



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Células Inmunes en el Parénquima Placentario.

Autor/es

Nuria Galán Gallego

Director/es

Jon Schoorlemmer

Facultad de Ciencias.
Máster en Biología Molecular y Celular.
Junio 2022.

Abreviaturas.

Ácido ribonucleico	ARN/RNA
Anticuerpo	Ac
Antígeno leucocitario humano	HLA
Célula dendrítica	CD
Célula mononuclear de sangre periférica	PBMC
Célula natural killer	Célula NK
Célula natural killer uterina	Célula uNK
Célula T helper	Th
Célula T reguladora	Tregs
Citoqueratina-7	CK-7
Citotrofoblasto	CT
Desoxirribonucleasa	DNasa
Dominio de unión al receptor	RBD
Enzima convertora de angiotensina 2	ACE2
Factor estimulante de colonias de macrófagos	M-CSF
Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos	GM-CSF
Factor de crecimiento transformante β	TGF- β
Factor de necrosis tumoral α	TNF- α
Forward scatter	FS
Interfase	I
Interferón γ	INF- γ
Interleucina	IL
Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa	qPCR
Región de marco de lectura abierto	ORF
Parénquima placentario	PP
Placa basal	PB
Proteína spike	S
Proteína de la envoltura	E
Proteína de membrana	M
Receptor de célula T	TCR
Side Scatter	SSC
Sincitiotrofoblasto	ST
Síndrome respiratorio agudo severo	SARS
Síndrome respiratorio del Medio Oriente	MERS
Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2	SARS-CoV-2
Umbral de ciclo	C _T
Yoduro de propidio	PI

Índice.

1. Resumen / Abstract.....	3
2. Introducción.....	4
2.1. La placenta.....	4
2.2. Formación y estructura placentaria.....	4
2.2.1. Decidua basal.....	5
2.2.2. Arterias espirales.....	6
2.2.3. Trofoblastos.....	7
2.2.3.1. Citotrofoblastos vellosos mononucleados.....	7
2.2.3.2. Sincitiotrofoblasto.....	7
2.3. Células inmunes en el embarazo.....	8
2.3.1. Células NK uterinas (uNK).....	9
2.3.2. Macrófagos.....	10
2.3.3. Células T.....	11
2.3.4. Células dendríticas.....	11
2.4. Inflamación placentaria.....	12
2.5. Locus NCAM1 y su influencia en la placenta.....	12
2.6. SARS-CoV-2 y sus efectos en el embarazo.....	13
3. Hipótesis y objetivos.....	14
4. Materiales y métodos.....	15
4.1. Obtención y tratamiento de placentas.....	15
4.2. Homogeneización de la placenta para extracción de ARN.....	17
4.3. Medidas de los niveles IL-6 y TNF- α mediante qPCR.....	19
4.4. Disociación celular.....	20
4.4.1. Digestión del tejido placentario.....	20
4.4.2. Separación celular mediante gradiente de Percoll.....	21
4.5. Estudios de la viabilidad e identificación de células aisladas.....	23
4.5.1. Marcaje extracelular.....	23
4.5.3. Viabilidad celular.....	23
4.5.2. Preparación de la muestra y marcaje con anticuerpos.....	24
5. Resultados.....	26
5.1. Extracción de ARN.....	26
5.2. Puesta a punto de qPCR para medir niveles de IL-6 y TNF- α	27

5.3. Puesta a punto del marcaje con CD56 y análisis por citometría de flujo.....	29
5.4. Optimización y testaje de la digestión tisular.	30
6. Discusión.	43
7. Conclusiones / Conclusions.....	44
8. Bibliografía.	45

1. Resumen / Abstract.

La placenta es el órgano más importante en el embarazo, ya que tiene multitud de funciones esenciales para el desarrollo del feto. Cualquier desregulación que se produzca en la misma puede desembocar en una serie de complicaciones en el embarazo como el parto prematuro, la preeclampsia, etc. El estudio de su estructura y función resultan de gran interés para abordar distintos campos terapéuticos. Este órgano está formado por tres áreas fundamentales: la placa coriónica, el parénquima placentario, a su vez formado por vellosidades, y la placa basal. Cubriendo a las vellosidades encontramos los trofoblastos, que representan las principales células placentarias. Puesto que el feto es considerado un injerto semialogénico, se precisa una tolerancia por parte del sistema inmune materno para evitar su rechazo. Las células inmunes maternas están ya presentes en endometrio antes del embarazo, y durante este, además, pueden encontrarse en la decidua y en la placa basal, pero no en el parénquima placentario. Sin embargo, se han descrito patologías inflamatorias marcadas por aumento en los niveles de IL-6 y TNF- α asociado a un aumento de expresión de NCAM/CD56+ cuyo origen podría ser materno. En base a esto, surge la necesidad del desarrollo de una metodología que permita la identificación de posibles infiltraciones maternas en la placenta y poder aplicarlo para el estudio de distintos tipos de patologías, como la reciente COVID-19.

Placenta is the most important organ in pregnancy, since it has many essential functions for the development of the fetus. Any dysregulation that may occur in the placenta can lead to a different type of pregnancy complications, such as premature labor, preeclampsia, etc. The study of its structure and function are of great interest to address various therapeutic fields. This organ is formed by three principal areas: the chorionic plate, the intervillous space and the basal plate. Covering the villi are the trophoblasts, which represent the main placental cells. Since the fetus is considered a semiallogeneic graft, a tolerance by the maternal immune system is required to avoid rejection. Maternal immune cells can be found in the endometrium, decidua and basal plate, but not in the placental parenchyma. However, inflammatory pathologies marked by increased levels of IL-6 and TNF- α associated with increased expression of NCAM/CD56+ have been described whose origin could be maternal. Based on this, the need for the design of a methodology that allows the identification of possible maternal infiltrations in the placenta and its application to the study of different types of pathologies, such as the recent COVID-19, has arisen.

2. Introducción.

2.1. La placenta.

La placenta es el órgano más importante en la evolución del embarazo y en el desarrollo del feto (1), siendo la única estructura que actúa a modo de intercambio de oxígeno, nutrientes y desechos entre la madre y el embrión, por lo que es esencial para el éxito del embarazo y la salud fetal (2,3). A lo largo del embarazo tiene diversas funciones, tales como la participación en la adaptación fisiológica de la madre (2) y en procesos renales, respiratorios, gastrointestinales, hepáticos, endocrinos e inmunológicos en el feto (4).

Fallos en la formación, fisiología o función placentaria pueden derivar en complicaciones en el desarrollo embrionario, tales como abortos espontáneos, muerte fetal, parto prematuro, restricción del crecimiento intrauterino, hipertensión gestacional y preeclampsia (2). Es muy importante comprender la anatomía placentaria y sus posibles alteraciones y así poder abordar distintos campos terapéuticos (1). Debido al complejo papel que desempeña en la comunicación materno-fetal hay diversas funciones que siguen siendo poco conocidas (2).

2.2. Formación y estructura placentaria.

La formación de la placenta comienza siete días después de la concepción, cuando el tejido polar trofoblástico se adhiere e implanta en la pared uterina, lo cual permite la diferenciación de la decidua uterina y del trofoblasto al sincitiotrofoblasto (ST). Posteriormente, se forma una segunda línea de células mononucleadas justo debajo del sincitiotrofoblasto, el citotrofoblasto (CT) (5). Poco a poco aparecen lagunas en el sincitiotrofoblasto que permiten la formación del espacio intervelloso y el árbol vellosos placentario. Quince días tras la concepción se forma el anclaje citotrofoblástico gracias a la invasión del sincitiotrofoblasto por parte de vellosidades con células citotrofoblásticas. Algunas de estas células citotrofoblásticas abandonan las vellosidades y se diferencian en el trofoblasto vellosos, capaz de invadir la decidua materna, permitiendo así el comienzo de la circulación materna. Con el tiempo las vellosidades van desarrollándose y se forma la barrera placentaria (*Fig. 1*), que es una estructura constituida por el endotelio capilar fetal, tejido conectivo laxo, vasos sanguíneos, vellosidades citotrofoblásticas y vellosidades sincitiotrofoblásticas, y permite los intercambios entre la madre y el feto (1).

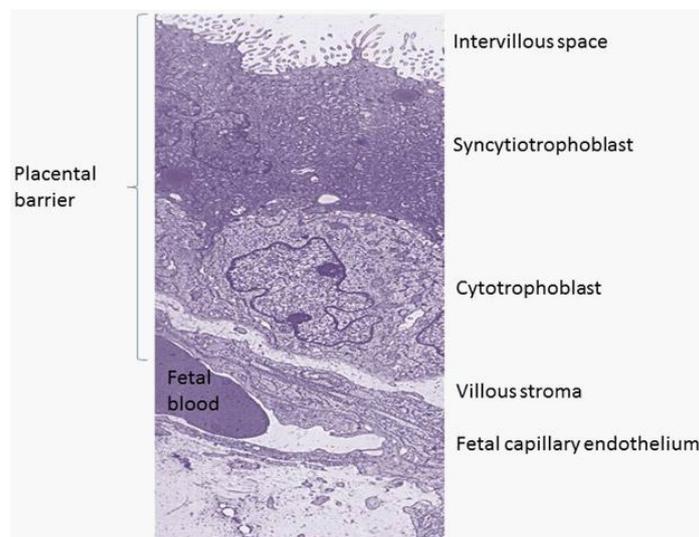


Figura 1. Estructura de la barrera placentaria donde se pueden observar distintas capas (espacio intervilloso, sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto, estroma veloso y un capilar del endotelio fetal) (1).

En una placenta se pueden detectar tres áreas fundamentales, la placa coriónica, el espacio intervilloso y la placa basal (1). La placa coriónica se sitúa frente al embrión y está formada por el amnios y el corión. El espacio intervilloso se sitúa entre la placa coriónica y la decidua y se caracteriza por presentar unas proyecciones conocidas como árboles vellosos fetales, los cuales surgen de una vellosidad unida a la superficie de la placa coriónica que se ramifica para crear un lóbulo globular. El centro de un lóbulo globular se sitúa sobre la abertura de una arteria espiral materna a través de la placa basal (6). La placa basal es una mezcla de trofoblastos fetales extravellosos y decidua uterina que se origina a partir de la separación de la placenta de la pared uterina al final del parto (1).

2.2.1. Decidua basal.

La decidualización es la transformación que sufre el compartimento estromal del endometrio para acomodar el embarazo. Si la mujer no se queda embarazada, se genera lo que se conoce como menstruación o decidualización espontánea, provocada en el endometrio superficial por una baja de los niveles de progesterona (7). Si hay embarazo, el blastocisto se adhiere y se implanta en el endometrio y las células del estroma uterino que rodean al embrión se diferencian en grandes células deciduales (Fig. 2). La decidua proporcionará el apoyo nutricional y una matriz inmunoprivilegiada al embrión antes de que se asiente una placenta funcional (8).

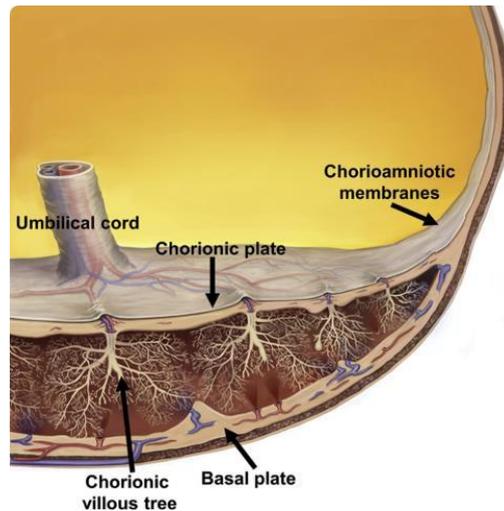


Figura 2. Representación gráfica de las estructuras principales placentarias, donde se puede observar la placa coriónica, el cordón umbilical, los árboles vellosos, la placa basal y la membrana corioamniótica (9).

2.2.2. Arterias espirales.

Las arterias espirales del útero humano desempeñan una gran variedad de funciones durante el ciclo menstrual y durante el embarazo. En el ciclo menstrual se encargan de irrigar el estroma endometrial y las glándulas en formación para la implantación del blastocisto, conservando la capacidad de contraerse a medida que las capas superiores del endometrio decidualizado se desprenden durante la menstruación para limitar la pérdida de sangre. Sin embargo, si se produce la implantación del blastocisto y la embriogénesis se necesita un canal de suministro para satisfacer las demandas fetales. Esta necesidad surge en el segundo trimestre y se vuelve crítica al final de la gestación debido al crecimiento fetal. Por tanto, estas arterias necesitan adaptarse para poder suministrar grandes cantidades de sangre al espacio intervelloso de la placenta, manteniendo un ritmo y una presión adecuados. Para ello, durante el embarazo, las arterias espirales sufren una serie de modificaciones que las hacen pasar de músculos altamente contráctiles a conductos dilatados y flácidos (*Fig. 3*) (10,11).

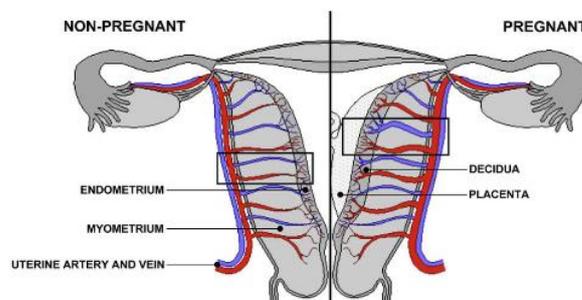


Figura 3. Representación de la vascularización uterina (arterias en rojo y venas en azul) donde se compara mujer no embarazada (izquierda) y embarazada (derecha). En el caso del embarazo se puede observar el lugar del anclaje placentario y el ensanchamiento de las arterias espirales (10).

2.2.3. Trofoblastos.

Los trofoblastos son células que forman unas vellosidades muy similares al epitelio (5). Los diferentes subtipos de trofoblastos surgen de las células madre del trofoectodermo, pudiendo distinguirse dos subtipos, citotrofoblastos y sincitiotrofoblastos. Una forma de diferenciar estos tipos celulares de otras células placentarias es gracias a la expresión de marcadores como la citoqueratina-7 (CK-7), que se expresa en todos los subtipos de trofoblastos (12).

2.2.3.1. Citotrofoblastos vellosos mononucleados.

Las células del citotrofoblasto velloso se encuentran siempre en contacto directo mediante su superficie basal con la membrana basal y, con su parte apical, en contacto con el sincitiotrofoblasto (5). Es importante destacar que son las progenitoras del sincitiotrofoblasto y, como tales, tienen gran importancia en el desarrollo y bienestar de la placenta (13).

Durante el primer trimestre de embarazo, el citotrofoblasto velloso se encuentra presente como una capa celular completa bajo la capa sincitial multinucleada, pero a medida que avanza el embarazo, los citotrofoblastos se reducen en número y, en el momento del parto, corresponden a un 15% del volumen total del trofoblasto velloso, posiblemente debido a que al llevarse a cabo una expansión de la superficie vellosa se lleva a cabo una separación de los citotrofoblastos individuales (5).

Las células vellosas del citotrofoblasto tienen distintos aspectos morfológicos que reflejan diferentes etapas de diferenciación (13). Los citotrofoblastos indiferenciados tienen forma cuboide y un citoplasma con pocos orgánulos pero, tras la diferenciación, se forman células intermedias con características intermedias entre el estado indiferenciado y el sincitiotrofoblasto, con un gran número de mitocondrias, ribosomas libres y altas cantidades de retículo endoplasmático rugoso y mRNA. En el estado de citotrofoblasto altamente diferenciado se pueden observar elevadas concentraciones de orgánulos, proteínas y mRNA. Posteriormente, estas células se fusionarán con el sincitiotrofoblasto y se convertirán en una parte integral de la capa sincitial (5).

2.2.3.2. Sincitiotrofoblasto.

El sincitiotrofoblasto placentario es la principal barrera entre la madre y el feto, constituido por una capa multinucleada, polar y continua que contiene una membrana basal y una membrana apical. En la parte apical, el sincitiotrofoblasto está constituido por unas microvellosidades que aumentan su superficie de seis a siete veces y están en contacto con la sangre materna, mientras que la membrana basal de este carece de microvellosidades pero tiene presente una densa red de filamentos de actina,

microtúbulos y microfilamentos. La parte citoplasmática contiene orgánulos, ribosomas, vesículas de pinocitosis y cuerpos densos (5,14).

Para atravesar la placenta, los nutrientes y las sustancias de desecho deben transportarse por las microvellosidades apicales y las membranas plasmáticas basales de esta capa, por lo que un transporte eficiente depende del área de la superficie de las membranas plasmáticas y apicales así como de las proteínas de transporte localizadas en estas membranas (14).

El sincitiotrofoblasto no muestra actividad proliferativa y tiene una tasa de actividad transcripcional muy baja, dependiendo su mantenimiento de la incorporación de citotrofoblastos a lo largo de la gestación (5).

2.3. Células inmunes en el embarazo.

El feto se considera un injerto semialogénico, por lo que es importante que exista una tolerancia inmune materno-fetal y que el sistema inmunitario materno sea capaz de protegerlo de antígenos endógenos y exógenos nocivos, como infecciones virales y bacterianas, para evitar su rechazo (15,16). Desde el comienzo del embarazo se pueden encontrar células del sistema inmune materno en el endometrio, en la decidua y en la placa basal (7,17).

Durante el primer trimestre de embarazo, de todas las células deciduales, entre el 30 y el 40% son leucocitos (16), siendo la mayoría células natural killer (NK), macrófagos, células T y células dendríticas (CD), aunque también se encuentran en menor cantidad mastocitos, células B y células linfoides innatas. La cantidad de células NK permanece relativamente estable durante la gestación, pero las células T reguladoras (Tregs) se expanden y se acumulan alrededor de los trofoblastos invasores (17,18). Por tanto, existe una fluctuación de estas células inmunitarias a medida que avanza el embarazo (Fig. 4).

En el caso de producirse variaciones en la cantidad de células inmunes y desencadenar un desequilibrio inmunológico podría poner en peligro el embarazo y provocar aborto espontáneo, preeclampsia, parto prematuro o retraso del crecimiento intrauterino (16).

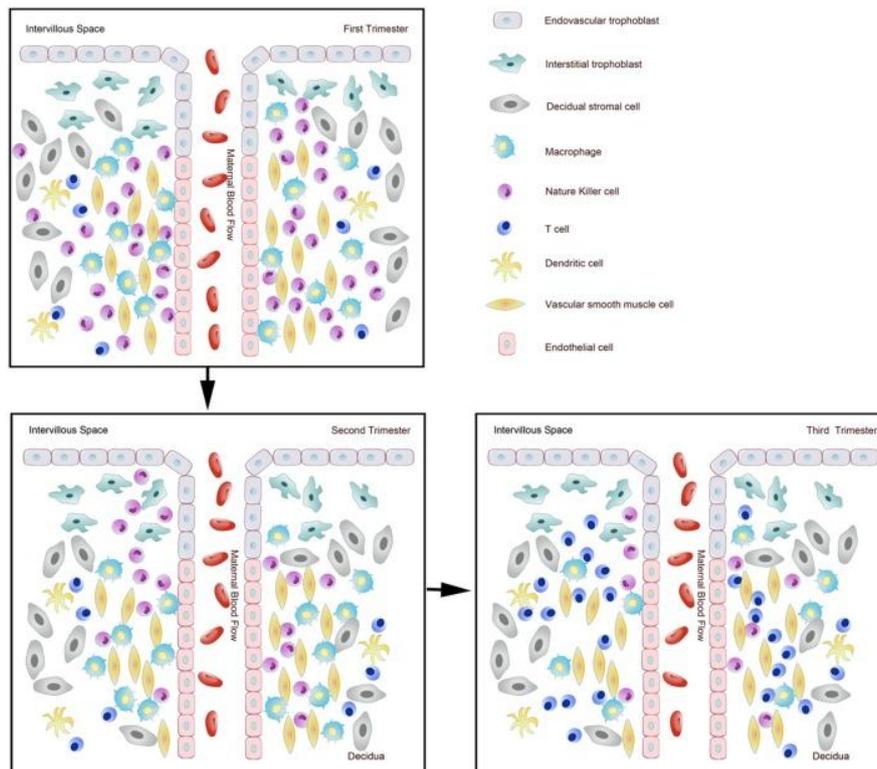


Figura 4. Variación de los distintos tipos de células inmunes en los tres trimestres del embarazo. En el primer trimestre se pueden observar una mayor cantidad de células NK que en los siguientes casos, donde podemos destacar el aumento del número de células T en el último trimestre. En el caso del segundo trimestre hay más células NK que células T, pero ya se encuentran en mucha menor proporción que en el primer trimestre (16).

2.3.1. Células NK uterinas (uNK).

Las células uNK son una población de linfocitos separada de las células T y B, que tienen funciones efectoras citotóxicas y productoras de citoquinas (18). En humanos se reconocen por la expresión de CD56 y se pueden distinguir dos tipos de subpoblaciones, las $CD56^{dim}/CD16^{+}$, que representan el 90%, y las $CD56^{bright}/CD16^{-}$ (15,16,18), siendo estas últimas las que parecen estar presentes en el endometrio humano y en el lecho placentario (18).

En el primer trimestre de embarazo es cuando alcanzan su máxima frecuencia constituyendo más del 70% de los leucocitos deciduales. A medida que avanza la gestación, su número disminuye progresivamente, encontrándose en muy poca cantidad en el momento del parto (16).

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, el feto se considera un injerto semi-alogénico, por lo que es necesario que la actividad citotóxica de las células uNK se reduzca frente a los antígenos fetales al principio del embarazo, y esto se puede lograr gracias a la expresión de los ligandos HLA expresados en los trofoblastos extravellosos fetales (15).

Se localizan en las proximidades de las células trofoblásticas fetales invasoras y en las proximidades de las arterias espirales que se están remodelando (15,18,19) y entre sus funciones se encuentra apoyar la implantación, la migración e invasión del trofoblasto y la remodelación de las arterias espirales uterinas, un proceso clave para permitir la perfusión adecuada de la placenta y del feto (17). También se sabe es que producen citocinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina-10 (IL-10), la interleucina-1 β (IL-1 β), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y el interferón γ (IFN- γ), además del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y diversos factores de crecimiento angiogénico (15,17,18).

2.3.2. Macrófagos.

Los macrófagos son células presentadoras de antígenos derivadas de los monocitos que participan en multitud de procesos desde la implantación hasta el parto, siendo muy importantes para la detección, digestión y procesamiento de materiales extraños, células muertas y otros desechos (17,18). Durante el embarazo, además de la protección del feto frente a infecciones, parecen tener un papel muy importante en la remodelación de la arteria espiral, en la invasión del trofoblasto y en la implantación del blastocisto (18).

Dentro de este grupo se distinguen dos subgrupos durante el embarazo, los macrófagos placentarios o células de Hofbauer, que corresponden al feto, y los macrófagos deciduales, que son maternos. A su vez hay dos fenotipos principales, los M1, que generalmente responden a citoquinas proinflamatorias para propagar la inflamación, y los M2, que están involucrados en procesos de antiinflamación (16,17).

Las células de Hofbauer tienen un fenotipo M2 y parece que pueden desempeñar un papel en la inflamación placentaria impulsada por microbios, mientras que los macrófagos deciduales tienen un alto nivel de plasticidad fenotípica, pudiéndose encontrar con fenotipo M1 en el periodo de preimplantación, como una mezcla de M1 y M2 en la placentación, predominando el fenotipo M2 cuando se establece la placenta y durante el resto de la gestación y, finalmente, del fenotipo M1 cerca del parto (17).

Durante el tiempo de implantación del embrión se encargan de establecer un microambiente proinflamatorio. En el primer trimestre del embarazo constituyen alrededor del 20%-30% de leucocitos deciduales en la interfaz materno-fetal, manteniéndose más o menos constante en el segundo trimestre, mientras que en los últimos meses de gestación sí se observa una disminución significativa, momento en el que secretan IL-1 β , IL-6 y TNF- α , entre otros factores, lo que hace que se consideren

las principales células inmunitarias innatas que contribuyen al parto a término y prematuro (16).

Se ha demostrado que se encuentran en las proximidades de las arterias espirales, encargándose de prepararlas para una mayor reconstrucción por parte de las células trofoblásticas. Además, también se encuentran cerca de las uNK, lo que implica que podrían ser considerados mediadores (16).

2.3.3. Células T.

Las células T constituyen una población diversa de células inmunitarias adaptativas y comprender su función en la interfaz materno-fetal es algo aún muy desconocido a causa de la gran cantidad de subconjuntos de células T, de las diversas funciones que ejercen y del hecho de que cada célula T tiene una especificidad antigénica distinta según lo determinado por su receptor (TCR) (16,19).

En comparación con otros subtipos de leucocitos es muy raro encontrarlas, ya que constituyen alrededor del 3% de los leucocitos deciduales (19). En la interfaz materno-fetal se incluyen las células T CD4⁺ (30%-45%) y células CD8⁺ (45%-75%) (20). Dentro de las CD4⁺, las mayoritarias son Th1, aunque también encontramos Th2, Th17 y Tregs, siendo estas últimas muy importantes para inducir la tolerancia y la formación de la placenta. Th17 se encargan de producir IL-17 en el embarazo, cuya función está regulada por células Tregs y uNK, por lo que este tipo celular podría desempeñar un papel en la defensa contra infecciones patológicas. Por tanto, un buen equilibrio entre células Th7 y Tregs es importante para poder desarrollar un embarazo normal (16,17).

Debido a la disminución de las células uNK en el tercer trimestre, las células T se convierten en mayoritarias en esta etapa de gestación. Se cree que estos tipos celulares son cruciales en la regulación del microambiente placentario y en el reconocimiento de antígenos fetales, aunque es algo difícil de definir. Lo que sí se sabe es que existe un equilibrio apropiado en la interfaz materno-fetal entre Th1, Th2, Th17 y Tregs construido por diferentes componentes en el útero, en la decidua y en el feto y que cualquier alteración en este equilibrio provocaría complicaciones en el embarazo (16).

2.3.4. Células dendríticas.

Las células dendríticas son otro grupo de células presentadoras de antígenos que migran a los ganglios linfáticos a través del sistema linfáticos tras la exposición a patógenos o estímulos inflamatorios. Una vez en los ganglios linfáticos pueden presentar antígenos a las células T vírgenes para dirigir su expansión, polarización y activación (17).

En la decidua se encuentran en muy poca cantidad desde el principio del embarazo (17) y su caracterización es muy difícil, ya que no existe un marcador específico para las CD deciduales (16).

2.4. Inflamación placentaria.

Una de las principales causas de distintos tipos de patologías placentarias como el parto prematuro o la preeclampsia se debe a la inflamación intraamniótica, bien sea estéril o causada por microorganismos (21). Sin embargo, también se asocia a estas enfermedades deficiencias en la vascularización y procesos de inflamación placentaria (22). Esta última se puede definir por el aumento de IL-6 y TNF- α (3,23) ligado con una disminución en los niveles de metilación de los loci NCAM1 y VEGFA, lo que se corresponde con una mayor expresión de los mismos. NCAM1/CD56+ en embarazos sin complicaciones no se expresa en los trofoblastos (24). Se ha propuesto que su presencia puede deberse o bien a la presencia de macrófagos fetales (como células de Hofbauer) (25) o a infiltraciones de células del sistema inmune materno tales como células NK o macrófagos (26), algo que ya ha sido descrito para algunas enfermedades crónicas como la villitis, la corioamnionitis crónica y la deciduitis crónica (9).

2.5. Locus NCAM1 y su influencia en la placenta.

El locus NCAM1 (NCAM, CD56, MSK39), localizado en el cromosoma 11 (q23.2), codifica para una proteína de adhesión celular perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas. La proteína está presente en multitud de órganos, siendo el más destacable en cerebro. Su expresión se ha encontrado en la placenta, aunque en proporciones mínimas si se compara con otros órganos (24). NCAM1 participa en procesos de interacción célula-célula y célula-matriz, y está involucrada en la expansión de los linfocitos T, linfocitos B y células NK (27). Entre las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), presenta niveles más altos en células NK (24). Además, la desregularización de esta molécula está asociada con diversas enfermedades (28). Cambios de la metilación placentaria en el locus NCAM1 han sido detectados en preeclampsia y en casos de parto prematuro con inflamación estéril. Dicha alteración en los niveles de metilación está asociado a cambios en la expresión genética de NCAM1. Esta combinación de observaciones es compatible con la infiltración de células maternas con bajos niveles de metilación y alta expresión de NCAM1 (3,29).

2.6. SARS-CoV-2 y sus efectos en el embarazo.

Los coronavirus, pertenecientes a la familia *Coronaviridae*, son virus considerados altamente patógenos de ARN monocatenario, no segmentado y envueltos que causan enfermedades que abarcan desde resfriados comunes hasta enfermedades fetales graves. En las últimas dos décadas se han producido tres brotes a gran escala a causa de este tipo de virus; el síndrome respiratorio agudo severo (SARS), el síndrome respiratorio del Medio Oriente (MERS) y el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (30,31).

El último de los brotes en aparecer fue SARS-CoV-2, cuyo origen se remonta a un grupo de casos de neumonía en la ciudad de Wuhan, China, produciéndose una rápida transmisión a escala mundial y siendo declarada como pandemia en marzo de 2022 (30,32).

SARS-CoV-2 tiene un genoma constituido por 14 marcos de lectura abiertos (ORF), de los cuales dos tercios codifican para 16 proteínas no estructurales y un tercio para nueve proteínas accesorias (ORF) y cuatro proteínas estructurales; spike (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N). Spike es la proteína mediadora para la entrada del SARS-CoV-2 en las células huésped y está constituida por un dominio de unión al receptor (RBD) que media el contacto directo con el receptor celular ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2) y un sitio de escisión S1/S2 que se escinde proteolíticamente por la cathepsina L celular y la proteasa serina 2 (TMPRSS2). De los tres virus mencionados al principio, parece que ser que SARS-CoV-2 es el que mayor afinidad tiene por el receptor ACE2, lo que probablemente le capacite para llevar a cabo infecciones más eficientes, aunque sea considerado como el menos letal de los tres (30,33).

Además, se ha relacionado que casos que tienen una mayor gravedad de COVID-19 tienen una menor abundancia de células NK que expresan CD56 en sangre periférica (27).

Debido a los cambios que se producen en la fisiología y en la función inmunológica materna durante el embarazo, las mujeres embarazadas pueden tener un mayor riesgo de infectarse con SARS-CoV-2 y desarrollar eventos clínicos más complicados, como la presencia de vasos lesionados y trombos intervellosos (31,34).

Es importante conocer los efectos que tienen las infecciones virales durante el embarazo, ya que los patógenos virales en la interfaz materno-fetal podrían afectar a la función de la placenta y causar complicaciones en el embarazo. La placenta actúa como barrera fisiológica e inmunológica para prevenir transferencias de la madre al feto, pero respuestas inmunológicas a infecciones pueden desencadenar en eventos negativos en la circulación fetal, sobre todo cuando dicha infección se lleva a cabo en la decidua (35).

3. Hipótesis y objetivos.

En el presente trabajo se ha enmarcado como objetivo principal desarrollar la metodología para el estudiar la infiltración de células inmunes maternas asociada a distintas patologías del embarazo como la COVID-19. Para desarrollar dicho objetivo, es preciso tener en cuenta una serie de objetivos parciales, dentro de los cuales se encuentran la disociación de tejido placentario para generar una suspensión celular, el aislamiento de células vivas placentarias y la determinación de su identidad. Una vez puesto a punto este proceso, se procede a la identificación de células que expresen NCAM1 en el parénquima placentario. Su análisis posterior permitirá determinar si son células inmunes de origen materno.

Para lograr estos objetivos es necesario poner a punto un protocolo que permita la aceleración del proceso de extracción de ARN para la medición de los niveles de IL-6 y TNF- α mediante qPCR. A su vez, se requiere de una serie de etapas que consigan un aislamiento celular eficaz de células trofoblásticas partiendo del órgano completo, comenzando por la digestión celular del tejido, la posterior separación celular mediante gradiente de Percoll y finalizando con la identificación y distinción de células NCAM+ mediante citometría de flujo.

4. Materiales y métodos.

4.1. Obtención y tratamiento de placentas.

Se usaron un total de 3 placentas recibidas del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza de mujeres con partos de cesárea programados. Las donantes deben firmar un consentimiento previo, proporcionado por parte del hospital, autorizando la donación del órgano.

El traslado de las muestras se realiza en frío y de la forma más rápida posible para evitar posibles deterioros. Una vez en el centro de investigación, se procesan y analizan para su posterior uso. En este caso fueron utilizadas para la puesta a punto de un protocolo que permita el análisis de células inmunes en el parénquima placentario. Para ello, se siguieron una serie de pasos (*Fig. 5*): disección del tejido, lavados en PBS y cortes en fragmentos pequeños el tejido. De estos fragmentos, uno de ellos se seleccionará para la posterior extracción de ARN, mientras que al resto se le añadirán enzimas de digestión para llevar a cabo una digestión tisular. Tras este paso, es necesario realizar distintas etapas de filtrado que permitan llevar la solución a un gradiente de Percoll con el que separar las células y, por último, llevar a cabo los marcajes necesarios para realizar un análisis por citometría de flujo e identificar las células de interés.

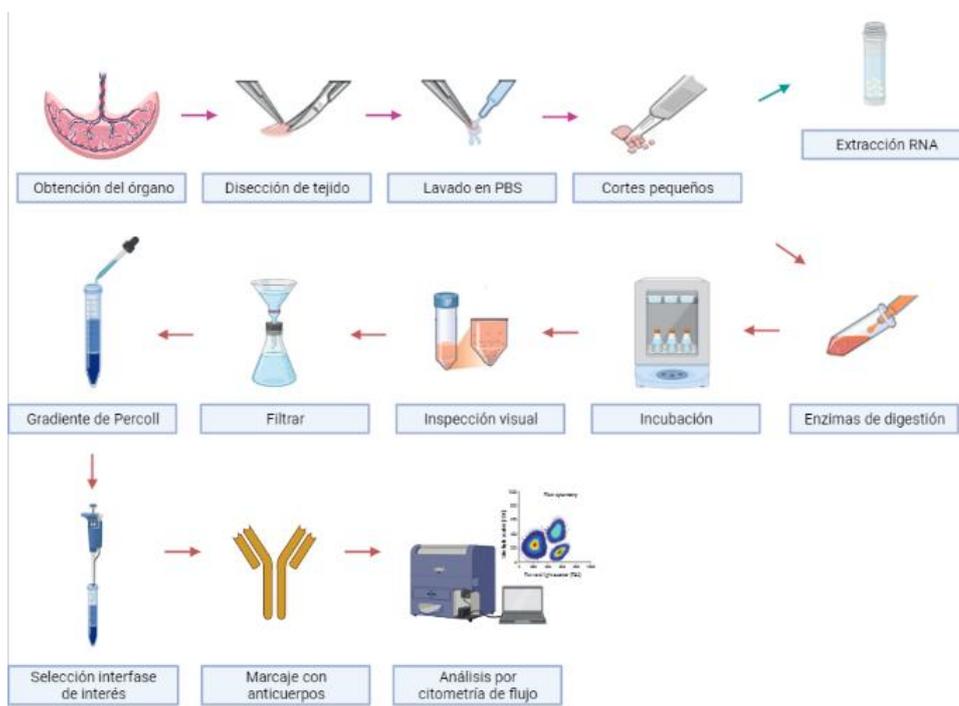


Figura 5. Representación esquemática del proceso general para el aislamiento de células procedentes de la placenta y preparación para extracción de RNA, desde la obtención del órgano hasta el análisis por citometría de flujo de las células aisladas.

La preparación de la muestra se llevó a cabo en un laboratorio de bioseguridad de nivel 2 en una campana de flujo laminar.

En primer lugar, se identifican la cara materna (*Fig. 6B*) y la cara fetal (*Fig. 6A*) del órgano. Posteriormente es necesario realizar lavados en PBS 10X (*Gibco*) frío para eliminar los restos de sangre y coágulos que se puedan haber formado.

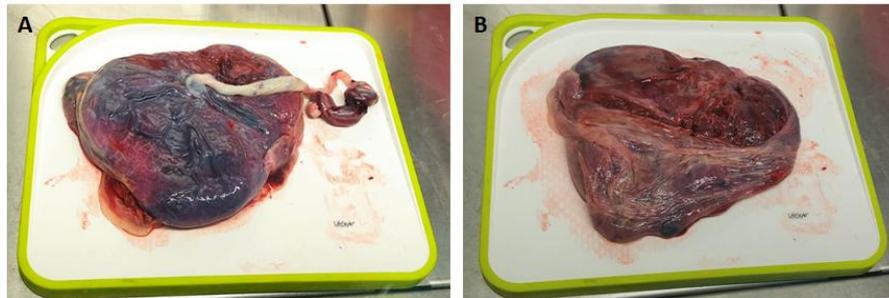


Figura 6. Muestra placentaria. **A.** Cara fetal de la placenta. Se puede apreciar el cordón umbilical, las membranas corioamnióticas y el árbol vellosos. **B.** Cara materna de la placenta, con la membrana corioamniótica arrastrada a causa del parto y una menor irrigación sanguínea que la cara fetal.

Una vez lavado, se retiran las membranas corioamnióticas y la placa basal, esta última se descartará en el caso de no querer ser analizada (*Figs. 7A, 7B*) con pinzas y tijeras, y se selecciona una parte del órgano para someter a los procesos posteriores (*Fig. 7C*). En nuestro caso, en todas las muestras seleccionamos la parte inferior derecha de la placenta. De este fragmento de órgano, se realizarán cortes transversales (*Fig. 7E*) y nos quedaremos con las partes más centrales, evitando así arrastrar partes maternas o fetales. Para eliminar toda la parte materna, con un bisturí se rasparán las caras superficiales del fragmento transversal seleccionado. Una vez eliminada, se tomará una muestra para extracción de RNA y otra para pasar a medios de digestión (*Fig. 7F*).

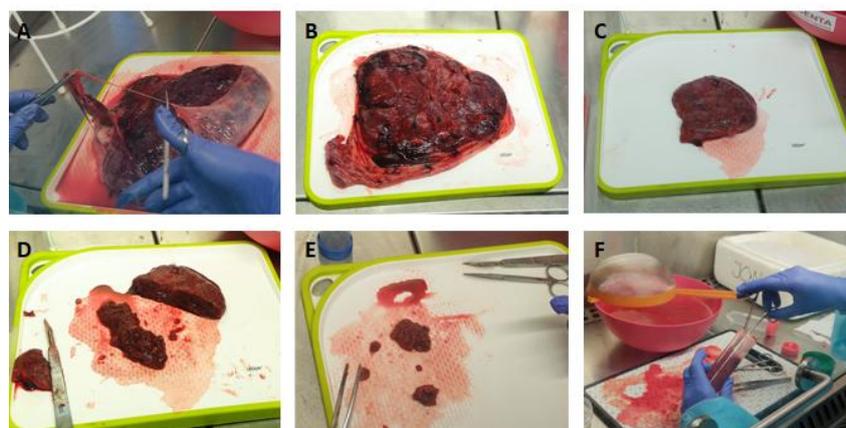


Figura 7. Pasos en el proceso de preparación de la muestra. **A, B.** Retirada de las membranas corioamnióticas. **C.** Fragmento del órgano seleccionado para su posterior análisis. **D.** Cortes transversales y raspado de estos para obtener la parte más interna de la placenta y así eliminar la parte materna y fetal. **E.** Sección escogida para la digestión del tejido. **F.** Cortes de la sección representada en E en fragmentos más pequeños para posteriormente añadir al medio de digestión.

4.2. Homogeneización de la placenta para extracción de ARN.

Se guardó una parte de tejido placentario para la extracción de RNA. Este fragmento de tejido fue añadido a un tubo eppendorf con tapa de rosca de 1,5 ml estériles (*IBIAN*) donde se añadieron bolas de zirconia (*BioSpec Products*) de 1,0 mm de diámetro hasta la mitad del tubo y 1 ml de trizol (*Sigma-Aldrich*). En cada tubo se introduce la alícuota de tejido y se corta con tijeras (previamente limpiadas con RNaseZAP™ *Cleaning agent for removing RNase SIGMA*.) hasta obtener fragmentos muy pequeños (*Fig. 8*). Una vez cortado el tejido, se introduce en Mini-Beadbeater-24 durante 4 minutos para obtener un lisado. Se recogerá el sobrenadante y se pasará a un tubo nuevo donde se añaden 1,4 ml de RNA later (*Sigma-Aldrich*).

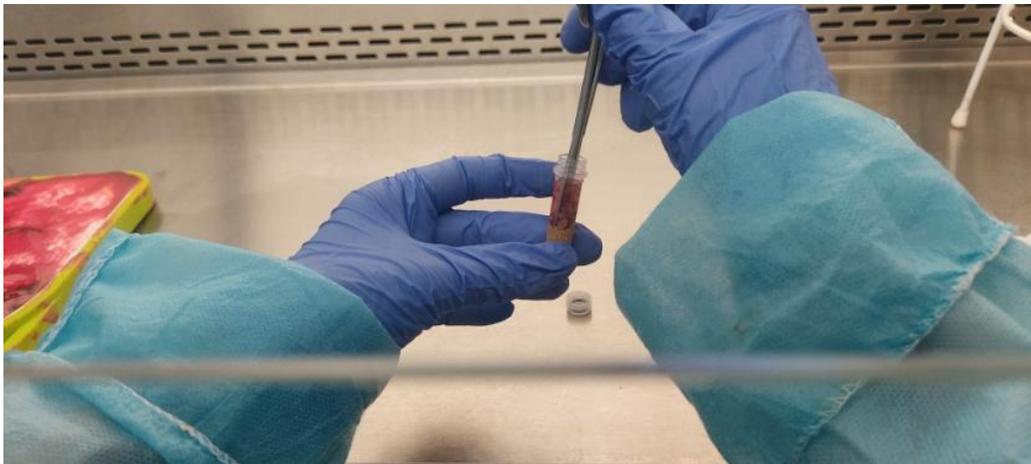


Figura 8. Proceso de corte del tejido seleccionado con tijeras para la extracción de RNA en trizol y esferas de zirconia antes de pasar por Mini-Beadbeater.

Se compararon cuatro protocolos post tratamiento de lisado para ver cuál era más eficiente a la hora de la extracción de ARN (*Fig. 9*). Para el protocolo 1 se realizó una incubación de 15 minutos en hielo. En el 2 se añadió trizol y se llevo a cabo la repetición del protocolo ya descrito basado en esferas de zirconia. En el tercero se añadió trizol y se utilizó una jeringuilla 25G (*Medical Cañada*) para volver a lisar la suspensión celular. En el cuarto protocolo se llevó a cabo un filtrado con gasas (*Medical Cañada*).

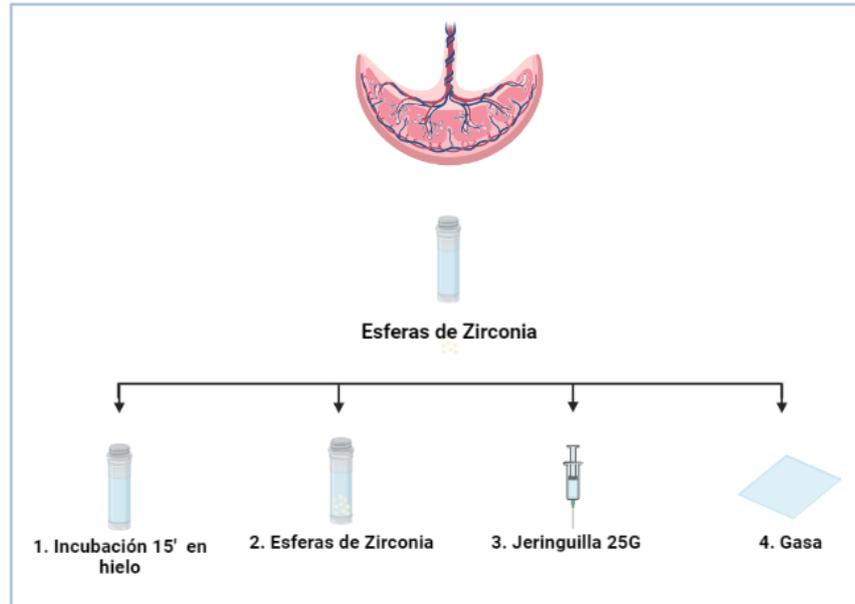


Figura 9. Diferentes protocolos post-lisis para optimizar la extracción de ARN. Tras un primer paso por Mini-Beadbeater, una de las alícuotas se dejó incubar 15 minutos en hielo. Dos de las alícuotas fueron diluidas en Trizol, una de ellas sometida de nuevo al proceso descrito con esferas de zirconia y otra directamente lisando el tejido con una jeringuilla. La última alícuota no fue diluida y simplemente fue filtrada con una gasa.

Una vez aplicadas las distintas condiciones, se pasa por columnas Direct-zol RNA Miniprep Kits (ZymoResearch). Para la preparación del Buffer, se agregan 10 ml de etanol 100% a 40 ml de Directzol™ RNA PreWash concentrado. Después, se añaden 48 ml de etanol 100% a 12 ml de RNA Wash Buffer concentrado. Para reconstruir la DNasa I liofilizada se mezcla con DNase/RNase-Free Water (para 1500 U se añadieron 275 µl de agua). Con respecto a la purificación de RNA, se añade un volumen de etanol 100% igual a una muestra lisada en trizol y se mezcla. Se transfiere la mezcla a una columna Zymo-Spin™ IICR en un tubo colector y se centrifuga a velocidad máxima durante 10 minutos. La columna se transfiere a un nuevo tubo colector y se descarta el sobrenadante. Se aplica el tratamiento con DNasa I añadiendo 400 µl de RNA Wash Buffer a la columna y se centrifuga durante 10 minutos a velocidad máxima. Después, se añaden 5 µl de DNasa I y 75 µl del Buffer de digestión de DNA, se mezcla y se añade directamente a la columna. Se incuba durante 15 minutos a 20-30 °C. Se añaden 400 µl de Direct-zol™ RNA PreWash a la columna y se centrifuga a máxima velocidad 10 minutos, se descarta el sobrenadante y se vuelve a repetir este paso. Después, se añaden 700 µl de RNA Wash Buffer a la columna y se centrifuga durante 1 minuto. Una vez centrifugado, se transfiere la columna a un eppendorf estéril sin tapa. Finalmente, para eluir el RNA, se agregan 50 µl de agua estéril directamente a la columna y se centrifuga durante 10 minutos a máxima velocidad.

Se analizó 1 µl de cada alícuota con un nanodrop (*Thermo Scientific modelo Nanodrop2000*).

4.3. Medidas de los niveles IL-6 y TNF-α mediante qPCR.

Para la puesta a punto de las medidas de IL-6 y TNF-α se usó una muestra de RNA de una placenta previamente estudiada por el grupo de investigación cuya expresión para estos marcadores había sido analizada y presentaba inflamación.

Se llevó a cabo un ensayo de retrotranscripción (*SuperScript® IV Reverse Transcriptase. Invitrogen Life Technologies*). Para ello, se mezclaron 1 µl de Oligo d(T)₂₀ (*Invitrogen Life Technologies*), 1 µl de 10 mM dNTP mix (*Invitrogen Life Technologies*), 10 µl de RNA y agua destilada libre de nucleasas. Se centrifuga la mezcla y después se calienta junto con el cebador de RNA a 65 °C durante 1 minuto. Por otro lado, se prepara una mezcla de 5x SuperScript IV Buffer (4 µl), 1 µl de 100 mM DTT, 1 µl de inhibidor de RNasa (*Rnase OUT™*) y 1 µl de la transcriptasa inversa SuperScript® IV (200 U/µl). Se centrifuga el contenido y se incuba a 50 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se aumenta la temperatura a 80 °C durante 10 minutos para inactivar la reacción. Una vez finalizado el tiempo, se congela a -20 °C hasta que vaya a ser utilizado para una qPCR.

Se realizaron rectas de calibración de qPCR para IL-6 y TNF-α. Para ello se usó el kit comercial Premix Ex Taq™ (*Takara*) con los ensayos Hs00985639_m1 (*ThermoFisher Scientific*) y Hs01113624_g1 (*ThermoFisher Scientific*) para IL-6 y TNF-α, respectivamente. Se compararon los resultados al añadir o no magnesio a estas reacciones (*Tabla 1*). Paralelamente, se precisó la preparación de diluciones seriadas, partiendo de 80 µl de RNA sin diluir hasta una dilución 1:64 (40 µl RNA y 40 µl de agua estéril). Se añadieron 5 µl de muestra y 15 µl del mix correspondiente en placas *Applied Biosystems™ MicroAmp™*. La qPCR se realizó en un termociclador *QuantStudio™ (ThermoFisher Scientific)* con el software *QuantStudio™ Design&Analysis (versión 1.5.1)* configurando 1 ciclo de 4 minutos a 95 °C, un segundo ciclo de 15 minutos a 95 °C y un tercer ciclo de un minuto a 60 °C e hibridación con la sonda FAM-MGB.

Tabla 1. Componentes necesarios para la elaboración de la Master Mix en cada caso. (*) *Los primers y las sondas son específicos de cada ensayo, ver en párrafo anterior.*

	Sin Magnesio		Con Magnesio	
	1 Reacción	26 Reacciones	1 Reacción	26 Reacciones
Agua MiliQ	3,6 µl	93,6 µl	2,8 µl	64,4 µl
2X Solution	10 µl	260 µl	10 µl	260 µl
Rox 50X (Tipo II)	0,4 µl	10,4 µl	0,4 µl	10,4 µl
Mg ²⁺ + 25 mM	-	-	0,8 µl	20,8 µl
Sonda + Primers 20X (*)	1 µl	26 µl	1 µl	26 µl

4.4. Disociación celular.

4.4.1. Digestión del tejido placentario.

Después de limpiar y cortar el tejido, el primer paso para la disociación del tejido placentario y la generación de una suspensión celular es necesario hacer una digestión tisular. Para hacer una comparativa de dos enzimas de digestión se prepararon dos tipos de buffer de digestión:

- Buffer de digestión 1: HBSS (*1X Ca/Mg free Hanks Buffered Salt Solution. PAN Biotech*) con 0.125% de tripsina (*0.25% Trypsin 1X. Gibco, Life Technologies*). Se añade 7.5 mL de tripsina 2.5% en 300 mL de HBSS.
- Buffer de digestion 2: con dispasa a una concentración final de 2.4 unidades/mL. Para ello, se añade 720 μ L de dispasa a 510 mg/mL en 300 mL de HBSS 1X libre de calcio y magnesio. Previamente es necesario preparar la solución dispasa (*Gibco, Life Technologies*) a 510 mg/ml. Sabemos que tiene una concentración final de 2.4 unidades/ml y una actividad enzimática de 1.96 unidades/mg. Se preparó para una solución de 1000 unidades, por lo que se disolvieron 510 mg de dispasa en 1 ml de PBS.

La solución de DNasa (*DNase I from bovine pancreas grade II*) se prepara a 10 mg/ml partiendo de que tiene una actividad enzimática de 3000 unidades/mg, por lo que la concentración final ha de ser de 100 unidades/mL. Se toman 10 mg de DNasa y se disuelven en 1 ml de agua MiliQ.

Todos los reactivos necesarios para la preparación de los buffer de digestión deben de estar precalentados en un baño termostataado a 37 °C, en este caso se usó un baño Selecta modelo Precistern (*número de serie 508492*).

Una vez preparados los medios de digestión, se añaden 30 g de tejido placentario en 75 ml de buffer de digestión 1 y en 300 ml de buffer de digestión 2. En el caso de las secciones placa basal se añadieron 15 g y se reajustaron las cantidades del buffer de digestión correspondiente y de la DNasa para obtener una concentración igual pero con un volumen menor que en el caso anterior.

En el caso de la tripsina, se dejó incubando en un shaker con termostato (*Incubator Shaker Innova 40 Serie 701128450*) durante 5 minutos y durante 30 minutos a temperatura de 37 °C y 100 rpm. También se comprobó si la adición de nuevo medio de digestión a los 15 minutos favorecía el proceso. En el primer caso, la DNasa se añadió en el momento en el que comenzó la digestión, mientras que en el segundo y tercer caso se añadió 15 minutos antes de que acabase la digestión.

Para la dispa se dejó incubando en las mismas condiciones que la tripsina pero durante 1 hora, añadiendo la DNasa a los 45 minutos de empezar la digestión.

Una vez pasado el tiempo de digestión, se realizó una inspección visual para garantizar que la digestión se había llevado a cabo de forma eficiente. Se dejó reposar durante 5 minutos y se procedió a filtrar los restos de tejidos en tres pasos para obtener una suspensión celular. Se usó un colador convencional (Figs. 10A, 10B) y dos mallas de nylon de 255 micras y de 70 micras de la casa comercial LABOPOLIS (Figs. 10C, 10D). Una vez filtrado, la solución obtenida se centrifuga a 4 °C a 500 xg durante 20 minutos. El sobrenadante es aspirado y se juntan todos los pellets celulares obtenidos de la misma muestra en un único tubo, donde se resuspenderán en un volumen total de 5 ml de 1X Ca/Mg free HBSS (PAN BioTech).

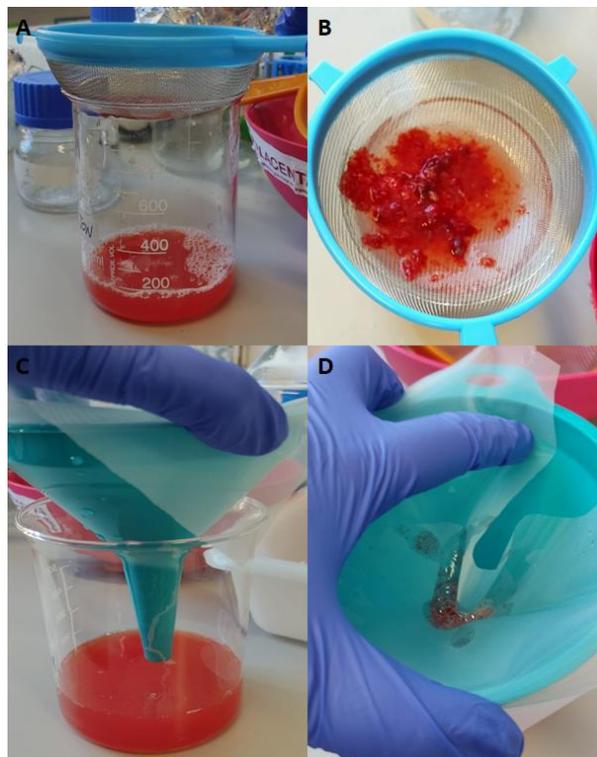


Figura 10. Proceso de filtrado del tejido digerido para generar una suspensión celular para cargarla en el gradiente de Percoll. **A.** Filtrado con colador. **B.** Restos tras el primer filtrado. **C.** Filtrado con malla de nylon. Este proceso se repite dos veces, una con una malla de 255 micras y otra con una malla de 70 micras. **D.** Restos obtenidos tras el filtrado con malla de nylon de 250 micras.

4.4.2. Separación celular mediante gradiente de Percoll.

El gradiente escalonado de Percoll se prepara en cuatro pasos. Desde la capa superior a la inferior, las densidades de carga son 20%, 30%, 40% y 50%. Es muy importante mantener en hielo el material.

En primer lugar, se prepara la solución de Percoll 100% con 36 ml de Percoll (*GE Healthcare*), 0,4 mL de 10X PBS (*Pan Biotech*) y 0,4 ml de 1M HEPES Buffer. Una vez preparado, se realizarán una serie de diluciones (*Tabla 2*) de Percoll al 100% con PBS 1X. Se añade Trypan Blue (*SIGMA*) a las densidades de 30 y 50% para poder distinguir bien las distintas fases que se formen en el gradiente.

Tabla 2. Diluciones a realizar para la preparación de las distintas densidades de carga para el gradiente de Percoll.

Densidad de carga (Percoll)	1X PBS	100% Percoll	Trypan Blue
20%	20 ml	5 ml	
30%	17,5 ml	7,5 ml	60 µl
40%	15 ml	10 ml	
50%	12,5 ml	12,5 ml	60 µl

De cada solución se pasarán 3 ml a un tubo Falcon de 25 ml mediante el uso de una bomba peristáltica. Las células que se carguen en el gradiente tienen que estar suspendidas en 2 ml de Percoll al 20% y se cargarán en la capa superior para su posterior centrifugación.

Una vez cargado con las células el gradiente, se centrifuga durante 30 minutos a 2000 xg, sin aceleración ni deceleración y a temperatura de 4 °C.

Tras la centrifugación se seleccionan las interfases de interés (*Fig. 11*) aspirando la solución de Percoll con una bomba y recogiendo el anillo de células con una pipeta. Las células recogidas se lavarán de nuevo con 5 ml de PBS, se centrifugarán durante 5 minutos a 300 xg y se recoge el pellet, el cual se resuspenderá de nuevo en PBS 10X.

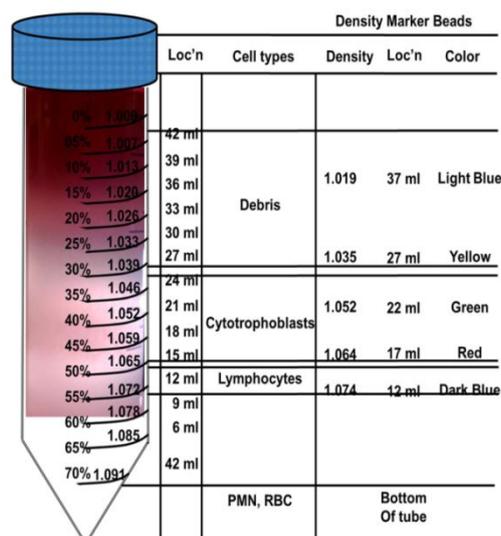


Figura 11. Representación gráfica de un gradiente de Percoll tras la centrifugación. Los desechos se situarían en la parte superior del gradiente y los glóbulos rojos en el fondo. Entre el 35-50% se encontrarían las células trofoblásticas, mientras que justo por debajo se situarían los linfocitos (36).

4.5. Estudios de la viabilidad e identificación de células aisladas.

4.5.1. Marcaje extracelular.

Se realizó un primer análisis por citometría de flujo para del marcaje de NCAM con PBMCs. Las células fueron diluidas 1:4 con PBS. En un tubo eppendorf de 2 ml (*SARSTEDT*) se adicionó ficoll (en proporción con la dilución de la muestra 2:1) y se añadió la muestra lentamente por la pared del tubo. Se centrifugó a 1400 rpm durante 30 minutos sin freno. Una vez centrifugado, se distinguen cuatro fases (*Fig. 12*). Se recogieron las interfases correspondientes entre el plasma y el ficoll con una micropipeta de 1000 μ l. Se añadió PBS y se centrifugó 5 minutos a 1600 rpm. El sobrenadante se descartó y el pellet se lavó de nuevo resuspendiendo en PBS y centrifugando durante 5 minutos a 1600 rpm.

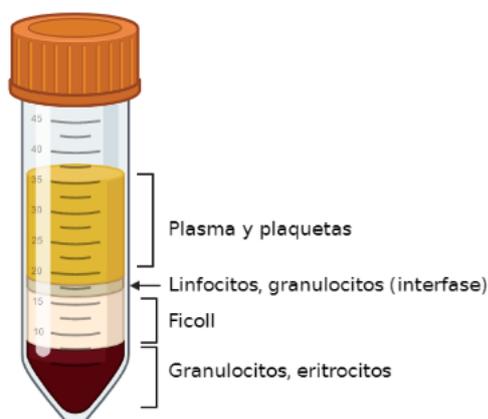


Figura 12. Representación gráfica de los resultados obtenidos tras la centrifugación para la separación celular con Ficoll. En la parte superior se encontrarían plasma y plaquetas. Entre esta fase y el Ficoll, se formaría un anillo interfásico correspondiente a los linfocitos y los granulocitos. Por último, en la fase inferior se localizarían granulocitos y eritrocitos.

Para identificar células que expresan NCAM1, la suspensión celular fue marcada con anticuerpo CD56-FITC (*Cytograbs*) en una dilución 1:10. Con la finalidad de discriminar estos tipos celulares de leucocitos, se llevó a cabo el marcaje anti-human CD45 CFBlue (*Immunostep*) en dilución 1:40. Posteriormente se realizó un análisis por citometría de flujo.

4.5.3. Viabilidad celular.

Para la medición de la viabilidad celular mediante citometría de flujo se añade una dilución 1:20 de yoduro de propidio (*Immunostep S.I.*) a la muestra sin marcar resuspendida en 100 μ l de PBS 1X. Se mezcla con vórtex y se añaden 250 μ l de PBS 1X para obtener un volumen final de 300-350 μ l aproximadamente. Se mezcla con una

pipeta y se pasa a tubos de fondo redondo de poliestireno de 5 ml (*ThermoFisher Scientific*) para analizar mediante citometría de flujo.

4.5.2. Preparación de la muestra y marcaje con anticuerpos.

Se pipetea un mínimo de 50 µl de la suspensión celular que se va a analizar en cada eppendorf. Para cada muestra se añade el volumen apropiado de anticuerpo conjugado dirigido contra el antígeno de interés (para CD45 se añaden 4 µl de *Anti-human CD45 CFBlue*, por cada 100 µl de solución, para CD16 se añade *Anti-human CD16 PE 16PE2-100T. Immunostep S.I.*, 2 µl por cada 100 µl de solución y para CD56 se añade *anti-CD56 CYT-56F*, 8,3 µl por cada 100 µl). Se incuba durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se añaden 100 µl de la solución A (*Fixation Solution*) del kit IntraCell de *Immunostep* para fijar a cada tubo, se mezcla y se deja incubar 15 minutos a temperatura ambiente. Tras este paso, se lava con 2 ml de PBS 1X y se centrifuga a 300 xg durante 5 minutos, se aspira el sobrenadante y se dejan unos 50 µL de fluido, el cual se resuspende en PBS 1X y se mezcla para que el pellet se encuentre en suspensión.

En el caso del marcaje con vimentina y CK-7, ambos anticuerpos se tienen que añadir en muestras separadas debido a su incompatibilidad. Para este marcaje, se parte del paso de la adición de la solución A descrito en el párrafo anterior. Una vez realizados estos pasos, se añaden 100 µl de la Solución B del kit IntraCell (*Permeabilization Solution*) para permeabilizar en cada tubo y se añade el volumen apropiado de anticuerpo primario específico; 5 µl de citokeratina-7 *Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 7 Clone OV-TL 12/30 (Immunostep S.I.)* para marcar células trofoblásticas, y de vimentina *Monoclonal Mouse Anti-Vimetin Clone VIm (Immunostep S.I.)* por cada 100 µl de muestra para diferenciar posibles contaminaciones celulares, y se deja incubar durante 45 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añade PBS 1X y se centrifuga a 300 xg durante 5 minutos, se aspira el sobrenadante y se dejan unos 50 µl de fluido, al que se añadirá PBS 1X para resuspender las células. Se añade el anticuerpo secundario (1 µl en 100 µl de AlexaFluor 633 *Thermofisher*) y se deja incubar durante 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Tras los 15 minutos, se lava con 2 ml de PBS 1X, se centrifuga a 300 xg durante 15 minutos y se aspira el sobrenadante.

En todos los casos es preciso resuspender las células en PBS 1X hasta un volumen final de 250 µl para analizar mediante citometría de flujo.

El citómetro empleado para todos los análisis es Beckman Coulter modelo *GALIOS A535196*. Los filtros y fluorocromos para cada tipo de muestra se describen en la *Tabla 3*.

Tabla 3. Filtros usados en el citómetro de flujo para el análisis de los distintos anticuerpos.

Fluorescencia	Filtro	Anticuerpo	Fluorocromo
FL1	525 (40) BP	CD56 CK-7/vimentina + Alexa	CYT F488
FL2	575 (30) BP	CD16	PE
FL3	620(30) BP		PI
FL9	450 (40) BP	CD45	CFBlue

5. Resultados.

5.1. Extracción de ARN.

Para poder identificar una placenta inflamada se necesita llevar a cabo un ensayo por qPCR. Tras obtener el lisado celular, la muestra se dividió en cuatro y se aplicaron los cuatro procesos post-lisis. Tras estos pasos, se procedió a cargar la solución en las distintas columnas del kit Direct-zol RNA Miniprep para llevar a cabo el proceso de extracción de ARN. En el proceso del pase por las columnas hay varias etapas de centrifugación. En la primera de estas ya se observaba que en el caso del protocolo 2 la solución logró pasar con más facilidad por la columna que en el resto. Tras la segunda centrifugación, se vio de forma clara, que solo en este caso la columna aparecía limpia sin restos celulares. En cambio, se vio que los protocolos 1, 3 y 4 no permitían el paso de la solución por la columna.

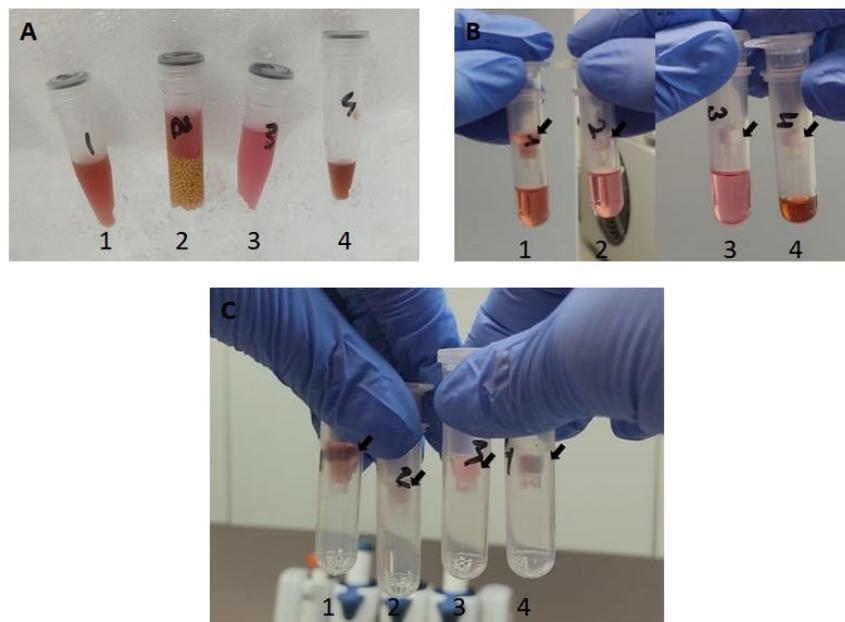


Figura 13. Resultados visuales de las distintas variaciones analizadas para la extracción de RNA. **A.** Primera inspección visual tras los procesos empleados (1. Sin dilución ni proceso adicional. 2. Segundo tratamiento con esferas de zirconia. 3. Lisis con jeringuilla. 4. Filtrado con gasa). **B.** Resultados tras la primera centrifugación en la columna (indicados con flechas). En el caso 2 no se observa casi saturación. **C.** Resultados tras la última centrifugación (indicados con flechas) donde se refleja más saturación en las columnas 1, 3 y 4. Prácticamente en el segundo caso no se produjo la saturación.

Los valores de concentración obtenidos con los protocolos 1 y 4 fueron los más altos, de 196,1 mg/ μ l y 215,5 mg/ μ l, respectivamente. Para el protocolo 2 el valor fue de 50,5 mg/ μ l y para el protocolo 3 de 137,4 mg/ μ l. El ratio 260/280, indicativo de la

pureza de ARN, en los casos de los protocolos 1, 3 y 4, se obtuvieron valores inferiores a 2. En el protocolo 2 el valor fue de 2,01. En el caso del ratio 260/230, indicativo de la presencia de proteínas, fue alto en los cuatro protocolos, superando el valor de 2 en los protocolos 2, 3 y 4, y con valor de 1,84 en el caso del protocolo 1 (Tabla 4).

En base a estos resultados, se seleccionó el protocolo 2 para futuros experimentos.

Tabla 4. Resultados obtenidos al analizar con nanodrop las muestras obtenidas por los cuatro protocolos comparados tras el proceso de extracción de ARN.

Protocolo	[] mg/ μ l	R 260/280	R 260/230
1	196,1	1,89	1,84
2	50,5	2,01	2,02
3	137,4	1,91	2,00
4	215,5	1,99	2,12

5.2. Puesta a punto de qPCR para medir niveles de IL-6 y TNF- α .

Se generaron curvas estándar de calibración para validar ensayos de qPCR. En el análisis de IL-6, al añadir magnesio en la preparación de la solución para la realización de la qPCR, desde un C_T de 24 hasta 30, hay una recta que presenta una pendiente de -3,403 y una eficacia del 0,996 (Fig. 14A) muy similar a los resultados obtenidos sin magnesio (pendiente de -3,433 y 0,966 de eficacia), donde los valores de C_T que abarca la recta son prácticamente iguales (Fig. 14B).

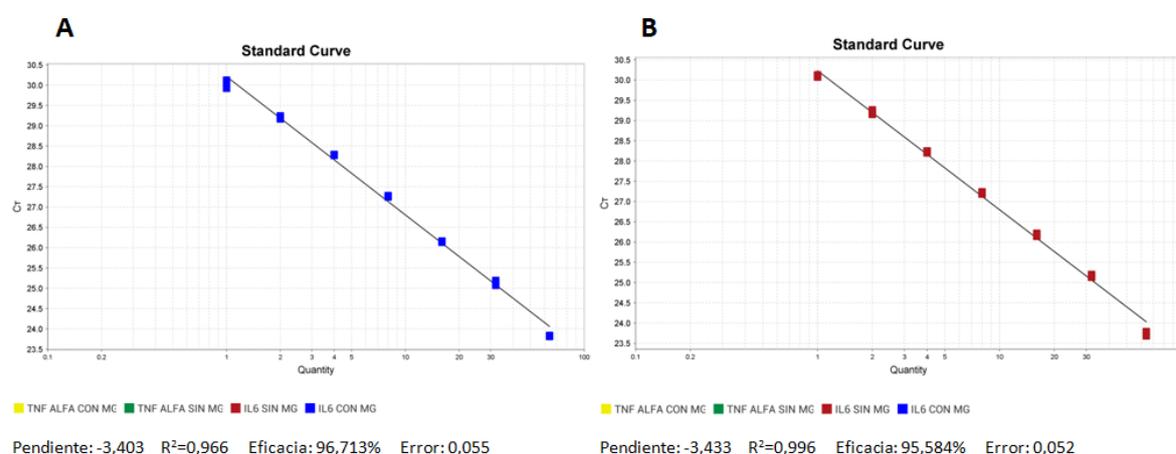


Figura 14. Curvas estándar de calibración de ensayo qPCR para IL-6. Tanto la pendiente como el valor de eficacia es prácticamente igual en ambos casos. Cuantificación/ C_T . **A.** Resultados obtenidos con la adición de magnesio. Pendiente: -3,403. R²: 0,966. Eficacia: 96,713%. Error: 0,055. **B.** Resultados obtenidos sin magnesio. Pendiente: -3,433. R²: 0,966. Eficacia: 95,584%. Error: 0,052.

Para el análisis de TNF- α , al añadir magnesio (Fig. 15A) se obtiene una pendiente de -3,405, mientras que sin magnesio (Fig. 15B) la pendiente incrementaría a -3,526. Con respecto a la eficacia, con magnesio se obtiene de un 0,999, superior que sin la adición de magnesio, donde el valor es de 0,944. Los valores de C_T en estos casos fueron similares, desde 24,5 hasta 30,5.

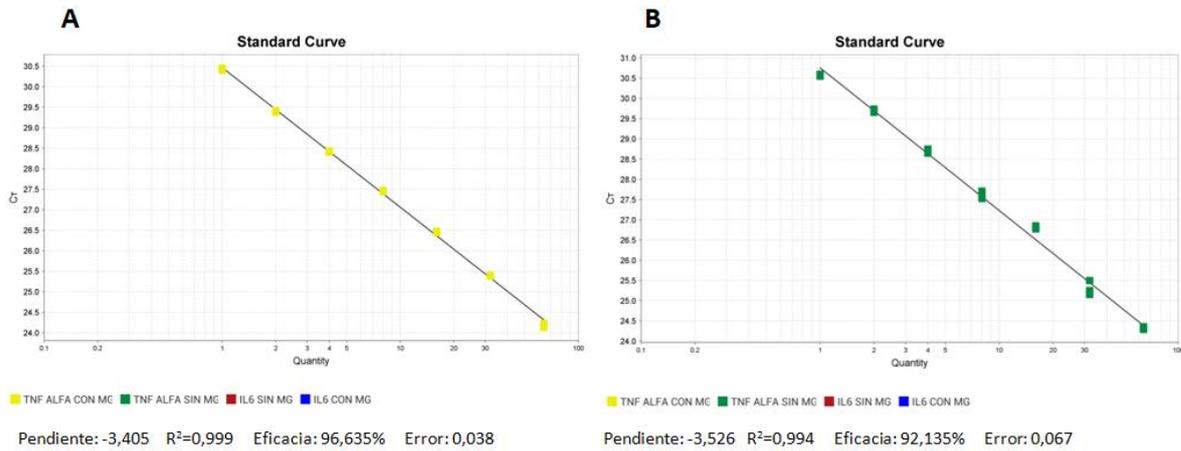


Figura 15. Curvas estándar de calibración de ensayo qPCR para TNF- α . Cuantificación/ C_T . **A.** Resultados obtenidos con la adición de magnesio. Pendiente: -3,405. R^2 : 0,999. Eficacia: 96,635%. Error: 0,038. **B.** Resultados obtenidos sin magnesio. Pendiente: -3,526. R^2 : 0,994. Eficacia: 92,135%. Error: 0,067.

5.3. Puesta a punto del marcaje con CD56 y análisis por citometría de flujo.

Con la finalidad de realizar la distinción de células CD45 y CD56 en PBMCs, previamente se llevó a cabo una prueba para diferenciar células que emitían señal para el mismo canal de intensidad de fluorescencia que CD56 (Fig. 16B). Para ello, las células fueron marcadas con CD45, se seleccionó el área de mayor emisión (Fig. 16A) en FL9 (CD45-CFBlue) y posteriormente se analizó en FL1 (CD56-CYT), donde se observó que había un 99,75% de células que emitían señal sin estar marcadas con CD56 (Fig. 16C).

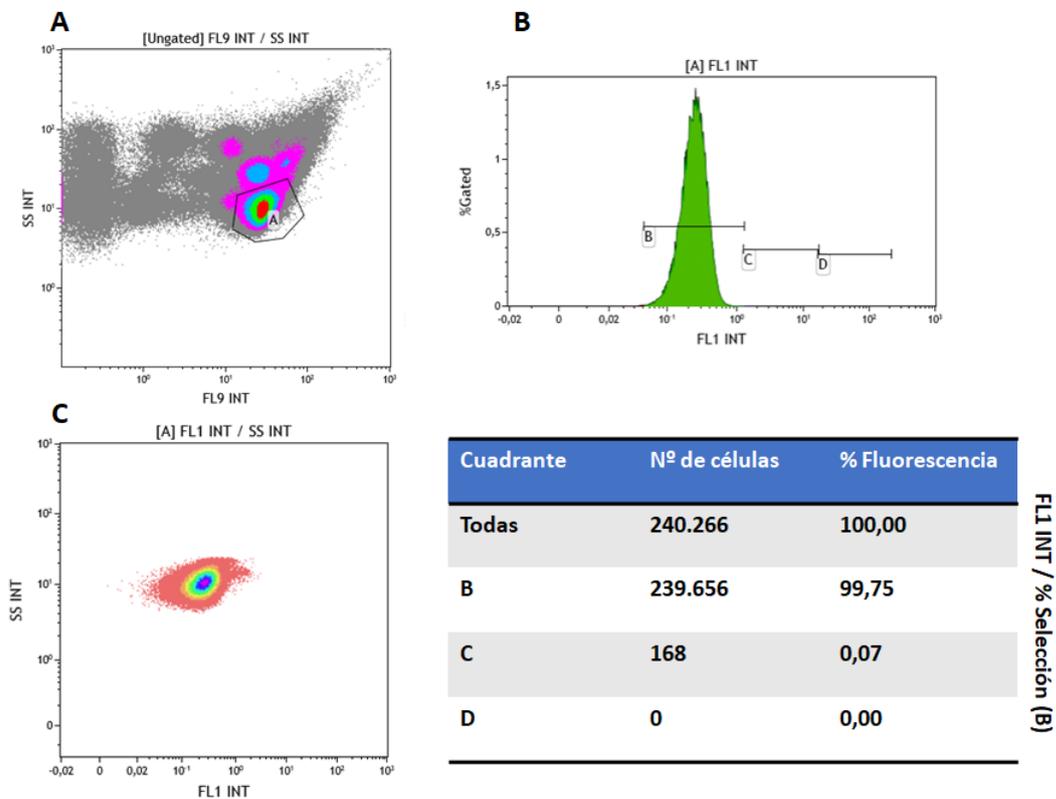


Figura 16. Análisis del marcaje de la muestra control de PBMCs marcada con CD45 para el análisis por citometría de flujo. **A.** Población de células marcadas para CD45. FL9 INT/ SS INT. FL9 para CD45-CF Blue. **B.** Niveles de corriente eléctrica de la población seleccionada al pasar por el haz de láser del citómetro de flujo. Un 99,75% resultó fluorescente en FL1. **C.** FL1 INT/SS INT. Población que emite fluorescencia sin marcaje en FL1.

Se marcaron dos suspensiones celulares de PBMCs con CD45 y CD56. En ambos casos apareció una nueva señal en el canal de intensidad de fluorescencia FL1 (Figs. 17A, 17B), por lo que el marcaje de células que responden a CD56 se llevó a cabo de forma correcta.

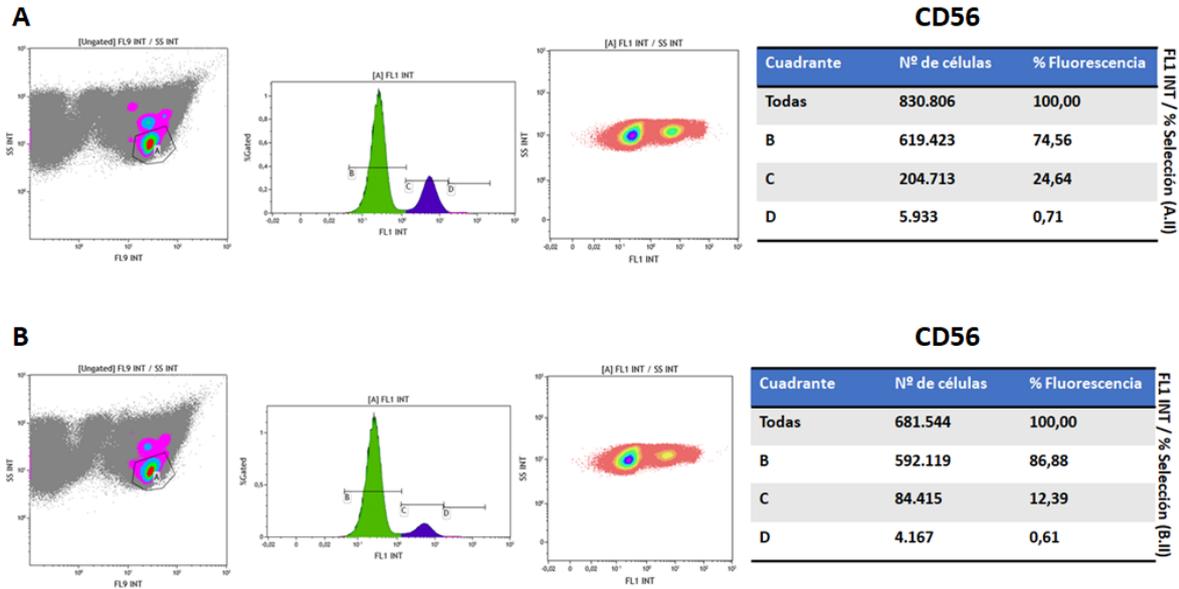


Figura 17. Resultados del marcaje de las dos muestras de PBMCs marcadas para CD45 y CD56. **A.** Selección de la población mayoritaria para esa muestra con FL9 (CD45-CF Blue). Se encontraron dos poblaciones al analizar CD56-CYT (FL1) de la población seleccionada, una representó el 74,56% de las células y la otra el 24,64%. **B.** Selección de la población mayoritaria con FL9 (CD45-CF Blue) para esa muestra. Se encontraron dos poblaciones al analizar CD56-CYT (FL1) de la población seleccionada, una representó el 86,88% de las células y la otra el 12,39%.

5.4. Optimización y testaje de la digestión tisular.

Tras el proceso de digestión tisular, la posterior filtración para la generación de una suspensión unicelular y su carga en el gradiente de Percoll, se pasó al análisis de los resultados obtenidos tras la centrifugación del gradiente.

Para el primer intento (**placenta 1**), se comparó la digestión de tripsina con la de dispasa. Las digestiones se llevaron a cabo de forma paralela, en el caso de la tripsina una durante 5 minutos y otra durante 30 minutos, mientras que en el caso de la dispasa fue una única digestión de una hora. En los tres casos se apreció la presencia de anillos entre las interfases del gradiente de Percoll. Comparando tripsina con dispasa, se observan anillos más destacables tras la digestión con dispasa (Fig. 18A). En el caso de la tripsina con tratamiento de 5 minutos sí se observaba separación celular, pero era mucho menor que si se dejaba actuar la enzima durante 30 minutos.

Se recogieron las células desde el 30% al 50% del gradiente. Tras el proceso de lavado, de nuevo, el pellet celular obtenido era mayor en el caso de la digestión con dispasa (Fig. 18B). Considerando estos resultados, por falta de células obtenidas en el caso del protocolo basado en una digestión con tripsina durante 5 minutos, se descartó seguir con el análisis de estas células.

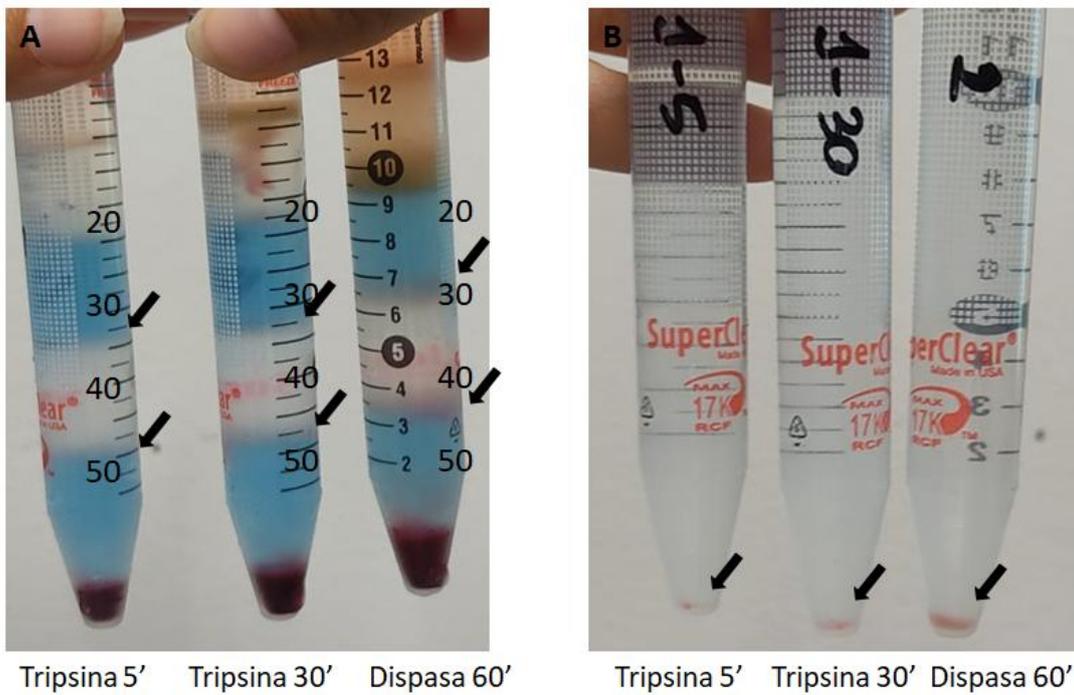


Figura 18. Fotos de los gradientes de Percoll tras su centrifugación. Placenta 1 (digestión del parénquima placentario). **A.** Se observan los anillos celulares (indicados con flechas) en las interfases 30-40% y 40-50% en los tres casos. **B.** Pellet de células obtenido (indicado con flechas) tras la recogida de las interfases y lavado en PBS.

Para el análisis por citometría de flujo, se realizó un control utilizando el anticuerpo secundario necesario para la detección de los anticuerpos vimentina y CK-7. Un 2,62% del total celular (40.516) resultaron positivas (*Fig. 19*).

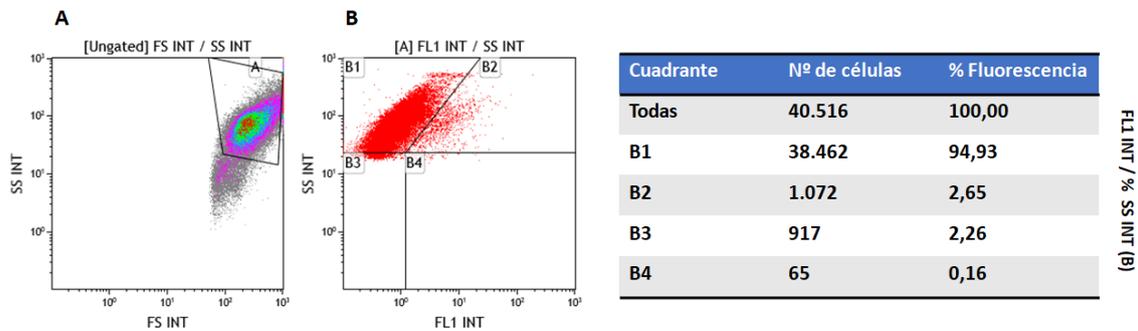


Figura 19. Marcaje con vimentina para muestra control. **A.** Población seleccionada para el análisis. FS INT / SS INT. **B.** De la población seleccionada, un 2,65% resultó tener señal en FL1 (CK-7, Alexa F488). FL1 INT / SS INT. FL1 para representación del marcaje con CK-7.

En el experimento realizado empleando digestión con tripsina, se pudo observar que al marcar las células con CK-7 un 11,13% del total marcaron para este anticuerpo (*Fig. 20A*). Por el contrario, al marcar con vimentina hubo un 56,07% de las células que resultaron positivas (*Fig. 20B*).

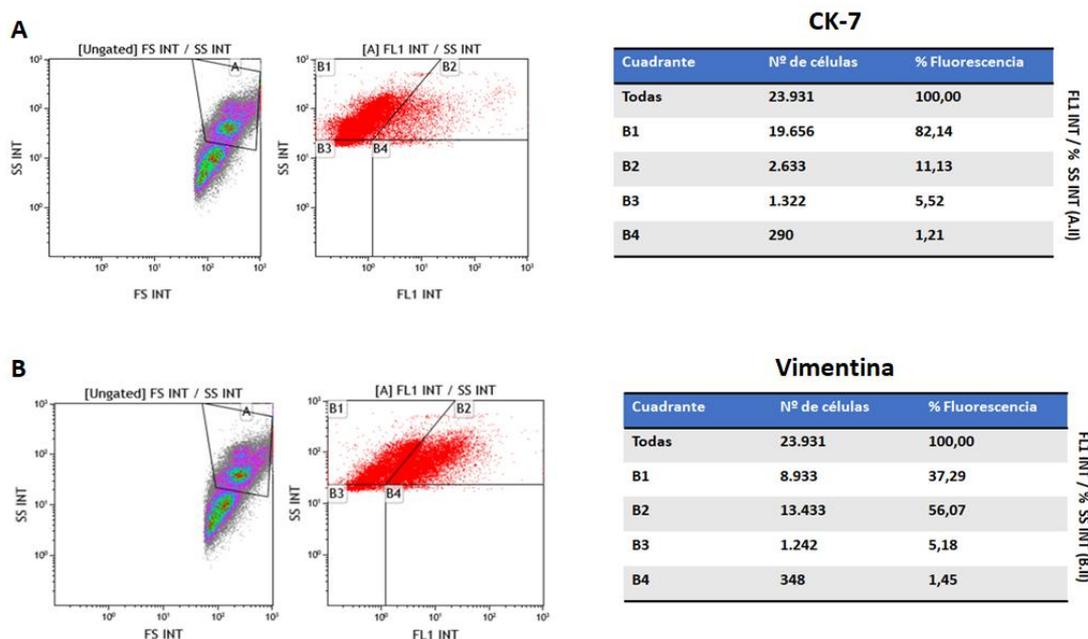


Figura 20. Resultados de citometría de flujo obtenidos en la placenta 1 al digerir el tejido con tripsina. FL1 Alexa F488 (CK-7 y vimentina) **A.** Marcaje con CK-7. Un 11,13% de las células seleccionadas resultaron positivas, un 82,14% no fueron marcadas con CK-7. **B.** Marcaje con vimentina. Un 56,07% de las células fueron marcadas, un 37,29% no fueron marcadas con vimentina.

Los resultados fueron inversos en el caso de realizar la digestión tisular con dispasa, donde un 64,58% de las células resultaron positivas para CK-7 (Fig. 21A) y un 34,28% para vimentina (Fig. 21B).

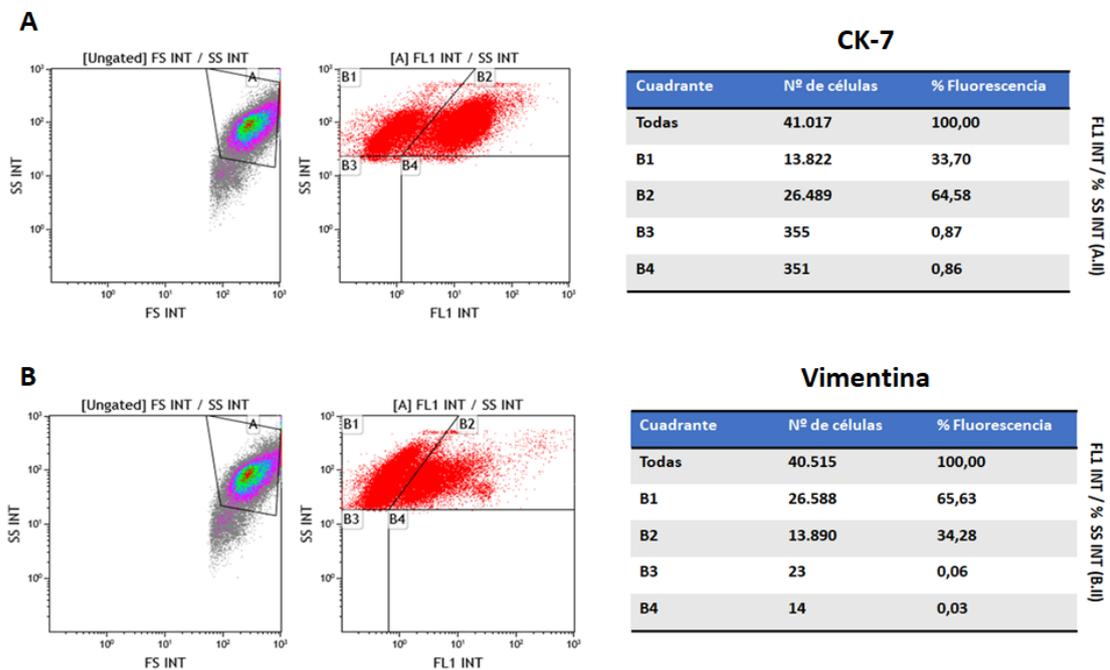


Figura 21. Resultados de citometría de flujo de la segunda muestra para el marcaje con CK-7 y vimentina tras digerir el tejido con dispasa. FL1 Alexa 488 (CK-7 y vimentina). **A.** Marcaje con CK-7. Se puede observar que más de la mitad de la población se marcó con CK-7 (64,58%), mientras que 33,70% no fueron marcadas. **B.** Marcaje con vimentina. En este caso, el 34,28% de la población marcó para vimentina y el 65,63% no.

Dado que uno de los objetivos era el aislamiento de células trofoblásticas del parénquima placentario, las cuales responden a marcaje con CK-7, en base a los resultados obtenidos, se descartaron futuras digestiones con tripsina.

En la **placenta 2** se analizó una muestra procedente del parénquima placentario y otra procedente de la placa basal. En la digestión se usó un medio con dispasa y, tras los posteriores pasos del protocolo descrito, en ambos casos, tras la centrifugación del gradiente, se observaron anillos celulares en las interfases del mismo. Estos anillos fueron recogidos de las interfases 1 (I-2) y 2 (I-2), correspondientes a linfocitos y células trofoblásticas, respectivamente (*Fig. 22A*). Tras su lavado, se obtuvo en pellet celular abundante en todos los casos (*Figs. 22A, 22B*).

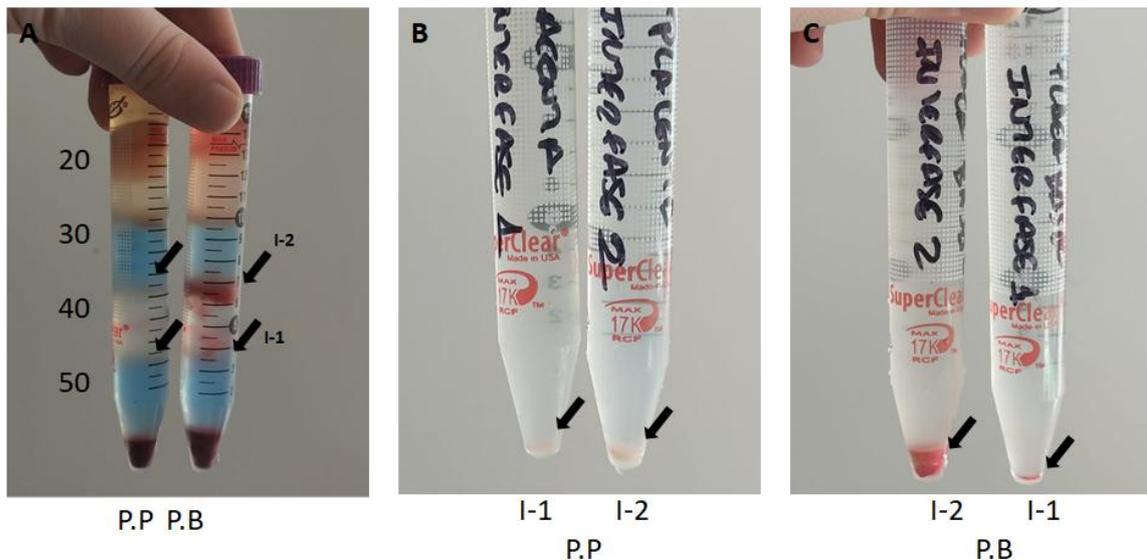
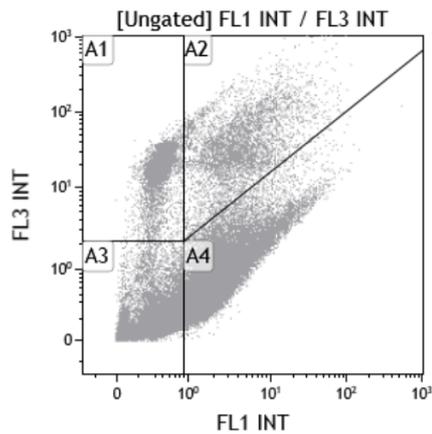


Figura 22. Resultados de la placenta 2 en la separación celular por gradiente de Percoll. **A.** Visualización de los anillos interfásicos (indicados con flechas) en el gradiente para la muestra de parénquima placentario (P.P) y de placa basal (P.B). **B.** Pellet celular obtenido de la muestra de placenta para las interfases 1 y 2, por separado (indicados con flechas). **C.** Pellet celular obtenido de la muestra de placa basal para las interfases 1 y 2 (indicados con flechas).

Se llevó a cabo un estudio de viabilidad con yoduro de propidio propidio (*Fig. 23*), mediante análisis FL1 / FL3 para CD56-CYT y PI, respectivamente. En el parénquima placentario I-1 se encontró un 11,54 % de células muertas (A1+A2 P.P I-1) marcadas con PI. Para la I-2 del parénquima placentario encontramos 14,25% de muerte (A1+A2 P.P I-2). En la placa basal, para I-1 la muerte era de un 1,22% (A1+A2 P.B I-1), mientras que para I-2 fue de 1,67% (A1+A2 P.B I-2).



Cuadrante	Nº de células	% Fluorescencia
Todas	100.000	100,00
A1	6.718	6,72
A2	4.816	4,82
A3	56.340	56,34
A4	31.126	32,13

P.P I-1

Cuadrante	Nº de células	% Fluorescencia
Todas	100.000	100,00
A1	1.079	1,08
A2	13.168	13,17
A3	27.643	13,17
A4	58.110	58,11

P.P I-2

Cuadrante	Nº de células	% Fluorescencia
Todas	100.000	100,00
A1	446	0,45
A2	773	0,77
A3	91.867	91,87
A4	6.914	6,91

P.B I-1

Cuadrante	Nº de células	% Fluorescencia
Todas	100.000	100,00
A1	971	0,97
A2	700	0,70
A3	85.683	85,68
A4	12.646	12,65

P.B I-2

Figura 23. Resultados del análisis de la viabilidad en la placenta 2. La suma de los cuadrantes A1 y A2 representa en todos los casos el porcentaje de células muertas totales, siendo en en el parénquima placentario I-1 (P.P I-1) 11,54%, en el parénquima placentario I-2 (P.P I-2) 14,25%, en la placa basal I-1 (P.B I-1) 1,22% y en la placa basal I-2 (P.B I-2) 1,67%. FL3 PI / FL1 CD56-CYT.

En el posterior análisis por citometría de flujo para poder distinguir células inmunes, se realizó una primera prueba sin ningún tipo de marcaje usando FL1 (CD56-CYT) y FL2 (CD16-PE), obteniendo los resultados representados en la *figura 24*.

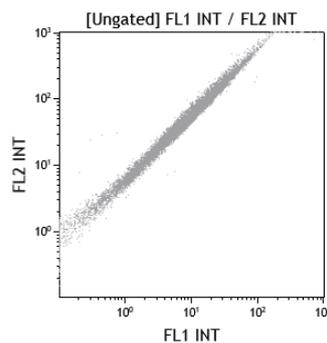


Figura 24. Control realizado (muestra sin marcar) para la placenta 2 mediante análisis por citometría de flujo para el posterior marcaje de CD56 (FL1) y CD16 (FL2).

En el caso del análisis de la I-1 de la muestra de parénquima placentario, se observaron dos poblaciones celulares, una correspondiente a CD56+ (4,47%) y otra CD16+ (21,27%) (Fig. 25A). En I-2 del parénquima placentario, la población CD16+ resultó ser un 1,71% con respecto al total, mientras que la población CD56+ fue un 33,41% (Fig. 25B).

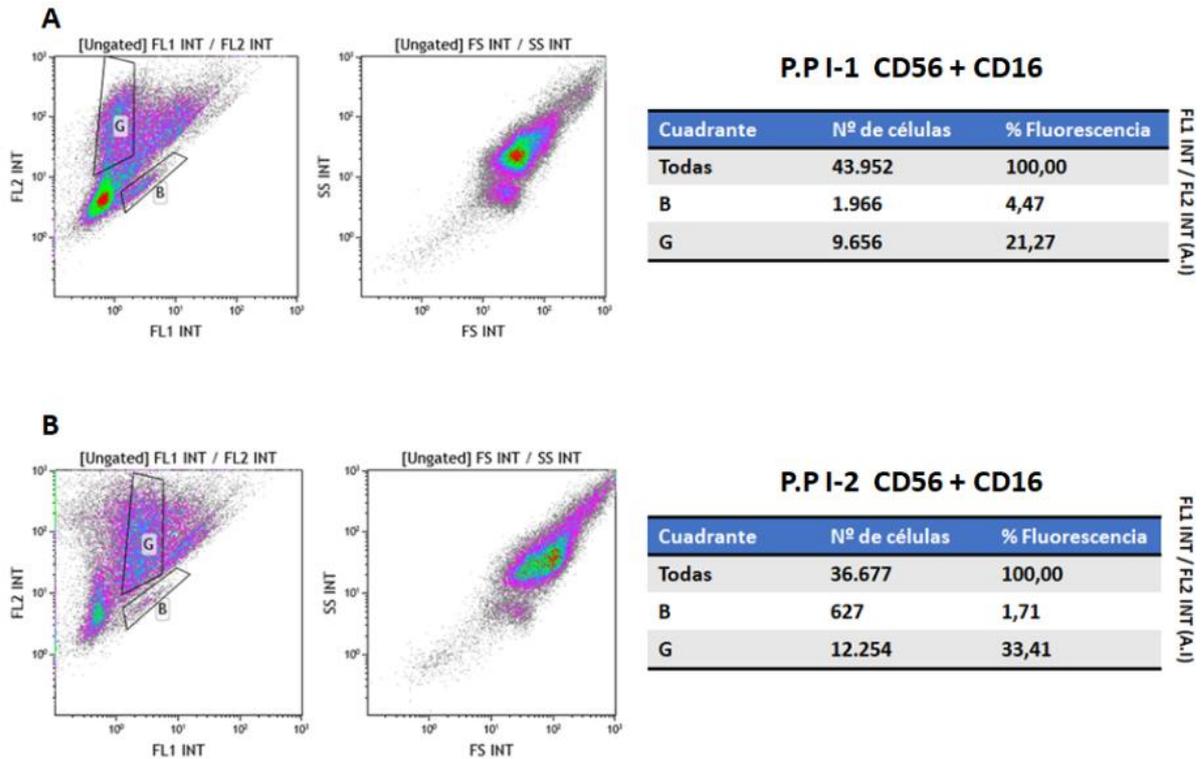


Figura 25. Resultados obtenidos tras la citometría de flujo para una tinción con CD16 (FL2) y CD56 (FL1) para la placenta 2. **A.** Interfase-1. El 4,47% de las células marcó para CD56, mientras que para CD16 hubo un 21,27%. **B.** Interfase -2. Para CD16 se encontraron 1,71% células positivas. Para CD56+ un 33,41% .

En el caso del análisis de la placa basal, se diferenciaron tres poblaciones celulares. En I-1, la población D (células CD16+) fue el 25% con respecto al total, F (células CD56+) el 6,55% y E (células CD16+ y CD56+) el 3,94% (Fig. 26A). En I-2, La población D representaba el 16,69% del total, mientras que F el 6,73% y E se correspondería con el 6,92% (Fig. 26B).

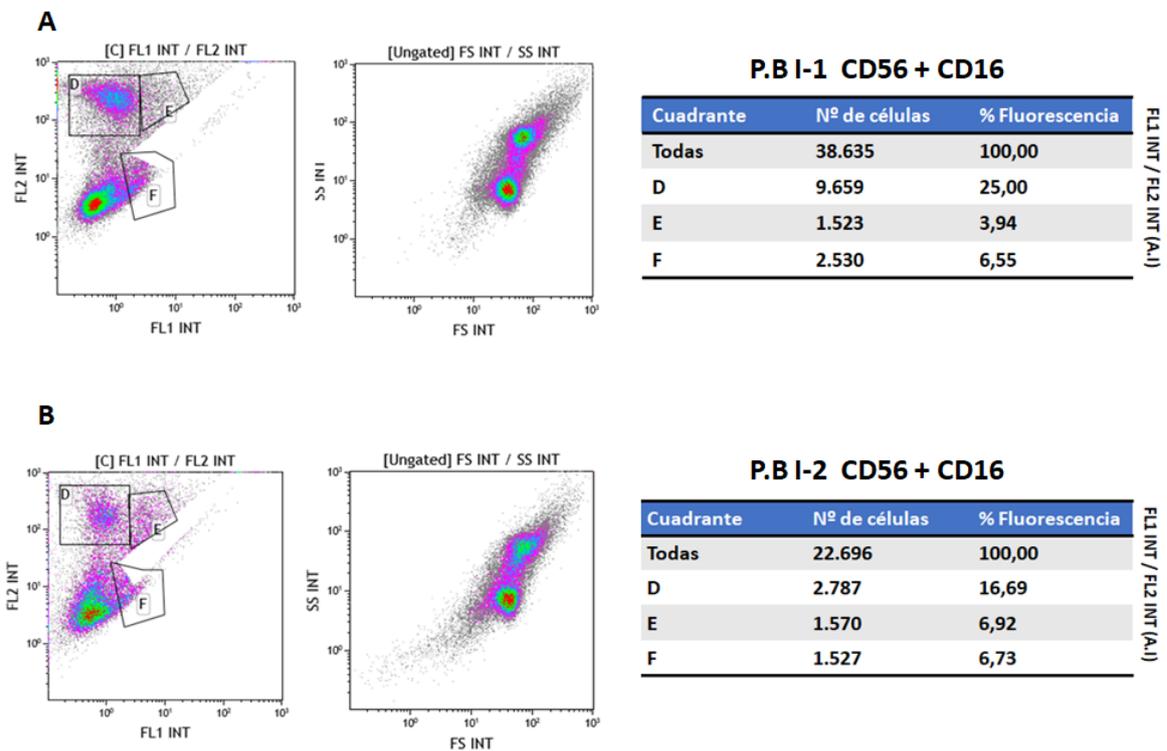


Figura 26. Resultados del análisis por citometría de flujo de la placa basal de la placenta 2. Se encontraron tres poblaciones (D, E, F). Análisis para CD16 (FL2) y CD56 (FL1). **A.** En I-1, la población D representa el 25% del total, la población E el 3,94% y la población F el 6,55%. **B.** En I-2. D representa el 16,69% del total celular, E el 6,92% y F el 6,73%.

En la **placenta 3** se realizó una digestión tisular con dispasa durante 60 minutos. Tras la centrifugación del gradiente de Percoll se recogieron células de I-1 e I-2 tanto del parénquima placentario como de placa basal (*Fig. 27A*). En todos los casos se obtuvo una gran cantidad de pellet celular (*Fig. 27B*).

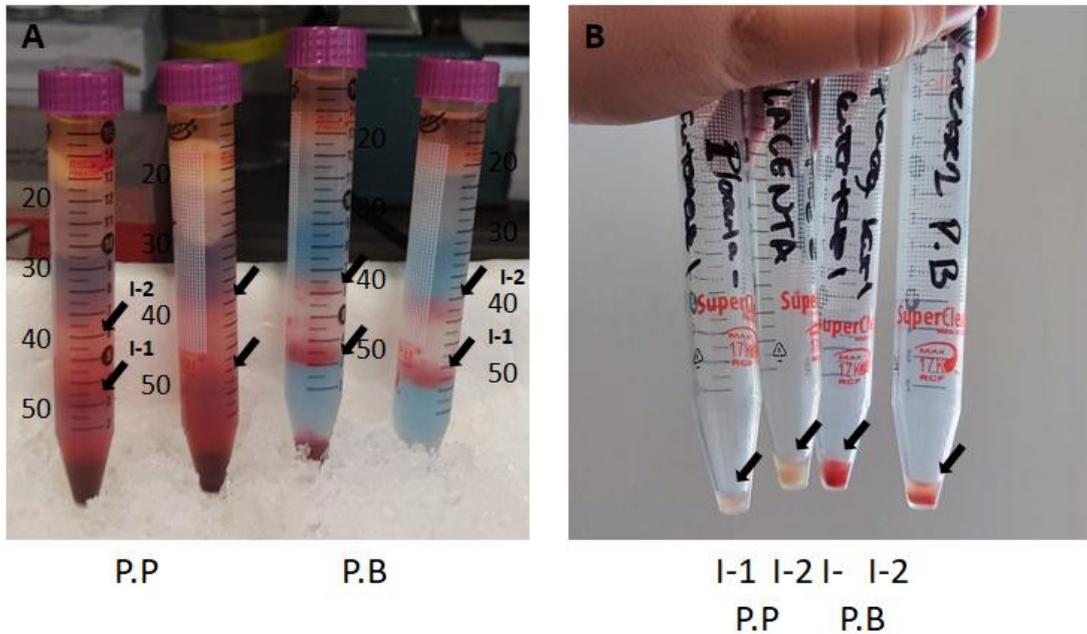


Figura 27. Resultados obtenidos para la placenta 3 tras la separación celular por gradiente de Percoll. **A.** Gradiente de Percoll tras su centrifugación celular. Se observan anillos interfásicos (indicados con flechas) entre 30-40% y 40-50%. Posible contaminación por eritrocitos. Distinción entre parénquima placentario (P.P) y placa basal (P.B). **B.** Pellet celular obtenido tras el lavado en PBS para las interfases 1 y 2 recogidas de la muestra de parénquima placentario y de placa basal.

En el estudio de viabilidad con yoduro de propidio, el resultado de muerte se refleja en A++ representados en la *tabla 5*. En el parénquima placentario encontramos un 25,16% de muerte para la muestra tomada del parénquima placentario I-1 (*Tabla 5.A*), 16,05% en el caso de I-2 (*Tabla 5.B*), 1,78% para la placa basal I-1 (*Tabla 5.C*) y 2,53% para I-2 de placa basal (*Tabla 5.D*). Para el análisis se usaron los canales BrilliantViolet 421-A / PE-A.

Tabla 5. Porcentaje y número de células tras el análisis con PI con citometría de flujo para la muestra de placenta 3. **A.** Parénquima placentario I-1 tiene un 25,16% de muerte. **B.** Parénquima placentario I-2 tiene un 16,05% de muerte. **C.** Placa basal I-1 tiene un 1,78% de muerte. **D.** Placa basal I-2 tiene un 2,53% de muerte.

A. P.P. I-1

Cuadrante	Nº de células	% Fluorescencia
Todas	100.000	100,00
A--	666	0,67
A+-	393	0,39
A+-	73.784	73,78
A++	25.157	25,16

B. P.P. I-2

Cuadrante	Nº de células	% Fluorescencia
Todas	100.000	100,00
A--	258	0,26
A+-	133	0,13
A+-	83.557	83,56
A++	16.052	16,05

C. P.B. I-1

Cuadrante	Nº de células	% Fluorescencia
Todas	100.000	100,00
A--	2.272	2,27
A+-	21	0,02
A+-	95.924	95,92
A++	1.783	1,78

D. P.B. I-2

Cuadrante	Nº de células	% Fluorescencia
Todas	100.000	100,00
A--	2.132	2,13
A+-	15	0,02
A+-	95.322	95,32
A++	2.531	2,53

Los resultados del control, obtenidos a partir de citometría de flujo de la muestra de parénquima placentario sin ningún marcaje, se representan en la *Figura 28* usando los canales FL1 y FL2.

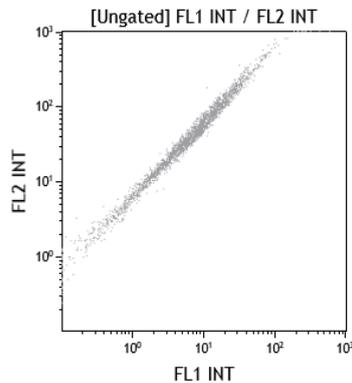


Figura 28. Prueba control realizado de la muestra de placenta 3 para análisis por citometría de flujo. FL1 y FL2 sin marcaje.

Para la placenta 3, los resultados del marcaje del parénquima placentario I-1 marcado con CD56 y CD16 muestra un 6,10% de células CD56+ y un 16,80% de células CD16% (Fig. 29A). En la I-2 encontramos 24,73% CD16+ y 23,70% CD56+ (Fig. 29B).

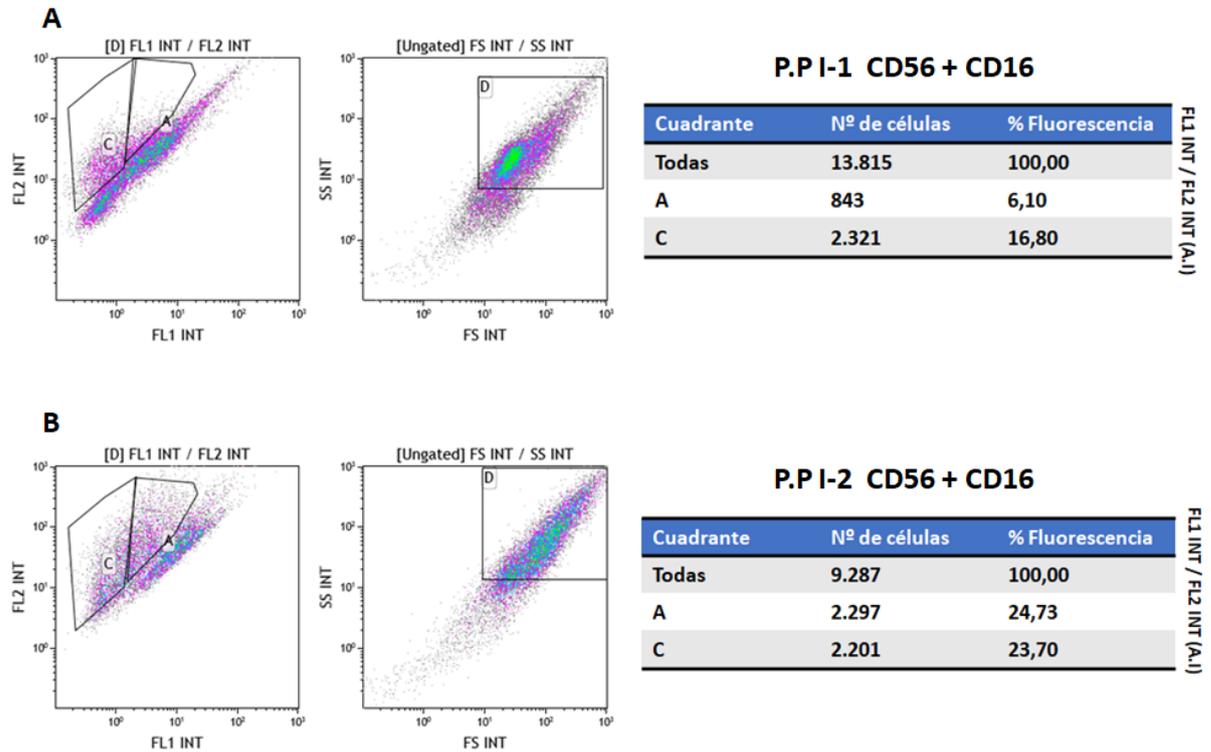


Figura 29. Muestra analizada de parénquima placentario I-1 en el análisis por citometría de flujo marcada con CD56 (FL1) y CD16 (FL2). **A.** I-1. La población A (CD56+) representa un 6,10% del total celular y la C el 16,80% (CD16+). **B.** La población A (CD56+) representa el 24,73% del total celular y la C (CD16+) el 23,70%.

En la placa basal de la misma placenta, en I-1, se obtuvieron valores de poblaciones inmunes de 19,20% en el caso de la población A (CD56+), mientras que para la población C (CD16+) se obtuvo un 41,31% (Fig. 30A). En el caso de I-2, la cantidad de la población A (CD56+) fue del 19,97%, mientras que la población C (CD16+) fue del 22,51% (Fig. 30B).

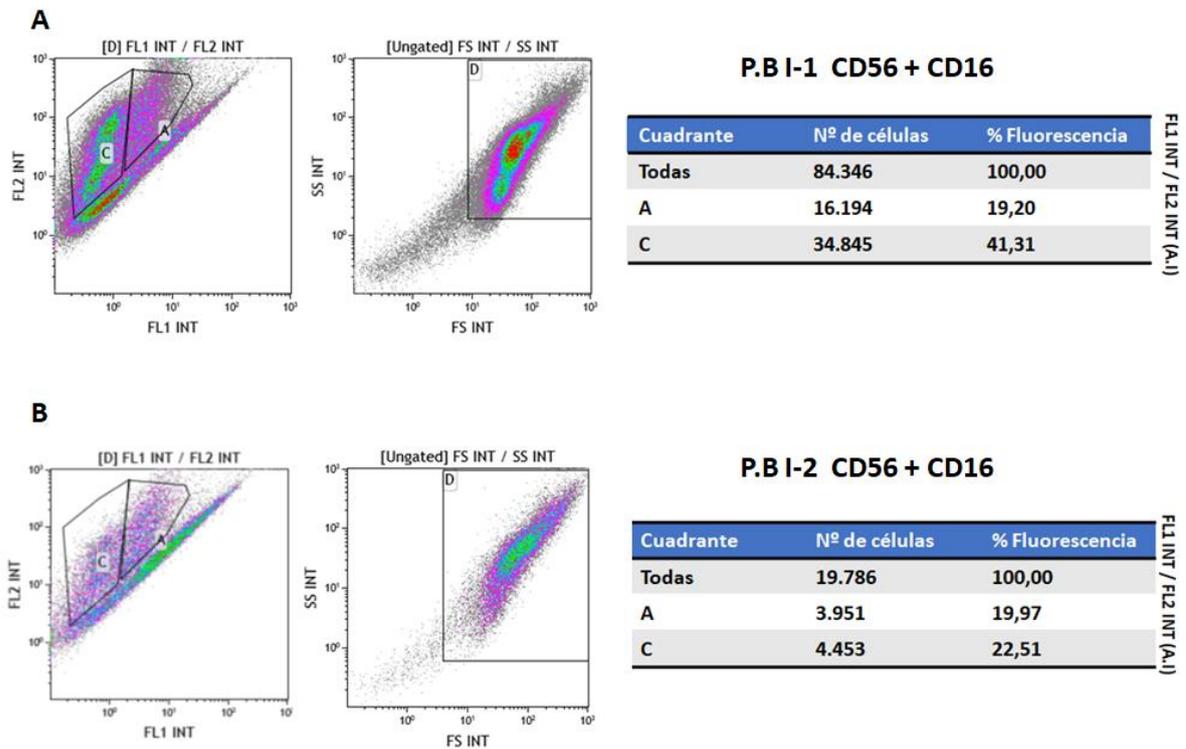


Figura 30. Resultados de citometría de flujo para placenta 3 muestra tomada de la placa basal. **A.** I-1. La población A (CD56+) constituye el 19,20% del total y la C (CD16+) el 41,31%. **B.** I-2. La población A (CD56+) se corresponde con un 19,97% y la C (CD16+) con un 22,51%.

A su vez, con la finalidad de realizar un marcaje simultáneo tanto de células trofoblásticas como de células inmunes presentes en las placentas 2 y 3, se llevó a cabo un marcaje con extracelular con CD56 y CD16 e intracelular con CK-7. En los análisis por citometría de flujo se observó que por razones técnicas no se dieron los resultados esperados, por lo fueron descartados.

En la *tabla 6* se refleja un resumen de los distintos protocolos empleados en las placentas analizadas.

Tabla 6. Resumen de las placentas sometidas a estudio. Zonas analizadas, enzimas de digestión usadas en el proceso de digestión tisular y células que se han identificado mediante citometría de flujo.

Placenta	Donante	Zonas analizadas	Enzima de digestión	Células identificadas
1	Mujer sana	Parénquima placentario	Tripsina 30' Tripsina 5' Dispasa 60'	Trofoblastos
2	Mujer sana (COVID-19 segundo trimestre)	Parénquima placentario Placa basal	Dispasa 60'	Células CD16+, CD56+
3	Mujer sana	Parénquima placentario Placa basal	Dispasa 60'	Células CD16+, CD56+

6. Discusión.

Gracias a las distintas pruebas realizadas, en el presente trabajo se ha logrado poner a punto un protocolo que permite la identificación de células CD56+ en el parénquima placentario. El uso de dispasa para realizar la digestión tisular ha supuesto una mejora a la hora de aislar poblaciones trofoblásticas, como confirmaron los resultados de citometría de CK-7 y vimentina, coincidiendo con los resultados de Nursalim et al. (37), donde definen una mayor eficacia para el aislamiento de estos tipos celulares al compararla con otras enzimas digestivas. Tras la digestión, es muy importante dejar reposar la solución resultante y someterla a distintas etapas de filtrado para generar una suspensión unicelular que permita ser cargada en un gradiente de Percoll. La elección de este gradiente y la selección de los anillos celulares interfásicos de interés se basó en los resultados obtenidos por Colson et al. (36).

Otro de los objetivos que se quería alcanzar era el aislamiento e identificación de células CD56+ en la placenta. En nuestro caso fueron identificadas de distintas zonas de la placenta (parénquima placentario y placa basal). Esta metodología podría emplearse para la identificación de células NCAM1/CD56+ en placentas con inflamación confirmadas previo análisis por qPCR de IL-6 y TNF- α para revelar posibles infiltraciones de células inmunes maternas, como sugieren Schoorlemmer et al. y Oros et al. (3,23). Por tanto, análisis de qPCR para estos marcadores inflamatorios supone un punto crítico en el proceso, y de ahí la importancia de la puesta a punto mediante curvas de calibración. Para ello es necesario un método eficaz y rápido de purificación de RNA. Mediante una doble homogeneización del tejido con esferas de zirconia es posible llevar a cabo un uso eficaz de las columnas Direct-zol RNA Miniprep Kit, lo cual permitiría extraer ARN de la forma esperada.

En un futuro esta metodología será aplicada al estudio de infiltraciones maternas NCAM+ en placentas cuyas gestantes hayan sido infectadas por SARS-CoV-2 durante el embarazo. Otros estudios ya han descrito la presencia de macrófagos, linfocitos T y neutrófilos en sincitiotrofoblastos mediante análisis por inmunohistoquímica para esta infección vírica (38,39), pero no en células NCAM+. Además de esta aplicación, el uso de este protocolo para identificar de forma rápida casos de inflamación y tener una metodología de aislar células de forma individual y confirmar su identidad permitirá realizar análisis de transcriptómica.

7. Conclusiones / Conclusions.

- Duplicar la homogenización de tejido con esferas de zirconia permite un uso eficaz de las columnas de Direct-zol RNA Miniprep Kit.
- Mediante curvas de calibración se han validado los ensayos de qPCR de IL-6 y TNF- α .
- Un método que permite una digestión eficaz de tejido se basa en el uso de la enzima dispasa y el posterior filtrado de la digestión para obtener una suspensión unicelular. Dicha suspensión se puede cargar en un gradiente de Percoll para aislar poblaciones celulares. De este gradiente se pueden rescatar los anillos interfásicos y lavarlos para llevar a cabo un análisis por citometría de flujo.
- Los ensayos de citometría de flujo han revelado que del gradiente de Percoll se pueden rescatar células trofoblásticas y células CD56+.

-
- Duplicate tissue homogenization with zirconia beads allow efficient use of the Direct-zol RNA Miniprep Kit columns.
 - Using standard curves, IL-6 and TNF- α qPCR assays were validated.
 - One method that allows efficient tissue digestion is based on the use of the enzyme dispase and then filtering the digest to obtain a single cell suspension. Such a suspension can be loaded into a Percoll gradient to isolate cell populations. From this gradient the cellular interphase rings can be recovered and washed for flow cytometric assay.
 - Flow cytometry assays have revealed that trophoblast cells and CD56+ cells can be rescued from the Percoll gradient.

8. Bibliografía.

1. Avagliano L, Massa V, Bulfamante GP. Histology of Human Placenta. :15.
2. Knöfler M, Haider S, Saleh L, Pollheimer J, Gamage TKJB, James J. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cell Mol Life Sci.* septiembre de 2019;76(18):3479-96.
3. Schoorlemmer J, Macías-Redondo S, Strunk M, Ramos-Ruíz R, Calvo P, Benito R, et al. Altered DNA methylation in human placenta after (suspected) preterm labor. *Epigenomics.* octubre de 2020;12(20):1769-82.
4. Guttmacher AE, Maddox YT, Spong CY. The Human Placenta Project: Placental structure, development, and function in real time. *Placenta.* mayo de 2014;35(5):303-4.
5. Huppertz B. The anatomy of the normal placenta. *Journal of Clinical Pathology.* 19 de julio de 2008;61(12):1296-302.
6. Burton GJ, Fowden AL. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Phil Trans R Soc B.* 5 de marzo de 2015;370(1663):20140066.
7. Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic Decidualization of the Human Endometrium in Reproductive Health and Failure. *Endocrine Reviews.* 1 de diciembre de 2014;35(6):851-905.
8. Zhang X, Wei H. Role of Decidual Natural Killer Cells in Human Pregnancy and Related Pregnancy Complications. *Front Immunol.* 26 de agosto de 2021;12:728291.
9. Kim CJ, Romero R, Chaemsaihong P, Kim JS. Chronic inflammation of the placenta: definition, classification, pathogenesis, and clinical significance. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* octubre de 2015;213(4):S53-69.
10. Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JCP. Rheological and Physiological Consequences of Conversion of the Maternal Spiral Arteries for Uteroplacental Blood Flow during Human Pregnancy. *Placenta.* junio de 2009;30(6):473-82.
11. Burton GJ, Jauniaux E. What is the placenta? *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* octubre de 2015;213(4):S6.e1-S6.e4.
12. Pastushek J, Nonn O, Gutiérrez-Samudio RN, Murrieta-Coxca JM, Müller J, Sanft J, et al. Molecular characteristics of established trophoblast-derived cell lines. *Placenta.* mayo de 2021;108:122-33.

13. Burton GJ, Skepper JN, Hempstock J, Cindrova T, Jones CJP, Jauniaux E. A Reappraisal of the Contrasting Morphological Appearances of Villous Cytotrophoblast Cells During Early Human Pregnancy; Evidence for Both Apoptosis and Primary Necrosis. *Placenta*. abril de 2003;24(4):297-305.
14. Tashev SA, Parsons D, Hillman C, Harris S, Lofthouse EM, Goggin P, et al. Folding of the syncytiotrophoblast basal plasma membrane increases the surface area available for exchange in human placenta. *Placenta*. enero de 2022;117:57-63.
15. Negishi Y, Takahashi H, Kuwabara Y, Takeshita T. Innate immune cells in reproduction: Innate immunity in reproduction. *J Obstet Gynaecol Res*. noviembre de 2018;44(11):2025-36.
16. Yang F, Zheng Q, Jin L. Dynamic Function and Composition Changes of Immune Cells During Normal and Pathological Pregnancy at the Maternal-Fetal Interface. *Front Immunol*. 18 de octubre de 2019;10:2317.
17. Tong M, Abrahams VM. Immunology of the Placenta. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. marzo de 2020;47(1):49-63.
18. Faas MM, de Vos P. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta*. agosto de 2017;56:44-52.
19. Nancy P, Erlebacher A. T cell behavior at the maternal-fetal interface. *Int J Dev Biol*. 2014;58(2-3-4):189-98.
20. Erlebacher A. Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus. *Nat Rev Immunol*. enero de 2013;13(1):23-33.
21. Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, Korzeniewski SJ, Chaemsaihong P, Gotsch F, et al. Prevalence and Clinical Significance of Sterile Intra-amniotic Inflammation in Patients with Preterm Labor and Intact Membranes. *Am J Reprod Immunol*. noviembre de 2014;72(5):458-74.
22. Young BC, Levine RJ, Karumanchi SA. Pathogenesis of Preeclampsia. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 1 de enero de 2010;5(1):173-92.
23. Oros D, Strunk M, Breton P, Paules C, Benito R, Moreno E, et al. Altered gene expression in human placenta after suspected preterm labour. *Placenta*. julio de 2017;55:21-8.
24. Immune cell - NCAM1 - The Human Protein Atlas [Internet]. [citado 4 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000149294-NCAM1/immune+cell>

25. Basu S, Leahy P, Challier JC, Minium J, Catalano P, Hauguel-de Mouzon S. Molecular phenotype of monocytes at the maternal–fetal interface. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. septiembre de 2011;205(3):265.e1-265.e8.
26. Guenther S, Vrekoussis T, Heublein S, Bayer B, Anz D, Knabl J, et al. Decidual Macrophages Are Significantly Increased in Spontaneous Miscarriages and Over-Express FasL: A Potential Role for Macrophages in Trophoblast Apoptosis. *IJMS*. 20 de julio de 2012;13(7):9069-80.
27. NCAM1 neural cell adhesion molecule 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4684>
28. Immunohistochemical study of immunological markers: HLAG, CD16, CD25, CD56 and CD68 in placenta tissues in recurrent pregnancy loss. *Histology and Histopathology*. 9 de julio de 2014;(29):1047-55.
29. Anton L, Brown AG, Bartolomei MS, Elovitz MA. Differential Methylation of Genes Associated with Cell Adhesion in Preeclamptic Placentas. Oudejans C, editor. *PLoS ONE*. 25 de junio de 2014;9(6):e100148.
30. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in Immunology*. diciembre de 2020;41(12):1100-15.
31. Wang CL, liu YY, Wu CH, Wang CY, Wang CH, Long CY. Impact of COVID-19 on Pregnancy. *Int J Med Sci*. 2021;18(3):763-7.
32. Wastnedge EA, Reynolds RM. Pregnancy and COVID-19. :40.
33. Hapshy V, Aziz D, Kahar P, Khanna D, Johnson KE, Parmar MS. COVID-19 and Pregnancy: Risk, Symptoms, Diagnosis, and Treatment. *SN Compr Clin Med*. julio de 2021;3(7):1477-83.
34. Shanes ED, Mithal LB, Otero S, Azad HA, Miller ES, Goldstein JA. Placental Pathology in COVID-19. *American Journal of Clinical Pathology*. 8 de junio de 2020;154(1):23-32.
35. Naidu SAG, Clemens RA, Pressman P, Zaigham M, Kadkhoda K, Davies KJA, et al. COVID-19 during Pregnancy and Postpartum:: I) Pathobiology of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) at Maternal-Fetal Interface. *Journal of Dietary Supplements*. 2 de enero de 2022;19(1):115-42.

36. Colson A, Depoix C, Hubinont C, Debiève F. Isolation of Primary Cytotrophoblasts From Human Placenta at Term. *BIO-PROTOCOL* [Internet]. 2021 [citado 15 de junio de 2022];11(19). Disponible en: <https://bio-protocol.org/e4185>
37. Nursalim YNS, Groom KM, Blenkiron C, Chamley LW. A simple method to isolate term trophoblasts and maintain them in extended culture. *Placenta*. mayo de 2021;108:1-10.
38. Hosier H, Farhadian SF, Morotti RA, Deshmukh U, Lu-Culligan A, Campbell KH, et al. SARS–CoV-2 infection of the placenta. *Journal of Clinical Investigation*. 17 de agosto de 2020;130(9):4947-53.
39. Facchetti F, Bugatti M, Drera E, Tripodo C, Sartori E, Cancila V, et al. SARS-CoV2 vertical transmission with adverse effects on the newborn revealed through integrated immunohistochemical, electron microscopy and molecular analyses of Placenta. *EBioMedicine*. septiembre de 2020;59:102951.

Anexo I. Tabla de materiales, kits y reactivos comerciales usados.

Nombre	Casa comercial	Referencia
Agua MiliQ	Gibco	15697708
Anti-human CD16	Immunostep S.I.	45CFB-100T
Anticuerpo CD45 CFBlue	Immunostep S.I.	45CFB1-100T
Anticuerpo CD56-FITC	Cytograbs	CYT-56F
AlexaFluor 633	ThermoFisher	A48255
Bomba peristáltica	IsmaTec	MS-CA 2/260 C
Baño Termostatado Precistern	Selecta	508492
Citómetro Beckman Coulter GALIOS	Beckman	A535196
Direct-zol RNA Miniprep Kits	ZymoResearch	R2050
Dispasa	Gibco	1705-041
DNase I from bovine pancreas grade II	Roche	10104159001
dNTP mix	Invitrogen Life Technologies	18418-020
Eppendorf 2 ml	SARSTEDT	72.699
Eppendorf con tapa de rosca 1,5 ml estériles	IBIAN	T150RCS
Etanol 100%	Sigma Aldrich	111727100
Ficoll	STEMCELL™ Technologies	07851
Gasas	Medical Cañada	001-520
HBSS 1X Ca/Mg free Hanks Buffered Salt Solution	PAN Biotech	P04-50500
HBSS 1X Ca/Mg free	PAN Biotech	P04-33010P
Hs00985639_m1 Assay	ThermoFisher Scientific	4331182
Hs01113624_g1	ThermoFisher Scientific	4331182
Incubator Shaker Innova 40	Eppendorf	701128450
Jeringuillas 25G	Medical Cañada	005-1318
Kit IntraCell	Immunostep	ANXVKF-100T
Malla nylon 255 micras	LABOPOLIS	NY-0162
Malla nylon 70 micras	LABOPOLIS	NY-0130
Mini-Beadbeater-24	BioSpec	112011
Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 7 Clone OV-TL	Immunostep S.I.	M7018
Monoclonal Mouse Anti-Vimentin Clone VIm 3B4	Immunostep S.I.	M7020
Nanodrop2000	Thermo Scientific	1139
Oligo d(T)20	Invitrogen Life Technologies	18418-020
PBS 1X	Gibco	J61196.AP
PBS 10X	Gibco	70011-036
Percoll 100%	Healthcare	SE-751-84
Placa múltiple qPCR	Applied Biosystems™	4346907
Premix Ex Taq™	Takara	RR390
RNaseZAP™ Cleaning agent for removing RNase	SIGMA	R2020-250 ML
SuperScript® IV Reverse Transcriptase	Invitrogen Life Technologies	18090010
Termociclador <i>QuantStudio™</i>	ThermoFisher Scientific	A33621
Tubos de centrifugación 15 ml	ThermoFisher Scientific	339651
Tubos de centrifugación 50 ml	SIGMA	SIAL0828
Tripsina 0.25% 1X	Gibco	25050-014
TRIZOL®	Sigma-Aldrich	T9424
Trypan Blue	SIGMA	T81554
Zirconia beads	BioSpec Products	11079110zx