ratones NP, intentan explicar los procesos inmunes observados durante la gestación. La menor capacidad de activación de las poblaciones B es un claro ejemplo de la intención del sistema inmune materno de lograr la tolerancia fetal. Resulta interesante pensar que estos mecanismos desarrollados a través de la evolución a fin de crear un ambiente tolerogénico hacia el feto, podrían poner en riesgo la defensa materna contra infecciones. En este sentido, se conoce que las mujeres embarazadas son más susceptibles a ciertas infecciones como malaria, hepatitis B, influenza A, HIV, siendo la anterior pandemia con el virus H1N1, un claro ejemplo de esto último (28,29,132,133). La inmunología de la preñez continúa siendo un enigma en la actualidad, en cuanto a los procesos específicos que permiten lograr un balance entre la tolerancia y desarrollo fetal con una correcta activación inmune que garantice la protección contra agentes infecciosos. Los datos hasta aquí obtenidos aportan conocimientos que ayudan a una mejor comprensión de estos procesos.

Parte II

“Caracterización fenotípica y funcional de la subpoblación de linfocitos B que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación y su potencial implicancia en la protección del parto prematuro”

1 Introducción

1.1 Regulación de la respuesta inmune materna durante la preñez (hormonas y aloantígenos)

Durante la gestación en mamíferos existen diversas adaptaciones transitorias tanto a nivel del sistema endócrino, así como del inmunológico cuyo objetivo central es generar un estado de tolerancia inmunológica que permita la gestación del feto semi-alogénico. En este sentido, se conoce que en etapas tempranas células del sistema inmune materno reconocen y reaccionan induciendo tolerancia hacia moléculas del MHC de clase Ib no clásicas (HLA-E y HLA-G) expresadas por el citotrofoblasto (11,14). Más aún, se demostró que aquellos clones de LB cuyos receptores reconocen antígenos fetales, son eliminados por procesos que involucran apoptosis durante el desarrollo de los mismos (104). La tolerancia inmunológica hacia el feto se ve, además, reforzada por la producción de anticuerpos bloqueantes por parte de LB dirigidos contra antígenos paternos.

Por otro lado, señales hormonales modulan modificaciones tanto anatómicas como del sistema inmune materno ocurridas durante la gestación, necesarias para la correcta implantación y desarrollo fetal. P4 y E2 son capaces de inducir modificaciones transitorias en diferentes células del sistema inmune materno, contribuyendo al desarrollo de un perfil tolerogénico observado durante la mayor parte de la

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

gestación(134,135). Específicamente, se conoce que los linfocitos B expresan el receptor de E2 alfa (ER- α) (136) y que la estimulación a través del mismo genera efectos sobre su desarrollo, maduración y proliferación (100). Así mismo, E2 aumenta la frecuencia de LB_{regs}-IL10⁺ esplénicos (137). Por otro lado, se ha demostrado la inducción de efectos tolerogénicos en los LB, como la producción de IL-10 y de anticuerpos asimétricos ante la presencia de PIBF inducido por progesterona (111,138).

1.2 Parto prematuro

Una de las complicaciones más recurrentes durante la gestación es el caso de los partos prematuros (PP). En humanos, se definen como aquellos partos que ocurren antes de la semana 37 del embarazo. Se estima que afectan entre el 5 y el 13% de todos los embarazos y tienen serias consecuencias no sólo para la madre sino también para la progenie (139). De hecho, los bebés nacidos prematuramente, presentan un mayor riesgo de alteraciones neurológicas, respiratorias, y gastrointestinales durante la vida adulta comparado a bebés nacidos a término. El término "PP" no indica si la afección es causada por una infección, una lesión vascular, una sobre distensión uterina, un reconocimiento alógeno anormal, estrés o algún otro proceso patológico(140). En este sentido, a pesar de que la etiología de esta enfermedad no se conoce en su totalidad, existe sólida evidencia epidemiológica y experimental que indica que existe un fuerte componente infeccioso. De hecho, se ha sugerido que casi el 40% de todos los casos de PP se deben o están íntimamente asociados a infecciones intrauterinas (141). Los microorganismos pueden acceder a la cavidad amniótica (CA) y al feto mediante cualquiera de las siguientes vías:

- ascendente desde la vagina y el cuello uterino;
- diseminación hematógica a través de la placenta (infección transplacentaria);
- siembra retrógrada desde la cavidad peritoneal a través de la trompa de Falopio;
- Introducción accidental en el momento de procedimientos invasivos, como amniocentesis

La vía más común de infección intrauterina es la ruta ascendente. En este sentido, la presencia de componentes bacterianos, como endotoxinas o lipopolisacáridos (LPS), en la CA de mujeres embarazadas, inducen la producción local así como sistémica de quimioquinas y citoquinas pro-inflamatorias, entre ellas TNF α , que cumple un papel fundamental en el desencadenamiento de mecanismos pro-inflamatorios que culminan en el parto prematuro (142,143). En este sentido, en los últimos años se ha estudiado el rol esencial de los LB en la protección ante el desencadenamiento prematuro del parto. Se conoce que los LB productores de IL-10 tienen la capacidad de disminuir la producción de TNF- α por parte de los LT CD4⁺, evitando así el proceso inflamatorio que induce el PP. Sumado a esto, se demostró que una población de LB presentes en la decidua es capaz de controlar la sobre-activación del sistema inmune inducido por LPS, a través de un mecanismo que involucra a la alarmina: interleuquina 33 (IL-33) (144) .

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

1.3 Acción de la señalización a través del receptor de IL-33 en respuesta a infecciones/inflamación durante el embarazo

La IL-33 es una “alarmina” perteneciente a la familia de las interleuquinas-1 que se libera frente a situaciones de daño celular o estrés y cuya actividad en diversos procesos biológicos está regulada mediante la expresión de sus receptores, así como de moléculas antagonistas (145,146). El receptor de IL-33 tiene dos isoformas, una soluble (ST2s) y otra asociada a membrana (IL-33R o ST2), cuya expresión diferencial controlan diversos mecanismos de señalización que modulan la respuesta inmune generada ante un aumento de IL-33 (147,148). El receptor ST2 está presente en diversos tejidos, así como en un gran número de células inmunes. En el caso de los LB la expresión del receptor ST2 ha sido descrita, hasta el momento, únicamente en las poblaciones celulares de LB B1 y Bregs. La unión de IL-33 a su receptor ST2 en LB1 esplénicos genera la producción de IL-5 y la proliferación de los mismos (149). Por otro lado, los LBregs responden a esta citoquina mediante un aumento en la producción de IL-10 (150). Recientemente, se demostró la unión de la IL-33 con su receptor ST2 presente en LB deciduales induce la producción de PIBF (144). Previamente se ha demostrado que PIBF es producido por los LB, así como por parte de otros tipos celulares, permitiendo la comunicación entre la madre y el feto, mediando acciones inmunomoduladoras de la progesterona(151). Recientemente, Huang y col. demostraron que la producción de PIBF por parte de los LB presentes en la decidua, es inducida preponderantemente por la IL-33 en lugar de progesterona(152). IL-33 y PIBF, actúan como moléculas inmuno-moduladoras,

induciendo, por ejemplo, la producción de citoquinas Th2 por parte de diferentes células inmunes. Adicionalmente, inhibe la activación de linfocitos NK e induce la producción de IL-10 por parte de los linfocitos T y B, así como la producción de anticuerpos asimétricos por parte de LB, necesarios para el correcto desarrollo de la gestación (134,151). Los niveles de PIBF aumentan durante el primer trimestre de embarazo y se mantienen elevados, disminuyendo hacia el final de la gestación (153). Se ha demostrado que bajos niveles de PIBF, así como un desequilibrio en el eje IL-33/ST2s/ST2 están asociados a problemas durante la gestación (154). En relación a esto último, aumentos en los niveles séricos de ST2s, se observan en enfermedades de la gestación como la pre eclampsia y el PP, demostrando que el mantenimiento de este equilibrio es esencial en el correcto desarrollo de la gestación (155,156). De manera similar, estudios realizados *in vitro*, demostraron que un estímulo de LPS sobre tejidos de la interface materno fetal genera un aumento de la producción tanto de IL-33 como de sST2 (157). En estos casos la unión de la IL-33 con el receptor soluble ST2s actúa disminuyendo el efecto de la IL-33 sobre la respuesta inmunológica (148). Por otra parte, estudios llevados a cabo utilizando un modelo murino de PP demostraron que ante la presencia de componentes infecciosos tales como el LPS, la mucosa uterina reacciona produciendo la alarmina IL-33, la cual actúa a través de su receptor de membrana ST2, en LB deciduales, induciendo la producción de PIBF, la cual a su vez inhibe la acción de las células NK y neutrófilos, evitando además la producción de mediadores pro-inflamatorios (144,147,156). Este mecanismo resulta fundamental para mantener la

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

homeostasis necesaria para evitar el desencadenamiento del PP (144) (Ilustración

1.3.1).

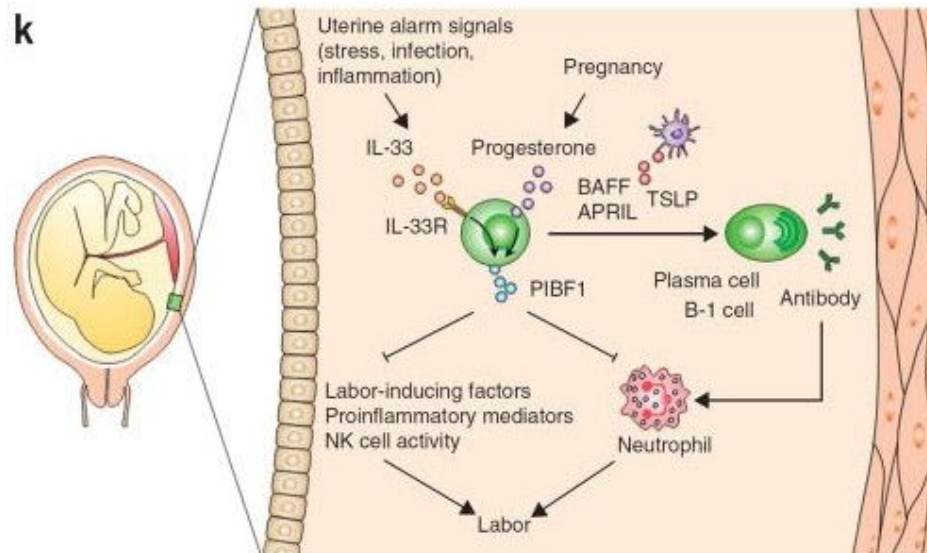


Ilustración 1.3.1 Modelo propuesto de protección mediada por células B coriodesiduales contra PP a través de la expresión de PIBF1 inducida por IL-33. En respuesta a la IL-33 coriodesidual, una alarmina que se libera después del estrés uterino, la inflamación y la infección, las células B coriodesiduales producen PIBF1 para suprimir el parto prematuro, probablemente a través de la inhibición de la producción de factores inductores del trabajo de parto, la actividad de las células asesinas naturales (NK), la infiltración y activación de neutrófilos y la producción de mediadores proinflamatorios. Así, IL-33, células B coriodesiduales y PIBF1 constituyen un eje protector para promover el embarazo a término al contrarrestar el estrés uterino, inflamación e infección. En el PP, las células B coriodesiduales experimentan una expansión aberrante, una mayor activación y diferenciación en células plasmáticas o células B-1, y secretan anticuerpos que pueden desencadenar cascadas inflamatorias que inducen el parto, como la activación del complemento y de los neutrófilos. Además, el eje protector que involucra IL-33, células B coriodesiduales y PIBF1 es defectuoso en PP, probablemente como resultado de la regulación negativa aberrante. (Huang 2017)

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

2 Hipótesis

Nuestros resultados preliminares mostraron un aumento significativo de la expresión del mensajero que codifica para el receptor de IL-33 (ST2) en linfocitos B esplénicos de ratones P comparado con ratones NP. Por otro lado, se ha descrito recientemente el rol fundamental que tienen los LB en la protección del PP inducido por componentes infecciosos mediante un mecanismo que involucra a la alarmina IL-33.

Por lo tanto, hipotetizamos que: la expresión del receptor de IL-33 se ve modulada positivamente durante la gestación en los LB de modo que los mismos puedan responder adecuadamente ante la liberación de esta citoquina en caso de un proceso inflamatorio durante la gestación que pudiera poner en riesgo la continuidad del embarazo.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

3 Objetivo

El objetivo general de esta sección es caracterizar en profundidad la expresión del receptor de IL-33 (ST2) en LB de ratones P comparado con ratones NP, así como su potencial implicancia en la protección del parto prematuro.

3.1 Objetivos específicos:

3.1.1 *Caracterizar la expresión del receptor de IL-33 (ST2) en LB en ratones P comparado con ratones NP.*

3.1.2 *Investigar los potenciales mecanismos que regulan la expresión del receptor de IL-33 (ST2) durante la preñez en LB*

3.1.3 *Caracterizar la expresión del receptor de IL-33 (ST2) en LB provenientes de un modelo murino de parto prematuro.*

4 Resultados

4.1 Expresión del receptor de IL-33 (ST2) en LB de ratones P comparado con ratones NP.

Los resultados del análisis transcriptómico mostraron que la expresión del ARNm (*il1rl1*) del gen que codifica para el receptor de IL-33 se encuentra significativamente aumentado en LB esplénicos de ratones P (día 14 de la gestación) comparado con ratones NP.

*4.1.1 Niveles de expresión relativa de ARNm de *Il1rl1* en LB de ratones P comparado con ratones NP*

Se procedió a validar mediante RT-qPCR los resultados obtenidos a partir del gene-array en cuanto a los niveles de ARNm de *il1rl1* durante el embarazo. Para ello, se realizó el aislamiento magnético de LB totales de bazo de ratones hembra P y NP (**Metodología 6.2**). Posteriormente, se realizó el aislamiento de RNA total, la síntesis de la primera hebra de ADNc (**Metodología 6.8**). Se analizó la expresión del mensajero *il1rl1* mediante PCR semicuantitativa (**Metodología 6.9**) utilizando cebadores específicos, previamente diseñados (**Metodología 6.7**).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

Se observó un aumento significativo ($p=0,0020$) en los niveles de expresión del ARNm de *il1rl1* en LB de ratones P comparado con ratones NP, en concordancia con lo observado en el estudio transcriptómico de los LB (FC=4.5) (**Figura 4.1.1.1**).

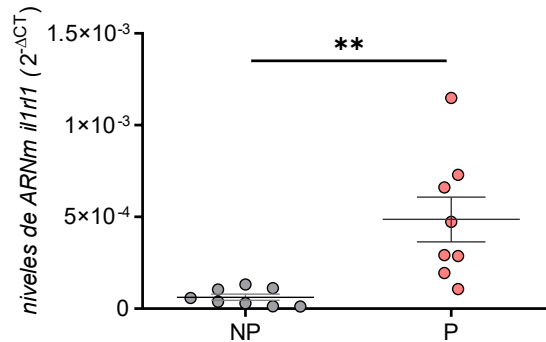


Figura 4.1.1.1. Niveles de expresión relativa de ARNm de *Il1rl1* en LB. El análisis semicuantitativo de los datos de qPCR mostró niveles de expresión de *il1rl1* significativamente mayores en LB esplénicas aislados de ratones P ($**6 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-5}$, $n=8$) comparado con ratones NP ($4 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-4}$, $n=8$). Se utilizó β -actina como gen de referencia. La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana normal, confirmada por los test de Shapiro-Wilk (nivel de confianza $\alpha=0.05$), por lo que fueron analizados con un test de Student desapareado, paramétrico, con un ($P<0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de puntos donde diferencias significativas se expresan como $**P<0,01$.

4.1.2 Expresión del receptor de IL-33 (ST2) en LB de ratones P comparado con ratones NP por citometría de flujo

A continuación, se evaluó la expresión del receptor ST2 (codificado por *Il1rl1*) en LB esplénicos, mediante citometría de flujo. Se realizó el aislamiento e inmuno-marcación de esplenocitos totales provenientes de ratones P y NP, con anticuerpos específicos (B220, ST2) (**Metodología 6.16**). La estrategia de gating utilizada se detalla en la **Figura 4.1.2.1**.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

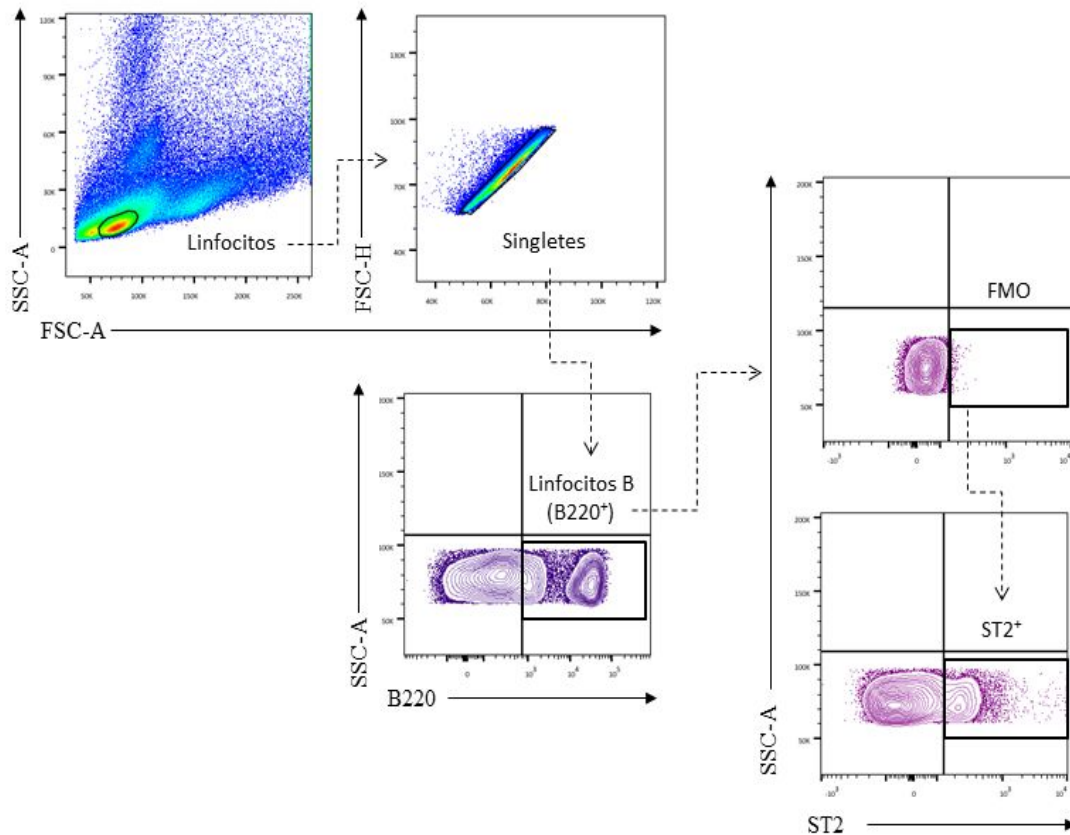


Figura 4.1.2.1 Estrategia de gating de la expresión de ST2 en LB totales. De manera representativa, gráficos en pseudocolor y contorno muestran la estrategia de gating utilizada para cuantificar los porcentajes de LB esplénicos que expresan ST2 de ratones P y NP. Se Determinó a partir del tamaño (FSC) y granularidad (SSC) la población correspondiente a los linfocitos. Se eliminaron dobles y se utilizó B220 (marcador PanB celular) para definir la población total de LB esplénicos. Posteriormente, se determinó el marcador de superficie del receptor de IL-33 (ST2) en células B220⁺, utilizando como control el FMO (del inglés fluorescence minus one). Los datos fueron analizados con FlowJo_V10.

Se observó un aumento significativo del porcentaje de LB-totales ST2⁺ ($p < 0,0001$), así como del número total de LB-totales ST2⁺ ($p = 0,0192$) provenientes de bazo de ratones P comparado a ratones controles NP (**Figura 4.1.2.2**).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

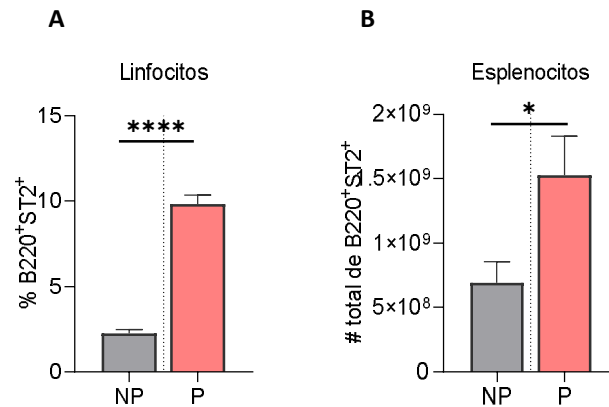


Figura 4.1.2.2. Análisis de la expresión de ST2 en LB esplénicos de ratones P comparado con ratones NP. A. Porcentaje de LB totales que expresan el receptor de IL-33 (B-ST2⁺) provenientes de bazo de ratones hembra P (9.82 ± 0.5 ****, $n=11$), comparado con NP (2.28 ± 0.2 , $n=11$). B. Número total de LB provenientes del bazo, que expresan el receptor de IL-33 (B-ST2⁺) de ratones P ($1,5 \times 10^9 \pm 3 \times 10^8$, $n=11$), comparado con ratones NP ($6,9 \times 10^8 \pm 1,6 \times 10^8$ *, $n=11$). La distribución de los datos no sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test desapareado, no paramétrico de una cola: Mann-Whitney (nivel de confianza $\alpha=0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como * $P<0,05$; **** $P<0,0001$.

Adicionalmente, se observó un aumento significativo en la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI, del inglés median of fluorescent intensity) (**Figura 4.1.2.3**) de ST2 en LB esplénicos totales (B220⁺) de ratones P respecto a ratones NP ($p=0,0154$) (**Figura 4.1.2.4**).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

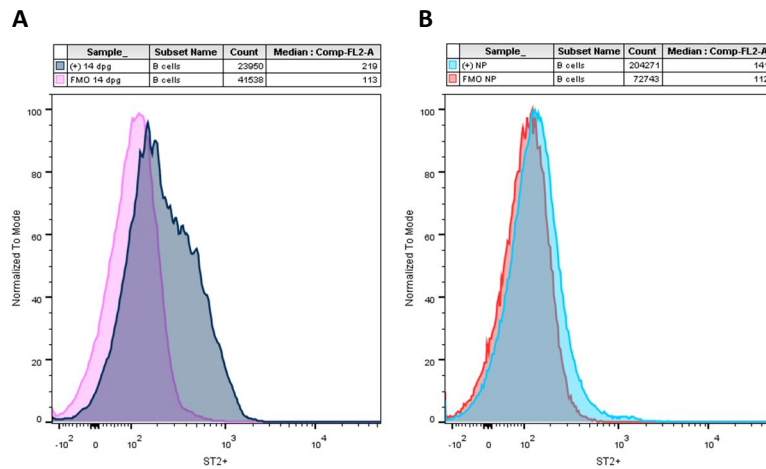


Figura 4.1.2.3 Histograma representativo de la medida de intensidad de fluorescencia del marcador de ST2 en LB (B220⁺). A. Análisis de la mediana de intensidad de fluorescencia de ST2 y el control FMO en LB (B220⁺) esplénicos de ratones P y B. ratones NP.

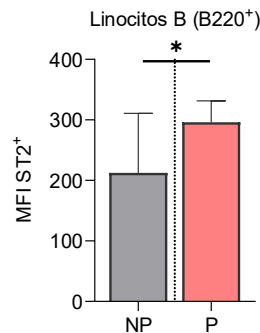


Figura 4.1.2.4. Análisis estadístico del MFI de ST2 en LB esplénicos. Se observó un aumento de la expresión del receptor de IL-33 (ST2⁺) en LB esplénicos provenientes de ratones P (296,1± 10,7 *, n=11) con respecto a ratones NP (212,6± 29,6, n=11). La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana normal, confirmada por el test de Shapiro-Wilk (nivel de confianza $\alpha=0.05$), por lo que fueron analizados con un test de Student despareado, paramétrico, de una cola con un ($P<0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como * $P<0,05$.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

4.1.3 Sub-poblaciones de LB esplénicos que expresan el receptor de IL-33

Para determinar si el aumento observado en el porcentaje de LB-totales ST2⁺ esplénicos de ratones P comparado con ratones NP era homogénea o si se correspondía con alguna subpoblación celular específica, se analizó la expresión de ST2 en las distintas subpoblaciones de LB mediante citometría de flujo. Brevemente, esplenocitos totales fueron-inmuno marcados con anticuerpos específicos (B220, CD23, CD21, ST2) (**Metodología 6.16**) a fin de evaluar la expresión de ST2 en las distintas subpoblaciones de LB, cómo ser los LB de la zona marginal del bazo (MZ: B220⁺CD23⁻CD21^{hi}) del bazo, los LB foliculares (FO: B220⁺CD23⁺CD21⁻) y B1 (B220^{low}CD23⁻CD21⁻). La estrategia de gating utilizada para determinar las distintas subpoblaciones de LB positivas para ST2 se detalla en la **Figura 4.1.3.1** .

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

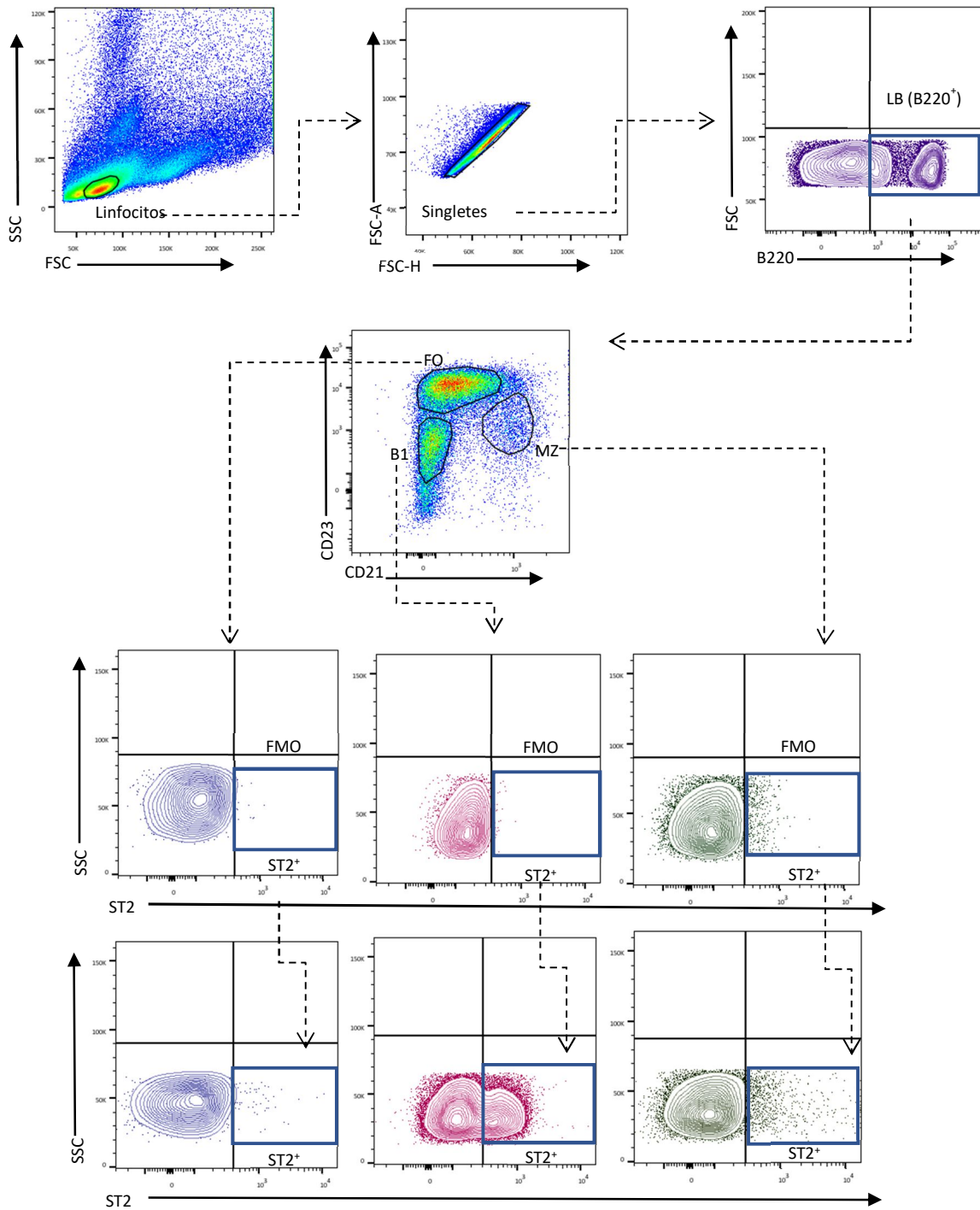
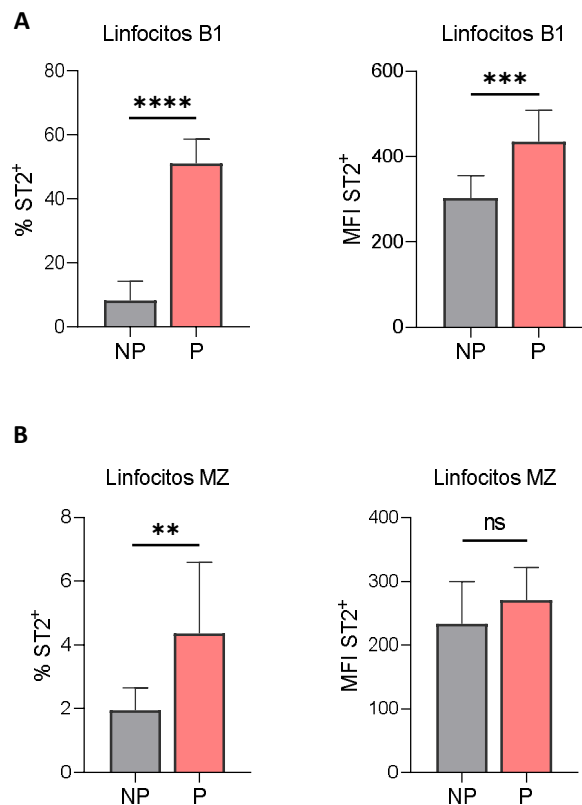


Figura 4.1.3.1 Estrategia de gating utilizada para cuantificar el porcentaje de LB Foliculares (FO), de la zona marginal del bazo (MZ) y B1 que expresan ST2 en su superficie celular. De manera representativa, gráficos en pseudocolor y contorno muestran la estrategia de gating utilizada para cuantificar los porcentajes de LB esplénicos FO, MZ o B1 ST2⁺ provenientes de ratones P y ratones NP. A partir del tamaño (FSC) y granularidad (SSC) se determinó la población correspondiente a los linfocitos. Se eliminaron dobles y se utilizó B220 (marcador PanB celular) para definir la población total de LB esplénicos (B220⁺).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

Se utilizaron los marcadores de superficie CD23 y CD21 para diferenciar las distintas subpoblaciones de LB de la siguiente manera: LB de la zona marginal del bazo (MZ: B220⁺CD23⁻CD21^{hi}), las LB foliculares (FO: B220⁺CD23⁺CD21⁻) y LB1 (B1: B220^{low}CD23⁻CD21⁻). Sobre cada una de estas poblaciones se determinaron las células positivas para el marcador ST2, utilizando como control el FMO (del inglés fluorescence minus one. Los datos fueron analizados con FlowJo_V10.

Se observó un aumento significativo tanto en el porcentaje ($p < 0,0001$) como en el MFI ($p = 0,0001$) de ST2⁺ en LB1 esplénicos de ratones P comparados con ratones NP (**Figura 4.1.3.2 A**). Adicionalmente, se observó un aumento significativo de la expresión de ST2 en las poblaciones MZ ($p = 0,0044$) y FO ($p = 0,0009$) de ratones P respecto de NP, siempre en rangos muy bajos de expresión comparados con la expresión observada en LB1. Por otro lado, el MFI de ST2 en estas subpoblaciones no mostró diferencias significativas (MZ: $p = 0,0820$; FO: $p = 0,1416$) (**Figura 4.1.3.2 B y C**).



Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

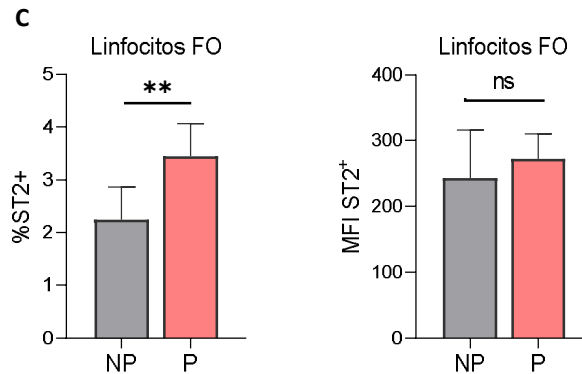


Figura 4.1.3.2 Análisis estadístico de la expresión de ST2 sobre las subpoblaciones de LB (B220⁺) durante la preñez. A. Análisis estadístico del porcentaje de expresión y MFI de ST2 en LB1 de ratones P ($51,13 \pm 2,3$; MFI: 434 ± 22 , $n=11$) comparado con ratones NP ($8,4 \pm 2,1$; MFI 302 ± 16 , $n=8$). B. Análisis estadístico del porcentaje de expresión y MFI de ST2 en LB MZ de ratones P ($4,36 \pm 0,7$; MFI 270 ± 16 , $n=11$) comparado con ratones NP ($1,95 \pm 0,25$; MFI 234 ± 20 , $n=8$). C. Análisis estadístico del porcentaje de expresión y MFI de ST2 en LB FO de ratones P ($**3,45 \pm 0,2$; MFI: 272 ± 12 , $n=9$) comparado con ratones NP ($**2,25 \pm 0,23$, MFI: 243 ± 26 , $n=7$). La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana normal, confirmada por los test D'Agostino & Pearson test y Shapiro-Wilk test (nivel de confianza $\alpha=0.05$), por lo que fueron analizados con un test de Student desapareado, paramétrico, de una cola con un ($P<0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como $*P<0,05$; $**P<0,01$; $***P<0,001$; $****P<0,0001$ y ns= no significativo.

A pesar de observar diferencias en el porcentaje de LB2-ST2⁺ durante la preñez, este aumento es significativamente menor comparado con los altos niveles de expresión de ST2 observado en los LB1 ($p<0,0001$) (Figura 4.1.3.3).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

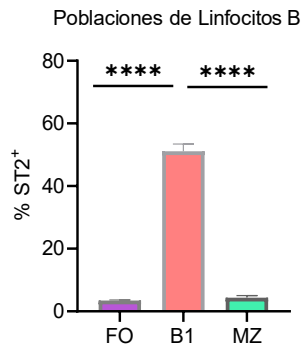


Figura 4.1.3.3. Análisis estadístico de la expresión de ST2 sobre las subpoblaciones de LB (B220⁺) de ratones P. Se comparó el porcentaje de expresión de ST2 en cada subpoblación de LB durante la preñez. Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como **** $P < 0,0001$. Se puede observar que el valor de expresión del ST2 en los LB2 es similar entre subpoblaciones, sin embargo, observamos una alta expresión del % de ST2 cuando comparamos con los LB1.

4.1.4 Expresión de ST2 en LB de la cavidad peritoneal

En ratones, la cavidad peritoneal es el reservorio natural de los LB1. Por lo tanto, se aislaron células totales de la cavidad peritoneal de ratones P y NP, las cuales fueron teñidas con anticuerpos específicos (CD19, CD5, ST2) como se detalla en la **Metodología 6.18**. La estrategia de gating utilizada para evaluar la expresión de ST2 en LB peritoneales se detalla en la **Figura 4.1.4.1**.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

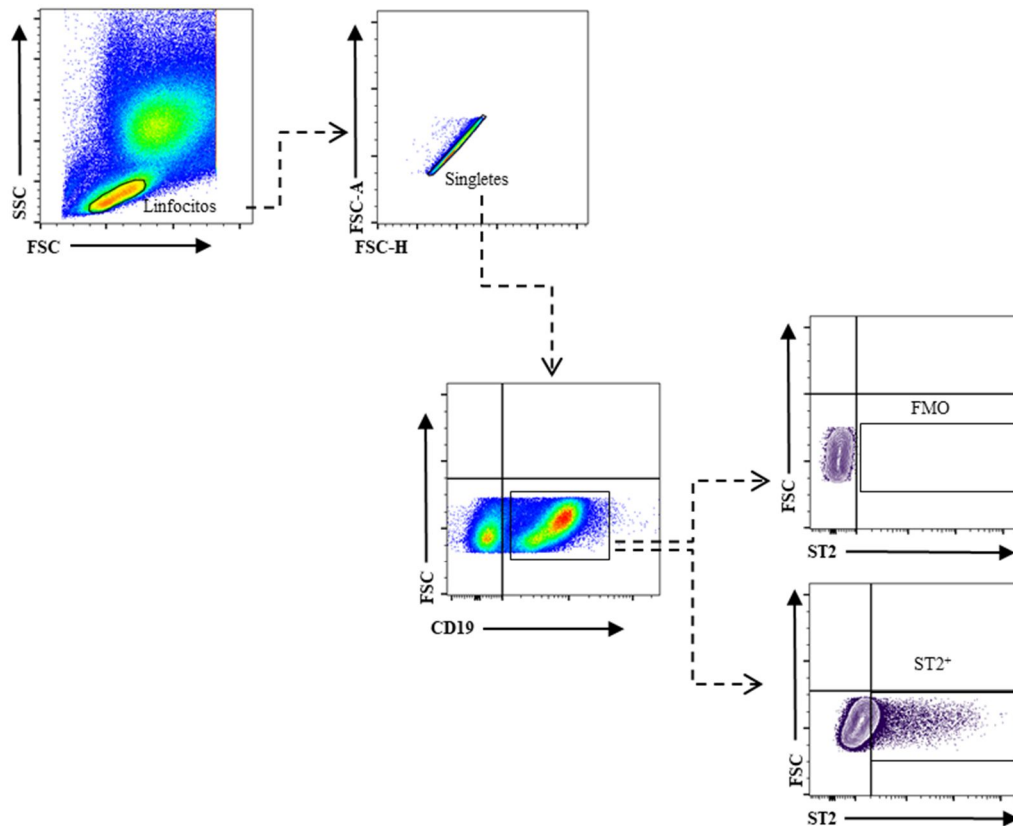


Figura 4.1.4.1. Estrategia de gating utilizada para evaluar la expresión de ST2 en LB (CD19⁺) peritoneales de ratones P comparado con ratones NP. De manera representativa, gráficos en pseudocolor y contorno muestran la estrategia de gating utilizada para cuantificar los porcentajes de LB-totales ST2⁺ peritoneales de ratones P y NP. A partir del tamaño (FSC) y granularidad (SSC) se determinó la población correspondiente a los linfocitos. Se eliminaron dobletes y se utilizó CD19⁺ (marcador Pan B celular) para definir la población total de LB peritoneales. Sobre esta población se determinaron las células positivas para el marcador de superficie del receptor de IL-33 (ST2), utilizando como control el FMO (del inglés fluorescence minus one). Los datos fueron analizados con FlowJo_V10.

A partir del análisis estadístico de los datos se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos CD19⁺ST2⁺ provenientes del peritoneo de ratones P comparado con ratones NP ($p < 0,0001$) (Figura 4.1.4.2)

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

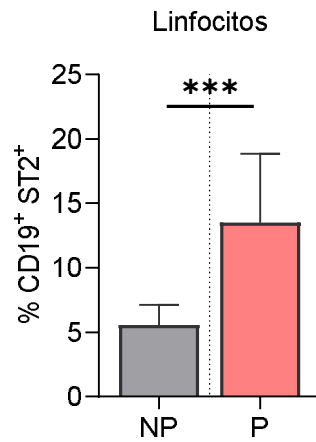


Figura 4.1.4.2. Análisis de la expresión de ST2 en LB (CD19⁺) peritoneales de ratones P comparado con ratones NP. Se observó un aumento significativo sobre el porcentaje de LB totales peritoneales que expresan el receptor de IL-33 (CD19⁺-ST2⁺) de bajo de ratones P (13,5±1,8, n=9), comparado con ratones NP (5,5±0,5 n=9). La distribución de los datos no sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test desapareado, no paramétrico de una cola de Mann-Whitney (nivel de confianza $\alpha=0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como ***P<0,001.

Posteriormente, se analizaron las distintas poblaciones de LB1-ST2⁺. La estrategia de gating utilizada se detalla en la **(Figura 4.1.4.3)**

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

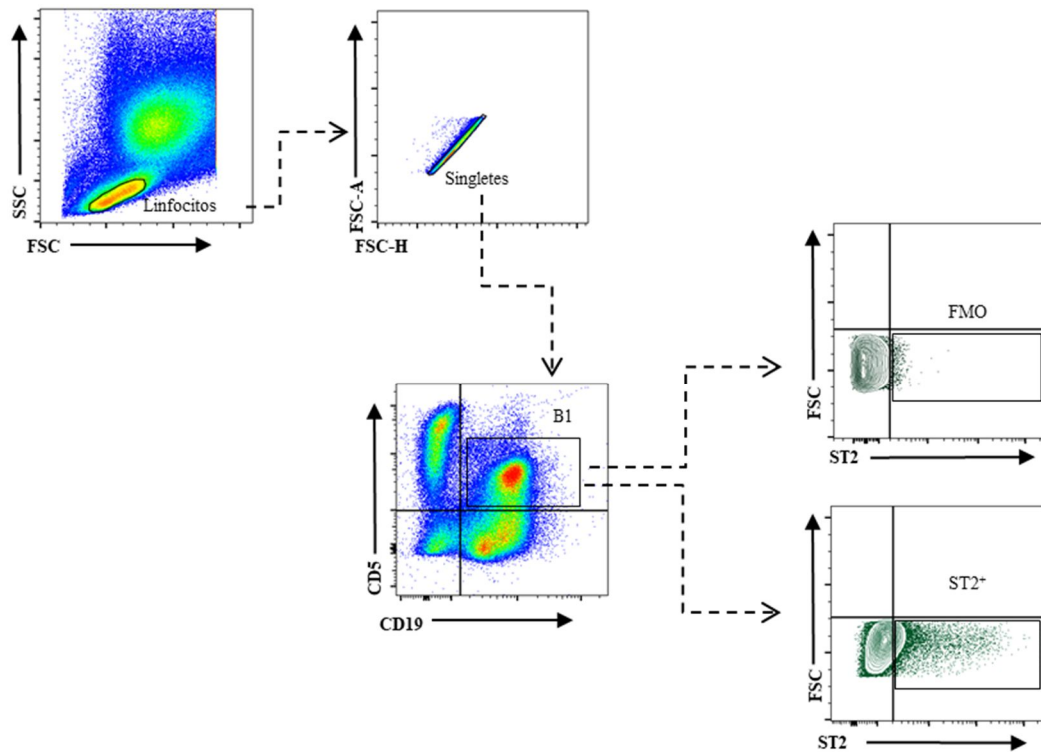


Figura 4.1.4.3. Estrategia de gating utilizada para evaluar la expresión de ST2 en LB1a (CD19⁺CD5⁺) de ratones P comparado con ratones NP. De manera representativa, gráficos en pseudocolor y contorno muestran la estrategia de gating utilizada para cuantificar los porcentajes de LB1a-ST2⁺ (CD19⁺B220^{low}CD5⁺ST2⁺) peritoneales de ratones P y ratones NP. A partir del tamaño (FSC) y granularidad (SSC) se determinó la población correspondiente a los linfocitos. Se eliminaron dobletes y se utilizaron CD19 y CD5 para determinar la población de LB1a (CD19⁺CD5⁺). Sobre estas poblaciones se determinaron las células positivas para el marcador de superficie del receptor de IL-33 (ST2), utilizando como control el FMO. Los datos fueron analizados con FlowJo_V10.

El análisis estadístico de los datos arrojó diferencias significativas en el porcentaje de LB1a que expresan el receptor ST2 (CD19⁺CD5⁺ST2⁺) provenientes de la cavidad peritoneal de ratones P comparado a ratones NP ($p < 0,0001$) (**Figura 4.1.4.4**).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

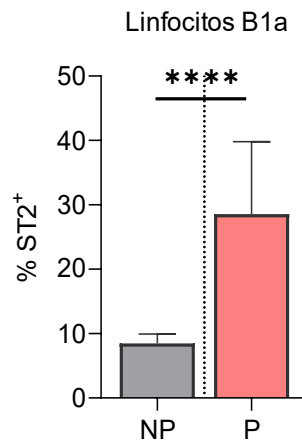


Figura 4.1.4.4. Análisis de la expresión de ST2 en LB1 peritoneales de ratones P comparado con ratones NP. Se observó un aumento significativo sobre el porcentaje de LB1a peritoneales que expresan el receptor de IL-33 (CD19⁺CD5⁺ST2⁺) de ratones P (28,5±3,7, n=9), comparado con ratones NP (8,5±0,5, n=9). La distribución de los datos no sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test desapareado, no paramétrico, de una cola, de Mann-Whitney (nivel de confianza $\alpha=0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como ****P<0,0001.

4.1.5 Expresión de ST2 en LB provenientes de ganglios para-aórticos

A continuación, se evaluó la expresión del receptor ST2 en LB de ganglios linfáticos que drenan el útero (para-aórticos). Se realizó el aislamiento e inmuno-marcación de células totales provenientes de los ganglios para-aórticos de ratones P y NP (**Metodología 6.17**). Se determinó la expresión de ST2 en LB2 (CD19⁺B220^{high}) mediante citometría de flujo. La estrategia de gating utilizada se detalla en la **Figura 4.1.5.1**.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

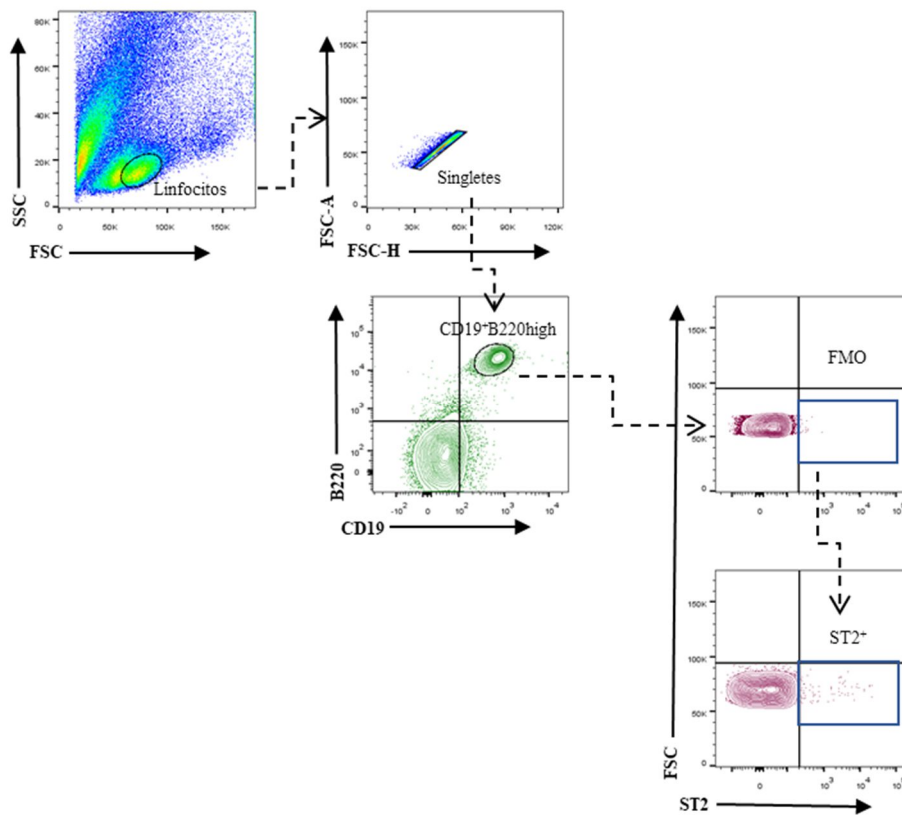


Figura 4.1.5.1. Estrategia de gating utilizada para evaluar la expresión de ST2 en LB2 provenientes de ganglios para-aórticos durante la gestación. De manera representativa, gráficos en pseudocolor y contorno muestran la estrategia de gating utilizada para cuantificar los porcentajes de LB2-ST2⁺ (CD19⁺B220^{high}ST2⁺) de ratones P y ratones NP. A partir del tamaño (FSC) y granularidad (SSC) se determinó la población correspondiente a los linfocitos. Se eliminaron dobles y se definió el porcentaje de LB2: CD19⁺B220^{high} que expresan el receptor de IL-33 (ST2⁺) provenientes de ganglios para-aórticos. Se utilizó como control el FMO. Los datos fueron analizados con FlowJo_V10.

No se observaron diferencias significativas tanto en el porcentaje ($p=0,21$) de LB (CD19⁺B220^{high}), así como en MFI de ST2 ($p=0,42$) en LB provenientes de los ganglios para-aórticos de ratones P comparado con ratones NP (**Figura 4.1.5.2**).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

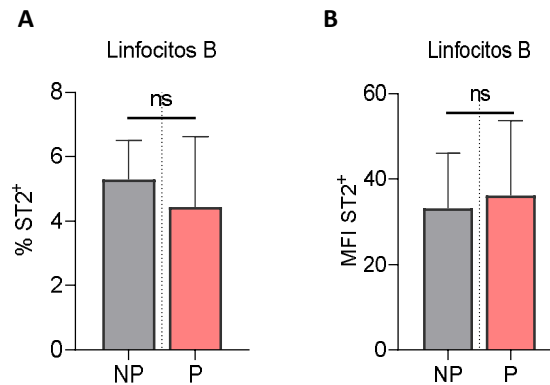


Figura 4.1.5.2. Análisis del porcentaje de la expresión de ST2 en LB provenientes de ganglios para-aórticos, de ratones P comparado con ratones NP. A. Análisis del porcentaje de LB que expresan ST2 (CD19⁺-ST2⁺) de ratones P (4,43±1,1; n=4), comparado con ratones NP (5,3±0,5; n=7). B: Análisis del MFI de ST2 en L provenientes de ratones P (36,2±17,5; n=5) comparado con ratones NP (33,23±12,73; n=8). La distribución de los datos no sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test desapareado, no paramétrico de dos una cola de Mann-Whitney (nivel de confianza $\alpha=0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias no significativas se expresan ns.

4.2 Cinética de expresión del receptor de IL-33 durante distintas etapas de la gestación

Se realizó una cinética de expresión de ST2 durante diferentes días gestacionales en ratón (días 12, 14 y 16 de la preñez) en las distintas poblaciones de LB provenientes de bazo y peritoneo mediante citometría de flujo (**Metodologías 6.16 y 6.18**).

4.2.1 Cinética de expresión del receptor de IL-33 en LB1 esplénicos

Se observó aumento significativo ($p < 0,0001$) del porcentaje de LB1- ST2⁺ esplénicos en el día 12 de la gestación comparado con ratones NP, este aumento se mantuvo hacia el día 14 de la gestación. Sin embargo, el día 16 de la preñez, observamos una disminución significativa del porcentaje de LB1-ST2⁺, siendo el mismo comparable al porcentaje de LB1-ST2⁺ observado en animales NP ($p > 0,9999$) (Figura 4.2.1.1).

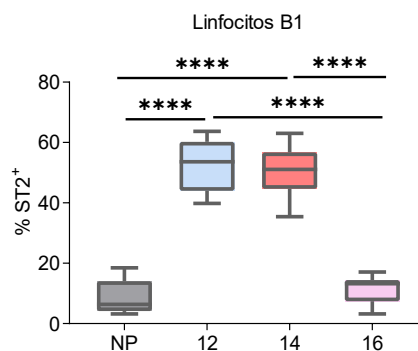


Figura 4.2.1.1. Análisis de la cinética de expresión de ST2 en subpoblaciones de LB1 esplénicos en diferentes días gestacionales. A. Porcentaje de LB1-ST2 esplénicos de ratones P en el día 12 ($51,9 \pm 2,9$; $n=9$), 14 ($51,13 \pm 2,28$; $n=11$) y 16 ($11,2 \pm 1,8$; $n=7$) de la gestación, comparado con ratones NP ($8,38 \pm 2,6$, $n=8$). B. Porcentaje de LB MZ-ST2 esplénicos de ratones P en el día 12 ($3,74 \pm 0,65$; $n=9$), 14 ($4,36 \pm 0,7$; $n=11$) y 16 ($1,64 \pm 0,18$; $n=7$) de la gestación, comparado con ratones NP ($1,94 \pm 0,25$, $n=8$). C. Porcentaje de LB FO-ST2 esplénicos de ratones P en el día 12 ($2,35 \pm 0,28$; $n=8$), 14 ($3,39 \pm 0,19$; $n=9$) y 16 ($2,32 \pm 0,37$; $n=7$) de la gestación, comparado con ratones NP ($2,24 \pm 0,23$, $n=7$). La distribución de los datos no sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test desapareado, no paramétrico de Kruskal-Wallis (nivel de confianza $\alpha=0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$.

4.2.2 Cinética de expresión del receptor de IL-33 en LB1 peritoneales

Se observó un aumento, que no llegó a ser significativo, en el porcentaje de LB1-ST2⁺ peritoneales de ratones P el día 12 de la gestación, el cual aumenta hacia el día 14 de la gestación, siendo significativamente mayor con respecto a ratones NP (p=0,001). El día 16 de la preñez, el porcentaje de LB1-ST2⁺ disminuye nuevamente, siendo similar al porcentaje observado en ratones NP (**Figura 4.2.2.1**).

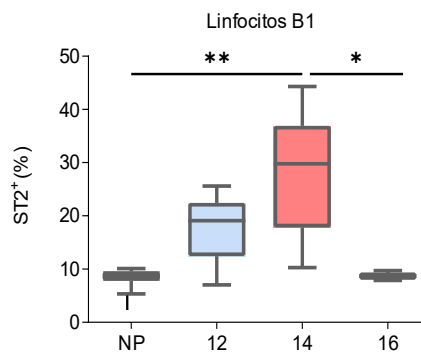


Figura 4.2.2.1 Análisis del porcentaje de LB1 provenientes de la cavidad peritoneal, que expresan el receptor de IL-33 (ST2) en diferentes días gestacionales. B. Porcentaje de LB1 peritoneales que expresan ST2 provenientes de ratones P en el día 12 ($17,7 \pm 3$, $n=5$), 14 ($28,5 \pm 7,3$; $n=9$) y 16 ($8,7 \pm 0,5$, $n=3$) de la gestación comparado con ratones NP ($8,5 \pm 0,5$; $n=9$). La distribución de los datos no sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test desapareado, no paramétrico de dos colas: Mann-Whitney (nivel de confianza $\alpha=0.05$). La distribución de los datos no sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test desapareado, no paramétrico de Kruskal-Wallis (nivel de confianza $\alpha=0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4.3 Mecanismos que regulan la expresión del receptor de IL-33 durante la preñez

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

A continuación, se evaluó el efecto de los aloantígenos presentes en el feto y de las hormonas sexuales femeninas, estradiol y progesterona, sobre la modulación en la expresión de ST2 observada en LB durante la gestación.

4.3.1 *Rol de las hormonas sexuales femeninas, estradiol y progesterona, en la regulación diferencial de la expresión del receptor de IL-33 en LB.*

Esplenocitos aislados de ratones NP fueron cultivados *in vitro* en presencia de distintos estímulos hormonales: estradiol (E2), progesterona (P4) y una combinación de ambas, utilizando concentraciones de ambas hormonas que se encuentran dentro del rango fisiológico observado durante la gestación en ratón (**Metodología 6.19**). Posteriormente se determinó, mediante citometría de flujo, la expresión del ST2 en LB1 (CD19⁺LB220^{low}). Se observó una tendencia de aumento, que no llegó a ser significativa, del porcentaje de LB1 que expresan el receptor de ST2 ($p= 0,8171$), así como el MFI de ST2 en LB1 ($p=0,6379$) ante el estímulo con estradiol (E2). El mismo resultado fue obtenido cuando se estimularon esplenocitos con ambas hormonas (E2+P4). No se observaron diferencias significativas ante el estímulo con P4 (**Figura 4.3.1.1**).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

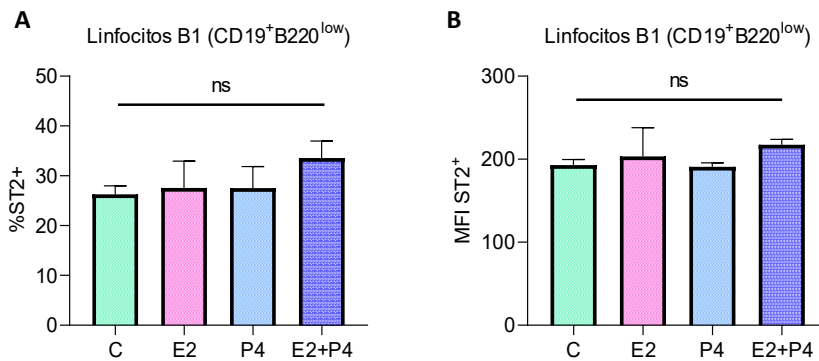


Figura 4.3.1.1. Influencia de las hormonas sexuales femeninas sobre la expresión de ST2 en LB1 esplénicos. A. Porcentaje de LB1 (CD19⁺B220^{low}) que expresan ST2 ante la estimulación con E2 (27,6±4,3; n=9), P4 (27,5±3,8; n=9), o E2+P4 (33,5±5,2; n=9), respecto de controles sin estimular (26,3±3,8; n=9). B. MFI de ST2 en LB1 esplénicos ante la estimulación con E2 (203,3±32,2; n=9), P4 (190,9±23,16; n=9), o E2+P4 (217,3±30,75; n=9), respecto de controles sin estimular (192,9±20,8; n=9). La distribución de los datos no sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test desapareado, no paramétrico de Kruskal-Wallis (nivel de confianza $\alpha=0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias no significativas se expresan como ns.

4.3.2 Incidencia de los aloantígenos presentes en el feto sobre la expresión del receptor de IL-33 en LB.

Se evaluó el efecto de la presencia de aloantígenos fetales sobre la expresión del receptor de ST2 en los LB1, para lo cual se utilizaron apareamientos singénicos (**Metodología 6.20**) y se compararon con los apareamientos alogénicos previamente descriptos y ratones NP.

Se observó una disminución significativa en el porcentaje de LB1-ST2⁺provenientes de bazo de ratones P singénicos comparado a ratones P alogénicos. De igual manera, aunque en menor proporción, se observó un aumento del porcentaje de LB1-ST2⁺ en ratones singénicos respecto de ratones NP. Así mismo, y como se mencionó en

resultados anteriores, ratones P alogénicos mostraron un aumento significativo en el porcentaje de LB totales-ST2⁺ y LB1-ST2⁺, respecto de ratones NP ($p < 0,0001$) (**Figura 4.3.2.1**).

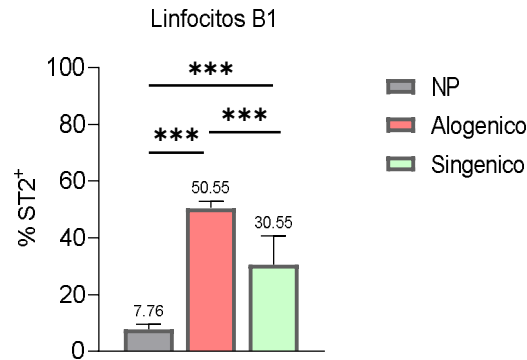


Figura 4.3.2.1. Influencia de la presencia de aloantígenos sobre LB1 esplénicos. Porcentaje de LB1 (B220^{low}CD23⁻CD21⁻) provenientes de ratones P alogénicos (50,6±2,4; n=10) y singénicos (30,5±4,1; n=6) comparados con ratones NP (7,8±1,8; n=8). La distribución de los datos no sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test desapareado, no paramétrico de Kruskal Wallis (nivel de confianza $\alpha=0,05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Sumado a esto, se observó la misma cinética en el porcentaje de LB1-ST2⁺ durante los distintos días de la gestación en ratones P singénicos, a la observada en ratones P alogénicos, explicada en el apartado anterior ($p < 0,0001$) (**Figura 4.3.2.2**).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

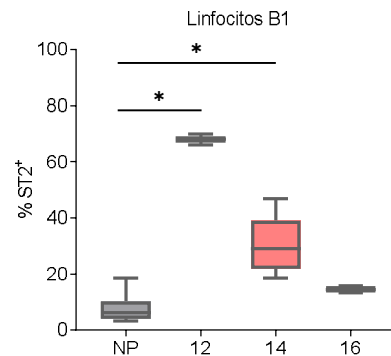


Figura 4.3.2.2 Análisis del porcentaje de LB1 esplénicos que expresan el receptor de IL-33 (ST2) en diferentes días gestacionales. Porcentaje de LB1 peritoneales que expresan ST2 (CD19⁺CD5⁺ST2⁺) provenientes de ratones P singénicos en el día 12 (68±1,9, n=2), 14 (30,6±4,1; n=6) y 16 (14,6±1,3, n=2) de la gestación comparado con ratones NP (7,8±1,8; n=8). La distribución de los datos no sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test desapareado, no paramétrico de dos colas: Mann-Whitney (nivel de confianza $\alpha=0.05$). La distribución de los datos no sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test desapareado, no paramétrico de Kruskal-Wallis (nivel de confianza $\alpha=0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como *P<0,05.

Adicionalmente, se observó una disminución, que no llegó a ser estadísticamente significativa, del porcentaje de LB1-ST2⁺ de la cavidad peritoneal de ratones P singénicos respecto de P alogénicos. Así mismo, LB1 (p<0,0001) peritoneales de ratones P alogénicos y P singénicos, mostraron un aumento en el porcentaje de ST2 comparado a ratones NP (**Figura 4.3.2.3**).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

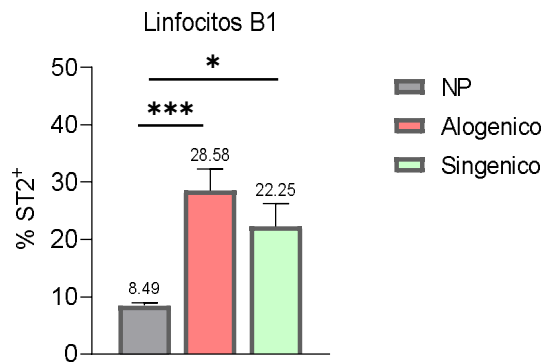


Figura 4.3.2.3 Influencia de la presencia de aloantígenos sobre de LB peritoneales. Porcentaje de LB1 (CD19⁺CD5⁺) provenientes de ratones P alogénicos (28,6±3,8; n=9) y singénicos (22,25±2; n=4) comparados con ratones NP (8,5±0,5; n=9). La distribución de los datos no sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test desapareado, no paramétrico de Kruskal-Wallis (nivel de confianza $\alpha=0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como *P<0,05; ***P<0,001.

El análisis del porcentaje de LB-totales ST2⁺ provenientes de ganglios para-aórticos no mostró diferencias significativas entre los apareamientos alogénico y singénico, así como comparado a ratones NP (p=0,6435) (**Figura 4.3.2.4**).

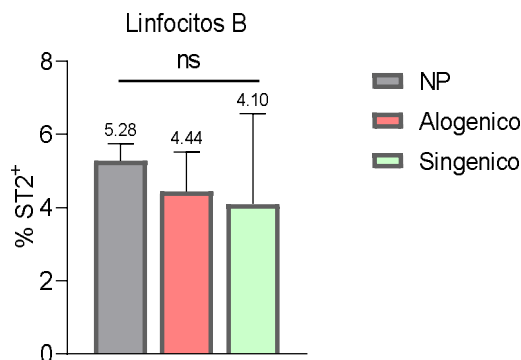


Figura 4.3.2.4 Influencia de la presencia de aloantígenos sobre de LB de ganglios para-aórticos. A. Porcentaje de LB (CD19⁺) provenientes de ratones P alogénicos (4,44±1; n=4) y singénicos (4,1±1,2; n=4), comparados con ratones NP (5,2±0,5; n=7). La distribución de los datos no sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test desapareado, no paramétrico de Kruskal-Wallis (nivel de confianza $\alpha=0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias no significativas se expresan como ns.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

4.4 Caracterización del receptor de IL-33 en los LB en un modelo murino de parto prematuro

Teniendo en cuenta el efecto protector sobre el PP descrito recientemente para la IL-33 a través de mecanismos que involucran a LB, a continuación, evaluamos la expresión del receptor ST2 en LB en la etapa aguda de inducción del PP en ratón. Para tal fin, se realizó la puesta a punto de un modelo murino de inducción del PP mediante la inyección intraperitoneal de lipopolisacárido bacteriano (LPS).

4.4.1 Modelo murino de parto prematuro:

El esquema utilizado en la puesta a punto del modelo de PP se ilustra a continuación (**Ilustración 4.4.1.1**). Brevemente, ratones hembra preñados fueron inyectadas con diferentes dosis de LPS o vehículo (PBS) (**Metodología 6.21**), en el día 16 de la gestación. La expulsión del primer feto fue considerada como inicio del parto, y se consideraron como PP aquellos nacimientos ocurridos entre las 24 y 48 h posteriores a la inyección de LPS. Se consideró parto normal (PN) al ocurrido posterior a las 48 h la inyección de LPS.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

Modelo de parto prematuro

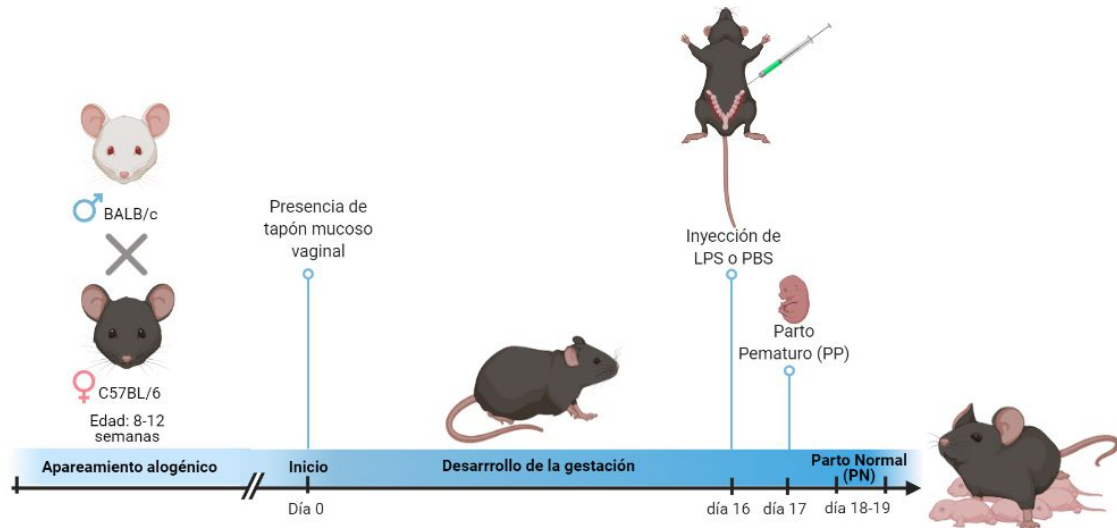


Ilustración 4.4.1.1. Esquema del modelo murino de parto prematuro. Esquema del modelo experimental a utilizar. Ratones hembra en el día 16 de gestación provenientes de apareamientos alógenos fueron inyectadas con dosis decrecientes de LPS a fin de determinar la dosis que permita la ocurrencia del 100% de partos prematuros (PP), definidos como los partos que ocurran en el transcurso de las 24 posteriores a la inducción por LPS. Partos posteriores las se determinarán como partos normales (PN).

Se determinó la dosis mínima de LPS capaz de inducir el 100% del PP, la cual resultó ser: 10µgr/ratón. La misma, fue utilizada en los estudios posteriores. Las dosis utilizadas y el resultado de la preñez se especifican en la **Tabla 4.4.1.1.**

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

TRATAMIENTO	Nº madres con PP		Nº madres con PN		%PP	Camada promedio
	Madres con crías muertas	Madres con crías vivas	Madres con crías muertas	Madres con crías vivas		
CONTROL (PBS)	0	0	0	5	0	9
LPS (5µg)	1 (25%)	1	0	4	25	8
LPS (10µg)	5 (100%)	0	0	0	100	7
LPS (20µg)	5 (100%)	0	0	0	100	9
LPS (25µg)	4 (100%)	0	0	0	100	9
LPS (50µg)	2 (100%)	0	0	0	100	8

Tabla 4.4.1.1. Dosis de LPS utilizadas en la inducción del parto prematuro. El día de ocurrencia del parto, determinando parto normal (PN) o prematuro (PP) y el número de crías promedio por madre se analizaron para determinar la dosis mínima de LPS a utilizar.

Una vez determinada la dosis de LPS, comenzamos con el estudio del efecto de la inducción del parto prematuro sobre LB y la expresión del receptor de ST2 en los mismos. Para este objetivo, los ratones hembra fueron sacrificados 5 h posteriores a la inyección con LPS, es decir, durante la etapa aguda del proceso inflamatorio y del desarrollo del PP.

Inicialmente para determinar la fiabilidad del modelo y el comienzo del proceso inflamatorio al momento de la toma de muestra, se evaluaron las características macroscópicas del estado de los fetos y de los tejidos de la interfase materno-fetal. Así mismo, se determinó, además, la existencia de modificaciones en el peso y número de células totales de los órganos evaluados previamente durante la preñez normal.

4.4.1.1 Características macroscópicas

Las características macroscópicas de las crías, úteros y placentas provenientes de ratones hembra cursando preñeces normales (ratones PN: PBS) y ratones hembra con parto prematuro (ratones PP: LPS) se ilustran en la **Figura 4.4.1.1.1** Ratones con PN mostraron fetos desarrollados correspondientes al día 16 de la preñez, placentas y úteros conservados. En el caso de ratones PP se observaron fetos y placentas más pequeños y hemorrágicas, el tejido uterino engrosado con estructuras poco conservadas. Así mismo al momento del sacrificio y toma de muestras se observó una pérdida de la elasticidad y fácil ruptura de los tejidos provenientes de ratones hembra PP comparadas con ratones hembra PN.

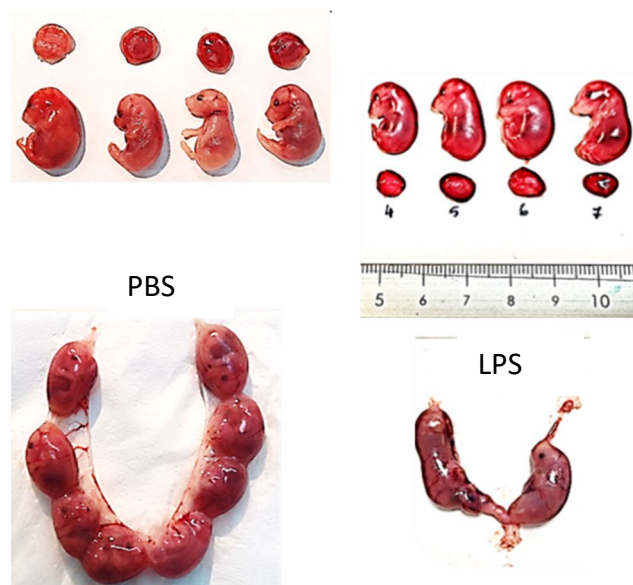


Figura 4.4.1.1.1. Características macroscópicas. útero, fetos y placentas provenientes de ratones hembra con preñeces normales (PN) a las cuales se les inyectó el vehículo comparado con ratones hembra que fueron inyectadas con LPS utilizadas como modelo de parto prematuro (PP).

4.4.1.2 Modificaciones celulares en PP

Se evaluó el peso y número de células totales del bazo y ganglios para-aórticos, estudiados previamente durante la gestación normal y durante la fase aguda de inducción de PP. Se observó un aumento significativo en el peso del bazo ($p=0,0011$), así como de los ganglios para-aórticos ($p=0,0134$) de ratones PP respecto de ratones PN (Figura 4.4.1.2.1).

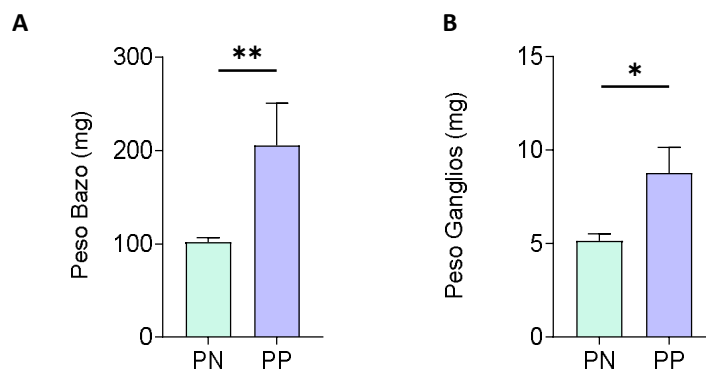


Figura 4.4.1.2.1 Análisis estadístico del peso de bazo y ganglios para-aórticos de ratones hembra PN comparado con ratones hembra PP. A. Peso del bazo de ratones PP ($205,1 \pm 45,6$, $n=6$) comparado con ratones PN ($101,7 \pm 5,2$, $n=6$). Los datos presentaron una distribución no gaussiana, por lo que fueron analizados con un test Mann-Whitney desapareado, no paramétrico de una cola (nivel de confianza $\alpha=0,05$). B. Análisis estadístico del peso ganglios para-aórticos de ratones hembra PN comparado con ratones hembra PP. B. Se observa un aumento significativo en el peso de ganglios provenientes de ratones hembra PP ($8,8 \pm 1,4$, $n=6$) comparado con ratones hembra PN ($5,1 \pm 0,4$, $n=6$). Los datos presentaron una distribución normal por lo que fueron analizados con un test de Student desapareado, no paramétrico de una cola (nivel de confianza $\alpha=0,05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como $*P<0,05$; $**P<0,01$.

Así mismo, se observó un aumento significativo en el número de células totales provenientes de bazo ($p= 0,0363$), ganglios para-aórticos ($p=0,0026$) y decidua ($p=0,0455$) de ratones PP respecto de ratones PN. No se observaron diferencias

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

significativas en el número total de células de la cavidad peritoneal ($p=0,2678$) y tejido uterino ($p=0,2628$) de ratones PP respecto de ratones PN (**Figura 4.4.1.2.2 A.**).

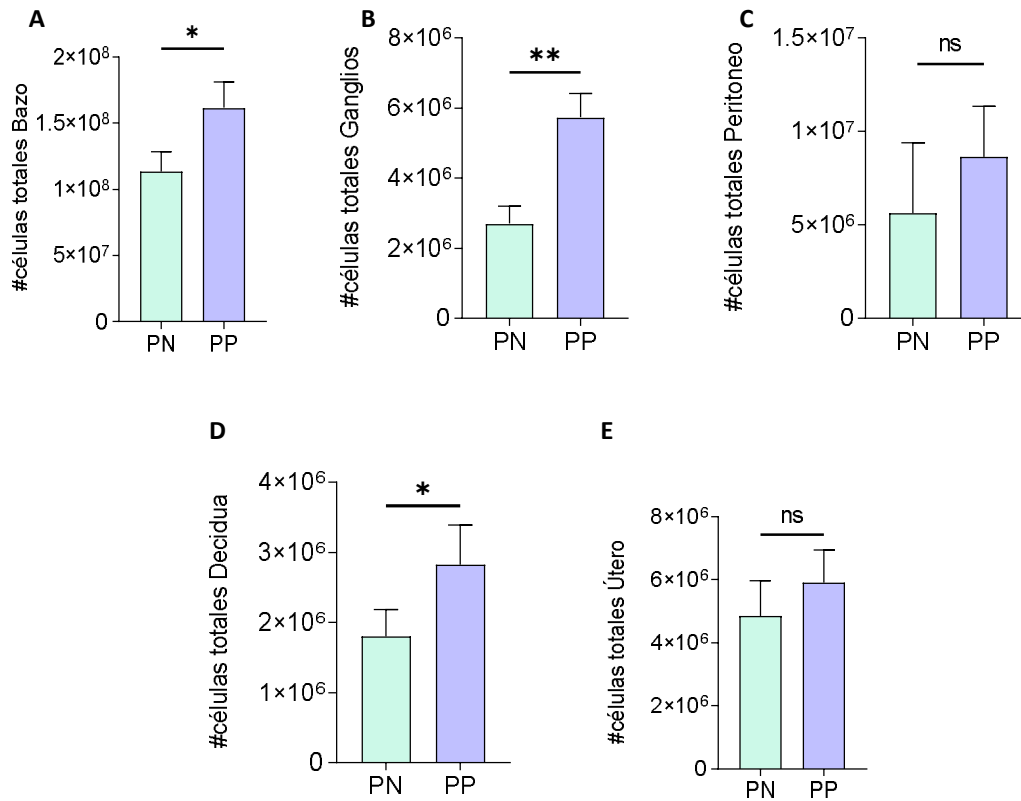


Figura 4.4.1.2.2 A. Análisis del número total de células en los órganos estudiados durante PP. A. Número total de células de bazo provenientes de ratones PP ($1,62 \times 10^8 \pm 1,9 \times 10^7$, $n=6$) respecto de ratones PN ($1,13 \times 10^8 \pm 1,5 \times 10^7$, $n=7$). B. Número total de células de ganglios para-aórticos provenientes de ratones PP ($5,7 \times 10^6 \pm 6,9 \times 10^5$, $n=6$) comparado con ratones hembra PN ($2,7 \times 10^6 \pm 5 \times 10^5$, $n=6$). C. Número total de células peritoneales en ratones PP ($8,7 \times 10^6 \pm 2,7 \times 10^6$, $n=6$) comparado con ratones hembra PN ($5,6 \times 10^6 \pm 3,7 \times 10^6$, $n=6$). D. Número total de células deciduales en ratones PP ($2,8 \times 10^6 \pm 5,6 \times 10^5$, $n=6$) comparado con ratones PN ($1,8 \times 10^6 \pm 3,8 \times 10^5$, $n=6$). E. Número total de células uterinas de ratones hembra PP ($5,9 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$, $n=6$) comparado con ratones hembra PN ($4,8 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$, $n=6$). La distribución de los datos no sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test desapareado, no paramétrico de dos colas: Mann-Whitney (nivel de confianza $\alpha=0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ Y ns= no significativo.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

4.4.2 Expresión del receptor ST2⁺ en LB1 esplénicos durante la fase aguda del parto prematuro

Posteriormente, se procedió a evaluar si la inducción del PP generaba cambios en la expresión de ST2 en LB1 esplénicos. Se observó un aumento significativo del porcentaje de LB1 que expresan ST2 en ratones PP respecto de ratones PN ($p=0,0065$) (**Figura 4.4.2.1**).

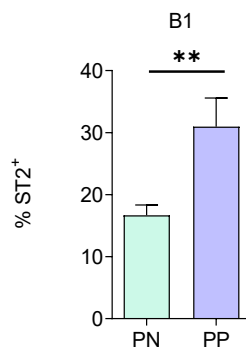


Figura 4.4.2.1 Análisis del porcentaje de subpoblaciones de LB1-ST2 esplénicos durante el PP. Porcentaje de LB1-ST2 de ratones PP ($31 \pm 4,6$; $n=6$) con respecto a ratones PN ($17,23 \pm 1,85$, $n=6$). La distribución de los datos no sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test de Wilcoxon apareado, no paramétrico de una cola (nivel de confianza $\alpha=0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como $P^{**}<0,01$ y ns= no significativo.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

4.4.3 *Expresión del receptor ST2⁺ en LB1 de la cavidad peritoneal durante la fase aguda del parto prematuro*

No se observaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de expresión de ST2 tanto en LB1 ($p=0,24$) provenientes de la cavidad peritoneal en ratones PP comparado con ratones PN (**Figura 4.4.3.1**).

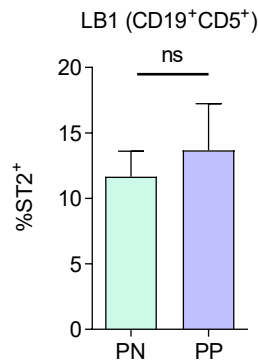


Figura 4.4.3.1 Análisis del porcentaje de LB1 peritoneales que expresan ST2 durante el PP. Porcentaje de LB1-ST2⁺ de ratones PP ($13,7 \pm 3,5$ n=6) con respecto a ratones PN ($11,6 \pm 1,95$; n=6). La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test de Student apareado, no paramétrico de una cola (nivel de confianza $\alpha=0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias no significativas se expresan como ns.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

4.4.4 Expresión del receptor ST2⁺ en LB provenientes de ganglios para-aórticos durante la fase aguda del parto prematuro

Al evaluar el porcentaje de expresión de ST2 en LB totales provenientes de ganglios para-aórticos, se observó un aumento significativo ($p=0,0078$) en ratones PP comparado con ratones PN (**Figura 4.4.4.1**).

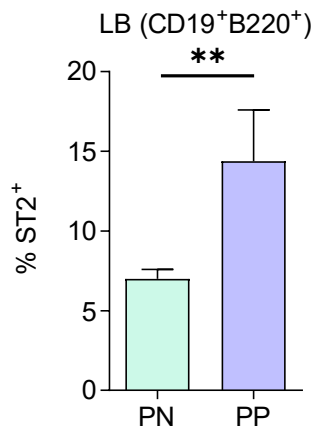


Figura 4.4.4.1 Análisis del porcentaje de LB totales que expresan el receptor de ST2 provenientes de ganglios para-aórticos durante el PP. Porcentaje de LB-totales ST2⁺ de ratones PP (14,4±3,2; n=6) con respecto a ratones PN (7 ± 0,6, n=6). La distribución de los datos no sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test de Wilcoxon apareado, no paramétrico de una cola (nivel de confianza $\alpha=0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan * $P<0,05$, ** $P<0,01$.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

4.4.5 *Expresión del receptor ST2⁺ en LB deciduales durante la fase aguda del parto prematuro*

En vista del rol protector demostrado para la IL-33 durante la gestación a través de un mecanismo que involucra a los LB deciduales, sumado al aumento observado en el porcentaje de LB-ST2⁺ de los ganglios que drenan la interfase materno-fetal, se buscó evaluar qué ocurría con la expresión de este receptor en LB provenientes de la decidua.

Para esto, células totales aisladas de decidua de ratones PP y PN fueron aislados y marcados con anticuerpos específicos como se detalla en la **Metodología 6.23**. La estrategia de gating utilizada para determinar el porcentaje de LB, así como la expresión de ST2⁺ en LB provenientes de decidua se detalla en la **Figura 4.4.5.1**.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

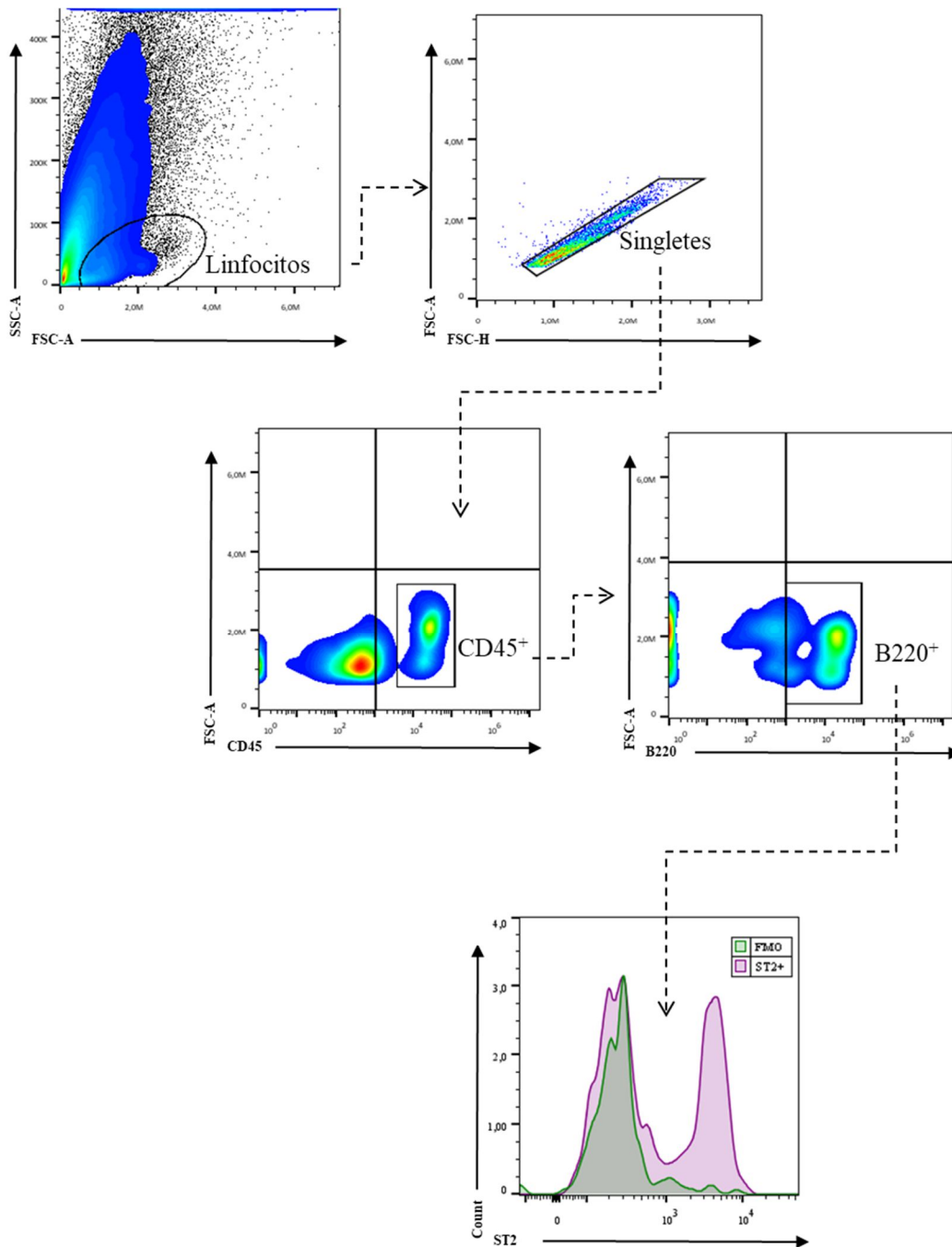


Figura 4.4.5.1 Estrategia de gating utilizada para cuantificar el porcentaje de LB deciduales que expresan el receptor de IL-33 en su superficie celular (B-ST2⁺). De manera representativa, gráficos en pseudocolor y contorno muestran la estrategia de gating utilizada para cuantificar los porcentajes de LB-totales ST2⁺ en la decidua de ratones PN y ratones PP. A partir del tamaño (FSC) y granularidad (SSC) se determinó la población correspondiente a los linfocitos, se eliminaron dobles y se utilizó el marcador CD45 para determinar la población correspondiente a los linfocitos. A partir de las células CD45⁺, se realizó el análisis del porcentaje de LB que expresan el receptor de IL-33 (B220⁺ST2⁺), utilizando como control el FMO. Los datos fueron analizados con FlowJo_V10.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

Al estudiar la expresión de ST2 en los mismos, se observó un aumento significativo tanto del porcentaje de LB-totales ST2⁺ (p=0,0024) así como del MFI de ST2 (p=0,0007) en esta población, en ratones PP con respecto a ratones NP (**Figura 4.4.5.2**).

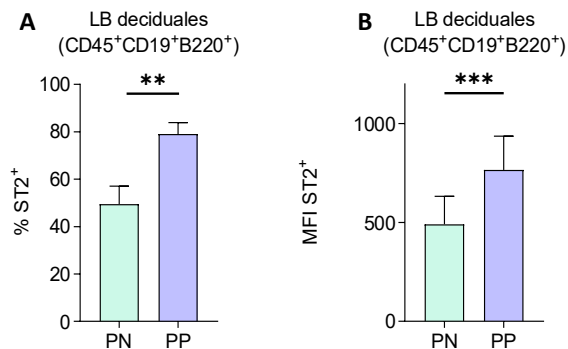


Figura 4.4.5.2 Análisis de la expresión de ST2 en LB totales provenientes de decidua durante el PP. A. Porcentaje de LB-totales ST2⁺ deciduales provenientes de ratones PP (79±4,8; n=6) con respecto a ratones PN (49,5 ± 7,5, n=6). B. MFI de ST2⁺ en LB deciduales provenientes de ratones PP (766±170; n=6) con respecto a ratones PN (490 ± 141, n=6). La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test de Student apareado, no paramétrico de una cola (nivel de confianza $\alpha=0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como **P<0,01, ***P<0,001.

4.4.6 Características funcionales de los LB que expresan el recetor de IL-33 (ST2⁺)

Para evaluar las características funcionales de la población de LB que expresan ST2, esplenocitos totales provenientes de ratones P y ratones NP fueron estimulados *in vitro* durante 24 h con y sin LPS. Se analizó el porcentaje de LB- totales ST2⁺ y LB1-ST2⁺, así como el perfil de citoquinas producidas por los mismos mediante citometría de flujo (**Metodología 6.24**). Se observó una tendencia de aumento, aunque no significativa, en

cuanto al porcentaje de LB-totales ST2⁺ ($p=0,5040$) y LB1-ST2⁺ ($p=0,1174$) esplénicos de ratones P, ante el desafío con LPS, respecto de ratones NP (**Figura 4.4.6.1**).

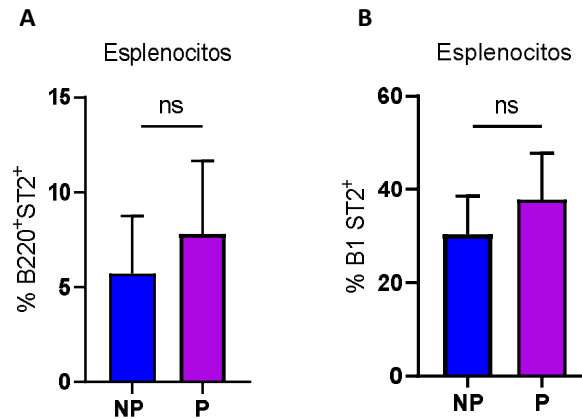


Figura 4.4.6.1. Porcentaje de LB-totales ST2⁺ y LB1-ST2⁺ esplénicos ante el estímulo con LPS in vitro en ratones P y ratones NP. A. Porcentaje de LB-ST2⁺ esplénicos estimulados in vitro con LPS provenientes de ratones P ($7,6 \pm 2,1$; $n=6$) con respecto a ratones NP ($5,7 \pm 1,4$, $n=6$). B. Porcentaje de LB1-ST2⁺ esplénicos estimulados in vitro con LPS provenientes de ratones P ($37,8 \pm 4,5$; $n=6$) con respecto a ratones NP ($30,4 \pm 3,6$, $n=6$). La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test de Student apareado, no paramétrico de una cola (nivel de confianza $\alpha=0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias no significativas se expresan como ns.

Se observó un aumento significativo del porcentaje de LB-totales ST2⁺ productores IL-10 de ratones P comparado a ratones NP ($P=0,0482$), ante el estímulo con LPS. Por otro lado, se observó una disminución significativa en el porcentaje de LB-totales ST2⁺ productores de TNF- α ratones P comparado a ratones NP, ante el LPS. Adicionalmente, LB-totales ST2⁺ productores de IL-17 no mostraron diferencias significativas ($P=0,0740$) en ratones P respecto de ratones NP (**Figura 4.4.6.2**).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

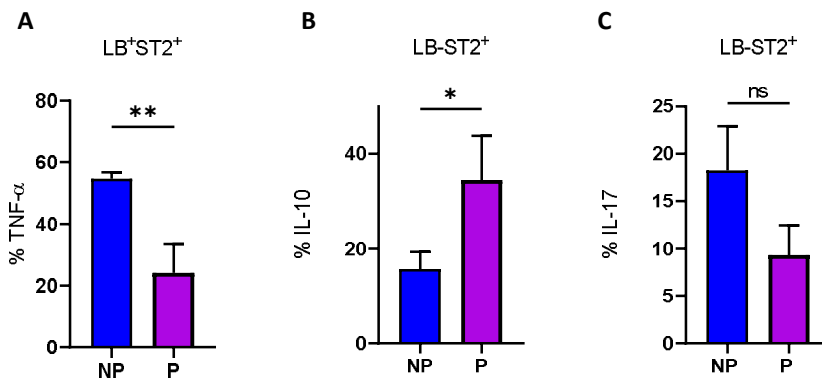


Figura 4.4.6.2. Porcentaje de LB-totales ST2⁺ productores de citoquinas pro y anti-inflamatorias, *in vitro* ante el estímulo con LPS, de ratones P comparado con ratones NP. A. Porcentaje de LB-totales ST2⁺ esplénicos productores de TNF- α en ratones P (24,25 \pm 9,3, n=5) respecto de ratones NP (54,5 \pm 2,3, n=5). **B.** Porcentaje de LB-totales ST2⁺ esplénicos productores de IL-10 en ratones P (34,4 \pm 9,3, n=5) respecto de ratones NP (15,6 \pm 3,7, n=5). **C.** Porcentaje de LB-totales ST2⁺ esplénicos productores de IL-17 en ratones P (9,3 \pm 3,2, n=5) respecto de ratones NP (18,2 \pm 4,6; n=5). La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test de Student apareado, no paramétrico de una cola (nivel de confianza $\alpha=0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como *P<0,05, **P<0,01 y ns=no significativo.

Posteriormente, se analizó el perfil de citoquinas producido por los LB1 que expresan ST2. Se observó un aumento significativo en el porcentaje de LB1-ST2⁺ productores de IL-10, de ratones P comparado a ratones NP (p=0,0181). No se observaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de LB1-ST2⁺ productores de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-17) entre ambos grupos (p=0,6651 y p=0,2063, respectivamente) (**Figura 4.4.6.3.**).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

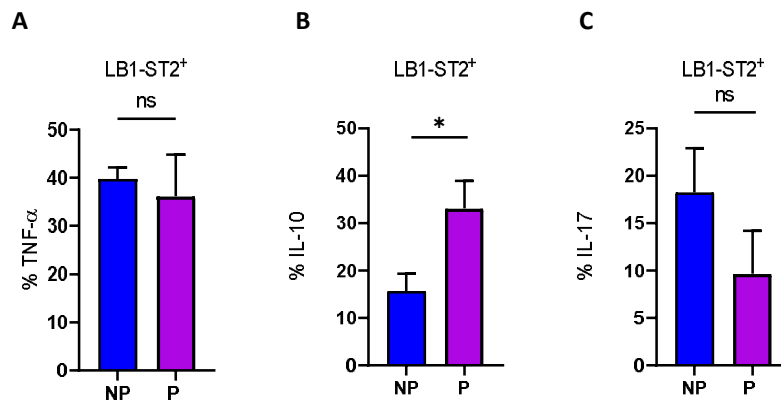


Figura 4.4.6.3. Porcentaje de LB1-ST2⁺ productores de citoquinas pro y anti-inflamatorias durante la gestación. A. Porcentaje de LB1-ST2⁺ esplénicos productores de TNF- α en ratones P (36,15±8,7, n=5) respecto de ratones NP (39,8 ± 2,3, n=5). B. Porcentaje de LB1-ST2⁺ esplénicos productores de IL-10 en ratones P (33 ± 5,9, n=5) respecto de ratones NP (15,6 ± 3,7, n=5). C. Porcentaje de LB1-ST2⁺ esplénicos productores de IL-17 en ratones P (9,63 ± 4,5, n=5) respecto de ratones NP (18,2 ± 4,6; n=5). La distribución de los datos sigue una tendencia gaussiana, por lo que fueron analizados con un test de Student apareado, no paramétrico de una cola (nivel de confianza $\alpha=0.05$). Las medias de cada grupo y su error estándar están representadas mediante un gráfico de barras donde diferencias significativas se expresan como *P<0,05, y ns=no significativo.

5 Discusión

Los resultados obtenidos en el marco de este trabajo permiten describir, por primera vez, un aumento significativo de la expresión del receptor de IL-33 en LB durante la gestación, particularmente en la subpoblación de LB1. Este aumento se observa tanto a nivel sistémico, bazo y peritoneo, así como a nivel local, interfase materno fetal (decidua). La inducción de la vía IL-33/ST2 en LB promueve la producción de IgM y citoquinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) que activan procesos de proliferación y activación autócrina (149), así como también la producción de IL-10 (150,158). La producción de IL-10 por los LB suprime procesos inflamatorios como la diferenciación de los LT hacia

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

perfiles Th1/Th17, la respuesta citotóxica de LT CD8⁺, así como la producción de moléculas pro-inflamatorias (TNF- α , INF- γ , IL-17) y la activación de macrófagos y neutrófilos. En este sentido, numerosos estudios han demostrado que durante la gestación, la producción de IL-10 por parte de los LB es esencial para el correcto desarrollo de la misma y que una disminución de esta citoquina está relacionada con el desarrollo de patologías asociadas al embarazo tales como pre-eclampsia o aborto recurrente (56,57,117,159). Durante años se ha pensado, que la producción de IL-10 por parte de LB (B_{regs}) cumple un rol esencial en el correcto desarrollo de la gestación. Sin embargo, un trabajo reciente demostró que LB de ratones deficientes de IL-10 son capaces de ejercer un efecto protector frente al desafío con LPS. Este efecto se demostró que está mediado por la producción de la alarmina IL-33 liberada por la mucosa uterina y que estimula a través de su receptor ST2, la producción de la molécula anti-inflamatoria PIBF por parte de los LB deciduales, evitando de este modo el desencadenamiento prematuro del parto (144). Este trabajo posiciona a la producción de PIBF por parte de los LB-ST2⁺ como el componente clave en la protección contra el parto prematuro inducido por componentes infecciosos. Respecto a esto, se conoce que la ausencia de la expresión de ST2 en células provenientes de la interfase materno-fetal, así como desbalances en el eje IL-33/ST2, se relacionan con pérdidas del embarazo y abortos recurrentes (155,156). Sabemos, además, que la IL-33 actúa en células inmunes Th2, Tregs e ILC2 a través de su receptor ST2 activando vías como Myd88 y NF-KB que inducen la producción de citoquinas de tipo Th2 (160). Preñeces normales están asociadas a elevados niveles de PIBF, inductores de un perfil Th2 en el segundo trimestre

del embarazo, que disminuyen hacia el final de la preñez (19,153,155,161). Una disminución de los mismos en instancias previas se asocia a patologías de la preñez como pre-eclampsia y parto prematuro (154,162). Respecto a estos antecedentes, al evaluar la expresión del ST2 en LB en distintos días gestacionales se observó una cinética particular, con un aumento de la expresión de ST2 durante los días 12 y 14 y una disminución de esta hacia el día 16 de la gestación, tanto en LB del bazo como en del peritoneo. Estos resultados se corresponden con los cambios observados durante la gestación de un perfil Th2 que ocupa la mayor parte de este periodo, hacia un perfil Th1 característico del final de esta. Podríamos suponer que este aumento en la expresión del receptor en los días 12 y 14 y la disminución al día 16, se corresponden con el cambio de un ambiente Th2 hacia un ambiente Th1. En vista de que PIBF es un factor modulador de un perfil Th2 y que los LB son los mayores productores de PIBF, aún en ausencia de progesterona, por un mecanismo mediado por IL-33 (144); podríamos pensar a los LB-ST2⁺ como esenciales para contribuir al perfil anti-inflamatorio (Th2) necesario para el correcto desarrollo de la gestación, evitando la inducción de perfiles Th1/Th17 incompatibles con la misma (17).

Debido a que las modificaciones hormonales, así como la presencia de aloantígenos paternos, son factores que modulan la respuesta inmune materna durante la gestación, se evaluó el efecto de estas sobre la expresión de ST2 en LB. A partir de los resultados obtenidos del cultivo *in vitro* con estímulos hormonales, no pudo determinarse un efecto directo del E2 ni de la P4 sobre la expresión de ST2 en LB esplénicos. Por otro lado, a pesar de observarse un aumento en la expresión de ST2 en LB provenientes de

ratones de ambos modelos de preñez (alogénico y singénico) comparado a ratones NP, el aumento fue significativamente mayor en LB aislados de ratones en los cuales había un desafío con aloantígenos paternos, respecto del modelo singénico. Adicionalmente, se observó en este modelo un aumento significativo del porcentaje de LB1 respecto de los otros grupos. Nuestros resultados nos permiten especular que la presencia de aloantígenos fetales, y no los cambios hormonales sufridos durante la gestación, estarían involucrados en la regulación de ST2 en LB.

Finalmente, a pesar de que los porcentajes de LB1 y LB1-ST2⁺ esplénicos disminuyen hacia el final de la gestación, sus niveles aumentan significativamente durante la fase aguda del PP inducido por LPS, comparado a PN. Del mismo modo, también se observó que los LB deciduales aumentan la expresión de ST2 en la fase aguda del PP inducido por LPS en comparación con LB de PN. Ante agresiones inflamatorias o infecciosas la respuesta mediada por el eje IL-33/ST2 induce el reclutamiento de células inmunes y la respuesta anti-inflamatoria frente a la liberación de IL-33, la cual permite restaurar la homeostasis de los tejidos dañados (70, 71). Por lo tanto, se puede argumentar que, tras un proceso inflamatorio agudo, inducido por el LPS, los LB deciduales rápidamente up-regulan la expresión de ST2, adquiriendo la capacidad de responder a la IL-33 producida por la mucosa contribuyendo de este modo a prevenir o resolver la inflamación. A partir de los resultados de cultivos celulares podríamos suponer que uno de los mecanismos a través de los cuales los LB1-ST2⁺ podrían actuar ante la inflamación sería mediante la liberación de IL-10 y disminución de la producción de TNF- α .

En resumen, nuestros resultados muestran un novedoso y aún no descrito mecanismo de acción de los LB durante la gestación, el cuál involucra al eje IL-33/ST2.

6 *Materiales y métodos*

6.1 *Modelos animales:*

Para todos los experimentos realizados en el país, se utilizaron ratones hembra (C57BL/6) y macho (C57BL/6, BALB /c) provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) o de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UBA). Los mismos fueron mantenidos en el Bioterio central del CEFYBO, alimentados *ad libitum*, respetando ciclos de luz y oscuridad (12L-12O).

Los protocolos realizados están avalados por el Comité de ética animal de la Facultad de Medicina de la UBA (Resolución CICUAL N 2248). En cuanto a los experimentos realizados en Alemania, los animales se mantuvieron en el BioTechnikum Greifswald bajo las mismas condiciones (alimentados *ad libitum*, 12L-12O). Los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices institucionales post aprobación ministerial (Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern [7221.3-1-068 / 13 a F.J.]) y en conformidad con la Directiva 86/609 / EEC del Consejo de las Comunidades Europeas.

6.1.1 *Modelo de Preñez Alogénica (ALO):*

Ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 8-12 semanas de edad, fueron apareados de manera alogénica con ratones macho de la cepa BALB /c en edad fértil. Los ratones hembra fueron revisadas a diario y el día de la aparición del tapón vaginal fue considerado como día cero (0) de la preñez.

6.1.2 *Correcto desarrollo de la preñez:*

Para determinar el éxito y duración de la preñez los ratones hembra con presencia de tapón vaginal fueron colocados en jaulas individuales y chequeadas diariamente hasta el momento del parto. Para determinar el parto normal y correcto desarrollo de las crías se chequearon día por medio parámetros conocidos de desarrollo como la lactancia normal, apertura de los ojos, la aparición de los incisivos y la separación del canal auditivo.

De los grupos experimentales a los cuales se le realizó la eutanasia previa al parto, se chequearon parámetros cualitativos y cuantitativos que determinan el correcto desarrollo del feto y la preñez, al momento de la cirugía, tanto en preñeces normales como en el modelo de parto prematuro. Se estudió así la presencia de abortos

espontáneos, el peso de las crías con relación al peso y longitud de la placenta, aspecto macroscópico y análisis microscópico de los tejidos de la interfase materno-fetal.

6.2 Aislamiento magnético de LB a partir de Bazo:

Se realizó el aislamiento magnético por selección negativa de LB totales provenientes de bazo de ratones no preñados (NP; n = 4) y ratones preñados (P; n = 4) en el día 14 de gestación, utilizando el kit comercial: Pan B cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Germany). Brevemente, se realizó el disgregado mecánico del bazo de cada animal sobre filtros de 100 µm de poro. Luego de 2 ciclos de lavado/centrifugado con MACS buffer (Anexo 1, 10 minutos, 4°C) se realizó el recuento celular. Esplenocitos totales (10^7) fueron resuspendidos en MACS buffer e incubados con la solución de anticuerpos asociados a Biotina (con Pan B Cell Biotin-Antibody Cocktail, 5 minutos a 4° C en oscuridad). Posteriormente, el pellet celular se incubó con bolitas magnéticas Anti-Biotina resuspendidas en MACS Buffer durante 10 minutos. Finalmente, se adicionó MACS buffer para obtener el eluato los LB totales. Muestras con una pureza del >95% fueron utilizadas para realizar los experimentos posteriores.

6.2.1 Pureza de los linfocitos los LB obtenidas por aislamiento magnético

LB obtenidas a partir del bazo de ratones P y ratones NP se aislaron mediante un aislamiento magnético negativo como se explicó anteriormente (**Metodología 6.2**). Se alicuotaron de 50000 células, las cuales fueron teñidas con anticuerpos específicos (sonda de viabilidad y el anticuerpo CD19), para determinar el porcentaje de LB aislados (CD19⁺) mediante citometría de flujo. Se utilizó la estrategia de gating descrita (**Figura 6.2.1.1**) y se utilizaron muestras con un 98% de pureza para realizar los experimentos posteriores.

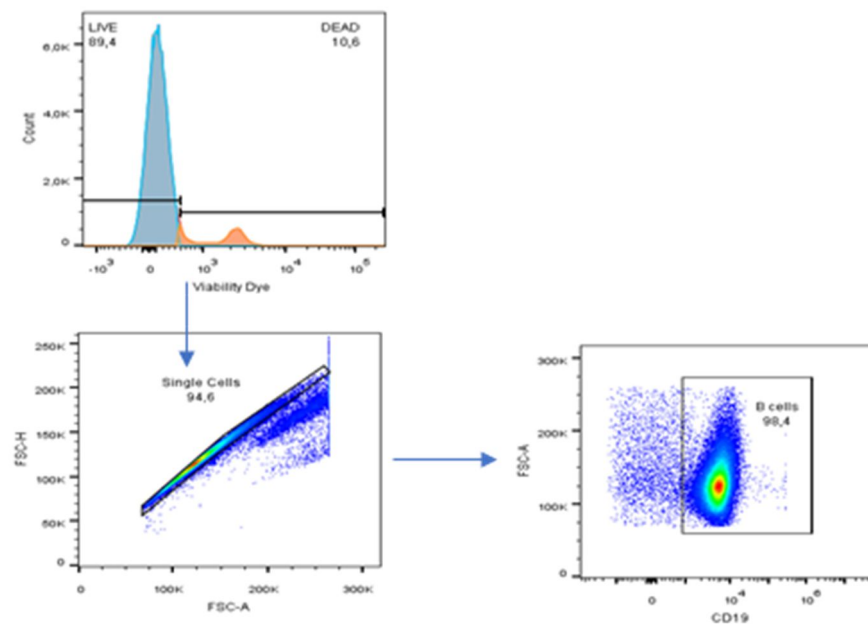


Figura 6.2.1.1 Estrategia de gating utilizada para cuantificar la pureza de los LB obtenidos a partir del aislamiento magnético a partir de esplenocitos totales. De manera representativa, gráficos en pseudocolor muestran la estrategia de gating utilizada para cuantificar los porcentajes de LB obtenidos en el aislamiento magnético a partir de esplenocitos totales de ratones hembra en el día 14 de gestación y ratones NP como control. En un principio se eliminaron las células muertas mediante una sonda de viabilidad, posteriormente se eliminaron los dobletes y se cuantificó el porcentaje de LB-CD19⁺ para determinar la pureza de la muestra.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

6.3 Aislamiento de ARN total

LB aisladas del bazo de ratones P y ratones NP, fueron almacenados en TriFast peqlab (1x10⁶ cel/ml) a -80°C hasta su uso. Se realizó la extracción de RNA siguiendo las instrucciones del fabricante. De manera resumida, se utilizaron 200 ml de cloroformo (cada 1 ml de Trifast) para permitir la separación de los ácidos nucleicos en la fase acuosa, de las proteínas y ADN genómico los cuales van a quedar contenidos en la interfase y la fase orgánica respectivamente. Posteriormente el ARN se precipitó con 500ml de Isopropanol (cada 1 ml de Trifast), el cual fue lavado dos veces con EtOH 75% y resuspendido en H₂O libre de ARNasas. La concentración de RNA obtenida se midió por Nanodrop (marca).

6.4 Procesamiento del gene-array

El ARN total preparado a partir de LB (200 ng, RIN \geq 7,4) se proporcionó al Departamento de Genómica Funcional de la Universidad de Medicina de Greifswald para su procesamiento e hibridación final con el Affymetrix GeneChip™ Mouse Gene 1.0 ST Array de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Affymetrix, Santa Clara, CA, Estados Unidos). La evaluación de la calidad de las hibridaciones se controló mediante la inspección de las imágenes escaneadas y mediante la revisión cuidadosa de los controles exo- y endógenos utilizando el software Expression Console (Affymetrix Inc.).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

Se realizaron procedimientos de QC y normalización en R / Bioconductor utilizando el paquete "oligo". Se empleó el algoritmo Robust MuLT ichip Average (RMA) para el ajuste de fondo, la normalización de cuantiles y el resumen de los valores del conjunto de sondas.

6.5 Procesamiento de datos del gene-array y análisis estadístico

Para identificar los genes expresados diferencialmente (DEG) entre los LB derivadas del bazo de ratones NP y P, utilizamos el paquete "limma" (prueba de eBayes, $p\text{-adj} < 0,01$; $FC > 1,5$). El análisis estadístico y la visualización del mapa de calor de genes expresados diferencialmente se realizaron con el software MuLT iExperiment Viewer (MeV 4.9). Los genes expresados diferencialmente ($FC > 1,5$; valor de p de ANOVA $< 0,01$) se examinaron adicionalmente utilizando el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Los datos completos del gene-array se enviaron a la base de datos Gene Expression Omnibus. Utilizamos el complemento ClueGO y CluePedia Cytoscapes y el recurso InnateDB (<http://www.innatedb.com/>) para el análisis de enriquecimiento funcional, la generación de redes y la visualización de los cambios en la expresión génica.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

6.6 Enriquecimiento funcional e interpretación biológica

Para la interpretación biológica de los DEGs, se exploraron los términos de ontología génica (GO) y las vías biológicas (PA) significativamente sobrerrepresentados con la herramienta de análisis InnateDB. La plataforma InnateDB implementa el algoritmo hipergeométrico con el método de corrección de prueba múltiple Benjamini-Hochberg (BH) para el análisis de sobrerrepresentación génica. La lista de identificadores Entrez, el valor de cambio (FC) y el p-valor se cargaron en la web de InnateDB, utilizando $FC=1,5$ ($1,5 < FC < -1,5$) y un p-valor $< 0,05$ como valores de referencia. El análisis de GO y de vías se consideró significativamente sobrerrepresentado con un FDR $< 0,05$ y un umbral de valor P $-\log > 1,3$. La tendencia de regulación se evalúa determinando la cantidad de genes regulados al alza (up) comparado con los genes regulados a la baja (down) en esa vía, mediante la utilización de la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Genes regulados al alza} - \text{genes regulados a la baja}}$$
$$\text{Genes totales en la vía}$$

6.7 Diseño de primers:

El diseño de primers específicos se realizó utilizando el programa Primer Express® Primer Design Software v3.0 (Applied Biosystems). Utilizando como características primers que

abarquen una unión exón-exón para así evitar la amplificación no deseada con ADN genómico contaminante. El largo de cada par de primers se determinó menor a 25pb y el fragmento obtenido menor a 250 pb. Se verificó la eficiencia de los primers, el largo y estabilidad de los fragmentos obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%, utilizando muestras representativas de todos los experimentos. Los resultados mostraron un aumento de fluorescencia correspondiente a un $20 < Ct < 25$, curvas de melting con un pico y una banda definidos correspondiente al largo deseado del amplicon a obtener. Ante la presencia de la presencia de fragmentos de menor tamaño que podrían representar amplicones no deseados o dímeros de primers se realizó el rediseño de los primers hasta conseguir bandas definidas sin impurezas.

En la **Tabla 6.2.1.1** se detallan las secuencias de los primers diseñados (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

Name	Forward primer (5'->3')	Reverse primer (5'->3')
<i>Blnk</i>	CAGTGGTCAGATGACTTCGACAG	ATAGGAATCGTCGCCCGTCT
<i>Card11</i>	TTACATCAACCCCGCCAAG	ATGTCCAACAATCGGCCTG
<i>Cbl</i>	GAGCTTTTTGCACGGACTAAGATT	AATGCGACCTTTGCGGG
<i>CD19</i>	TACCATGCCATCTCCTCTCCC	AACATTGCCTCCCTCTTCTACCT
<i>CD22</i>	GCGTGGCCAAGCGTGT	CAGAAAGCCTGTTTCCTCCTGT
<i>CD72</i>	GGACCTGGACCAGAGGTTGA	GGGCGTCAGAGAGGTATTCATAGT
<i>Grap2</i>	CAACCTCTTCGCGTCCCA	GGCCTTCATGGAACCACTCA
<i>Ikbkb</i>	TCGCCTGTAGCAAAGTCCG	CCTCAGGCGGTTACCGTG
<i>Itgal</i>	CTTCCACTTCCCAGATCTGCAT	GGTCAGGTTTGCCTCACACTTC
<i>Malt1</i>	ATATGCCACGTGCCAAGGAG	TCAGACAAGCTGCTGCGAAT
<i>Map3k8</i>	TCCGGGGAACAGAGATATACATG	GTGGATGAGTGTGGCTCCAA
<i>Mapk11</i>	TCAGTCTGCTCGGCCTACG	CAGGGTCGTCACGAGGTACA
<i>Nfatc1</i>	AAAGGAGAGGTCGGACTCGG	ACTGTAGTGTCTTCCCTCGGCC
<i>Nfkbie</i>	TGGCTGAGGACCTCCTTTCTTA	TCAGTACATAGCAGTGGTTTGCC
<i>Pik3ap1</i>	GTTGTGTGGAGTGCAGCCAG	TCACAGCCAGAATCTTCAGAAATG
<i>Pik3cd</i>	GGAAGCTGACGGACGATGAG	AAACCGCAGAGCCACTGATG
<i>Plcg2</i>	GAACAGCAGGAGCTATGGGC	CTGCATGTCCACTGCATCGT
<i>Ppp3ca</i>	TGCGCTAATGAACCAGCAGT	TGGTTCTTTGAATCGGTCTAATTTT
<i>Prkca</i>	TGTGGGTCCTGCTCTATGG	TCTCGTACCGTGACGTGGAG
<i>Ptk2b</i>	CTGGAGAGCATCAACTGTGTGC	GTAGACGGGTCACAGAGGCTTT
<i>Ptpn6</i>	TCCTGAAGGTCTGGATCCCTG	CACCTGATCATCCACCCTGAC
<i>Rasgrp1</i>	TCCATGTGGCTCAGAACTCC	ACACAGTCCCCGATCACAG
<i>Syk</i>	GAGGATCGGAGAACCGGG	TGGAGAAGTACCGCATTTTCAGAG
<i>Vav1</i>	TGTGCATCTCTGGTATGCGG	GATGGCGAACTCCGCTGTAT
<i>il1rl1</i>	CCAGTAAGTGAGACAGCAGCATTT	CTGTAGATACCCAGATGAAGGGCT
<i>β-actin</i>	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC
<i>Il1rl1</i>	CCAGTAAGTGAGACAGCAGCATTT	CTGTAGATACCCAGATGAAGGGCT

Tabla 6.2.1.1 Secuencia de primers. Lista detallada de la secuencia de los primers sentido y antisentido utilizados para la confirmación del gene-array mediante qPCR.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

6.8 Aislamiento de ARN y síntesis de ADN complementario

Los LB de ratones P y ratones NP, fueron aislados de manera magnética (Pan B Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec) como se explicó en la **Metodología 6.2**, y almacenados en TriFast peqlab (1x10⁶ cel/ml) a -80°C hasta su uso. Se realizó la extracción de RNA total como se explicó en la **Metodología 6.3**, y se utilizó 1ugr de RNA inicial para realizar la síntesis de la primera hebra a de ADNc mediante el kit comercial (SuperScript™ III First-Strand Synthesis System, Invitrogen).

6.9 Cuantificación de la expresión relativa de ARNm mediante qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa se realizó a partir del ADNc obtenido en la **Metodología 6.8**, utilizando el kit comercial Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad). Las muestras fueron amplificadas por duplicados, utilizando NTC (del inglés non-template controls: muestras sin molde como control de la reacción), utilizando β -actina como gen de referencia (*β -actin*). Los resultados obtenidos en el equipo CFX96 Real-Time PCR Detection Systems (BioRad) fueron analizados mediante el programa BioRad CFX Manager 2.0. La expresión relativa de ARNm para cada grupo se calculó de la siguiente forma:

Expresión relativa = $2^{-\Delta CT}$; donde $\Delta CT = CT_{gen} - Ct_{\beta-actin}$.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

6.10 Aislamiento de esplenocitos totales

Esplenocitos totales fueron obtenidos mediante el disgregado mecánico del bazo sobre un filtro de poro de 100 μm , realizando lavados sucesivos con PBS estéril (10 minutos, 4°C, 300g). Posteriormente, los eritrocitos fueron eliminados mediante incubación y lavado con buffer de lisis (Anexo1) y se realizó el recuento de esplenocitos totales obtenidos mediante cámara de Neubauer.

6.11 Análisis de fases del ciclo celular por citometría de flujo

Se utilizaron esplenocitos totales aislados de ratones P y ratones NP como control, los cuales fueron teñidos con Ioduro de propidio (IP) y CD19, a fin de evaluar las fases del ciclo celular en LB durante la preñez. Para ello, 1×10^6 esplenocitos totales fueron teñidos con una solución de anticuerpo CD19 en buffer FACS (Anexo1) durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Luego de sucesivos lavados con PBS (300g durante 10min y 4°C), el pellet celular se fijó con una solución de etanol (EtOH 70% frío), de a una gota y realizando una agitación enérgica (vórtex) para evitar el agregado celular (clumping) generado por el EtOH y conservadas a 4°C en oscuridad. El día de la medición en el en el citómetro de flujo (FACS Cantoll, INBIRS), se realizó la tinción con la solución de IP (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a 37°C, en oscuridad durante 30 min). El análisis de los resultados se realizó utilizando el programa FlowjoV-10.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

La tinción de IP nos permite determinar las diferentes fases del ciclo celular: G0/G1 donde las células aumentan su volumen intracelular y la síntesis de proteínas, la cual se va a diferenciar de las fases S y G2/M, donde se produce la duplicación del material genético y la duplicación celular, reflejado en un aumento de la intensidad de fluorescencia. Por lo que podemos esperar que la fase G2/M se represente por un pico definido con el doble de intensidad de fluorescencia que el pico G0/G1, teniendo una fase S intermedia (Figura 1.5).

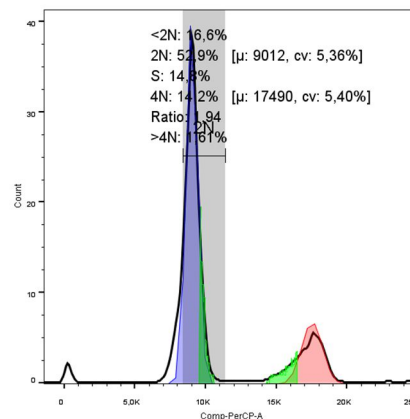


Figura 6.2.1.1. Esquema representativo del ciclo celular en LB de bazo (CD19⁺). Histograma de las fases del ciclo celular analizado en LB-CD19⁺ por citometría de flujo. El pico en violeta correspondiente a la fase G0/G1 (definido como 2N), seguido por una fase S delimitada en verde y el pico correspondiente a la fase G2/M en rojo (definido como 4N), con el doble de intensidad de fluorescencia.

6.12 Análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo en Bazo

1x10⁶ esplenocitos totales de ratones P y ratones NP fueron aislados como se describe en la **Metdología 6.10** e incubados (30 min. a 4°C, en oscuridad) con una solución de anticuerpos específicos anti B220, CD23, CD21 en buffer FACS (Anexo1). Luego de

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

sucesivos lavados con buffer FACS (300g durante 10min y 4°C), fueron fijados con una solución de 1% de para formaldehído (PFA, Anexo1) durante toda la noche (ON: del inglés over nighth, a 4°C en oscuridad). Tras sucesivos lavados, el pellet celular fue resuspendido en 200 µl de buffer FACS para ser medido en el citómetro de flujo (FACS Cantoll, INBIRS). El análisis de los resultados se realizó en el programa FlowjoV-10.

6.13 Análisis de proliferación en subpoblaciones de LB mediante la inmuno marcación con Ki-67

Se realizó la tinción para el análisis de poblaciones de LB en esplenocitos totales provenientes de ratones P y NP. Tras sucesivos lavados con PBS (Anexo1) a fin de eliminar el exceso de anticuerpos (300g durante 10min y 4°C), el pellet celular fue resuspendido en 3ml de EtOH 70%, gota a gota utilizando el vórtex, a fin de evitar el clumping. Las muestras fueron incubadas a -20°C durante una hora en oscuridad y luego fueron teñidas con una solución del anticuerpo ki-67 (Anexo1, 30 minutos, T_{amb}, oscuridad). Posteriormente, se realizaron dos lavados con (300g durante 10min y 4°C) y se resuspendió el pellet celular en 200µl de buffer FACS para ser medido por citometría (FACS Cantoll, INBIRS). El análisis de los resultados se realizó en el programa FlowjoV-10.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

6.14 *Análisis de la producción de citoquinas por las poblaciones celulares B*

Esplenocitos totales (1×10^6) obtenidos de ratones P y ratones NP (**Metdología 6.10**) fueron cultivados en medio de cultivo (RPMI) suplementado con 10% de suero fetal bobino (FBS) y 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) durante 24h y estimulados con o sin 10ug/ml de lipopolisacárido (LPS). Las células fueron estimuladas durante las últimas 5 h con Forbol 12-miristato, 13-acetato (PMA), Ionomicina (Iono) y Brefeldin A (BFA), a fin de evaluar citoquinas intracelulares. Luego de cada cultivo, las células fueron recolectadas, teñidas con anticuerpos específicos (B220, CD23, CD21) para identificar las poblaciones celulares B (MZ, B1, FO) y fijadas con PFA 1% (ON, 4°C, oscuridad). Posteriormente, se realizó la permeabilización con una solución 0,1% de saponina (10 min, 4°C, oscuridad) y tinción intracelular con anticuerpos específicos para citoquinas pro y anti-inflamatorias (IL-10, TNF- α , IL-17 respectivamente). Tras sucesivos lavados, el pellet celular fue resuspendido en 200 μ l de FACS y las muestras se analizaron mediante citometría de flujo (FACS Cantoll, INBIRS). El análisis de los resultados se realizó en el programa FlowjoV-10.

6.15 *Análisis del marcador CD1d en subpoblaciones de LB de bazo:*

Esplenocitos totales (1×10^6) obtenidos a partir de bazo de ratones P y ratones NP (**Metodología 6.10**) fueron incubados con una solución de anticuerpos específicos anti

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

B220, CD23, CD21, CD1d en buffer FACS (Anexo1, 30 min. a 4°C, en oscuridad). Luego de sucesivos lavados con buffer FACS (300g durante 10min y 4°C), las células fueron fijadas con una solución de 1% de PFA (Anexo1, ON, 4°C en oscuridad). Se utilizó como control una tinción FMO para CD1d (Fluorescence minus one), donde se utilizaron los anticuerpos correspondientes a la evaluación de las subpoblaciones celulares (B220, CD23, CD21), evitando adicionar CD1d, cuya expresión diferencial se analizará entre las poblaciones de LB durante la en preñez. Este control permite identificar la señal de fluorescencia dada por la interacción entre fluoróforos, evitando así falsas señales positivas a la hora de evaluar el fluoróforo de interés. Finalmente, las células fueron lavadas y resuspendidas en 200 µl de buffer FACS para ser medidas en el citómetro de flujo (FACS Cantoll, INBIRS). El análisis de los resultados se realizó en el programa FlowjoV-10.

6.16 Análisis de la expresión del receptor de IL-33 por citometría de flujo en Bazo

Esplenocitos totales (1×10^6) obtenidos a partir de bazo de ratones P y ratones NP (**Metodología 6.10**) fueron incubados con una solución de anticuerpos específicos anti B220, CD23, CD21, ST2 en buffer FACS (Anexo1, 30 min. a 4°C, en oscuridad). Luego de sucesivos lavados con buffer FACS (300g durante 10min y 4°C), las células fueron fijadas con una solución de 1% de PFA (Anexo1, ON, 4°C en oscuridad). Se utilizó como control una tinción FMO para ST2 (B220, CD23, CD21), cuya expresión diferencial se analizará

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

entre las poblaciones de LB durante la en preñez. Finalmente, las células fueron lavadas y resuspendidas en 200 µl de buffer FACS para ser medidas en el citómetro de flujo (FACS Cantoll, INBIRS). El análisis de los resultados se realizó en el programa FlowjoV-10.

6.17 Aislamiento e inmuno marcación de células del ganglio linfático para-aórtico

Se obtuvieron los ganglios linfáticos que drenan el útero (para-aórtico) a partir de ratones P y NP. Células totales fueron obtenidas mediante el disgregado mecánico de los ganglios sobre un filtro de poro de 100 µm, realizando ciclos de lavado/centrifugado con buffer FACS (10 minutos, 4°C, 300g). Posteriormente, se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer y 1×10^6 células obtenidas fueron incubadas con una solución de anticuerpos específicos (CD19, B220, ST2) durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Tras sucesivos ciclos de lavado/centrifugado con buffer FACS (10 minutos, 4°C, 300g) las células fueron fijadas con una solución de PFA 1% (ON, 4°C, oscuridad). Finalmente, luego de sucesivos ciclos de lavado/centrifugado, las células fijadas fueron resuspendidas en 200 µl de buffer FACS para ser analizadas por citometría de flujo (FACS Cantoll, INBIRS). El análisis de los resultados se realizó en el programa FlowjoV-10.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

6.18 Aislamiento e inmuno marcación de células del peritoneo

Se realizó el aislamiento de células del peritoneo, de ratones P y NP. Una vez sacrificados los ratones, se inyectaron 10 ml de PBS suplementado con 1% de BSA de forma intraperitoneal (ip), utilizando una jeringa de 10 ml y una aguja 27G. Posteriormente, se recuperó cuidadosamente el líquido inyectado utilizando la misma jeringa y aguja. Se realizaron sucesivos ciclos de lavado/centrifugado, el recuento en cámara de Neubauer y a continuación, 1×10^6 células fueron incubadas con una solución de anticuerpos específicos (ST2, B220, CD19, CD5) durante 30 min a 4°C en oscuridad. Finalmente, luego de sucesivos ciclos de lavado/centrifugado, las células fijadas fueron resuspendidas en 200 μ l de buffer FACS para ser analizadas por citometría de flujo (FACS Cantoll, INBIRS). El análisis de los resultados se realizó en el programa FlowjoV-10. Los anticuerpos utilizados en este caso nos permitirán analizar la expresión del receptor de IL-33 (ST2) en las principales poblaciones de LB peritoneales LB1-a ($B220^{low}CD19^+CD5^+$) y LB1-b ($B220^{low}CD19^+CD5^-$).

6.19 Capacidad de las hormonas sexuales femeninas, estradiol (E2) y progesterona (P4), de modular la expresión del receptor de IL-33 en LB.

Esplenocitos totales de ratones P y NP, serán estimulados in vitro con estradiol (E2), progesterona (P4) o ambas hormonas. Las mismas serán cultivadas in vitro en placas de

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

cultivo de 24 pocillos conteniendo 1 ml de medio de cultivo (RPMI sin rojo fenol) suplementado con 10% de suero fetal bobino (FBS) previamente charcoalizado más 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) y estimuladas con E2 (50 pg/ml), P4 (50 ng/ml) o ambas durante 24 h. Las dosis de hormonas a ser utilizadas fueron establecidas previamente en nuestro laboratorio y corresponden a dosis fisiológicas de ambas hormonas (163). Luego de cada cultivo, las células fueron recolectadas, teñidas con anticuerpos específicos (B220, CD19, ST2) y fijadas con PFA 1% (ON, 4°C, oscuridad). Finalmente, luego de sucesivos ciclos de lavado/centrifugado, las células fijadas fueron resuspendidas en 200 µl de buffer FACS para ser analizadas por citometría de flujo (FACS Cantoll, INBIRS). El análisis de los resultados se realizó en el programa FlowjoV-10.

6.20 Incidencia de los antígenos semi-alogénicos presentes en el feto sobre la expresión del receptor de IL-33 en LB durante la gestación.

Ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 8-12 semanas de edad, fueron apareadas singénicamente con machos de la cepa C57BL/6 en edad fértil. Los ratones hembra fueron revisados a diario y el día de la aparición del tapón vaginal fue considerado como día cero (0) de la preñez singénica (SIN). Los ratones hembra serán sacrificados en el día 14 de la preñez) y la expresión del receptor de IL-33 será analizada por citometría de flujo en diferentes poblaciones de LB del bazo, peritoneo, ganglios para-aórticos como se explicó anteriormente.

6.21 Modelo de Parto Prematuro (PP)

Ratones hembra C57BL/6 fueron apareados con machos BALB/c como se explicó anteriormente. Los ratones hembra P fueron desafiadas por vía intraperitoneal el día 16 de la gestación con diferentes dosis de lipopolisacárido (LPS): 5, 10, 20 y 50 µg en 200 µl de Buffer fosfato salino (PBS) por ratón. De la misma manera, ratones hembra en el día 16 de preñez fueron desafiadas únicamente con 200 µl de vehículo (PBS), para ser utilizadas como control. Los animales fueron monitoreados, y la expulsión del primer feto fue considerada como indicativa de inicio del parto. Se consideró prematuro (PP) el parto ocurrido dentro de las 24-48 h posteriores a la dosis de LPS o PBS. Así mismo se consideró parto normal el parto ocurrido luego de las 48 h de la inducción (LPS o PBS según corresponda). Se seleccionó la dosis mínima de LPS que produjo un 100% de partos prematuros sin efectos deletéreos sobre la madre.

6.22 Determinación de la expresión del receptor de IL-33 en LB en un modelo de parto prematuro

Ratones hembra C57BL/6 fueron apareados con machos BALB /c y desafiados por vía intraperitoneal el día 16 de la gestación con 10 µg/ratón de LPS o PBS como control. Se realizó el sacrificio de los animales a las 5 h posteriores a la inyección con LPS o PBS y se aislaron células del bazo, peritoneo, ganglios para-aórticos. Adicionalmente se realizará

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

el aislamiento de células deciduales en ambos grupos. Las mismas fueron inmuno marcadas de la misma manera que se explicó en los apartados anteriores a fin de identificar las distintas poblaciones de LB y el receptor de IL-33 (ST2).

6.23 Aislamiento e inmuno marcación de leucocitos deciduales

Ratones hembra en el día 16 de la gestación 5hs post-inyección con LPS o PBS, fueron sacrificadas y se aisló el tejido uterino. Se tomó la porción ubicada entre dos sitios de implantación, y se aislaron ambas porciones de decidua (basalis y parietales). Posteriormente, se realizó la ruptura mecánica con tijeras estériles, sobre hielo durante 2 minutos en una solución de StemPro Accutase. Adicionalmente, se realizó una digestión enzimática durante 30 minutos a 37°C con la solución comercial. Una vez digeridos, los tejidos fueron filtrados (100µm), lavados con 20 ml de PBS y centrifugados (2000 rpm, 10 minutos a 4°C). Las células mononucleares fueron separadas por un gradiente de densidad con Ficoll y resuspendidas en 1 ml de buffer FACS buffer para su posterior recuento en cámara de Neubauer. Se realizó una tinción de 1×10^6 células con anticuerpos específicos (B220, CD19, CD45, ST2) durante 30 minutos a 4°C y oscuridad. Se realizaron dos ciclos de lavado/centriugado con buffer FACS a fin de eliminar el exceso de anticuerpos (300g, 10 min, 4°C). Finalmente, las células fueron resuspendidas en 200 µl de buffer FACS para ser medidas en el citómetro de flujo (FACS Cantoll, INBIRS). El análisis de los resultados se realizó en el programa FlowjoV-10.

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

6.24 Determinación del perfil inmunológico de LB que expresan el receptor de IL-33

Esplenocitos totales obtenidos de ratones P en el día 14 de la gestación y ratones NP como control fueron cultivados a fin de evaluar la expresión de citoquinas por los LB que expresan el receptor de ST2 durante la preñez. Para este objetivo, 1×10^6 esplenocitos totales de cada uno de los grupos fueron cultivados en medio de cultivo (RPMI) suplementado con 10% de suero fetal bobino (FBS) y 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) durante 24h como control o adicionando 10ug/ml de LPS, para evaluar la respuesta inflamatoria ejecutada por los mismos. Las células serán estimuladas durante las últimas 5 h con PMA, ionomicina y brefeldin A. Los esplenocitos obtenidos de cada cultivo, fueron teñidos con anticuerpos específicos para evaluar por las poblaciones celulares B que expresan el receptor de IL-33 (B220, CD23, CD21, ST2), durante 30 minutos a 4°C y oscuridad. Posteriormente, se realizó la permeabilización con una solución 0,1% de saponina (10 min, 4°C, oscuridad) y tinción intracelular con anticuerpos específicos para citoquinas pro y anti-inflamatorias (IL-10, TNF- α , respectivamente). Tras sucesivos lavados, el pellet celular fue resuspendido en 200 μ l de FACS y las muestras se analizaron mediante citometría de flujo (FACS Cantoll, INBIRS). El análisis de los resultados se realizó en el programa FlowjoV-10.

6.25 Análisis estadístico

Para todos los grupos experimentales los datos se analizaron con el software PRISM (ver. 5.01; GraphPad). La normalidad se comprobó mediante la prueba de normalidad de D'Agostino & Pearson, o la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Se aplicó la prueba t para datos no apareados (datos con distribución normal) o la prueba U de Mann-Whitney (datos con distribución no normal) para comparar dos grupos, o ANOVA/Kruskal Wallis, según corresponda. Un resultado con un $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Para el análisis de correlación de Pearson se realizó sobre el valor de la relación \log_2 de la expresión de ARNm de qPCR y datos de gene-array, para todos los animales replicados. Un valor de $r > 0,8$ se consideró como correlación positiva significativa entre grupos.

7 Bibliografía

1. MEDAWAR, PB. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol* (1953) **7**:320–337. Available at: <http://ci.nii.ac.jp/naid/10008663008/en/> [Accessed September 9, 2021]
2. BILLINGHAM RE, BRENT L, MEDAWAR PB. 'Actively Acquired Tolerance' of Foreign Cells. *Nature* (1953) **172**:603–606. doi:10.1038/172603a0
3. Moldenhauer LM, Diener KR, Thring DM, Brown MP, Hayball JD, Robertson SA. Cross-Presentation of Male Seminal Fluid Antigens Elicits T Cell Activation to Initiate the Female Immune Response to Pregnancy. *J Immunol* (2009) **182**:8080–8093. doi:10.4049/jimmunol.0804018
4. Schumacher A, Sharkey DJ, Robertson SA, Zenclussen AC. Immune Cells at the Fetomaternal Interface: How the Microenvironment Modulates Immune Cells To Foster Fetal Development. *J Immunol* (2018) **201**:325–334. doi:10.4049/jimmunol.1800058
5. Arenas-Hernandez M, Sanchez-Rodriguez EN, Mial TN, Robertson SA, Gomez-Lopez N. Isolation of Leukocytes from the Murine Tissues at the Maternal-Fetal Interface. *J Vis Exp* (2015) doi:10.3791/52866
6. Trundley A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* (2004) **63**:1–12. doi:10.1111/j.1399-0039.2004.00170.x
7. Moffett A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol* (2006) **6**:584–594. doi:10.1038/nri1897
8. Faas MM, de Vos P. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta* (2017) **56**:44–52. doi:10.1016/j.placenta.2017.03.001
9. Hill JB, Sheffield JS, McIntire DD, Wendel GD. Acute pyelonephritis in pregnancy. *Obstet Gynecol* (2005) **105**:18–23. doi:10.1097/01.AOG.0000149154.96285.a0
10. Holmes CH, Simpson KL. 3 Complement and pregnancy: new insights into the immunobiology of the fetomaternal relationship. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* (1992) **6**:439–460. doi:10.1016/S0950-3552(05)80005-7
11. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J* (2005) **19**:681–693. doi:10.1096/fj.04-2078rev
12. Riley JK. *Trophoblast immune receptors in maternal-fetal tolerance*. (2008). doi:10.1080/08820130802206066
13. Girardi G, Bulla R, Salmon JE, Tedesco F. The complement system in the pathophysiology of pregnancy. *Mol Immunol* (2006) **43**:68–77. doi:10.1016/j.molimm.2005.06.017
14. Papuchova H, Kshirsagar S, Xu L, Gomes HAB, Li Q, Iyer V, Norwitz ER, Strominger JL, Tilburgs T. Three types of HLA-G+ extravillous trophoblasts that have distinct immune regulatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2020) **117**:15772–15777. doi:10.1073/pnas.2000484117
15. Guzman-Genuino RM, Dimova T, You Y, Aldo P, Hayball JD, Mor G, Diener KR. Trophoblasts promote induction of a regulatory phenotype in B cells that can protect against detrimental T cell-mediated inflammation. *Am J Reprod Immunol* (2019) **82**:139–148. doi:10.1111/aji.13187
16. Jørgensen N, Persson G, Hviid TVF. The tolerogenic function of regulatory T cells in pregnancy and cancer. *Front Immunol* (2019) **10**: doi:10.3389/fimmu.2019.00911
17. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* (1997) **18**:478–482. doi:10.1016/S0167-5699(97)01127-4
18. Raghupathy R. Pregnancy: Success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin*

- Immunol* (2001) **13**:219–227. doi:10.1006/smim.2001.0316
19. Chaouat G. The Th1/Th2 paradigm: Still important in pregnancy? *Semin Immunopathol* (2007) **29**:95–113. doi:10.1007/s00281-007-0069-0
 20. Sykes L, MacIntyre DA, Yap XJ, Teoh TG, Bennett PR. The Th1:Th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. *Mediators Inflamm* (2012) **2012**: doi:10.1155/2012/967629
 21. Wang WJ, Liu FJ, Qu HM, Hao CF, Qu QL, Xiong-Wang, Bao HC, Wang XR. Regulation of the expression of Th17 cells and regulatory T cells by IL-27 in patients with unexplained early recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol* (2013) **99**:39–45. doi:10.1016/j.jri.2013.04.002
 22. Qian J, Zhang N, Lin J, Wang C, Pan X, Chen L, Li D, Wang L. Distinct pattern of Th17/Treg cells in pregnant women with a history of unexplained recurrent spontaneous abortion. *Biosci Trends* (2018) **12**:157–167. doi:10.5582/bst.2018.01012
 23. Raghupathy R, Al-Azemi M, Azizieh F. Intrauterine Growth Restriction: Cytokine Profiles of Trophoblast Antigen-Stimulated Maternal Lymphocytes. *Clin Dev Immunol* (2012) **2012**:1–10. doi:10.1155/2012/734865
 24. Toldi G, Rigó J, Stenczer B, Vászárhelyi B, Molvarec A. Increased prevalence of IL-17-producing peripheral blood lymphocytes in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* (2011) **66**:223–229. doi:10.1111/j.1600-0897.2011.00987.x
 25. Dhillon P, Wallace K, Herse F, Scott J, Wallukat G, Heath J, Mosely J, Martin Jr JN, Dechend R, LaMarca B. CALL FOR PAPERS Integrative and Translational Physiology: Inflammation and Immunity in Organ System Physiology IL-17-mediated oxidative stress is an important stimulator of AT1-AA and hypertension during pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2012) **303**:353–358. doi:10.1152/ajpregu.00051.2012.-Pre
 26. Makhseed M, Raghupathy R, El-Shazly S, Azizieh F, Al-Harmi JA, Al-Azemi MMK. Pro-inflammatory maternal cytokine profile in preterm delivery. *Am J Reprod Immunol* (2003) **49**:308–318. doi:10.1034/j.1600-0897.2003.00038.x
 27. Nahmias AJ, Schollin J, Abramowsky C. Evolutionary-developmental perspectives on immune system interactions among the pregnant woman, placenta, and fetus, and responses to sexually transmitted infectious agents. *Ann N Y Acad Sci* (2011) **1230**:25–47. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06137.x
 28. Sappenfield E, Jamieson DJ, Kourtis AP. Pregnancy and susceptibility to infectious diseases. *Infect Dis Obstet Gynecol* (2013) **2013**: doi:10.1155/2013/752852
 29. Kourtis AP, Read JS, Jamieson DJ. Pregnancy and Infection. *N Engl J Med* (2014) **370**:2211–2218. doi:10.1056/NEJMra1213566
 30. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: How they develop and function. *Blood* (2008) **112**:1570–1580. doi:10.1182/blood-2008-02-078071
 31. Rodríguez-Pinto D. B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol* (2005) **238**:67–75. doi:10.1016/j.cellimm.2006.02.005
 32. Yuseff M-I, Pierobon P, Reversat A, Lennon-Duménil A-M. How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nat Rev Immunol* (2013) **13**:475–486. doi:10.1038/nri3469
 33. Hua Z, Hou B. The role of B cell antigen presentation in the initiation of CD4+ T cell response. *Immunol Rev* (2020) **296**:24–35. doi:10.1111/imr.12859
 34. Luu VP, Vazquez MI, Zlotnik A. B cells participate in tolerance and autoimmunity through cytokine production. *Autoimmunity* (2014) **47**:1–12. doi:10.3109/08916934.2013.856006
 35. Hayakawa K, Hardy RR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Progenitors for Ly-1 b cells are

- distinct from progenitors for other b cells. *J Exp Med* (1985) **161**:1554–1568. doi:10.1084/jem.161.6.1554
36. Tung JW, Mrazek MD, Yang Y, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Phenotypically distinct B cell development pathways map to the three B cell lineages in the mouse. *Proc Natl Acad Sci* (2006) **103**:6293–6298. doi:10.1073/pnas.0511305103
37. Montecino-Rodriguez E, Leathers H, Dorshkind K. Identification of a B-1 B cell–specified progenitor. *Nat Immunol* (2006) **7**:293–301. doi:10.1038/ni1301
38. Barber CL, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. Reduced production of B-1-specified common lymphoid progenitors results in diminished potential of adult marrow to generate B-1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) **108**:13700–13704. doi:10.1073/pnas.1107172108
39. Berland R, Wortis HH. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol* (2002) **20**:253–300. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064833
40. Hardy RR. B-1 B Cell Development. *J Immunol* (2006) **177**:2749–2754. doi:10.4049/jimmunol.177.5.2749
41. KROESE FGM, AMMERLAAN WAM, DEENEN GJ. Location and Function of B-Cell Lineages. *Ann N Y Acad Sci* (1992) **651**:44–58. doi:10.1111/j.1749-6632.1992.tb24592.x
42. Bos NA, Kroese FGM, Cebra JJ. *B-1 cells and the mucosal immune system*. Third Edit. Elsevier Inc. (2005). doi:10.1016/B978-012491543-5/50037-1
43. Hiroshi I, Hastings R, Kearney J, Howard M. Continuous anti-interleukin 10 antibody administration depletes mice of ly-1 b cells but not conventional b cells. *J Exp Med* (1992) **175**:1213–1220. doi:10.1084/jem.175.5.1213
44. Gary-Gouy H, Harriague J, Bismuth G, Platzer C, Schmitt C, Dalloul AH. Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production. *Blood* (2002) **100**:4537–4543. doi:10.1182/blood-2002-05-1525
45. Baumgarth N. B-1 cell heterogeneity and the regulation of natural and antigen-induced IgM production. *Front Immunol* (2016) **7**:1–9. doi:10.3389/fimmu.2016.00324
46. Biswas TK, VanderLaan PA, Que X, Gonen A, Krishack P, Binder CJ, Witztum JL, Getz GS, Reardon CA. CD1d Selectively Down Regulates the Expression of the Oxidized Phospholipid-Specific E06 IgM Natural Antibody in Ldlr^{-/-} Mice. *Antibodies* (2020) **9**:30. doi:10.3390/antib9030030
47. Allman D, Pillai S. Peripheral B Cell Subsets. *Curr Opin Immunology* (2008) **20**:149–157. doi:10.1016/j.coi.2008.03.014.Peripheral
48. Pillai S, Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol* (2009) **9**:767–777. doi:10.1038/nri2656
49. Monroe JG, Dorshkind K. Fate Decisions Regulating Bone Marrow and Peripheral B Lymphocyte Development. *Adv Immunol* (2007) **95**:1–50. doi:10.1016/S0065-2776(07)95001-4
50. Pillai S, Cariappa A, Moran ST. Marginal Zone B Cells. *Annu Rev Immunol* (2005) **23**:161–196. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115728
51. Elsner RA, Shlomchik MJ. Germinal Center and Extrafollicular B Cell Responses in Vaccination, Immunity, and Autoimmunity. *Immunity* (2020) **53**:1136–1150. doi:10.1016/j.immuni.2020.11.006
52. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol* (2012) **30**:221–41. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074934
53. Slawek A, Lorek D, Kedzierska AE, Chelmonska-Soyta A. Regulatory B cells with IL-35 and

- IL-10 expression in a normal and abortion-prone murine pregnancy model. *Am J Reprod Immunol* (2020) **83**:1–7. doi:10.1111/aji.13217
54. Rincón-Arévalo H, Sanchez-Parra CC, Castaño D, Yassin L, Vásquez G. Regulatory B Cells and Mechanisms. *Int Rev Immunol* (2015)1–21. doi:10.3109/08830185.2015.1015719
 55. Gorosito Serrán M, Fiocca Vernengo F, Beccaria CG, Acosta Rodriguez E V, Montes CL, Gruppi A. The regulatory role of B cells in autoimmunity, infections and cancer: Perspectives beyond IL10 production. *FEBS Lett* (2015) **589**:3362–3369. doi:10.1016/j.febslet.2015.08.048
 56. Jensen F, Muzzio D, Soldati R, Fest S, Zenclussen AC. Regulatory B10 cells restore pregnancy tolerance in a mouse model. *Biol Reprod* (2013) **89**:90. doi:10.1095/biolreprod.113.110791
 57. Rolle L, Memarzadeh Tehran M, Morell-García A, Raeva Y, Schumacher A, Hartig R, Costa SD, Jensen F, Zenclussen AC. Cutting Edge: IL-10-Producing Regulatory B Cells in Early Human Pregnancy. *Am J Reprod Immunol* (2013) **70**:448–453. doi:10.1111/aji.12157
 58. Guzman-Genuino RM, Diener KR. Regulatory B cells in pregnancy: Lessons from autoimmunity, graft tolerance, and cancer. *Front Immunol* (2017) **8**:1–13. doi:10.3389/fimmu.2017.00172
 59. Dutta S, Sengupta P, Haque N. Reproductive immunomodulatory functions of B cells in pregnancy. *Int Rev Immunol* (2020) **39**:53–66. doi:10.1080/08830185.2019.1674299
 60. Dal Porto JM, Gauld SB, Merrell KT, Mills D, Pugh-Bernard AE, Cambier J. B cell antigen receptor signaling 101. *Mol Immunol* (2004) **41**:599–613. doi:10.1016/j.molimm.2004.04.008
 61. Cambier JC. Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol* (1995) **155**:3281–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7561018>
 62. Treanor B, Depoil D, Gonzalez-Granja A, Barral P, Weber M, Dushek O, Bruckbauer A, Batista FD. The Membrane Skeleton Controls Diffusion Dynamics and Signaling through the B Cell Receptor. *Immunity* (2010) **32**:187–199. doi:10.1016/j.immuni.2009.12.005
 63. Harwood NE, Batista FD. New Insights into the Early Molecular Events Underlying B Cell Activation. *Immunity* (2008) **28**:609–619. doi:10.1016/j.immuni.2008.04.007
 64. Fleire SJ, Goldman JP, Carrasco YR, Weber M, Bray D, Batista FD. B cell ligand discrimination through a spreading and contraction response. *Science (80-)* (2006) **312**:738–741. doi:10.1126/science.1123940
 65. Carrasco YR, Batista FD. B cell recognition of membrane-bound antigen: an exquisite way of sensing ligands. *Curr Opin Immunol* (2006) **18**:286–291. doi:10.1016/j.coi.2006.03.013
 66. Ackermann JA, Nys J, Schweighoffer E, Mcclary S, Smithers N, Tybulewicz VLJ. Syk Tyrosine Kinase Is Critical for B Cell Antibody Responses and Memory B Cell Survival. (2015) doi:10.4049/jimmunol.1500461
 67. Fu C, Turck CW, Kurosaki T, Chan AC. BLNK: A central linker protein in B cell activation. *Immunity* (1998) **9**:93–103. doi:10.1016/S1074-7613(00)80591-9
 68. Weber M, Treanor B, Depoil D, Shinohara H, Harwood NE, Hikida M, Kurosaki T, Batista FD. Phospholipase C- γ 2 and Vav cooperate within signaling microclusters to propagate B cell spreading in response to membrane-bound antigen. *J Exp Med* (2008) **205**:853–868. doi:10.1084/jem.20072619
 69. Depoil D, Fleire S, Treanor BL, Weber M, Harwood NE, Marchbank KL, Tybulewicz VLJ, Batista FD. CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor-antigen

- microcluster formation in response to membrane-bound ligand. *Nat Immunol* (2008) **9**:63–72. doi:10.1038/ni1547
70. Kurosaki T. Regulation of the phospholipase C- γ 2 pathway in B cells. *Int Congr Ser* (2002) **1246**:51–54. doi:10.1016/S0531-5131(02)01150-0
71. Vigorito E, Clayton E, Turner M. BCR activation of PI3K is Vav-independent in murine B cells. in *Biochemical Society Transactions*, 781–784. doi:10.1042/BST0320781
72. Scharenberg AM, Humphries LA, Rawlings DJ. Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nat Rev Immunol* (2007) **7**:778–789. doi:10.1038/nri2172
73. King LB, Freedman BD. B-lymphocyte calcium influx. *Immunol Rev* (2009) **231**:265–277. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00822.x
74. Fenninger F, Jefferies WA. What's Bred in the Bone: Calcium Channels in Lymphocytes. *J Immunol* (2019) **202**:1021–1030. doi:10.4049/jimmunol.1800837
75. Bhattacharyya S, Deb J, Patra AK, Pham DAT, Chen W, Vaeth M, Berberich-Siebelt F, Klein-Hessling S, Lamperti ED, Reifenberg K, et al. NFATc1 affects mouse splenic B cell function by controlling the calcineurin-NFAT signaling network. *J Exp Med* (2011) **208**:823–839. doi:10.1084/jem.20100945
76. Teixeira LK, Carrossini N, Sécca C, Kroll JE, DaCunha DC, Faget D V., Carvalho LDS, de Souza SJ, Viola JPB. NFAT1 transcription factor regulates cell cycle progression and cyclin E expression in B lymphocytes. *Cell Cycle* (2016) **15**:2346–2359. doi:10.1080/15384101.2016.1203485
77. Barrington RA, Borde M, Rao A, Carroll MC. Involvement of NFAT1 in B Cell Self-Tolerance. *J Immunol* (2006) **177**:1510–1515. doi:10.4049/jimmunol.177.3.1510
78. Schulze-Luehrmann J, Ghosh S. Antigen-Receptor Signaling to Nuclear Factor κ B. *Immunity* (2006) **25**:701–715. doi:10.1016/j.immuni.2006.10.010
79. Juilland M, Thome M. Holding All the CARDS: How MALT1 Controls CARMA/CARD-Dependent Signaling. *Front Immunol* (2018) **9**:1927. doi:10.3389/fimmu.2018.01927
80. Ruland J ürgen, Duncan GS, Wakeham A, Mak TW. Differential requirement for Malt1 in T and B cell antigen receptor signaling. *Immunity* (2003) **19**:749–758. doi:10.1016/S1074-7613(03)00293-0
81. Gerondakis S, Siebenlist U. Roles of the NF-kappaB pathway in lymphocyte development and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2010) **2**:1–29. doi:10.1101/cshperspect.a000182
82. Chen X, Jensen PE. The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* (2008) **56**:77–83. doi:10.1007/s00005-008-0014-5
83. Lanzavecchia A. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* (1985) **314**:537–539. doi:10.1038/314537a0
84. Adler LN, Jiang W, Bhamidipati K, Millican M, Macaubas C, Hung S chen, Mellins ED. The other function: Class II-restricted antigen presentation by B cells. *Front Immunol* (2017) **8**:1–14. doi:10.3389/fimmu.2017.00319
85. Clark MR, Massenbourg D, Siemasko K, Hou P, Zhang M. B-cell antigen receptor signaling requirements for targeting antigen to the MHC class II presentation pathway. *Curr Opin Immunol* (2004) **16**:382–387. doi:10.1016/j.coi.2004.03.007
86. Crotty S. Follicular Helper CD4 T cells (T FH). *Annu Rev Immunol* (2011) **29**:621–663. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101400
87. Linton P-J, Harbertson J, Bradley LM. A Critical Role for B Cells in the Development of Memory CD4 Cells. *J Immunol* (2000) **165**:5558–5565. doi:10.4049/jimmunol.165.10.5558

88. Popi AF, Longo-Maugéri IM, Mariano M. An overview of B-1 cells as antigen-presenting cells. *Front Immunol* (2016) **7**:1–6. doi:10.3389/fimmu.2016.00138
89. Berland R, Wortis HH. Normal B-1a cell development requires B cell-intrinsic NFATc1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) **100**:13459–13464. doi:10.1073/pnas.2233620100
90. Casola S. Control of peripheral B-cell development. doi:10.1016/j.coi.2007.02.010
91. Casola S, Otipoby KL, Alimzhanov M, Humme S, Uyttersprot N, Kutok JL, Carroll MC, Rajewsky K. B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol* (2004) **5**:317–327. doi:10.1038/ni1036
92. Alhakeem SS, Sindhava VJ, Mckenna MK, Gachuki BW, Byrd JC, Muthusamy N, Bondada S. Role of B cell receptor signaling in IL-10 production by normal and malignant B-1 cells. *Ann N Y Acad Sci* (2015) **1362**:239–249. doi:10.1111/nyas.12802
93. Zhong X, Gao W, Degauque N, Bai C, Lu Y, Kenny J, Oukka M, Strom TB, Rothstein TL. Reciprocal generation of Th1/Th17 and Treg cells by B1 and B2 B cells. *Eur J Immunol* (2007) **37**:2400–2404. doi:10.1002/eji.200737296
94. Shen P, Fillatreau S. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nat Rev Immunol* (2015) **15**:441–451. doi:10.1038/nri3857
95. Duddy ME, Alter A, Bar-Or A. Distinct Profiles of Human B Cell Effector Cytokines: A Role in Immune Regulation? *J Immunol* (2004) **172**:3422–3427. doi:10.4049/jimmunol.172.6.3422
96. Croft M. The TNF family in T cell differentiation and function – Unanswered questions and future directions. *Semin Immunol* (2014) **26**:183–190. doi:10.1016/J.SMIM.2014.02.005
97. Yanaba K, Bouaziz J-D, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A Regulatory B Cell Subset with a Unique CD1dhiCD5+ Phenotype Controls T Cell-Dependent Inflammatory Responses. *Immunity* (2008) **28**:639–650. doi:10.1016/j.immuni.2008.03.017
98. Bermejo DA, Jackson SW, Gorosito-Serran M, Acosta-Rodriguez E V, Amezcua-Vesely MC, Sather BD, Singh AK, Khim S, Mucci J, Liggitt D, et al. Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR γ t and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. *Nat Immunol* (2013) **14**:514–22. doi:10.1038/ni.2569
99. Lima J, Martins C, Leandro MJ, Nunes G, Sousa MJ, Branco JC, Borrego LM. Characterization of B cells in healthy pregnant women from late pregnancy to post-partum: A prospective observational study. *BMC Pregnancy Childbirth* (2016) **16**:1–13. doi:10.1186/s12884-016-0927-7
100. Medina KL, Smithson G, Kincade PW. Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. *J Exp Med* (1993) **178**:1507–1515. doi:10.1084/jem.178.5.1507
101. Medina KL, Kincade PW. Pregnancy-related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis. *Proc Natl Acad Sci* (1994) **91**:5382–5386. doi:10.1073/pnas.91.12.5382
102. Gomez-Lopez N, Romero R, Hassan SS, Bhatti G, Berry SM, Kusanovic JP, Pacora P, Tarca AL. The Cellular Transcriptome in the Maternal Circulation During Normal Pregnancy: A Longitudinal Study. *Front Immunol* (2019) **10**:1–23. doi:10.3389/fimmu.2019.02863
103. Muzzio DO, Soldati R, Ehrhardt J, Utpatel K, Evert M, Zenclussen AC, Zygmunt M, Jensen F. B Cell Development Undergoes Profound Modifications and Adaptations During Pregnancy in Mice. *Biol Reprod* (2014) **91**:1–11. doi:10.1095/biolreprod.114.122366
104. Ait-Azzouzene D, Gendron MC, Houdayer M, Langkopf A, Bürki K, Nemazee D, Kanellopoulos-Langevin C. Maternal B lymphocytes specific for paternal

- histocompatibility antigens are partially deleted during pregnancy. *J Immunol* (1998) **161**:2677–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9743323>
105. Muzzio DO, Ziegler KB, Ehrhardt J, Zygmunt M, Jensen F. Marginal zone B cells emerge as a critical component of pregnancy well-being. *REPRODUCTION* (2016) **151**:29–37. doi:10.1530/REP-15-0274
 106. Ziegler KB, Muzzio DO, Matzner F, Bommer I, Malinowsky K, Ehrhardt J, Ventimiglia MS, Zygmunt M, Jensen F. Human pregnancy is accompanied by modifications in B cell development and immunoglobulin profile. *J Reprod Immunol* (2018) **129**:40–47. doi:10.1016/j.jri.2018.07.003
 107. Gelabert A, Balasch J, Ercilla G, Vanrell JA, Vives J, González-Merlo J, Castillo R. Abortion May Sensitize the Mother to HLA Antigens. *Tissue Antigens* (1981) **17**:353–356. doi:10.1111/j.1399-0039.1981.tb00714.x
 108. Taylor P V, Hancock KW. Antigenicity of trophoblast and possible antigen-masking effects during pregnancy. *Immunology* (1975) **28**:973–982. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/124305>
 109. Labeta MO, Margni RA, Leoni J, Binaghi RA. Structure of asymmetric non-precipitating antibody: presence of a carbohydrate residue in only one Fab region of the molecule. *Immunology* (1986) **57**:311. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1453940/%5Cnpapers3://publication/uuid/7CA8C420-82F1-4E69-AC8C-48F8D6223E62>
 110. Borel IM, Gentile T, Angelucci J, Pividori J, del Carmen Guala M, Binaghi RA, Margni RA. IgG asymmetric molecules with antipaternal activity isolated from sera and placenta of pregnant human. *J Reprod Immunol* (1991) **20**:129–140. doi:10.1016/0165-0378(91)90029-P
 111. Kelemen K, Bogner I, Paal M, Szekeres-Bartho J. A Progesterone-Induced Protein Increases the Synthesis of Asymmetric Antibodies. *Cell Immunol* (1996) **167**:129–134. doi:10.1006/CIMM.1996.0016
 112. Canellada A, Färber A, Zenclussen AC, Gentile T, Dokmetjian J, Keil A, Blois S, Miranda S, Berod L, Gutiérrez G, et al. Interleukin regulation of asymmetric antibody synthesized by isolated placental B cells. *Am J Reprod Immunol* (2002) **48**:275–282. doi:10.1034/j.1600-0897.2002.01125.x
 113. Benner M, Feyaerts D, García CC, Inci N, López SC, Fasse E, Shadmanfar W, van der Heijden OWH, Gorris MAJ, Joosten I, et al. Clusters of Tolerogenic B Cells Feature in the Dynamic Immunological Landscape of the Pregnant Uterus. *Cell Rep* (2020) **32**: doi:10.1016/j.celrep.2020.108204
 114. Jensen F, Wallukat G, Herse F, Budner O, El-Mousleh T, Costa S-D, Dechend R, Zenclussen AC. CD19 + CD5 + Cells as Indicators of Preeclampsia. *Hypertension* (2012) **59**:861–868. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.188276
 115. Wang Y, Rothstein TL. Induction of Th17 cell differentiation by B-1 cells. *Front Immunol* (2012) **3**:1–7. doi:10.3389/fimmu.2012.00281
 116. Muzzio DO, Soldati R, Rolle L, Zygmunt M, Zenclussen AC, Jensen F. B-1a B Cells Regulate T Cell Differentiation Associated with Pregnancy Disturbances. *Front Immunol* (2014) **5**:1–8. doi:10.3389/fimmu.2014.00006
 117. Busse M, Campe KNJ, Nowak D, Schumacher A, Plenagl S, Langwisch S, Tiegs G, Reinhold A, Zenclussen AC. IL-10 producing B cells rescue mouse fetuses from inflammation-driven fetal death and are able to modulate T cell immune responses. *Sci Rep* (2019) **9**:1–10. doi:10.1038/s41598-019-45860-2

118. LeibundGut-Landmann S, Waldburger J-M, e Sousa CR, Acha-Orbea H, Reith W. MHC class II expression is differentially regulated in plasmacytoid and conventional dendritic cells. *Nat Immunol* (2004) **5**:899–908. doi:10.1038/ni1109
119. Rincón-Arévalo H, Yassin-Noreña L, Vásquez G, Castaño D. Linfocitos B reguladores en enfermedades humanas y modelos murinos de autoinmunidad. *Inmunologia* (2013) **32**:129–138. doi:10.1016/j.inmuno.2013.06.001
120. Dubois F, Limou S, Chesneau M, Degauque N, Brouard S, Danger R. Transcriptional meta-analysis of regulatory B cells. *Eur J Immunol* (2020) **50**:1757–1769. doi:10.1002/eji.201948489
121. Jumaa H, Wollscheid B, Mitterer M, Reth M, Nielsen PJ, Planck M. Abnormal Development and Function of B Lymphocytes in Mice Deficient for the Signaling Adaptor Protein SLP-65. (1999) **11**:547–554.
122. Xu S, Tan JE-L, Wong EP-Y, Manickam A, Ponniah S, Lam K-P. B cell development and activation defects resulting in *xid*-like immunodeficiency in BLNK/SLP-65-deficient mice. *Int Immunol* (2000) **12**:397–404. doi:10.1093/intimm/12.3.397
123. Antony P, Petro JB, Carlesso G, Shinnars NP, Lowe J, Khan WN. B Cell receptor directs the activation of NFAT and NF- κ B via distinct molecular mechanisms. *Exp Cell Res* (2003) **291**:11–24. doi:10.1016/S0014-4827(03)00338-0
124. Hikida M, Casola S, Takahashi N, Kaji T, Takemori T, Rajewsky K, Kurosaki T. PLC- γ 2 is essential for formation and maintenance of memory B cells. *J Exp Med* (2009) **206**:681–689. doi:10.1084/jem.20082100
125. Giampaolo S, Wójcik G, Klein-Hessling S, Serfling E, Patra AK. B cell development is critically dependent on NFATc1 activity. *Cell Mol Immunol* (2019) **16**:508–520. doi:10.1038/s41423-018-0052-9
126. Limnander A, Zikherman J, Lau T, Leitges M, Weiss A, Roose JP. Protein Kinase C Promotes Transitional B Cell-Negative Selection and Limits Proximal B Cell Receptor Signaling To Enforce Tolerance. *Mol Cell Biol* (2014) **34**:1474–1485. doi:10.1128/MCB.01699-13
127. Tsui C, Martinez-Martin N, Gaya M, Maldonado P, Llorian M, Legrave NM, Rossi M, MacRae JI, Cameron AJ, Parker PJ, et al. Protein Kinase C- β Dictates B Cell Fate by Regulating Mitochondrial Remodeling, Metabolic Reprogramming, and Heme Biosynthesis. *Immunity* (2018) **48**:1144–1159.e5. doi:10.1016/j.immuni.2018.04.031
128. Burns SO, Plagnol V, Gutierrez BM, Al Zahrani D, Curtis J, Gaspar M, Hassan A, Jones AM, Malone M, Rampling D, et al. Immunodeficiency and disseminated mycobacterial infection associated with homozygous nonsense mutation of IKK β . *J Allergy Clin Immunol* (2014) **134**:215–218.e3. doi:10.1016/j.jaci.2013.12.1093
129. Jun JE, Wilson LE, Vinuesa CG, Lesage S, Blery M, Miosge LA, Cook MC, Kucharska EM, Hara H, Penninger JM, et al. Identifying the MAGUK protein Carma-1 as a central regulator of humoral immune responses and atopy by genome-wide mouse mutagenesis. *Immunity* (2003) **18**:751–762. doi:10.1016/S1074-7613(03)00141-9
130. Della-Valle V, Roos-Weil D, Scourzic L, Mouly E, Aid Z, Darwiche W, Lecluse Y, Damm F, Mémet S, Mercher T, et al. Nfkbie-deficiency leads to increased susceptibility to develop B-cell lymphoproliferative disorders in aged mice. *Blood Cancer J* (2020) **10**: doi:10.1038/s41408-020-0305-6
131. Fischer GM, Solt LA, Hastings WD, Yang K, Gerstein RM, Nikolajczyk BS, Clarke SH, Rothstein TL. Splenic and peritoneal B-1 cells differ in terms of transcriptional and proliferative features that separate peritoneal B-1 from splenic B-2 cells. *Cell Immunol* (2001) **213**:62–71. doi:10.1006/cimm.2001.1860

132. Requena P, Campo JJ, Umbers AJ, Ome M, Wangnapi R, Barrios D, Robinson LJ, Samol P, Rosanas-Urgell A, Ubillos I, et al. Pregnancy and Malaria Exposure Are Associated with Changes in the B Cell Pool and in Plasma Eotaxin Levels. *J Immunol* (2014) **193**:2971–2983. doi:10.4049/jimmunol.1401037
133. Engels G, Hierweger AM, Hoffmann J, Thieme R, Thiele S, Bertram S, Dreier C, Resa-Infante P, Jacobsen H, Thiele K, et al. Pregnancy-Related Immune Adaptation Promotes the Emergence of Highly Virulent H1N1 Influenza Virus Strains in Allogeneically Pregnant Mice. *Cell Host Microbe* (2017) **21**:321–333. doi:10.1016/j.chom.2017.02.020
134. Shah NM, Lai PF, Imami N, Johnson MR. Progesterone-related immune modulation of pregnancy and labor. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2019) **10**:1–19. doi:10.3389/fendo.2019.00198
135. Costa MA. The endocrine function of human placenta: An overview. *Reprod Biomed Online* (2016) **32**:14–43. doi:10.1016/j.rbmo.2015.10.005
136. Phiel KL, Henderson RA, Adelman SJ, Elloso MM. Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunol Lett* (2005) **97**:107–113. doi:10.1016/J.IMLET.2004.10.007
137. Zhang J, Lapato A, Bodhankar S, Vandembark AA, Offner H. Treatment with IL-10 producing B cells in combination with E2 ameliorates EAE severity and decreases CNS inflammation in B cell-deficient mice. *Metab Brain Dis* (2015) **30**:1117–1127. doi:10.1007/s11011-015-9661-5
138. Yates MA, Li Y, Chlebeck P, Proctor T, Vandembark AA, Offner H. Progesterone treatment reduces disease severity and increases IL-10 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* (2010) **220**:136–139. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.01.013
139. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Preterm Birth 1: Epidemiology and Causes of Preterm Birth. *Obstet Anesth Dig* (2009) **29**:6–7. doi:10.1097/01.aoa.0000344666.82463.8d
140. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, Chaiworapongsa T, Mazor M. The preterm parturition syndrome. *BJOG* (2006) **113** Suppl:17–42. doi:10.1111/j.1471-0528.2006.01120.x
141. Romero R, Espinoza J, Gonçalves L, Kusanovic J, Friel L, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med* (2007) **25**:21–39. doi:10.1055/s-2006-956773.
142. Deb K, Chaturvedi MM, Jaiswal YK. Comprehending the role of LPS in Gram-negative bacterial vaginosis: ogling into the causes of unfulfilled child-wish. *Arch Gynecol Obstet* (2004) **270**:133–146. doi:10.1007/s00404-004-0623-0
143. Burdet J, Sacerdoti F, Cella M, Franchi AM, Ibarra C. Role of TNF- α in the mechanisms responsible for preterm delivery induced by Stx2 in rats. *Br J Pharmacol* (2013) **168**:946–953. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02239.x
144. Huang B, Faucette AN, Pawlitz MD, Pei B, Goyert JW, Zhou JZ, El-Hage NG, Deng J, Lin J, Yao F, et al. Interleukin-33-induced expression of PIBF1 by decidual B cells protects against preterm labor. *Nat Med* (2017) **23**:128–135. doi:10.1038/nm.4244
145. Afonina IS, Müller C, Martin SJ, Beyaert R. Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity* (2015) **42**:991–1004. doi:10.1016/j.immuni.2015.06.003
146. Liew FY, Girard J-P, Turnquist HR. Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol* (2016) **16**:676–689. doi:10.1038/nri.2016.95

147. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, et al. IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. *Immunity* (2005) **23**:479–490. doi:10.1016/j.immuni.2005.09.015
148. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov* (2008) **7**:827–40. doi:10.1038/nrd2660
149. Komai-Koma M, Gilchrist DS, McKenzie ANJ, Goodyear CS, Xu D, Liew FY. IL-33 Activates B1 Cells and Exacerbates Contact Sensitivity. *J Immunol* (2011) **186**:2584–2591. doi:10.4049/jimmunol.1002103
150. Sattler S, Ling GS, Xu D, Hussaarts L, Romaine A, Zhao H, Fossati-Jimack L, Malik T, Cook HT, Botto M, et al. IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 (BregIL-33) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut. *J Autoimmun* (2014) **50**:107–122. doi:10.1016/j.jaut.2014.01.032
151. Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Par G, Polgar B, Palkovics T, Szereday L. Progesterone as an immunomodulatory molecule. *Int Immunopharmacol* (2001) **1**:1037–1048. doi:10.1016/S1567-5769(01)00035-2
152. Huang B, Faucette AN, Pawlitz MD, Pei B, Goyert JW, Zhou JZ, El-Hage NG, Deng J, Lin J, Yao F, et al. Interleukin-33-induced expression of PIBF1 by decidual B cells protects against preterm labor. *Nat Med* (2017) **23**:128–135. doi:10.1038/nm.4244
153. Polgár B, Nagy E, Mikó É, Varga P, Szekeres-Barthó J. Urinary progesterone-induced blocking factor concentration is related to pregnancy outcome. *Biol Reprod* (2004) **71**:1699–1705. doi:10.1095/biolreprod.104.030437
154. Salker MS, Nautiyal J, Steel JH, Webster Z, Šućurović S, Nicou M, Singh Y, Lucas ES, Murakami K, Chan YW, et al. Disordered IL-33/ST2 Activation in Decidualizing Stromal Cells Prolongs Uterine Receptivity in Women with Recurrent Pregnancy Loss. *PLoS One* (2012) **7**: doi:10.1371/journal.pone.0052252
155. Granne I, Southcombe JH, Snider J V., Tannetta DS, Child T, Redman CWG, Sargent IL. ST2 and IL-33 in pregnancy and pre-eclampsia. *PLoS One* (2011) **6**: doi:10.1371/journal.pone.0024463
156. Stampalija T, Chaiworapongsa T, Romero R, Tarca AL, Bhatti G, Chiang PJ, Than NG, Ferrazzi E, Hassan SS, Yeo L. Soluble ST2, a modulator of the inflammatory response, in preterm and term labor. *J Matern Neonatal Med* (2014) **27**:111–121. doi:10.3109/14767058.2013.806894
157. Scott LM, Bryant AH, Rees A, Down B, Jones RH, Thornton CA. Production and regulation of interleukin-1 family cytokines at the materno-fetal interface. *Cytokine* (2017) **99**:194–202. doi:10.1016/j.cyto.2017.07.005
158. Zhu J, Xu Y, Zhu C, Zhao J, Meng X, Chen S, Wang T, Li X, Zhang L, Lu C, et al. IL-33 induces both regulatory B cells and regulatory T cells in dextran sulfate sodium-induced colitis. *Int Immunopharmacol* (2017) **46**:38–47. doi:10.1016/j.intimp.2017.02.006
159. Guzman-Genuino RM, Eldi P, Garcia-Valtanen P, Hayball JD, Diener KR. Uterine B Cells Exhibit Regulatory Properties During the Peri-Implantation Stage of Murine Pregnancy. *Front Immunol* (2019) **10**:1–12. doi:10.3389/fimmu.2019.02899
160. Griesenauer B, Paczesny S. The ST2/IL-33 axis in immune cells during inflammatory diseases. *Front Immunol* (2017) **8**:1–17. doi:10.3389/fimmu.2017.00475
161. Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, Martal J. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol* (2002)

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

- 53:241–256. doi:10.1016/S0165-0378(01)00119-X**
162. Çekmez Y, Çekmez F, Özkaya E, Pirgon Ö, Yılmaz Z, Yılmaz EA, Kaya G, Süer N, Küçüközkan T. uPAR, IL-33, and ST2 Values as a Predictor of Subclinical Chorioamnionitis in Preterm Premature Rupture of Membranes. *J Interf Cytokine Res* (2013) **33:778–782**. doi:10.1089/jir.2012.0151
163. Bommer I, Muzzio DO, Zygmunt M, Jensen F. Progesterone and estradiol exert an inhibitory effect on the production of anti-inflammatory cytokine IL-10 by activated MZ B cells. *J Reprod Immunol* (2016) **116:113–116**. doi:10.1016/j.jri.2016.05.008

8 Anexo 1

PBS buffer 10X

NaCl	8 % (p/v).
KCl	0,2 % (p/v)
Na ₂ HPO ₄	1,44 % (p/v)
KH ₂ PO ₄	0,24 % (p/v)

MACS buffer1X

PBS	1X
BSA	0.5% (p/v)
EDTA	2 mM
pH	7,2

MojoSort buffer 5X

PBS	5X
BSA	2.5%
EDTA	10 mM
pH	7,2

FACS buffer

PBS	1X
BSA	1%
azida sódico	0,1%

Buffer de Lisis

NH ₄ Cl	1,5 M
KHCO ₃	0,1 M
EDTA	0,9 M

Caracterización fenotípica y funcional de la sub-población de linfocitos b que expresan el receptor de IL-33 durante la gestación: potencial implicancia en la protección del parto prematuro

Anticuerpos

1. Anti-mouse CD19, Clone: 6D5 FITC (x2)
2. Anti-mouse CD21/35 (CR2/CR1), Clone: 7B9 FITC
3. Anti-mouse/human CD45R/b220, Clone: RA3-6B2 APC
4. Anti-mouse CD1d (CD1.1, Ly-38), Clone: 1B1 PE
5. Anti-mouse TNF-a, Clone: MP6-XT22 PE (X2)
6. Anti-mouse IL-17A, Clone: TC11-18H10.1 PE (X2)
7. Anti-mouse IL-10, Clone: JES5-16E3 PE
8. Anti-mouse CD23, Clone: B3B4 PE
9. Anti-mouse IL-33Ra (IL1RIL1, ST2), Clone: 1B1 PE (x2)
10. Anti-mouse CD23, Clone: B3B4 PE/Cy7
11. Anti-mouse CD5, Clone: 53-7.3 PE/Cy7
12. Anti-mouse CD45, Clone: 30F-11 PerCP/Cy5.5
13. Anti-mouse CD5 PerCP
14. Anti-mouse CD19, APC