



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Departamento de Química
Biológica

**Estudio de diferencias asociadas al sexo en el perfil
funcional y metabólico de macrófagos placentarios
humanos: Abordaje bioinformático y funcional**

Tesis presentada para optar al título de Licenciado en Ciencias Biológicas

Julio Franco Aguilera

Director:
Dr. Daniel Esteban Paparini

Co-Director:
Dr. Marcelo A. Martí

Laboratorio de Inmunofarmacología
Laboratorio de Bioinformática
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales

Marzo 2025

Índice

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	5
ABREVIATURAS.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
1. Generación de la Interfaz materno-fetal.....	9
1.1 Implantación.....	9
1.2 Placentación.....	11
1.3 Participación de las células inmunes en la interfaz materno-fetal.....	11
1.3.1 Células inmunes maternas.....	12
1.3.2 Célula inmune placentaria.....	13
2. Metabolismo celular.....	15
2.1 Metabolismo de la glucosa.....	16
2.2 Metabolismo de lípidos.....	17
2.3 Metabolismo en macrófagos.....	19
3. Diferencias asociadas al sexo.....	19
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
Muestras de placenta y aislamiento de células Hofbauer.....	23
Análisis bioinformático.....	24
RT-qPCR.....	24
Citometría de flujo y ELISA.....	25
Ensayo de eferocitosis.....	25
Microscopía confocal.....	26
Sondas metabólicas.....	26
Captación de análogo de glucosa.....	27
Detección de especies reactivas de oxígeno totales.....	27
Secreción de lactato.....	27
Captación de ácidos grasos de cadena larga.....	27
Acumulación de gotas lipídicas.....	28
Análisis estadístico.....	28
RESULTADOS.....	29
CAPÍTULO 1.....	30
CAPÍTULO 2.....	35
CAPÍTULO 3.....	40
DISCUSIÓN.....	47
Referencias.....	51

RESUMEN

A lo largo de los años se han informado diferencias en el desarrollo del embarazo y los resultados con respecto al sexo del neonato, como peso y tamaño. El crecimiento fetal está determinado en parte por el sexo del feto. Durante la gestación, los fetos masculinos (MASC) crecen más rápido que los fetos femeninos (FEM), lo que los hace más susceptibles a alteraciones nutricionales maternas y a la exposición a distintos estímulos inflamatorios. Además, los fetos MASC desarrollan con mayor incidencia complicaciones del embarazo con peores resultados a lo largo de sus vidas.

Los macrófagos placentarios, células de Hofbauer (HBC), son la única población de células inmunes fetales dentro del estroma de la placenta sana. Son actores centrales en el mantenimiento de la tolerancia inmune durante el embarazo ya que, fisiológicamente, están activados en un perfil alternativo o M2 y sostienen procesos como la remoción de cuerpos apoptóticos (eferocitosis), angiogénesis y la secreción de mediadores antiinflamatorios. En complicaciones del embarazo asociadas a un ambiente proinflamatorio, los HBC cambian a una activación predominantemente clásica o fenotipo M1 afectando la homeostasis en la interfase materno-placentaria.

El inmunometabolismo  integra el metabolismo celular con las respuestas inmunes y el destino celular. Los macrófagos en el perfil M1, el requerimiento energético proviene preferentemente de la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato.  Los macrófagos con fenotipo M2, la energía se obtiene de la fosforilación oxidativa, la oxidación de ácidos grasos y el metabolismo de aminoácidos.

El objetivo de este proyecto es investigar la influencia del sexo  del neonato en el perfil funcional y metabólico de HBC, aislados de placetas humanas término de embarazos sin complicaciones.

Para abordar este objetivo, se utilizaron dos diseños experimentales. Por un lado, estudios *in silico* en bases de datos públicas. Por otro lado, se realizaron ensayos *ex vivo* donde aislamos vellosidades y macrófagos placentarios de embarazos a término sin complicaciones para evaluar el microambiente inmunológico y el metabolismo asociado a estas células, según el sexo del neonato.

Con técnicas bioinformáticas, pudimos observar  que las vellosidades placentarias a término provenientes de placetas con neonato FEM tenían genes de expresión diferencial asociado  a un microambiente más tolerogénico y un metabolismo dependiente de ácidos grasos frente aquellas provenientes de embarazos con bebés MASC. El microambiente tolerogénico diferencial observado *in silico* fue validado *in vitro* con muestras de explantos de vellosidades, según el

sexo. Por otro lado, con los experimentos *ex vivo* midiendo marcadores antiinflamatorios y eferocitosis, concluimos que los HBC-FEM tenían un perfil de activación alternativo más marcado que los HBC-MASC y estaba acompañando por un metabolismo predominantemente lipídico que no cambiaba frente a un desafío con LPS; los HBC-MASC son más dependiente de la glucosa y frente al LPS incrementan más este metabolismo.

En conjunto, los resultados respaldan que los HBC poseen diferencias en el perfil fenotípico, funcional y metabólico sexo-dependiente. Con este estudio esperamos aportar conocimiento original sobre los mecanismos inmunometabólicos observados en la unidad placentaria, con foco en los HBC, que en el futuro podría contribuir a un seguimiento de medicina personalizada del embarazo con abordajes clínicos según el sexo del feto.

ABSTRACT

“Study of sex-related differences in the functional and metabolic profile of human placental macrophages: Bioinformatics and functional approaches”

Over the years, differences in pregnancy development and outcomes have been reported with respect to the sex of the newborn, such as weight and size. Fetal growth is determined in part by the sex of the fetus. During gestation, male fetuses (MASC) grow faster than female fetuses (FEM), making them more susceptible to maternal nutritional alterations and exposure to different inflammatory stimuli. In addition, MASC fetuses develop pregnancy complications with a higher incidence, with worse outcomes throughout their lives.

Placental macrophages, Hofbauer cells (HBC), are the only population of fetal immune cells within the stroma of the healthy placenta. They are central players in maintaining immune tolerance during pregnancy since, physiologically, they are activated in an alternative or M2 profile and support processes such as the removal of apoptotic bodies (efferocytosis), angiogenesis, and the secretion of anti-inflammatory mediators. In pregnancy complications associated with a proinflammatory environment, HBCs switch to a predominantly classical activation or M1 phenotype affecting homeostasis at the maternal-placental interface.

Immunometabolism integrates cellular metabolism with immune responses and cell fate. In macrophages with the M1 profile, the energy requirement comes preferably from glycolysis and the pentose phosphate pathway. In macrophages with the M2 phenotype, energy is obtained from oxidative phosphorylation, fatty acid oxidation and amino acid metabolism.

The aim of this project is to investigate the influence of the sex of the newborn on the functional and metabolic profile of HBCs, isolated from human placentas at term from uncomplicated pregnancies.

To address this objective, two experimental designs were used. On the one hand, *in silico* studies in public databases. On the other hand, *ex vivo* assays were performed where we isolated placental villi and macrophages from uncomplicated full-term pregnancies to evaluate the immunological microenvironment and the metabolism associated with these cells, according to the sex of the newborn.

Using bioinformatics techniques, we were able to observe that full-term placental villi from placentas with FEM newborns had differential expression genes associated with a more tolerogenic microenvironment and a fatty acid-dependent metabolism compared to those from pregnancies with MASC babies. The differential

tolerogenic microenvironment observed *in silico* was validated *in vitro* with samples of villi explants, according to sex. On the other hand, with *ex vivo* experiments measuring anti-inflammatory markers and efferocytosis, we concluded that HBC-FEM had a more marked alternative activation profile than HBC-MASC and was accompanied by a predominantly lipid metabolism that did not change when challenged with LPS; HBC-MASC are more dependent on glucose and increase this metabolism more when challenged with LPS.

Taken together, the results support that HBCs have sex-dependent differences in phenotypic, functional and metabolic profiles. With this study we hope to provide original knowledge on the immunometabolic mechanisms observed in the placental unit, with a focus on HBCs, which in the future could contribute to personalized pregnancy medicine monitoring with clinical approaches based on the sex of the fetus.

ABREVIATURAS

- 2-DG: 2-deoxy-D-glucosa
2-NBDG: (2-deoxi-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino]-D-glucosa)
AG: Ácidos grasos
CD: Células dendríticas
CFSE: carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster
cTb: Citotrofoblasto primitivo
dMA: Macrófagos deciduales
DEGs: Genes diferencialmente expresados
ETC: Cadena de transporte de electrones
EVT: Células trofoblásticas extravellosas
FAO: β -oxidación de ácidos grasos
FAS: Síntesis de ácidos grasos
FEM: Femenino
FOSFOX: Fosforilación oxidativa
G-6-P: Glucosa-6-P
HBC: Células Hofbauer
HK: Hexoquinasa
LCFAs: Ácidos grasos de cadena larga
LD: gotas lipídicas
LPS: Lipopolisacárido
MASC: Masculino
MCI: Macizo celular interno
PE: Preeclampsia
PPP: Vía de las pentosas fosfato
RCF: Restricción del crecimiento fetal
ROS: Especies reactivas de oxígeno
ROT: Rotenona
RPL: Pérdida recurrente del embarazo
SFB: Suero fetal bovino
sTb: Sinciciotrofoblasto
TCA: Ciclo de ácidos tricarboxílicos
Treg: Linfocitos T CD4 reguladores
uNK: Células Natural Killer uterinas

INTRODUCCIÓN

1. Generación de la Interfaz materno-fetal

En condiciones fisiológicas, para que un embarazo exitoso se produzca, el útero cíclicamente experimenta una serie de transformaciones graduales dependientes de cambios hormonales, metabólicos y de citoquinas tal que pueda generar un ambiente propicio para que ocurra la implantación del blastocisto y el desarrollo de la placentación temprana. En caso de no ocurrir la implantación, la transformación involucionará hasta llegar a un estado basal; en el caso de que si ocurra una correcta implantación, el endometrio continuará con dichas transformaciones, por estímulos dependientes de la placenta en formación. Algunos de estos cambios persisten durante todo el embarazo.

1.1 Implantación

En un ciclo sexual de 28 días, donde el día 1 es el primer día de la menstruación y el 14 el día de la ovulación, se reinicia asociado a la liberación de estrógenos. Estos producen una rápida proliferación de células epiteliales y estromales (fase proliferativa del ciclo menstrual o folicular). En esta, el endometrio funcional progresiona desde el endometrio basal aumentando **en tamaño** las glándulas y las arterias espiraladas en tamaño y cantidad. Posteriormente a la ovulación, cuando los niveles de progesterona comienzan a aumentar, cesa la proliferación y comienza la diferenciación (fase secretoria o lútea). En esta fase el endometrio se prepara para la implantación del blastocisto generando un endometrio funcional bien irrigado y con infiltración leucocitaria. Todo este proceso se inicia en el ciclo menstrual normal y eventualmente termina en forma conjunta con este. Si ocurre la fertilización, los cambios en las células estromales son más marcados y estos llevan a la diferenciación de la **decidua** en distintas capas con funciones más especializadas.

Estos cambios producen que el estroma del endometrio se diferencie a decidua, proceso que involucra varias poblaciones celulares presentes en la mucosa uterina. Luego de la implantación, bajo la influencia de estrógenos, la principal función de la misma sería la de soporte sólido para la nutrición y desarrollo del feto [1].

Luego de la fertilización en las trompas de falopio, el ovocito sufre una serie de divisiones simétricas hasta llegar al estadio de blastocisto. El **blastocisto** es el primer estadio del desarrollo en el que se pueden diferenciar dos tipos celulares: un pequeño cúmulo de células, que en el polo apical forma el macizo celular interno

(MCI) y una monocapa de células epiteliales, continua e impermeable, que rodea y recubre al MCI y al blastocele llamada trofoectodermo [1, p. 199], [2] (Fig.1).

Del MCI deriva el embrión, que crece y comienza a diferenciarse dando origen a los tejidos embrionarios (ectodermo, mesodermo y endodermo), por medio de la activación del genoma embrionario, que luego darán lugar a los tejidos y órganos del feto. De este MCI también derivan algunas estructuras extraembrionarias: el saco vitelino, la lámina coriónica y el cordón umbilical [3], [4]. El trofoectodermo es el epitelio precursor de la placenta y el principal componente del sistema de estructuras extraembrionarias. Cuando el blastocisto llega al útero, las células del trofoectodermo establecen un contacto inicial con el epitelio uterino [5][6]).

La **implantación** es el proceso por el cual el blastocisto invade el endometrio decidualizado, entre los 8-9 días post-fertilización. Este proceso sólo puede ocurrir durante un lapso breve denominado ventana de implantación (a 20 días del inicio de la menstruación [6]), en el cual el útero se encuentra receptivo y en humanos dura aproximadamente de 2 a 4 días. El proceso de implantación marca un evento fundamental para el éxito del embarazo y se lo puede describir en tres estadios. Un primer paso inicial donde el blastocisto se adhiere inestablemente al epitelio del endometrio (aposición). Luego, el trofoectodermo se adhiere establemente al epitelio del endometrio por medio de interacciones complejas entre moléculas de adhesión [7]. Tras la adhesión, viene la invasión donde el sinciciotrofoblasto penetra la capa endometrial por secreción de factores que degradan la matriz extracelular del mismo [7], [8].

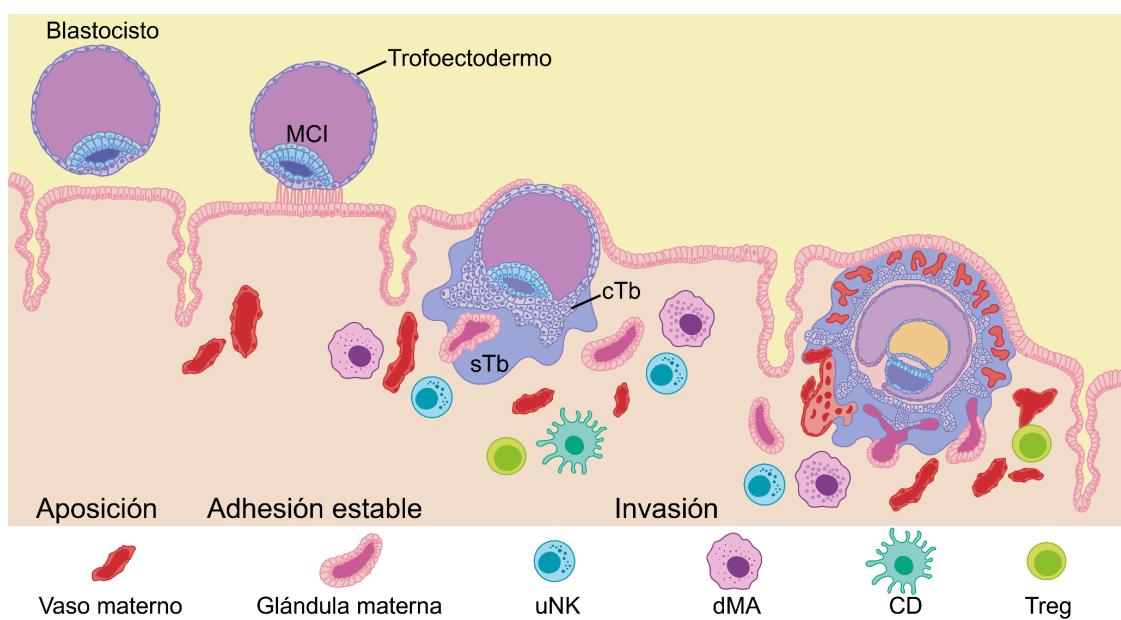


Fig. 1: Tres etapas de la implantación del blastocisto: aposición, adhesión estable e invasión. MCI (macizo celular interno), sinciciotrofoblasto

primitivo (cTb), uNK (células *Natural Killer* uterinas), macrófagos deciduales (dMA), células dendríticas (CD) y linfocitos T CD4 reguladores (Treg).

1.2 Placentación

Una vez que el trofoectodermo del blastocisto entra en contacto con el epitelio endometrial, este constituye el trofoblasto que se diferencia en dos capas una más externa llamada **sinciciotrofoblasto** y una capa interna mononuclear conocida como **citotrofoblástica primitiva**. Con el pasar de los días el citotrofoblasto se diferencia siguiendo dos caminos: citotrofoblasto veloso, cubre la placenta definitiva por debajo del sinciciotrofoblasto y participa en funciones de oxigenación y transporte de nutrientes [1,9]. Por el contrario, el citotrofoblasto extraveloso penetra a través del sinciciotrofoblasto y las células se ubican en las extremidades de las vellosidades de anclaje, estableciendo contacto con la decidua y formando columnas celulares. Las células del citotrofoblasto veloso quedan en contacto con la membrana basal y continúan proliferando, mientras que las que pierden el contacto, sufren una transición similar a la epitelio mesenquimática en el cual pierden la capacidad proliferativa y adquieren un fenotipo invasivo. Estas últimas, conocidas como células trofoblásticas extravellosas (EVT), tienen la capacidad de remodelar las arterias uterinas para garantizar un flujo sanguíneo adecuado al espacio interveloso, donde se llevará a cabo el intercambio materno-fetal y, a su vez, modulan la función de otras células presentes para favorecer al desarrollo de la interfaz materno-placentaria. Estos fenómenos son esenciales para establecer un ambiente adecuado para el desarrollo del embrión y la formación de la placenta. La **placenta** es un órgano transitorio que tiene la capacidad de regular el desarrollo intrauterino. Proporciona nutrientes, oxígeno y elimina desechos metabólicos y produce o metaboliza hormonas necesarias tanto para el feto como para la madre [9]. Además tiene funciones inmunológicas como barrera de protección frente a patógenos y como órgano inmunológico para el mantenimiento de la homeostasis al modular los perfiles funcionales de los leucocitos presentes en la decidua [10], [11].

1.3 Participación de las células inmunes en la interfaz materno-fetal

El proceso invasivo de las células trofoblásticas desencadena una compleja interacción con el sistema inmune materno, que en circunstancias normales no afecta a las células embrionarias debido a un equilibrio entre respuestas proinflamatorias y antiinflamatorias cuidadosamente reguladas [12].

1.3.1 Células inmunes maternas

El resultado de estas interacciones, es el establecimiento de un microambiente inmunológico controlado en cada una de sus tres fases inmunológicas donde la abundancia de las células inmunes cambia durante las distintas fases [13]. La **etapa temprana** se caracteriza por un perfil proinflamatorio donde el blastocisto se implanta en el útero, dañando el endometrio y reemplazando el endotelio y músculo liso de la vasculatura materna para asegurarse un adecuado suministro de sangre, si bien hay presencia de numerosas células inmunes en esta etapa, las células natural killer uterinas (uNK) cobran un rol protagónico en este proceso, representan la célula inmune más abundante presente solo en esta etapa y promueven la remodelación vascular [14]. La siguiente población abundante que se mantiene constante a lo largo de todo el embarazo son los macrófagos deciduales (dMA) que mantienen su proporción presente en la decidua por el reclutamiento de monocitos circulantes y se diferencian a macrófago bajo el microambiente presente regulado por las células trofoblásticas. Los dMA a pesar de estar en un ambiente predominantemente proinflamatorio, en condiciones fisiológicas, mantienen su perfil de activación alternativo (M2) en el cual se encargan de procesos de remoción de células apoptóticas en un endometrio en transformación y el mantenimiento de la homeostasis tisular [15], [16].

La **etapa media del embarazo**, se caracteriza por la inducción de un estado antiinflamatorio que controla las interacciones inmunes y endocrinas para favorecer el crecimiento y desarrollo fetal [17].

Durante la **etapa tardía**, el feto ya ha concluido su desarrollo y es necesario que ocurra el parto, generando nuevamente una respuesta inflamatoria que promueva la contracción del útero y la expulsión del neonato y de la placenta [17], [18].

Si bien hay otras células inmunes presentes en la interfaz materno-placentaria, que no ahondaremos en este trabajo, necesitamos destacar el rol de las células dendríticas (CD) que representan alrededor de un 2% de las células inmunes presentes en la interfaz temprana y tienen un perfil ESI-tolerogénico. Las CD, si bien son necesarias para una correcta decidualización estromal y remodelación vascular [19], [20], cumplen un rol como células presentadoras de antígeno profesionales y poseen una cualidad única: activar linfocitos T naïve y poner en marcha la respuesta inmune adaptativa. En particular, generan la diferenciación de linfocitos T CD4 naïve a T reguladoras. Estos últimos, cumplen un papel central como inmunoreguladoras y con un efecto tolerogénico al inhibir la proliferación y producción de citoquinas por células T CD4+ y CD8+, y la actividad citotóxica de las células NK [21], [22]. Si bien se distinguen subpoblaciones

de células T CD4 reguladoras según el fenotipo, tejidos de origen, citoquinas que secretan y mecanismos de acción, exceden los contenidos de este trabajo.

En complicaciones del embarazo con etiología inflamatoria, como preeclampsia (PE) y restricción del crecimiento fetal (RCF), las EVT no adquieren el fenotipo invasivo normal y como consecuencia la remodelación de las arterias espiraladas es incompleta, resultando en deficiencias en la placentación. Las arterias espiraladas tienden a desarrollar aterosis e hiperplasia intimal [23]. En PE y RCF se ha visto uNK, monocitos y dMA presentes en distinta proporción y expresan marcadores fenotípicos proinflamatorios [14], [24], [25], [26] favoreciendo el desarrollo de estos síndromes en etapas tardías de la gestación con alta tasa de mortalidad y morbilidad [26], [27], [28].

1.3.2 Célula inmune placentaria

En el lado placentario, las vellosidades coriónicas inmaduras (primer trimestre) se forman y permanecen inmaduras hasta las últimas etapas de este trimestre. Las vellosidades inmaduras están cubiertas por la capa de sincitiotrofoblasto, con una capa contigua de citotrofoblastos debajo de esta capa. El estroma de las vellosidades en el primer trimestre contiene vasos fetales, que comienzan a formarse alrededor de las seis a ocho semanas de gestación y alrededor de ellos se encuentra la única población de células inmunes fetal dentro del estroma de la placenta sana, los macrófagos placentarios o Hofbauers (HBC) [29], [30], [31]. La microvasculatura materna sufre una remodelación extensa durante el primer trimestre, y la placenta pasa a ser hemocorial al final de esta etapa de la gestación. En el segundo y tercer trimestre (derecha de figura), las vellosidades coriónicas maduran y permanecen cubiertas por el sincitiotrofoblasto. Sin embargo, a diferencia de las vellosidades inmaduras del primer trimestre, la capa de citotrofoblasto se vuelve discontinua en las últimas etapas de la gestación. En esta etapa, la microvasculatura fetal está completamente desarrollada y el estroma veloso se enriquece en HBC. El intercambio de gases y nutrientes se da a través de las capilaridades fetales que se encuentran en la vellosidad coriónica flotante [32]

Los **macrófagos placentarios**, tienen apariencia larga (10-30 μm), pleomórficas y muy vacuoladas. Son detectadas desde el día 18 post-concepción hasta el término de la gestación. Si bien la ontogenia de estas células sigue en discusión, se cree que derivan de células madre velosas al principio del embarazo y, por lo tanto, pueden verse como las primeras células inmunes "fetales". Son transcripcional y cromosómicamente similares a los macrófagos del saco vitelino [33], [34]. Son actores centrales en el mantenimiento de la tolerancia inmune durante el embarazo [29], [30], [35], [36].

Los HBC están vagamente descritos debido a su heterogeneidad. Fisiológicamente, los HBC generalmente se activan en un perfil alternativo o M2 y sostienen la reparación tisular, la remodelación, la remoción de cuerpos apoptóticos (eferocitosis), la angiogénesis y la tolerancia inmunológica a través de una secreción masiva de mediadores antiinflamatorios [29], [36], [37], [37]. A pesar de su fenotipo M2, los HBC tienen la capacidad de fagocitar y eliminar patógenos que puedan infectar la placenta.

En complicaciones del embarazo como PE y RCF, el número de HBC y la expresión de moléculas antiinflamatorias, como DC-SIGN (CD209) e IL-10, se reducen significativamente en pacientes con PE grave [27], [28]. Se ha sugerido que la reducción de los HBC en PE puede estar promoviendo el daño inflamatorio debido a que éstos promueven la tolerancia.

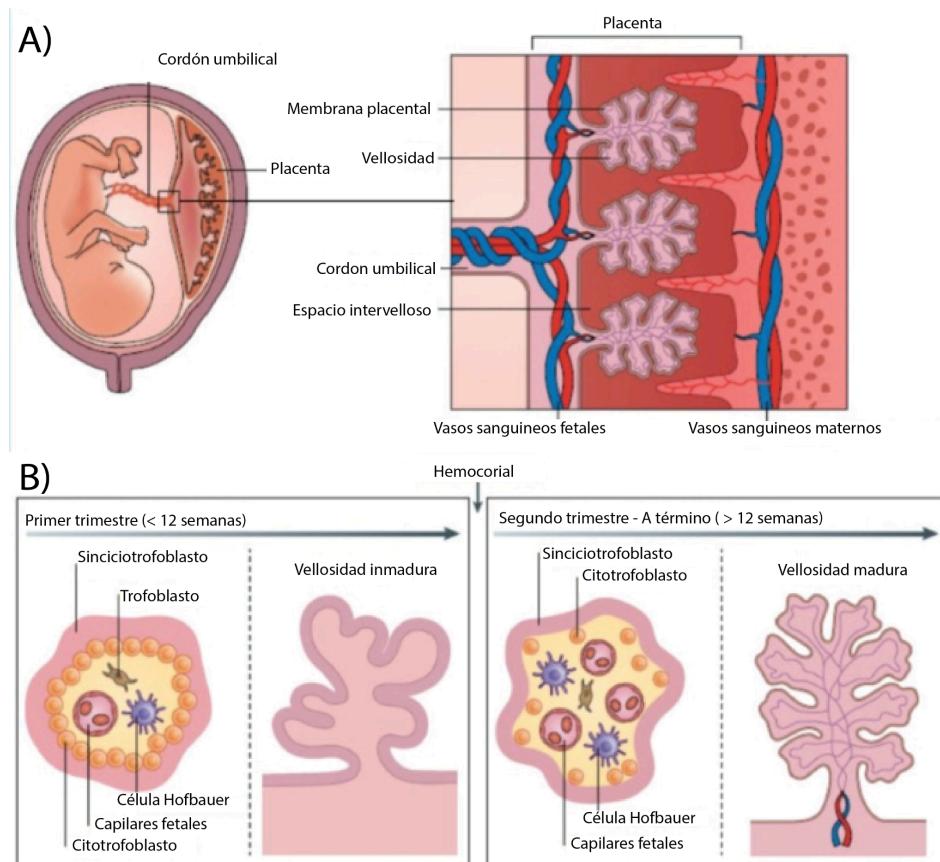


Fig. 2: Estructura y composición celular de la interfaz materno-fetal. A) Dibujo donde se describen las estructuras placentarias de la interfaz materno-fetal, una vez concluida la placentación (12-16 semanas de gestación). Las vellosidades coriónicas están incluidas en la decidua materna. B) La parte izquierda ilustra una vellosidad coriónica inmadura (<12 semanas) donde están cubiertas por la capa de sincitiotrofoblasto, con una capa contigua de citotrofoblastos debajo de esta capa y ya se observan macrófagos placentarios, fibroblastos y capilares fetales (a partir de las seis a ocho semanas de gestación). La parte derecha muestra una vellosidad coriónica madura donde ya se estableció la nutrición hemocorial. Las vellosidades permanecen cubiertas por el

sincitiotrofoblasto pero con una capa de citotrofoblasto discontinua. En esta etapa, la microvasculatura fetal está completamente desarrollada y el estroma veloso se enriquece en células de Hofbauer. Ilustración modificada de Thomas J. et al. J Ex Med 2020.

2. Metabolismo celular

Hace ya más de dos décadas que se originó un concepto conocido como immunometabolismo. Este asocia la reprogramación del metabolismo celular, dependiente del estímulo y microambiente, con la adquisición de un determinado fenotipo en las diferentes poblaciones inmunes presentes y permite comprender mejor su función y destino celular [38], [39], [40].

Para la incorporación de distintos nutrientes y su utilización por parte de la célula, estas necesitan reunir ciertos requisitos. La disponibilidad de los mismos; la capacidad de incorporarlos según la cantidad, distribución y actividad de los transportadores específicos; y por último expresar las enzimas necesarias para que dichos nutrientes sean convertidos en energía u otros metabolitos que activen vías de señalización asociadas a la función de la célula [41], [42], [43]

2.1 Metabolismo de la glucosa

La **glucosa** es la principal fuente de energía celular. Se metaboliza para obtener energía o se almacena en glucógeno para su posterior utilización. Para su metabolización, el monosacárido es transportado principalmente mediante difusión facilitada por proteínas transportadoras específicas conocidas como GLUTs. Una vez que la glucosa ingresa a la célula, es fosforilada en el carbono 6 por la enzima hexoquinasa (HK) dando glucosa-6-P (G-6-P) que puede tener distintos destinos posibles según el requerimiento celular. La G-6-P puede ser metabolizada por la vía de las pentosas fosfato (PPP) (Fig. 3), siendo la fuente exclusiva de regeneración de NADPH requerida para la reducción de glutatión que funciona como principal amortiguador de especies reactivas de oxígeno (ROS) [44]. Por otro lado, la G-6-P puede ser metabolizada a Fructosa-6-P y continuar la oxidación vía glucólisis hasta dar lactato, con la formación de 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa (Fig. 3) [38], [39], [40]. En presencia de oxígeno la glucosa puede ser metabolizada a piruvato y transportado a la mitocondria. Allí, el piruvato continúa su oxidación en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), mientras que, en situaciones de hipoxia, el piruvato es metabolizado por la enzima LDH a lactato dando 2 moléculas de ATP como se menciona anteriormente (Fig. 3). Sin embargo, aún en presencia de oxígeno -aunque sus niveles son menores en el microambiente implantatorio-, las células trofoblásticas y los macrófagos pueden producir altas cantidades de lactato, proceso denominado glucólisis aeróbica (efecto Warburg) [38], [39], [40].

El piruvato puede ser metabolizado a lactato o importado a la mitocondria, convertido a Acetyl-CoA y oxalacetato que ingresa en el TCA proveyendo intermediarios para la generación de ATP por fosforilación oxidativa (FOSFOX) a través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (ETC). El TCA no solo metaboliza Acetyl-CoA proveniente de la glucólisis, sino que la metabolización de otros nutrientes, ácidos grasos y aminoácidos, también genera intermediarios que son oxidados en el TCA [45], [46]

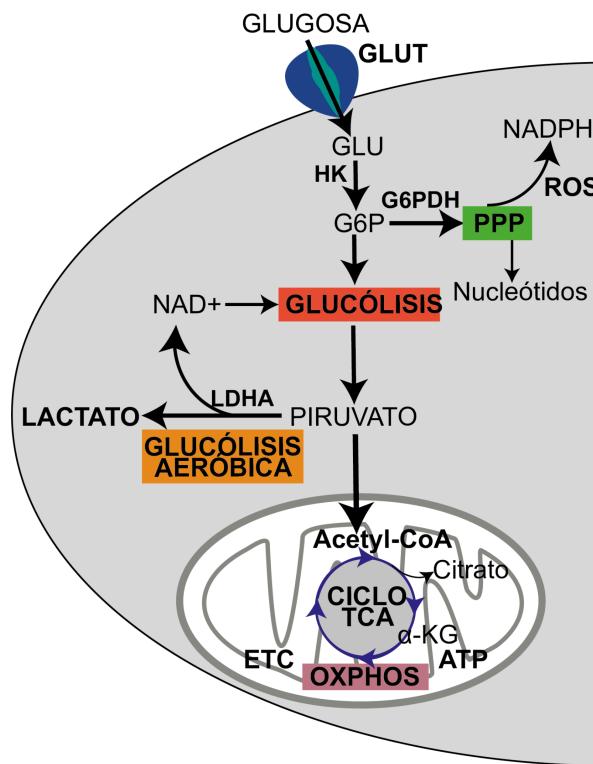


Fig. 3: Esquema simplificado del metabolismo de la glucosa. Abreviaturas: Glucosa (GLU), hexokinasa (HK), glucosa-6-fosfato (G6P), G6P dehydrogenasa (G6PDH), vía de las pentosas fosfato (PPP), especies reactivas del oxígeno (ROS), Lactato deshidrogenasa A (LDHA), ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), cadena de transporte de electrones (ETC), fosforilación oxidativa (OXPHOS).

2.2 Metabolismo de lípidos

Los **ácidos grasos (AG)** también constituyen una fuente de energía y aportan más energía que la glucosa. Para su utilización, por un lado, ácidos grasos libres de cadena larga (LCFAs) provenientes de otras células liberados en forma no esterificada, pueden ser incorporados por transportadores específicos, uno de ellos es el receptor scavenger CD36. Este transportador de membrana puede internalizar no solo ácidos grasos, sino que también colágeno, trombospondina y fosfolípidos aniónicos, entre otros [47]. Por otro lado, los AG libres pueden obtenerse luego de

que los triglicéridos sean clivados por lipasas generando las formas no esterificadas [34, 35]. Los AG se activan con coenzima A (CoA), se transportan a la matriz mitocondrial mediante la carnitina y sufren una serie de oxidaciones seriadas, proveyendo Acetil-CoA al TCA a través de la **β -oxidación de ácidos grasos (FAO)**. Los LCFAs son también precursores para fosfolípidos de membrana, pueden operar como señalizadores celulares activando receptores como PPAR- γ y también pueden ser almacenados en forma esterificada en gotas lipídicas (LD) citoplasmáticas (Fig. 4).

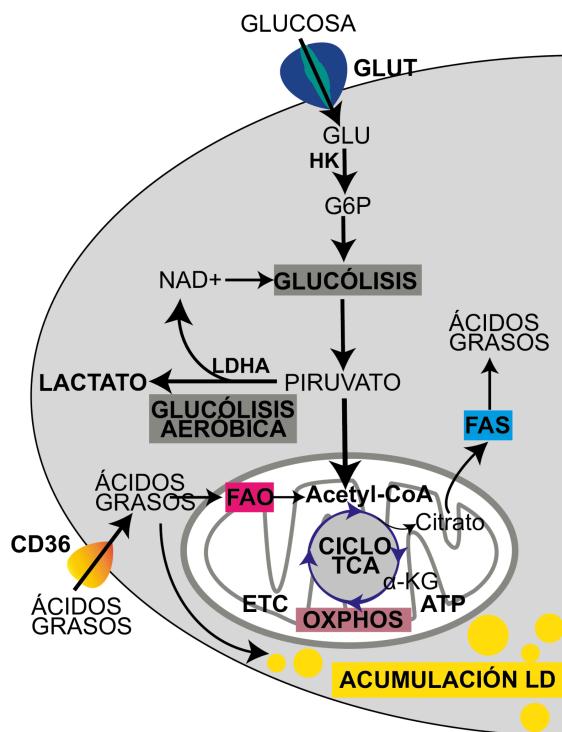


Fig. 4: Esquema simplificado del metabolismo de los ácidos grasos.

Abreviaturas: Glucosa (GLU), hexokinasa (HK), glucosa-6-fosfato (G6P), G6P dehydrogenasa (G6PDH), Lactato deshidrogenasa A (LDHA), ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), cadena de transporte de electrones (ETC), fosforilación oxidativa (OXPHOS), oxidación de ácidos grasos (FAO), síntesis de ácidos grasos (FAS).

Además de la obtención de ATP a través de la activación de la vía glucolítica en el citoplasma, tanto la glucólisis, como la generación de los diferentes intermediarios del TCA a partir del piruvato, aminoácidos o ácidos grasos, resultan en la formación de intermediarios NADH y FADH₂ que donan sus electrones en la ETC para la obtención de energía por fosforilación oxidativa.

Los metabolitos intermediarios del TCA también funcionan como precursores biosintéticos, cuando un exceso de citrato es exportado hacia el citosol, puede ser metabolizado a Acetil-CoA y participar de la síntesis de ácidos grasos (FAS). A su vez, metabolitos como citrato, intermediarios del glutamato, prolina y la vitamina D

han cobrado atención como posibles marcadores en complicaciones como PE y RCF [48], ya que pueden tener otras funciones como señalizadores celulares [44], [49].

2.3 Metabolismo en macrófagos

Los macrófagos tienen enormes demandas metabólicas; cuando se activan en un fenotipo M1, el requerimiento energético proviene preferentemente de la glucólisis y PPP; los estímulos proinflamatorios como LPS pueden aumentar aún más el metabolismo glucolítico e inducir interrupciones del TCA favoreciendo la activación de las vías de señalización inflamatorias a través de la acumulación de diferentes intermediarios [41], [42], [43].

Por otro lado, en los macrófagos con un fenotipo M2 el TCA intacto sostiene mayoritariamente la producción de ATP y la oxidación de ácidos grasos promueve el perfil antiinflamatorio de estas células inhibiendo vías de señalización proinflamatorias. [30], [31], [42], [43].

Más aún, el metabolismo de los macrófagos en reproducción es un campo muy poco explorado. Se ha visto que el ácido láctico se encuentra aumentado en pacientes con pérdida recurrente del embarazo (RPL) y este puede alterar la polarización de los dMA a través de la fosforilación oxidativa, perdiendo parte de su rol tolerogénico como la eferocitosis [20], [52]. Recientemente, nuestro grupo reportó que el embarazo altera el metabolismo y la función de los monocitos. Se detectó una mayor dependencia de la glucosa asociada a una mayor eferocitosis en monocitos de mujeres embarazadas en estado de reposo, en comparación con los controles no embarazadas sugiriendo que la reprogramación neurometabólica de monocitos no es estrictamente binaria asociada a fenotipos clásicos, intermedios o no clásicos. Además, los monocitos de mujeres gestantes no modulan su metabolismo cuando son desafiados con un estímulo clásico proinflamatorio como el LPS, como sí lo hicieron los monocitos de mujeres no gestantes. El perfil metabólico de los monocitos en esta etapa del embarazo fue comparable con aquellos monocitos humanos tratados *in vitro* con medios condicionados de células trofoblásticas humanas de primer trimestre [53]. Hasta el momento, no había ninguna evidencia sobre el metabolismo de los HBC humanos, excepto algunas alusiones a procesos involucrados. En un trabajo se demostró que los HBC aislados de placenta a término de origen fetal femenino estimulados con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) bacteriano (LPS) o virales (poly I:C), montaban una respuesta inmunológica más fuerte y amplia que los HBC provenientes de placenta de neonatos masculinos. A su vez, al estudiar la proteómica de los HBC de placenta masculina se observó un mayor número de proteínas relacionadas con el metabolismo del colesterol (esteroides) y la biosíntesis

de alcoholes, mientras que en los HBC de placentas femeninas se detectó un incremento de proteínas relacionada al citoesqueleto [43].

3. Diferencias asociadas al sexo

El dimorfismo sexual en la respuesta inmune ha sido ampliamente documentado en humanos, evidenciando diferencias significativas en la manera en que hombres y mujeres responden a antígenos externos e internos. [54].

En general, las mujeres presentan menores tasas de infección por diversos patógenos bacterianos, virales y parásitarios en comparación con los hombres. Sin embargo, esta mayor reactividad inmune también se asocia con una mayor incidencia de enfermedades autoinmunes en mujeres. [33], [55] Estos hallazgos sugieren que el sistema inmunológico femenino exhibe una mayor reactogenicidad tanto frente a patrones moleculares propios como ajenos.

Diferentes factores han sido identificados como responsables de esta disparidad en la respuesta inmune entre sexos, incluyendo factores genéticos y mediadores hormonales, los cuales contribuyen de manera independiente al dimorfismo en la respuesta inmune innata. Por ejemplo, varios genes que codifican moléculas del sistema inmune innato se encuentran en el cromosoma X. Además, se ha reportado que los estrógenos y/o la testosterona modulan la diferenciación, maduración, vida media y funciones efectoras de diversas células inmunitarias innatas, como neutrófilos, macrófagos, NK y células dendríticas. [54]

Las diferencias sexuales en las respuestas inmunológicas desempeñan un papel crucial en los resultados de la salud en general y, también del embarazo. Los fetos masculinos priorizan el crecimiento sobre la adaptabilidad, lo que los hace más vulnerables a resultados adversos [56], [57]. Mientras que los fetos femeninos exhiben una respuesta inmune más reguladora, los fetos masculinos presentan una respuesta inflamatoria más intensa [57]. Estas diferencias afectan tanto la inmunidad innata como la adaptativa, influyendo en la señalización de citocinas, la biología de las células T y la producción de anticuerpos [57], [58].

En este contexto, se ha sugerido que el sexo fetal masculino es un factor de riesgo independiente para resultados adversos en el embarazo, con una mayor morbilidad y mortalidad perinatal en comparación con los fetos femeninos [59]. Frente a una misma complicación en el embarazo como PE y RCF, el impacto sobre los fetos masculinos es más severo y con mayor probabilidad de desarrollar afecciones a lo largo de su vida postnatal relacionadas al sistema nervioso y cardíaco [56], [60], [61]. Las mujeres que gestan fetos masculinos parecen tener un mayor riesgo de desarrollar patologías como hipertensión inducida por el embarazo, parto prematuro espontáneo e incluso diabetes gestacional. [62]. Además, en ciertos

casos, se ha observado que la preeclampsia complicada con parto prematuro es más prevalente en embarazos de fetos femeninos. [63], [64].

Dado que muchas de estas diferencias biológicas comienzan desde la vida intrauterina, la contribución del sexo biológico al "origen del desarrollo de la salud y la enfermedad" está siendo cada vez más reconocida. Comprender los mecanismos subyacentes a este dimorfismo en la respuesta inmune y su impacto en la salud materno-fetal es fundamental para desarrollar estrategias de prevención y tratamiento más eficaces para ambos sexos.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

HIPÓTESIS DE TRABAJO: Los macrófagos placentarios (HBC) humanos tienen un perfil fenotípico, funcional y metabólico diferente según el sexo del bebé. Estas características sexo-dependiente promueven la susceptibilidad diferencial frente a la exposición a distintos estímulos inflamatorios en el embarazo.

Para abordar esta hipótesis nos proponemos los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Estudiar el perfil de activación y el metabolismo de los macrófagos placentarios (HBC) aislados de placenta humanas a término, según el sexo del neonato.

Objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Estudiar el microambiente inmunológico y metabólico de la vellosidad placentaria a término según el sexo del neonato.

- a) Estudio bioinformático del microambiente inmunológico y metabólico en bases de datos públicas de vellosidades aisladas a término y diferenciadas por sexo del bebé.
- b) Validación *in vitro* del microambiente inmunológico usando muestras de vellosidades humanas a término segregadas por el sexo del neonato.

Objetivo específico 2: Estudiar diferencias asociadas al sexo en el perfil fenotípico y funcional de macrófagos placentarios humanos a término.

- a) Analizar la producción de citoquinas pro/antiinflamatorias en HBC según el sexo del neonato.
- b) Evaluar la posible asociación del sexo con la capacidad de remover cuerpos apoptóticos por los HBC.

Objetivo específico 3: Investigar la dependencia del metabolismo **glugolítico y lipídico en los HBC según el sexo.**

- a) Investigar mediadores asociados al metabolismo glucolítico en los HBC, según el sexo.
- b) Investigar mediadores asociados al metabolismo lipídico en los HBC, según el sexo.
- c) Evaluar la dependencia de estas vías metabólicas en el proceso de eferocitosis.
- d) Estudiar si la dependencia metabólica puede ser reprogramada por un estímulo proinflamatorio como el LPS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de placenta y aislamiento de células Hofbauer

Se recolectaron placas a término ($N = 31$, 16 de placas masculinas y 15 de femeninas según el sexo del recién nacido único) con una edad gestacional de $39,1 \pm 0,6$ ESanas de mujeres sometidas a cesáreas programadas. Las participantes tenían entre 26 y 41 años ($34,5 \pm 0,7$) y presentaban un IMC normal ($23,6 \pm 0,6$). Tenían serología negativa para VIH, HBCV, enfermedad de Chagas y sífilis, y no registraban antecedentes de enfermedades gestacionales ni más de una pérdida de embarazo. Se excluyeron muestras de mujeres con complicaciones graves durante el embarazo, como infecciones que comprometieron la gestación o muerte fetal. También se excluyeron neonatos con malformaciones orgánicas conocidas o trastornos congénitos. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Italiano de Buenos Aires (HIBA 1681). Todas las participantes firmaron un consentimiento informado antes de ser incorporadas al protocolo.

Se separó la velloSIDAD placentaria inmediatamente contigua a la decidua basal. Se aisló siguiendo un protocolo estándar utilizado en el laboratorio descrito en trabajos previos [65], [66]. Por un lado, se extrajeron explantes pequeños de velloSIDADES, de alrededor de $5 \times 5 \times 1$ mm, se lavaron con PBS frío y se cultivaron en placas de poliestireno de 24 pocillos en 500 μl de DMEM: F12 completo, con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de penicilina/100 U/ml de estreptomicina (Life Technologies, Buenos Aires, Argentina) durante 20 h. Los explantes se recolectaron para ensayos de ARN en TRIzol y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Para el aislamiento de células Hofbauer, se lavaron a fondo 20-40 g de velloSIDADES con PBS para minimizar la presencia de células maternas. Posteriormente, se digirieron con colagenasa IV (1 mg/ml), ADNasa I (0,1 mg/ml) y Tripsina-EDTA (0,25 %, Gibco) durante 45 min. La digestión enzimática se detuvo añadiendo SFB al 10 % y se continuó con centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque, como se informó previamente [67], [68]. Para enriquecer la muestra en macrófagos placentarios, se realizó un paso adicional de adherencia o aislamiento positivo con un kit de selección celular CD14 con perlas magnéticas acopladas a anticuerpos (Miltenyi), logrando un 95 % de pureza (90–99 %). La posible activación de las células Hofbauer (HBC) durante la purificación por selección positiva de CD14 parece insignificante, ya que las células respondieron a diferentes estímulos con la variabilidad leve esperada según el sexo.

Análisis bioinformático

Se eligió el experimento GSE247382 de RNAseq disponible en la base de datos “Gene Expression Omnibus” (GEO), el cual fue llevado a cabo por la plataforma Illumina NovaSeq 6000. Se seleccionaron las muestras disponibles del archivo de conteos crudos, categorizando a aquellas que tuviesen la etiqueta “PL” como muestras de tercer trimestre, obteniendo un total de 42 muestras. El sexo de las mismas fue especificado por los investigadores.

Una vez descargada la matriz, se procedió a colapsar la misma para obtener los nombres de los genes en formato *symbol* y eliminar posibles duplicados con el uso del programa Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Luego, se filtraron todas las muestras del primer trimestre y aquellos genes que hubieran tenido un conteo de diez o menos en todas las muestras del tercer trimestre. Posteriormente se realizó la normalización de esta matriz, mediante el método de la mediana de *ratios*, y el análisis de expresión diferencial con el paquete “DESeq2” del lenguaje de programación R. Se utilizó un corte de p valor ajustado de 0.05.

Los controles de calidad incluyen MApplots y “Rejections Curves” para asegurar que las mediciones del RNAseq tienen distribuciones similares. Posterior a estos controles se obtuvieron los DEG y se graficó un volcano plot con el fin de observar los genes más significativos con respecto al resto. Adicionalmente, se realizó un análisis de enriquecimiento de genes con el paquete “gseapy” del lenguaje de programación Python, con el objetivo de determinar las vías significativamente enriquecidas en este experimento. Para ello, se utilizó una matriz que contenía la expresión normalizada de los genes en las muestras femeninas y masculinas del tercer trimestre.

Por último, se generó una red de relaciones funcionales entre genes diferencialmente expresados y procesos biológicos asociados a las vías enriquecidas con el programa “Gephi”.

RT-qPCR

La expresión génica en vellosidades de citoquinas [Interleucina (IL) -1 β , -6, -10; Indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) 1, Factor transformante de crecimiento (TGF-) β 1, Factor de necrosis tumoral (TNF) - α], receptor toll-like 4 (TLR4), prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (PTGS2) se determinó mediante RT-qPCR.

El ARN total se aisló siguiendo las recomendaciones del fabricante con el reactivo Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), y se generaron ADNc a partir de 1 μ g de ARN utilizando transcriptasa reversa MMLV, inhibidor de ARNasa RNAsin y un kit de oligodT (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Las muestras se almacenaron a -20 °C para análisis por lotes.

Se utilizó la mezcla maestra de RT-qPCR (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina) según las recomendaciones del fabricante. La PCR en tiempo real se

realizó en un sistema Bio-Rad iQ5. Los niveles relativos de expresión génica se determinaron utilizando el método de ciclo umbral (CT) (método 2^Δ-ΔCT) con referencia a dos genes constitutivos que no mostraron influencia por sexo, la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la beta-2 microglobulina (B2-M). Las secuencias de los cebadores se describen en la Tabla 1.

Genes	Primer Forward	Primer reverse	Tm (°C)
B2-M	5' AAGCAGCATCATGGAGGTTG 3'	5' GAGCTACCTGTGGAGCAACC 3'	58
GAPDH	5' ATCACCATCTTCCAGGAGCGA 3'	5' GGTCACACCCATGACGAAC 3'	60
IDO-1	5' AGGCCCTGATTATGAGAACAT 3'	5' TTTCCAACAGCGCCTTAGC 3'	60
IL-1 β	5' GGATATGGAGCAACAAGTGGTGT 3'	5' CACGCAGGACAGGTACAGATT 3'	60
IL-6	5' TTCGGTACATCCTCGAGGC 3'	5' TCACCAGGCAAGTCTCCTA 3'	60
IL-10	5' CATCAAGGCGCATGTGAAC 3'	5' CACAGGGAAGAAATCGATGACAG 3'	60
PTGS2	5' TGGATGCTTCGTTAATTGTTTC 3'	5' ACCCACAGTGCTTGACAC 3'	60
TGF- β 1	5' GGACACCAACTATTGCTTCAG 3'	5' CCAGGCTCCAATGTAGGG 3'	56
TNF- α	5' GCCTCTCTCCTCCTGATCG 3'	5' CAGCTTGAGGGTTTGCTACA 3'	60
TRL4	5' ATCCCCTGAGGCATTAGGC 3'	5' TTGTCTGGATTCACACCTGG 3'	58

Tabla 1: Secuencia de primers con su temperatura de melting

Citometría de flujo y ELISA

Se cultivaron 4×10^5 HBC sin o con 100 nM de lipopolisacárido (LPS), en medio RPMI-160 (RPMI) con 2 % de SFB. Después de 20 h, las células se recuperaron con tripsina-EDTA (0,25 %, Gibco) para la marcación por citometría de flujo de moléculas de superficie. Los sobrenadantes (SN) se recolectaron y preservaron para la medición de factores solubles secretados.

Citoquinas por citometría de flujo:

Se usaron anticuerpos monoclonales conjugados con Fluoresceína Isotiocianato (FITC), Ficoeritrina (PE), Ficoeritrina-Cianina7 (PECy7) o Alocianina (APC) dirigidos a:

- CD14 (BioLegend, Cat. No. 325617, RRID: AB_830690)
- CD36/FAT (BD Biosciences, Cat. No. 555454, RRID: AB_2291112)

- CD39/ENTPD1 (BioLegend, Cat. No. 328205, RRID: AB_940423)
- CD163/SCARI1 (BioLegend, Cat. No. 333605, RRID: AB_1134005)
- CD206/MRC1 (BD Pharmingen, San Diego, Cat. No. 17-2099-42, RRID: AB_11039758).
- CD209/DC-SIGN (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA. Cat. No. 17-2099-42, RRID:AB_11039758)

Todos los reactivos se obtuvieron de Thermo Fisher Scientific. Se adquirieron 50.000 eventos en un citómetro FACS Aria II® (Becton Dickinson) y los resultados se analizaron usando FlowJo.

ELISA:

Se determinaron los niveles de IL-1 β e IL-10 en el sobrenadante de HBC en ausencia o presencia de LPS usando un kit comercial (BD Biosciences), siguiendo las recomendaciones del fabricante y como se describió en trabajos previos [35]. La densidad óptica se leyó a 450 nm mediante un lector de ELISA (Lab systems Multiskan MS) y los resultados se expresaron en pg/ml o ng/ml.

Ensayo de eferocitosis

Se procesaron muestras de sangre de mujeres embarazadas a término (N= 10, 4 de neonato masculinos y 6 neonatos femeninos) recolectadas junto a su placenta, al momento de la cesárea. Ninguna donante estuvo bajo tratamiento farmacológico durante al menos 10 días antes del muestreo. La sangre se obtuvo mediante punción de la vena del antebrazo y se recogió directamente en tubos plásticos estériles que contenían heparina. Los estudios fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación y el Comité de Investigación del Hospital Italiano de Buenos Aires (HIBA 1681). Las muestras se recolectaron tras obtener el consentimiento informado por escrito correspondiente de las participantes.

La fagocitosis de neutrófilos apoptóticos autólogos (eferocitosis) en 3×10^5 células HBC CD14 positivas, se llevó a cabo como se reportó previamente [58], [59]. Los neutrófilos se obtuvieron tras un gradiente de Ficoll-Hypaque y una posterior purificación con dextran [70], [71]. Los neutrófilos apoptóticos se generaron tras una incubación de 20 horas en RPMI (apoptosis espontánea) y se tiñeron con 3 μ M/10 6 células de CFSE (Life Technologies, Buenos Aires) durante 10 minutos en RPMI sin SFB. El exceso de CFSE se eliminó mediante lavados seriados con RPMI al 10 % de SFB.

El porcentaje de apoptosis de neutrófilos fue superior al 50 %, determinado por tinción con anexoína-propidio y citometría de flujo [69], [70][70], [71]; [69], [70]).

Los HBC se incubaron con neutrófilos apoptóticos en una proporción de 1:5 y, tras 50 minutos de eferocitosis, las células se recolectaron, se marcaron para CD14 y se analizó el porcentaje de células doble positivas para CD14/CFSE mediante citometría de flujo.

Para el estudio del metabolismo involucrado en dicho proceso, se utilizaron inhibidores farmacológicos específicos. Se añadieron 10 mM de 2-desoxi-D-glucosa (2-DG), 100 nM de rotenona (ROT) o 10 µM de etomoxir a los cultivos de HBC 90 minutos antes del ensayo de eferocitosis, inhibiendo el uso de glucosa, la cadena de transporte de electrones mitocondrial o la oxidación de ácidos grasos, respectivamente.

Microscopía confocal

Los HBC se marcaron con el colorante lipídico intercalante PKH26 (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los macrófagos masculinos o femeninos se incubaron con sus neutrófilos apoptóticos autólogos teñidos con CFSE y se realizó el ensayo de eferocitosis como se describió previamente. Luego, las células se lavaron, se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se tiñeron con DAPI.

Las células se visualizaron y se microfotografiaron con un microscopio de fluorescencia confocal Zeiss-LSM980. Las fotografías se analizaron utilizando el software Fiji. Los controles negativos se establecieron para cada tinte fluorescente por separado, y las imágenes presentadas fueron obtenidas a 60x.

Sondas metabólicas

- 2-NBDG-green para la captación de glucosa
- DCFH-DA-green para especies reactivas de oxígeno (ROS)
- BODIPY-FL C12-green para la captación de ácidos grasos de cadena larga
- BODIPY 493/503 para la acumulación de gotas lipídicas

Todos los reactivos se obtuvieron de Thermo Fisher Scientific

Captación de análogo de glucosa

Se retiró el sobrenadante tras 20 h en RPMI 2 % SFB sin o con tratamientos, y las células se incubaron con 100 µM de 2-NBDG y CD14-PECy7 a 37 °C, 5 % CO₂ en RPMI sin glucosa durante 10 min. Las células se lavaron con PBS frío, se resuspendieron en PBS con 2 % SFB y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados se expresaron como la intensidad de fluorescencia media (IFM) del 2-NBDG en células CD14 positivas como en [72]

Detección de especies reactivas de oxígeno totales

Se retiró el sobrenadante tras 20 h en RPMI 2 % SFB sin o con tratamientos, y las células se incubaron con 5 µM de DCFH-DA-FITC y CD14-PECy7 a 37 °C, 5 % CO₂ en RPMI durante 15 min. Las células se lavaron con PBS frío, se resuspendieron en PBS con 2 % SFB y se analizaron por citometría de flujo. Los

resultados se expresaron como la intensidad de fluorescencia media (IFM) de DCFH-DA en células CD14 positivas.

Producción de lactato

La concentración de lactato en el sobrenadante celular se midió 20 horas después de los tratamientos utilizando el kit de lactato L-Lactato (Wiener Lab), adaptando el protocolo del proveedor. El lactato de la muestra es oxidado por la enzima específica lactato oxidasa (LOD). El peróxido de hidrógeno formado en esta reacción es luego utilizado por la peroxidasa (POD) para generar un cromógeno. La intensidad cromática del complejo formado es directamente proporcional a la concentración de L-lactato en la muestra y se determina midiendo el aumento de absorbancia a 540-550 nm. Se colocaron en placa de 96 pocillos 2 ul de sobrenadante o 2 ul del calibrador con concentración conocida de lactato y se utilizaron las soluciones provistas por el kit. Para cuantificar la producción de L-lactato se midió absorbancia al finalizar el ensayo a 540 nm, y utilizando el factor obtenido a partir de la absorbancia del calibrador pudimos obtener la concentración de lactato en los sobrenadantes de nuestros cultivos.

Incorporación de ácidos grasos de cadena larga

Después de los tratamientos, las células se tiñeron con la sonda fluorescente específica BODIPY-FL C12, [42]. Esta sonda es un ácido graso saturado de 12 carbonos unido al fluoróforo BODIPY (4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indaceno), que se aESeja a un ácido graso de 18 carbonos [73] La sonda se preincubó con albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos al 0,1 % (FAF-BSA, Sigma) durante 30 minutos a 37 °C. Las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con una solución de 5 µM de BODIPY-FL C12 en RPMI sin suero durante 5 minutos a 37 °C, 5 % de CO₂. Las células se lavaron con BSA al 0,2 %, se resuspendieron en solución FACS y se adquirieron los datos como en el ensayo de captación de glucosa. Los resultados se expresaron como la intensidad media de fluorescencia (MFI) de BODIPY FL C12 en células CD14 positivas.

Acumulación de gotas lipídicas

Las células se trataron de forma similar a los ensayos de captación de glucosa y ácidos grasos de cadena larga. Luego se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con una sonda fluorescente BODIPY 493/503 a 2 µM en PBS durante 15 minutos a 37 °C, 5 % de CO₂. Posteriormente, las células se lavaron con PBS frío, se recolectaron con tripsina-EDTA (0,25 %) y se resuspendieron en solución FACS. La citometría de flujo se realizó como se describió anteriormente. Los resultados se expresaron como la IFM de BODIPY 493/503 en células CD14 positivas.

Análisis estadístico

La significancia de los resultados se analizó utilizando las siguientes pruebas:

- **Wilcoxon de pares relacionados o U de Mann-Whitney**, para comparar dos muestras no paramétricas.
- En caso de requerir múltiples comparaciones, se utilizó **ANOVA unidireccional o bidireccional**, seguido de pruebas de comparación múltiple de Holm-Sidak o Tukey.

Se consideraron diferencias estadísticamente significativas para valores de **P < 0.05**, empleando el software **GraphPad Prism9** (GraphPad, San Diego, CA, USA).

- En los análisis bioinformáticos, DESeq2 se utilizó para el análisis de expresión diferencial en datos de RNA-seq, empleando un **modelo de regresión basado en distribución binomial negativa**. La normalización de los datos se realizó mediante el método de medianas de razones (median of ratios) para corregir diferencias en profundidad de secuenciación. Se calcularon los valores de log2FoldChange y p-valores ajustados mediante el método de **Benjamini-Hochberg** para el control de la tasa de falsos descubrimientos (FDR).

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

A lo largo de los años se han informado diferencias en el desarrollo del embarazo con respecto al sexo del neonato. El crecimiento fetal está determinado en parte por el sexo del feto; al nacer, los recién nacidos varones tienden a ser de mayor tamaño y peso que las mujeres sin importar el peso placentario [60], [74]. Curiosamente, durante la gestación, los fetos masculinos crecen más rápido que los fetos femeninos, lo que los hace más susceptibles a las alteraciones nutricionales maternas [75], [76], a la exposición a sustancias químicas [5], [77], [78] y a agentes infecciosos [76], [79]. Además, los fetos masculinos desarrollan con mayor incidencia complicaciones del embarazo y sobre estos con peores resultados a lo largo de sus vidas [74], [80], [81], [82].

Teniendo en cuenta el hecho que el sistema inmune es diferente entre hombres y mujeres a lo largo de su vida [83], nos preguntamos cómo es el microambiente inmunológico materno-placentario según el sexo del bebé en gestación. Para ello, utilizando bases datos de públicas (GSE247382), se llevó a cabo un análisis de la expresión génica en tejido placentario de 42 muestras a término, con el objetivo de determinar si existen diferencias significativas en la expresión de genes dentro del microambiente placentario asociadas al sexo del neonato.

En el *heatmap* de la Fig. 5A se observa que 22 genes están diferencialmente expresados (DEGs) en muestras masculinas y 15 en muestras femeninas. Al observar la distribución de los DEG en un *volcano plot*, pudimos ver que mientras las muestras femeninas tenían un p-valor ajustado similar, en las masculinas había dos grupos: p-valor ajustado bajo similar a los DEG femeninos y otros de p-valor ajustado alto (Fig. 5B).

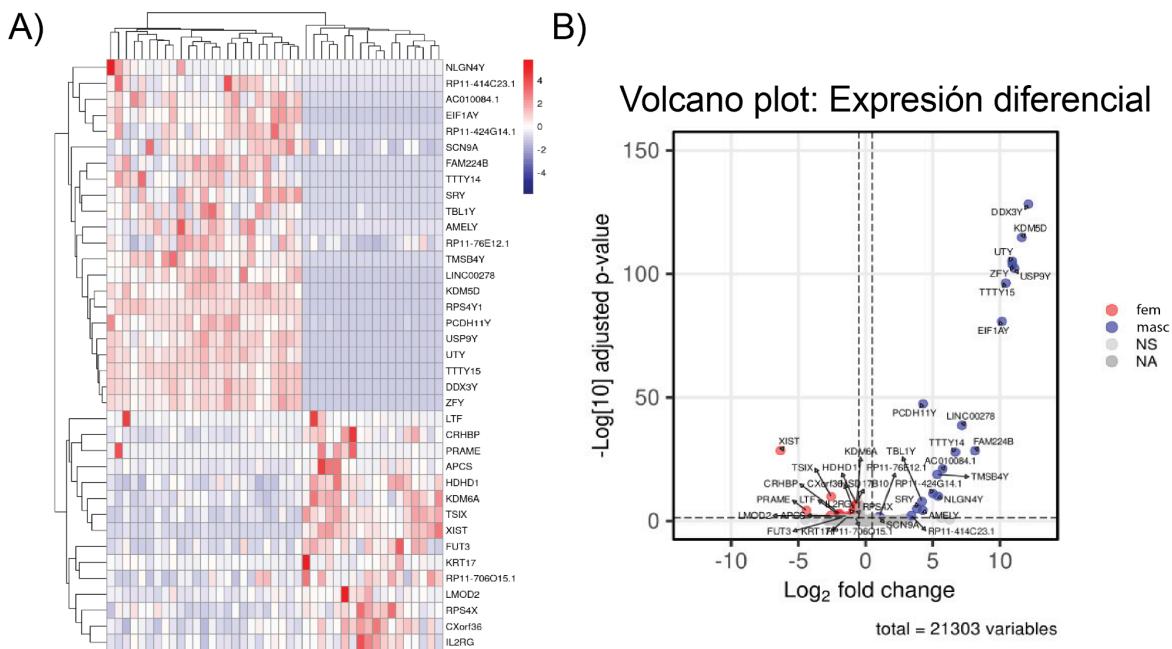


Figura 5. Estudio in silico de la expresión génica del microambiente placentario de muestras a término. A) Heatmap de expresión de genes diferencialmente expresados en muestras de placenta pertenecientes al tercer trimestre del embarazo. El color rojo indica mayor expresión y el azul una expresión disminuida. Las muestras están organizadas en columnas y los genes en filas. B) Volcano plot de la expresión de genes evaluados por RNAseq en muestras de placenta pertenecientes al tercer trimestre del embarazo. Los puntos en color indican genes diferencialmente expresados ($|lfc| \geq 0.58$, $adjPval \leq 0.05$). En azul genes con expresión aumentada en muestras masculinas. En rojo, aquellos de muestras femeninas.

Luego, se llevó a cabo un análisis funcional de los genes diferencialmente expresados con el objetivo de identificar las vías biológicas específicas en las que participan, con foco especial en vías celulares involucradas en la respuesta inflamatoria (pro y anti), metabolismo y perfil alternativo (M2) de macrófagos, pudiendo ser mecanismos potenciales que acompañen las diferencias observadas en los recién nacidos según su sexo.

En la Fig. 6A (dotplot) se pudo identificar en muestras de placenta femenina (NES negativo) un incremento en la expresión de genes asociados a vías de respuesta antiinflamatoria, metabolismo lipídico y angiogénesis, entre otras, que son relevantes a la hora de caracterizar su funcionalidad. Por otro lado, en la Fig. 6B (Red funcional) se ilustra la complejidad de las relaciones entre los genes que participan en alguna de las cuatro categorías analizadas. Se puede observar que los genes con una expresión aumentada en muestras femeninas se vinculan predominantemente con una respuesta antiinflamatoria, funciones de macrófagos de perfil M2, y metabolismo lipídico. En contraste, no se identificaron asociaciones

claras entre estos genes y procesos relacionados con la respuesta inflamatoria, lo que podría reflejar diferencias funcionales vinculadas al sexo del feto.

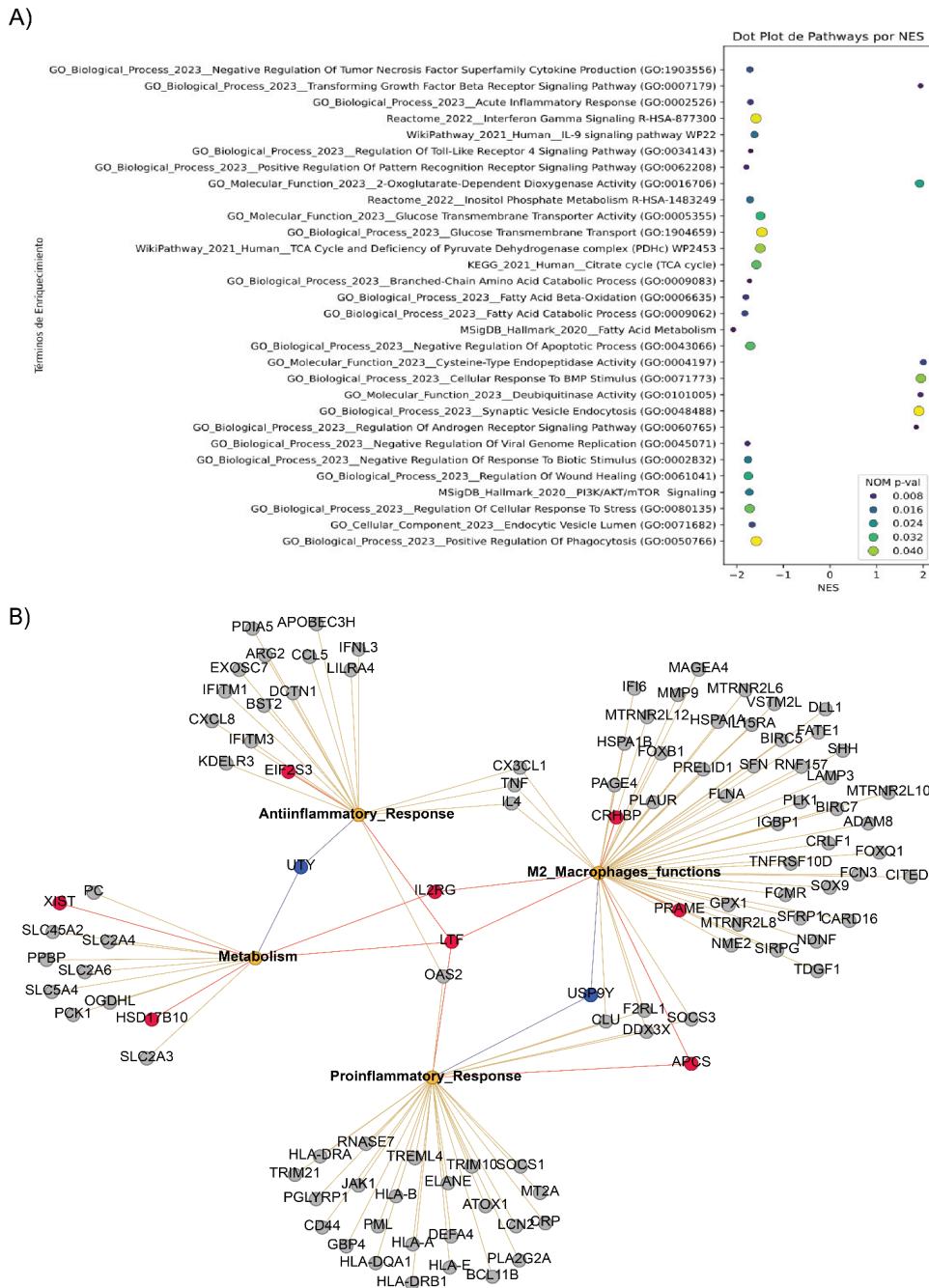


Figura 6. Estudio *in silico* de la funcionalidad de genes diferencialmente expresados en el microambiente placentario de muestras a término. A) Dot Plot de resultados de análisis de enriquecimiento con vías asociadas a procesos inflamatorios, antiinflamatorios, metabolismo y otros. Cada punto representa una vía enriquecida, donde el tamaño del punto indica el número de genes involucrados y el color refleja el valor de q (ajustado para FDR). Un NES negativo corresponde a las muestras femeninas mientras que un NES positivo a las masculinas. B) Red de genes asociados a metabolismo, respuesta inmune antiinflamatoria y respuesta proinflamatoria. Cada nodo

representa un gen, y las conexiones indican relaciones funcionales con alguno de los procesos anteriores. En rojo, genes sobreexpresados en muestras femeninas y en azul genes sobreexpresados en muestras masculinas.

Con el objetivo de ampliar los resultados obtenidos de estos análisis bioinformáticos, se procedió a realizar estudios *in vitro* de la expresión génica de genes involucrados en la respuesta inflamatoria del microambiente placentario a partir de explantes de vellosidades placentarias cultivados durante 20 h.

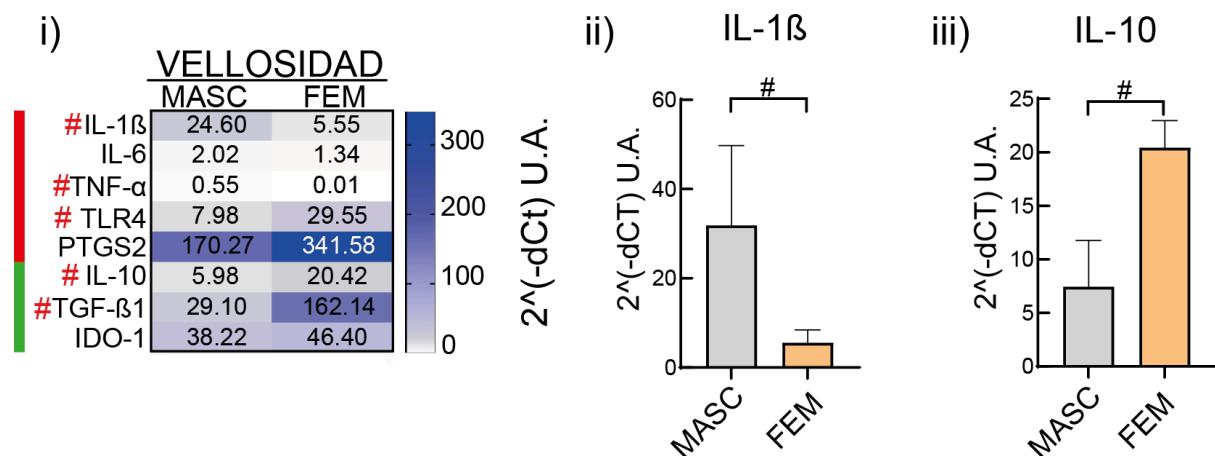


Figura 7. Diferencias transcripcionales asociadas al sexo en el microambiente placentario. Se procesaron placenta (de 4 nacimientos masculinos y 4 femeninos) para estudiar la expresión génica en explantes de vellosidades mediante RT-qPCR. i) Heatmap donde la expresión génica, masculina o femenina, se muestra como las unidades arbitrarias (U.A.) de expresión media $2^{(-dCt)}$, normalizada con 2 genes controles que no presentaron diferencias ligadas al sexo (GAPDH y β-2 microglobulina). Las líneas rojas y verdes representan genes proinflamatorios y antiinflamatorios, respectivamente. En los gráficos de barra se muestra la expresión de un gen ii) proinflamatorio (IL-1β) y iii) antiinflamatorio (IL-10). Los resultados se presentan como la media ± ES de unidades arbitrarias (U.A.) de su expresión media $2^{(-dCt)}$. Las diferencias estadísticamente significativas entre sexos se indican con # P < 0.05 (prueba de Mann-Whitney).

En la Fig. 7i, se determinó que los genes asociados a procesos antiinflamatorios (IL-10 y TGF-β1) presentan una mayor expresión en los explantes de muestras femeninas en comparación con los genes relacionados con procesos proinflamatorios (IL-1β y TNF-α). Las muestras femeninas exhiben una mayor expresión de TLR4, lo cual es consistente con los resultados bioinformáticos que indicaron un enriquecimiento de la vía de regulación de TLR4 en las vellosidades de fetos femeninos.

Para explorar si la respuesta de TLR-4 puede estar ligada a alguna regulación diferencial según el sexo, por lo menos en la interfaz materno-placentaria, realizamos estudios de correlación como muestra la Fig. 8.

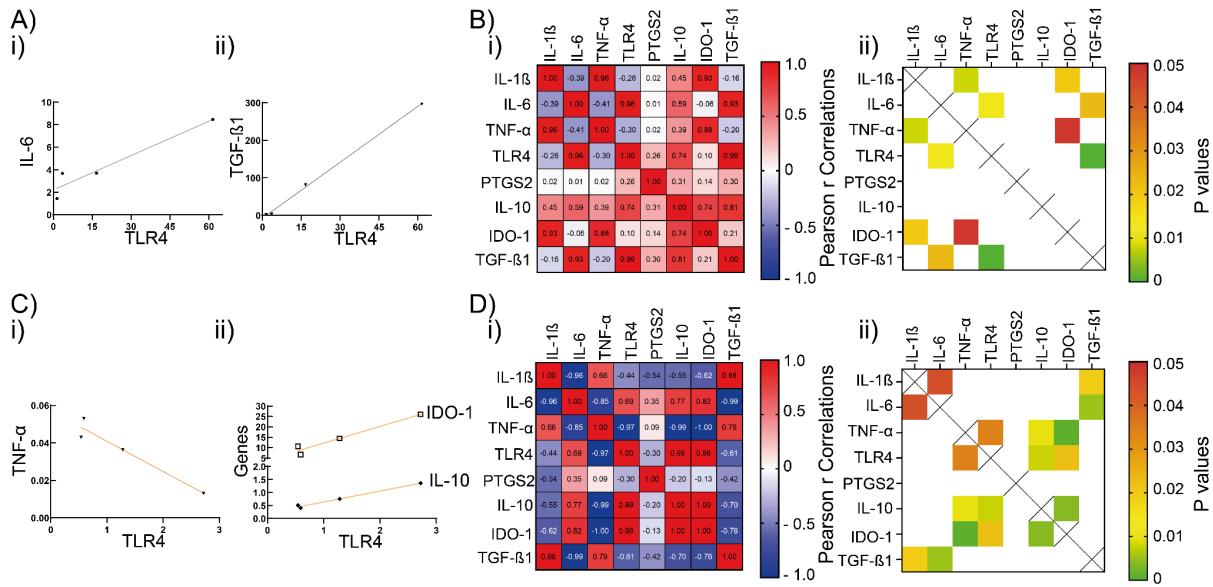


Fig. 8: Diferencias transcripcionales asociadas al sexo en el microambiente placentario. Se procesaron placenta (de 4 nacimientos masculinos y 4 femeninos) para estudiar la expresión génica en explantes de vellosidades mediante RT-qPCR. En A y C se muestra la correlación de TLR4 con genes i) proinflamatorios y genes ii) antiinflamatorios de muestras masculinas y femeninas, respectivamente. B y D i) Correlación multivariado corregido por Pearson r donde en rojo la correlación es positiva y en azul negativa. Todas las correlaciones mostradas tienen valores de $P < 0.05$.

Estos resultados demuestran que hay un microambiente inmunológico en la vellosidad placentaria a término sexo-dependiente, mostrando un perfil más antiinflamatorio en el caso de fetos femeninos. Además, se identificaron mecanismos de regulación diferencial, tanto intrínsecos como extrínsecos, asociados al receptor TLR4. En las muestras masculinas, TLR4 mostró una correlación positiva tanto con un gen proinflamatorio (IL-6) como con uno antiinflamatorio (TGF- β 1). En contraste, en las muestras femeninas, TLR4 presentó una correlación negativa con un gen proinflamatorio (TNF- α) y positiva con dos genes antiinflamatorios (IL-10 e IDO-1).

CAPÍTULO 2

Los macrófagos placentarios, también conocidos como células Hofbauer (HBC) son componentes fundamentales para preservar la homeostasis y garantizar el adecuado funcionamiento del sistema inmunitario en la placenta, contribuyendo así al desarrollo saludable del embrión. Por esta razón, su caracterización resulta esencial para comprender cómo contribuye al microambiente placentario y como este último influye en su funcionalidad. Para profundizar, resulta un aporte la segregación de estas células según el sexo del feto, debido a que tienen la misma carga cromosómica. Dicha segregación puede permitir conocer diferencias de regulación y funcionales que se pierdan en el conjunto.

En primer lugar, procedimos a aislar los HBC de vellosidades de placentas a término de neonatos masculinos (MASC) y femeninos (FEM) y caracterizamos en condición basal, dos marcadores de la población: CD14 y CD163, como se muestra en la Fig. 9.

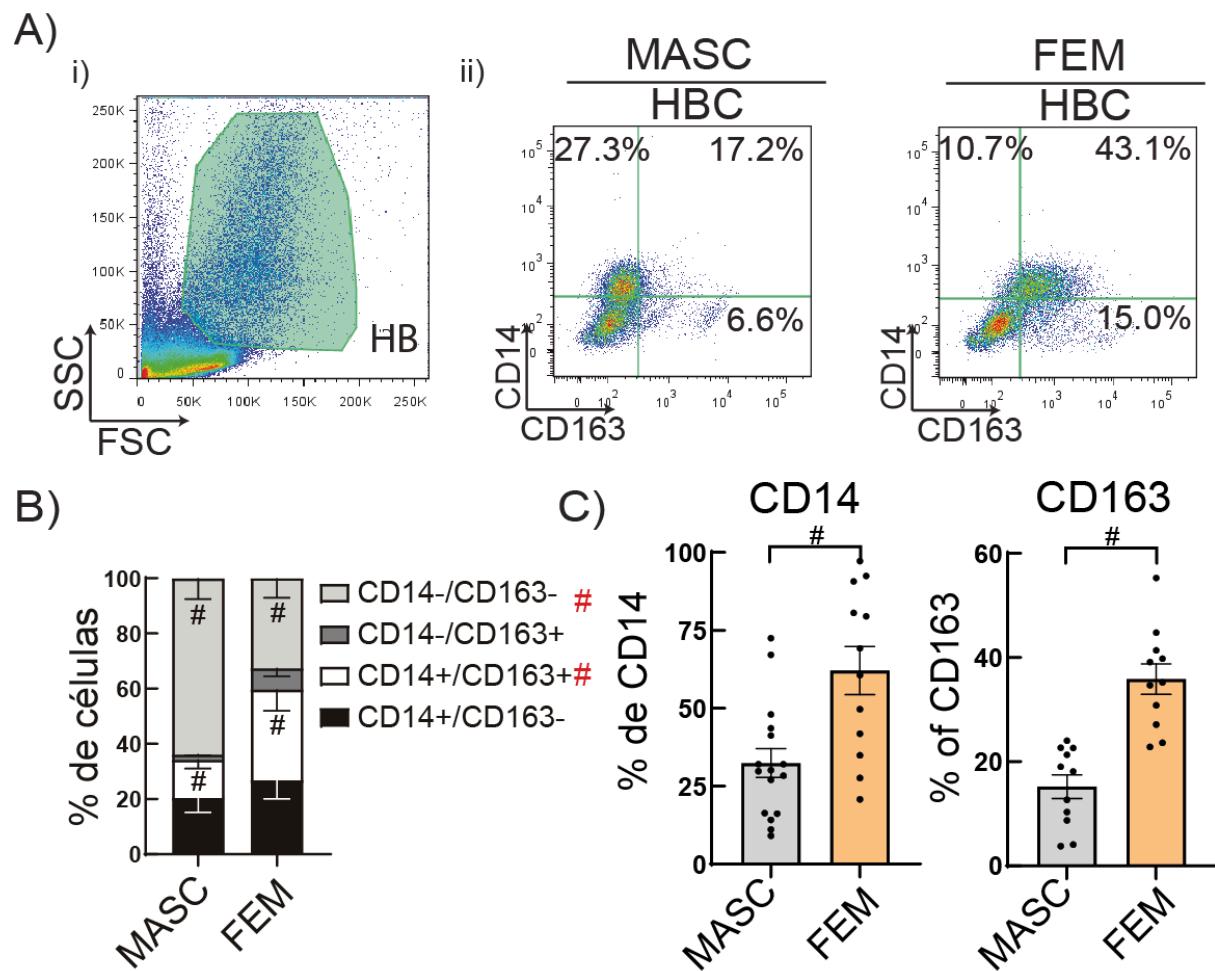


Figura 9. Caracterización de células Hofbauer aisladas de explantes de tejido placentario a término. Se aislaron HBC de 31 placas (16 de recién nacidos masculinos y 15 de femeninos) mediante digestión enzimática y se cultivaron en RPMI al 2% SFB durante la noche. Las células fueron recolectadas y se analizó por citometría de flujo la proporción de CD14 y CD163 por citometría de flujo. A) Dot plots representativos de (i) HBC gate y (ii) el porcentaje de células positivas para CD14-CD163 en células masculinas (izquierda) y femeninas (derecha). B,C) Gráficos de barras expresando el porcentaje determinado de CD14 y CD163. Los resultados se expresan como Media ± ES. Las diferencias estadísticamente significativas por sexo placentario se representan como # (rojo) P < 0.05 por ANOVA de dos vías, prueba de comparaciones múltiples de Tukey [Interacción: F(3) = 8.628, P-valor < 0.0001; Sexo: F(1) = 5.99e-008, P-valor = 0.998; Población celular: F(3) = 20.64, P < 0.0001]. P < 0.05 (prueba de Mann-Whitney) cuando solo se analizaron 2 condiciones. Cada punto representa un experimento independiente.

Los resultados de la figura 9 permiten identificar que las células provenientes de muestras femeninas poseen un mayor porcentaje de resultados doble positivos para los receptores de membrana CD14 y CD163 que aquellas extraídas de muestras masculinas.

Para profundizar el estado de activación de dichos macrófagos según el sexo, teniendo en cuenta que por literatura se los describe en un perfil de activación alternativo, se estudiaron otros marcadores asociados al perfil M2 como CD39, CD206, CD209 y la secreción de IL-10; y además la secreción de la citoquina proinflamatoria IL-1 \square (Figura 10).

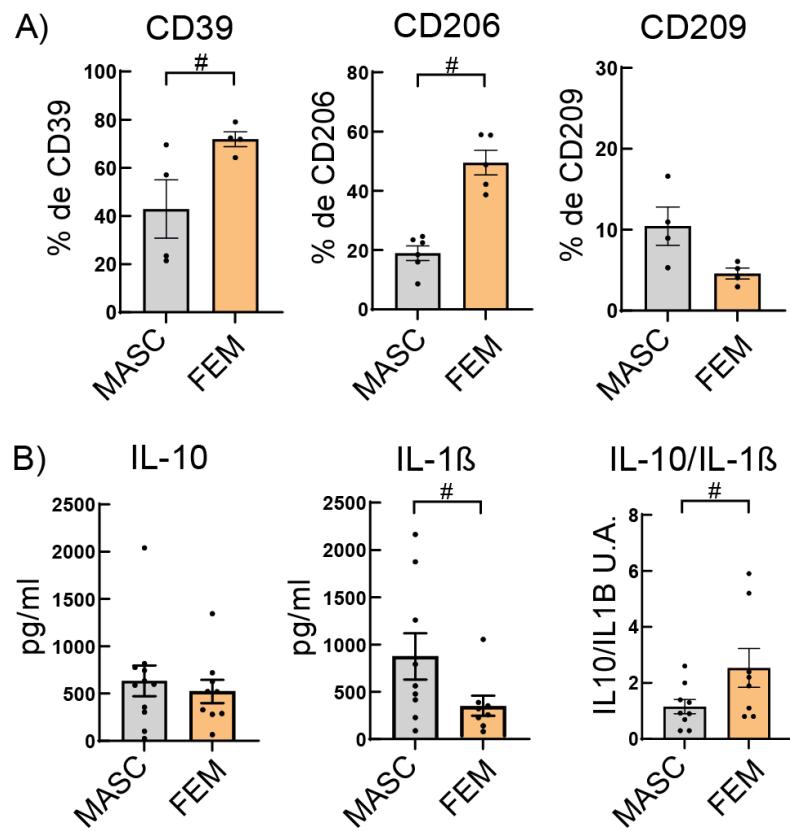


Figura 10. Caracterización de células Hofbauer según mediadores pro y antiinflamatorios. Se aislaron HBC de 31 placentas (16 de recién nacidos masculinos y 15 de femeninos) mediante digestión enzimática y se cultivaron en RPMI al 2% SFB durante la noche. Las células fueron recolectadas y se analizó por citometría de flujo la proporción de CD39, CD206, CD209 y la secreción de IL-10 e IL-1B (pg/ml) en los sobrenadantes mediante ELISA. Los resultados se expresan como Media ± ES. Cada punto representa un experimento independiente. A) Las diferencias estadísticamente significativas por sexo placentario se representan como # (rojo) P < 0.05 por ANOVA de dos vías, prueba de comparaciones múltiples de Tukey. B) Los resultados se expresan como Media ± ES. P < 0.05 (prueba de Mann-Whitney) cuando solo se analizaron 2 condiciones.

En la figura 10.A, los datos muestran que los HBC extraídas de muestras FEM presentan una mayor expresión de los marcadores CD39 y CD206, que están asociados con funciones antiinflamatorias y de regulación de la respuesta inmune. Además, si bien la secreción de IL-10 es similar (figura 10.B), las muestras FEM tienen una marcada reducción en la secreción de la citoquina IL-1β y una relación IL-10/IL-1β mayor que los HBC MASC.

Para ahondar en la caracterización de este perfil M2 marcado en HBC FEM, se decidió estudiar la función de remoción de cuerpos apoptóticos. Para esto, se cultivaron HBC con neutrófilos maternos apoptóticos marcados con CFSE en una relación 1:5 durante 1 h. Los resultados se muestran en la figura 11.

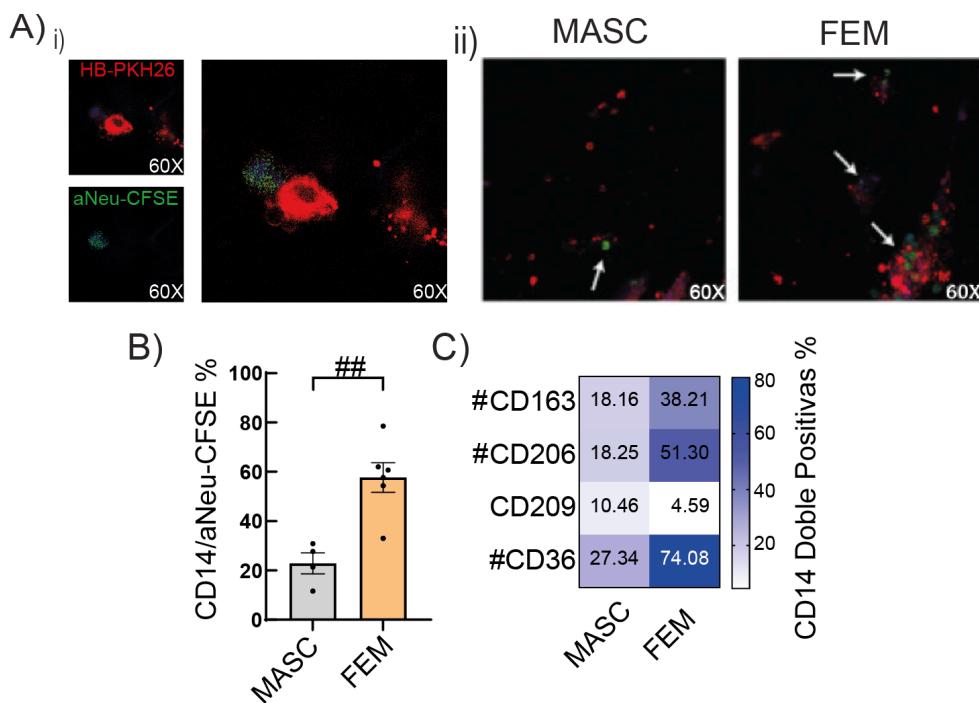


Figura 11. Capacidad eferocítica diferencial de HBC de placentas femeninas y masculinas Los HBC masculinos o femeninos fueron expuestos con neutrófilos apoptóticos maternos (aNeu), marcados con CFSE, en una proporción de 1:5 durante 1 hora. A) Se obtuvieron microfotografías representativas del proceso, capturadas con un microscopio confocal Zeiss LSM980 en tres experimentos independientes. En las imágenes representativas, los cuerpos apoptóticos (verde) fagocitados por las células Hofbauer (rojas, teñidas con PKH26) están indicados con flechas blancas. En azul se aprecian los núcleos teñidos con DAPI. B) Posteriormente a la eferocitosis, los HBC se lavaron y se incubaron con un anticuerpo anti-CD14 y se analizó el porcentaje de células doble positivas (CD14/aNeu-CFSE) por citometría de flujo. C) Duplicados de HBC cultivados por 20 h fueron cosechados previo a la eferocitosis para el estudio de receptores *scavenger* (CD163, CD206, CD209 y CD36) involucrados en dicho proceso por citometría de flujo. Los resultados se expresan como el porcentaje (Media ± ES) de células positivas para los diferentes receptores en la población CD14 positiva tanto en el gráfico de barras B) como en el heatmap C). Diferencias estadísticamente significativas entre HBC según sexo se expresan como #P < 0.05, ## P < 0.01 (prueba de Mann-Whitney). Cada punto representa una muestra independiente de HBC.

Los resultados observados en la figura 11.A y 11.B indican que las células Hofbauer femeninas tienen una capacidad significativamente mayor de remoción de cuerpos apoptóticos, acompañados por mayor expresión de receptores *scavenger* involucrados (figura 11.C), en comparación con las masculinas. Este hallazgo sugiere que las células Hofbauer femeninas desempeñan un papel más activo en la resolución de la inflamación a través de la fagocitosis de células apoptóticas. Este proceso es crucial para mantener la homeostasis del microambiente placentario y

podría estar vinculado con una mayor orientación hacia funciones antiinflamatorias observadas en estudios previos.

La mayor eficiencia de los HBC femeninas en la eferocitosis refuerza la hipótesis de que el sexo fetal influye en las propiedades funcionales de estas células inmunes placentarias, lo que podría tener implicaciones importantes en el control de la inflamación y en el origen de complicaciones en el embarazo.

El proceso de eferocitosis no solo está regulado por marcadores celulares específicos, sino que también puede verse afectado por el metabolismo predominante en la célula, por lo que resulta imperativo determinar si existen diferencias metabólicas dependientes del sexo del neonato que influyan en el perfil inmunometabólico de estas células. Tales diferencias podrían impactar en su funcionalidad como reguladoras clave del estado inmunológico de la placenta.

CAPÍTULO 3

Teniendo en cuenta que en la literatura se refiere en términos binarios, aunque se aclara que es una simplificación, que un macrófago M1 principalmente utiliza la glucólisis para la producción de ATP y un macrófago M2 FOSFOX siendo los lípidos la principal fuente de energía, decidimos estudiar algunos metabolitos involucrados en el metabolismo glucolítico y lipídico, ya que hasta el momento no se exploró el metabolismo en dichas células.

Para estudiar la vía glucolítica se eligieron 3 determinaciones, primero se evaluó la incorporación de un análogo de la glucosa. Luego, la secreción de lactato para el estudio de la glucólisis aeróbica y la producción de especies reactivas de oxígeno totales (ROS) producidas por la vía de las pentosas, entre otras. Los resultados se presentan en la figura 12.

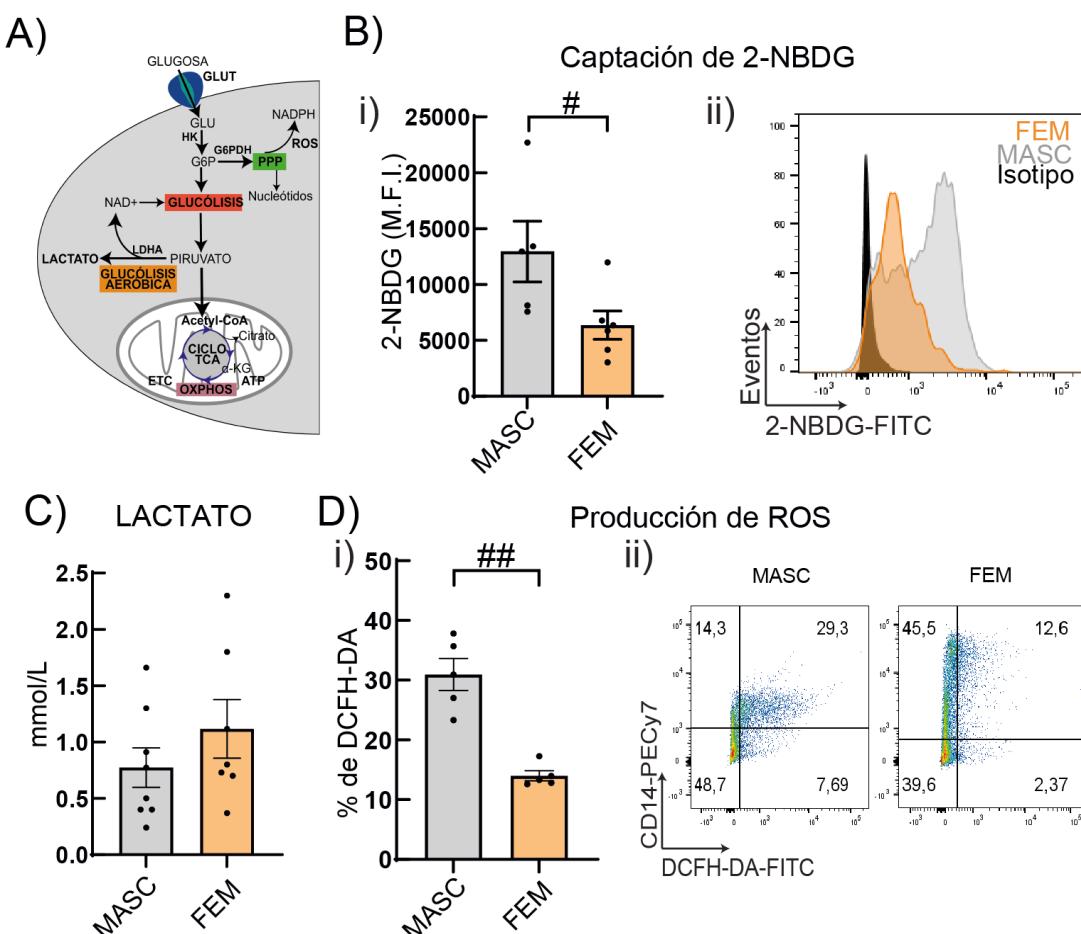


Figura 12. Vía glucolítica y producción de ROS en HBC masculinos y femeninos. 350.000 HBC fueron cultivadas con RPMI suplementado con 2% de SFB durante la noche (ON) y recolectadas junto a su sobrenadante para realizar ensayos

metabólicos. A) Representación esquemática simplificada del metabolismo de la glucosa. B) i) Gráfico de barras indicando la captación de 2-NBDG para ambos sexos ii) Histograma representativo del análisis de captación de 2-NBDG (análogo fluorescente de glucosa) en células HBC, diferenciando entre sexos. La curva en color naranja corresponde a muestras de sexo femenino, mientras que la curva gris representa las de sexo masculino. La curva negra muestra el control de autofluorescencia como referencia. C) Secreción de lactato registrada por ensayo colorimétrico en el sobrenadante. D) Producción de ROS evaluada por (i) porcentaje de células positivas para la incorporación sonda de ROS totales (DCFH-DA) en muestras femeninas y masculinas y (ii) mediante citometría de flujo en las mismas muestras. A, C, D) Los resultados se expresan como Media ± ES. Las diferencias estadísticamente significativas entre los sexos se representan como # P < 0.05 (prueba de Mann-Whitney). Cada punto representa una muestra independiente de HBC.

La figura 12.B ilustra las diferencias significativas en el metabolismo glucolítico presentes entre células Hofbauers provenientes de neonatos de ambos sexos. Los resultados indican que las células masculinas no sólo incorporan más el análogo de glucosa fluorescente, 2-NBDG, sino que también producen más especies reactivas de oxígeno sin cambiar la concentración de lactato secretado (figura 12.C.D), en comparación con las femeninas. Esto podría sugerir que los HBC MASC tienen una mayor dependencia de la glucosa que los HBC FEM y esto podría explicar parcialmente su fenotipo M2 más atenuado que los HBC FEM.

Teniendo en cuenta los hallazgos previamente mencionados, se cuestionó si los HBC FEM tienen una preferencia metabólica asociado a un perfil M2. Con el objetivo de estudiar el metabolismo lipídico, analizamos la incorporación de ácidos grasos de cadena larga (LCFA) no esterificados (BODIPY FL C12), la expresión del transportador de ácidos grasos, CD36/FAT y la acumulación de gotas lipídicas (BODIPY 493/503). Los resultados se muestran en la figura 13.

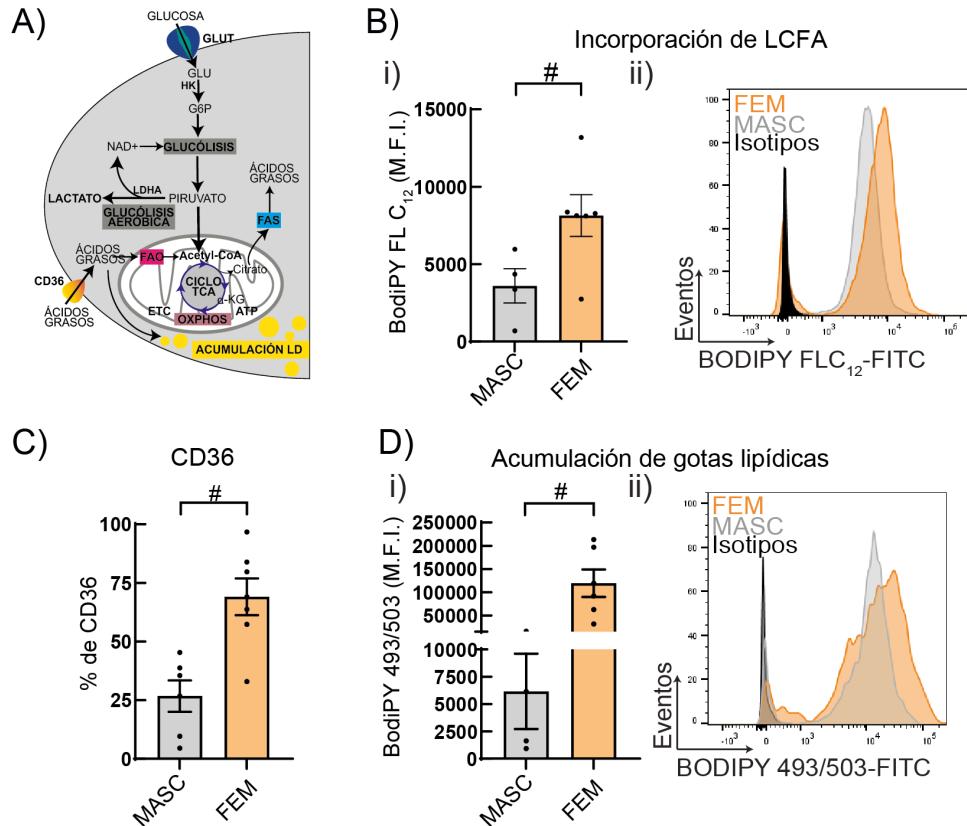


Figura 13. Parámetros asociados al metabolismo lipídico en HBC masculinos y femeninos. A) Representación esquemática simplificada del metabolismo de ácidos grasos. 350.000 HBC fueron cultivadas con RPMI con 2% de SFB ON y recolectadas para realizar ensayos metabólicos. Estudiamos B) la incorporación de LFCAs con la sonda fluorescente Bodipy FL C₁₂, C) la expresión del transportador CD36 y D) la acumulación de gotas lipídicas (LD) con la sonda fluorescente Bodipy 493/503, por citometría de flujo. Los resultados se expresan como la Media ± ES de la intensidad de fluorescencia media (MFI) o el porcentaje (%) de células positivas. En ii) se muestran resultados representativos de ambos histogramas. Las diferencias estadísticamente significativas entre los sexos se representan como # P < 0.05 (prueba de Mann-Whitney). Cada punto representa una muestra independiente de HBC.

Se observó que las células provenientes de muestras femeninas presentan una mayor capacidad para incorporar ácidos grasos de cadena larga acompañado por una mayor expresión del transportador CD36 (Figura 13.B.C). Además, acumulan una cantidad significativamente mayor de gotas lipídicas en comparación con las células masculinas (Figura 13.D).

Al detectar estas diferencias metabólicas según el sexo del neonato, se decidió examinar la dependencia de estas vías para la función de remoción de cuerpos apotóticos a través del uso de inhibidores metabólicos sobre los HBC, como se grafican en la figura 14.

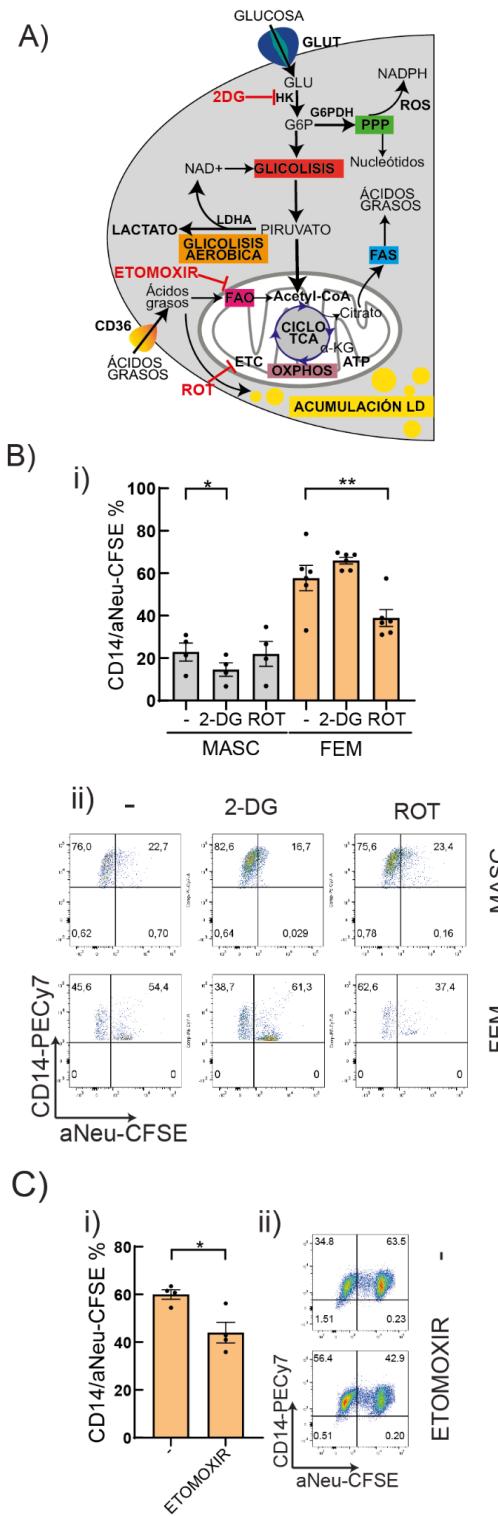


Figura 14. Efecto de la inhibición de las diferentes vías metabólicas sobre la eferocitosis de HBC masculinos y femeninos. 350.000 HBC fueron cultivadas ON. Se estimularon 90 minutos previos a la eferocitosis de neutrófilos apoptóticos con inhibidores farmacológicos metabólicos: 2-DG (10 mM), ROT (100 nM) o ETOMOXIR (10 µM). Se realizó la eferocitosis como se describió previamente y se evaluó % de células doble positivas mediante citometría de flujo. A) Esquema simplificado de las vías metabólicas y los inhibidores farmacológicos en las células Hofbauer. B) El estudio de la dependencia metabólica se muestra por la Media ± ES del porcentaje de CD14/aNeu-CFSE de los HBC

basal (-) o en presencia de los inhibidores 2-Deoxy-D-glucosa (2-DG) y rotenona (ROT) por citometría de flujo. Diferencias estadísticamente significativas se expresan como * P < 0.05, ** P < 0.01. P < 0.05, ** P < 0.01. ANOVA de dos vías con prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. C) Estudio de la dependencia de la oxidación de ácidos grasos para el proceso de eferocitosis en HBC FEM basal (-) o con el inhibidor etomoxir. Los resultados se expresan como Media ± ES de las células doble positivas para la marca CD14 y CFSE. Diferencias estadísticamente significativas se expresan como * P < 0.05 (- vs. ETOMOXIR, prueba de rangos con signo de Wilcoxon para pares coincidentes). En ii) se muestran *dot plots* representativos y cada punto representa una muestra independiente de HBC.

Los resultados exhibidos en la figura 14.B indicaron que un inhibidor de la utilización de la glucosa, 2DG, en células Hofbauer masculinas disminuyó significativamente el proceso de eferocitosis, respecto al control, mientras no se observaron cambios en presencia del inhibidor del complejo I de la ETC, rotenona (ROT). En contraste, en HBC FEM, solo se ve comprometida dicha función cuando se utilizó ROT y más aún cuando se bloquea con etomoxir el transporte de ácidos grasos hacia la mitocondria para su oxidación.

Los resultados expuestos acerca del metabolismo involucrado en la capacidad eferocítica de las células Hofbauer masculinas y femeninas revela una dependencia metabólica diferencial para cumplir con funciones clave como la remoción de cuerpos apoptóticos, independientemente de que estén expuestas a los mismos nutrientes en el medio de cultivo. A partir de esto, surgió la pregunta de si este metabolismo puede ser reprogramado frente a un estímulo proinflamatorio clásico, como el lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*. Según la literatura, los macrófagos expuestos a este estímulo aumentan su metabolismo glucolítico.

Para simular un contexto proinflamatorio, se realizaron ensayos metabólicos en respuesta al estímulo de LPS como se muestra en la Figura 15.

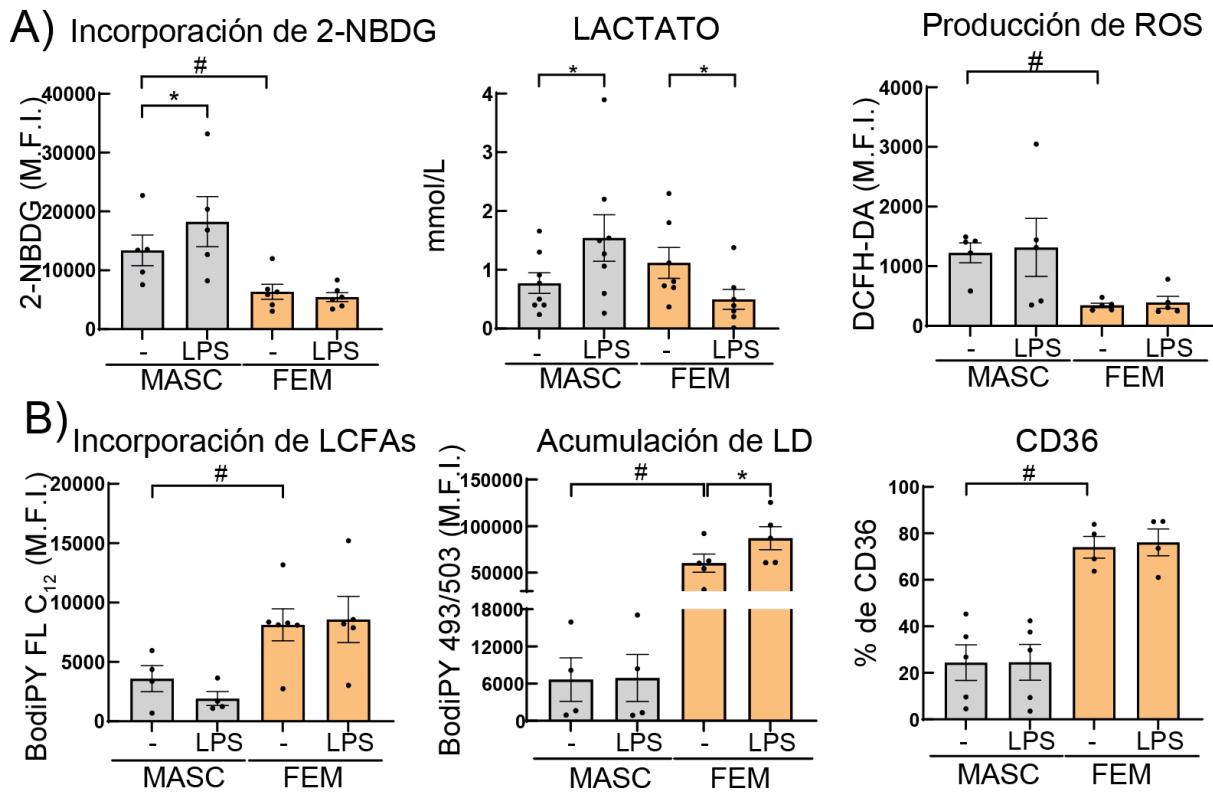


Figura 15. Perfil inmunometabólico de HBC modulado por LPS. 350.000 HBC se cultivaron ON basalmente (-) o con 100 nM de LPS y se estudió A) metabolismo glucolítico (Incorporación de 2-NBDG, Lactato y producción de ROS) y el B) metabolismo lipídico (Incorporación de LCFAs, CD36 y acumulación de LD) por citometría de flujo, excepto lactato por una prueba colorimétrica. Los resultados se expresan como Media ± ES. Las diferencias estadísticamente significativas debido a los estímulos dentro de cada sexo se representan como * P < 0,05 (prueba de rangos con signo de Wilcoxon para pares coincidentes), y aquellos parámetros detectados como significativamente diferentes entre HBC masculinas y femeninas en condiciones basales están marcados con #. Cada punto representa una muestra independiente de HBC.

De acuerdo con la figura 15, se observa que frente a un estímulo con LPS los HBC MASC incorporan una cantidad de análogo de glucosa significativamente mayor que en situaciones control. Este aumento en la captación de glucosa se ve acompañado de un incremento en la secreción de lactato sin cambiar la producción de ROS. Esto sugiere que las células masculinas, frente a un estímulo inflamatorio, incrementan su actividad glucolítica sin modificar la incorporación de ácidos grasos y parámetro asociados al metabolismo lipídico. Sorprendentemente, las células femeninas, frente al mismo estímulo con LPS, no solo no incorporan más análogo de glucosa, sino que reducen la producción de lactato y, al mismo tiempo, tienen una mayor acumulación de gotas lipídicas respecto al control. Esto podría indicar que los HBC FEM podrían estar utilizando de manera más activa la vía metabólica lipídica incluso en respuesta al estímulo proinflamatorio, pero más estudios se necesitan para confirmarlo.

Teniendo en cuenta que frente al LPS sus preferencias metabólicas no cambian, se estudiaron marcadores de perfil de activación principalmente M2 en la Figura 16.

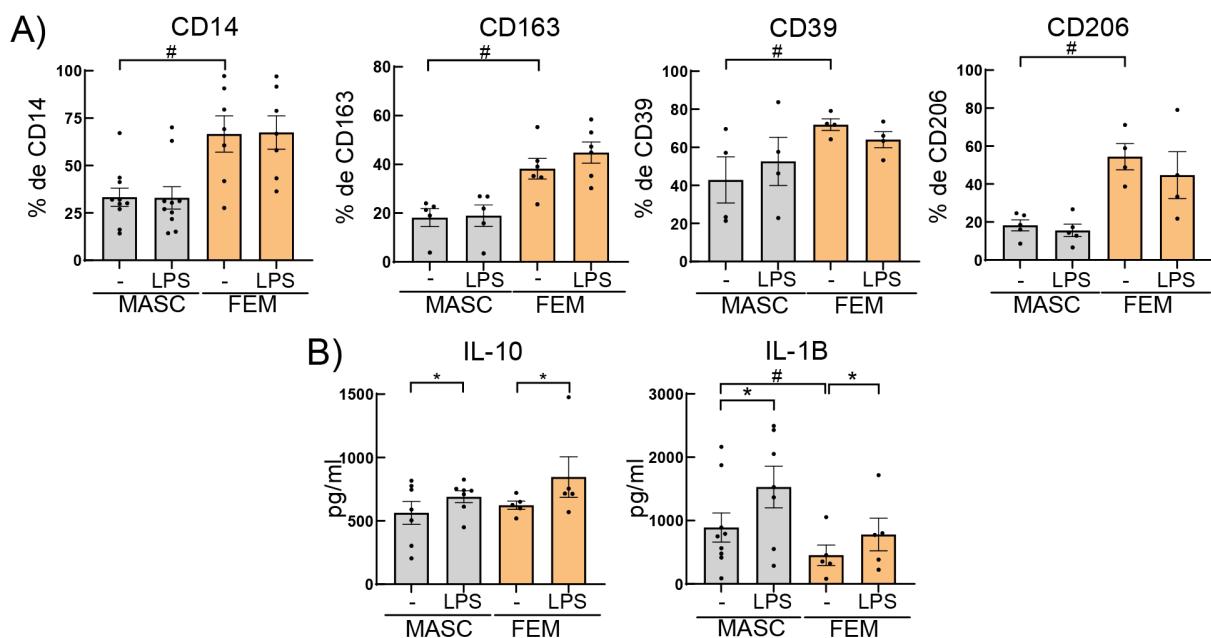


Figura 16. Perfil inmunometabólico de HBC modulado por LPS. 350.000 HBC se cultivaron ON basalmente (-) o con 100 nM de LPS y se estudió mediante citometría de flujo CD14, CD163, CD206, CD39 y la secreción de IL-1 β e IL-10 en el sobrenadante por ELISA. Los resultados se expresan como Media \pm ES. Las diferencias estadísticamente significativas debido a los estímulos dentro de cada sexo se representan como * P < 0,05 (prueba de rangos con signo de Wilcoxon para pares coincidentes), y aquellos parámetros detectados como significativamente diferentes entre HBC masculinas y femeninas en condiciones basales están marcados con #. Cada punto representa una muestra independiente de HBC.

Por último, en la figura 16 se puede observar que la exposición a LPS no provoca grandes diferencias tanto en las muestras masculinas como femeninas. Ambas conservan los marcadores de superficie M2 sin cambio, excepto HBC FEM que tiene una tendencia al incremento en CD163. Finalmente, el tratamiento en HBC MASC y FEM incrementa la secreción de la citoquina IL-1 β , pero acompañada de una mayor secreción de IL-10. Este enfoque permitió confirmar que, frente a un desafío inflamatorio, común en la interfaz materno-placentaria durante situaciones de infección, el metabolismo diferencial asociado al sexo no cambiaría frente al mismo.

DISCUSIÓN

La interacción materno-fetal es un proceso altamente regulado que permite la implantación y el desarrollo placentario sin desencadenar una respuesta inmunitaria adversa. En este contexto, la placenta no solo actúa como una interfaz física entre la madre y el feto, sino que también desempeña un papel clave en la modulación inmunológica. Un componente esencial de este proceso es la participación de los macrófagos deciduales y fetales, que regulan el ambiente inflamatorio y favorecen la invasión trofoblástica mediante la secreción de citoquinas y factores angiogénicos [71]

En este contexto, las células Hofbauer, como macrófagos residentes en la placenta, son cruciales para mantener el equilibrio inmunológico en la interfaz materno-fetal. Localizadas en cercanía con el endotelio y el trofoblasto, estas células juegan un papel importante en la regulación de la función de estas otras células, mediando su actividad a través de señales paracrinas o interacción directa. [84]. Los HBC generalmente muestran características asociadas a los macrófagos tipo M2, los cuales se caracterizan por su rol en la resolución de la inflamación y la promoción de la reparación tisular. Los macrófagos M2 suelen estar involucrados en respuestas inmunológicas antiinflamatorias, la secreción de factores que favorecen la angiogénesis [85], y la remodelación del tejido. Además, presentan un metabolismo orientado hacia la oxidación de ácidos grasos y la síntesis de proteínas antiinflamatorias, lo que les permite contribuir a un ambiente placentario favorable para el desarrollo fetal.

Sin embargo, las células Hofbauer exhiben una notable plasticidad, lo que les permite ajustar su comportamiento en respuesta a los cambios del microambiente. Esto implica que pueden modificar su fenotipo y función según las señales que reciben, adaptándose a situaciones específicas durante el embarazo, como infecciones o complicaciones que alteran el equilibrio inmunológico y vascular en la placenta [84]

Considerando la naturaleza diferencial de los sistemas inmunes entre hombres y mujeres, es fundamental explorar si existen variaciones en las características y funciones de las células Hofbauer durante el embarazo, dado su potencial impacto en la respuesta inmunitaria y el desarrollo placentario.

En el presente trabajo, primero se analizó el microambiente en el que se encuentran los HBC, a partir de muestras de placetas a término de pacientes sanas, para dilucidar si las diferencias sexuales están presentes en este entorno. Posteriormente, se estudió la caracterización de estas células, prestando especial atención a las posibles diferencias sexuales en su funcionamiento. En particular, se

analizó su metabolismo para determinar si existen dependencia diferencial según el sexo del neonato, tanto en sus características basales como en su respuesta a un estímulo proinflamatorio inducido por LPS. Este enfoque permitió investigar cómo el sexo podría influir en la plasticidad funcional de los macrófagos placentarios, especialmente en su capacidad para modular su actividad metabólica e inmunológica bajo condiciones de inflamación. La comprensión de estas diferencias podría proporcionar información clave sobre el impacto del sexo en la regulación del microambiente placentario y el desarrollo fetal.

Los resultados obtenidos evidencian diferencias en el transcriptoma del microambiente placentario según el sexo del neonato. En particular, las muestras femeninas tienden a expresar genes asociados a procesos antiinflamatorios y al metabolismo lipídico. Estas diferencias están estrechamente vinculadas a la expresión diferencial de genes ligados a los cromosomas X e Y, en concordancia con estudios que describen el dimorfismo sexual en la placenta [5], [86], [87]. La validación *in vitro* de los análisis bioinformáticos confirmó que las muestras femeninas presentan una menor producción del factor proinflamatorio IL-1 β y una mayor producción del factor antiinflamatorio IL-10, en comparación con las muestras masculinas. Además, los explantes placentarios femeninos mostraron una mayor expresión de genes antiinflamatorios como TGF- β 1 y una menor expresión de genes proinflamatorios como TNF- α . Estos hallazgos se alinean con la amplia evidencia que indica que el sistema inmune femenino tiende a ser más antiinflamatorio que el masculino [55], [88], lo que podría tener implicaciones en la respuesta inmunológica durante el desarrollo fetal y en la susceptibilidad a enfermedades inflamatorias a lo largo de la vida.

Por otro lado, las muestras femeninas mostraron un aumento en la expresión de TLR4 y un enriquecimiento de las vías asociadas a este receptor, según los análisis de GSEA. A nivel regulatorio, se identificaron patrones de correlación diferencial según el sexo: en muestras masculinas, TLR4 presentó una correlación positiva tanto con el gen proinflamatorio IL-6 como con el gen antiinflamatorio TGF- β 1. En contraste, en muestras femeninas, TLR4 mostró una correlación negativa con TNF- α y positiva con los genes antiinflamatorios IL-10 e IDO-1. Estudios previos han reportado una alta inmunoreactividad de TLR4 en la vellosidad y en los trofoblastos intermedios de placetas humanas [89], [90], [90]. Sin embargo, los resultados de este trabajo revelan que la expresión de este factor también está modulada por el sexo del neonato evidenciando que se necesitan hacer más estudios complementarios para dilucidar la vía de TLR4 en HBC masculinos y femeninos.

En conjunto, estos resultados demuestran la existencia de un **microambiente inmunológico diferencial** en la vellosidad placentaria a término, con un perfil más antiinflamatorio en fetos femeninos y una **regulación diferencial del eje TLR4-citoquinas mediado según el sexo**.

Tras establecer las diferencias sexuales a nivel transcriptómica del microambiente placentario, se procedió a estudiar las células Hofbauer provenientes de los explantes de placenta para evaluar si estas diferencias también se manifestaban a nivel celular.

Se observó que los HBCs femeninas presentaron una mayor proporción de células dobles positivas para los receptores CD14/CD36, así como una mayor expresión de los marcadores CD39 y CD206. Además, mostraron una reducción en la producción de IL-1 β y una relación IL-10/IL-1 β significativamente mayor  comparación con las células masculinas. Estos hallazgos indican que los **HBCs femeninas** exhiben un perfil inmunológico más orientado hacia una **respuesta antiinflamatoria y reguladora**, lo que sugiere un **fenotipo alternativo más pronunciado** en comparación con los HBC masculinas.

Dado que la resolución de la inflamación es un proceso clave para el mantenimiento de la homeostasis placentaria, resulta fundamental estudiar la capacidad de las células Hofbauer para llevar a cabo la eferocitosis, es decir, la eliminación de cuerpos apoptóticos. En este sentido, los resultados muestran que **los HBC femeninas realizan más eferocitosis** y presentan una mayor eficiencia en este proceso en comparación con las masculinas. Esta diferencia sugiere que los HBC femeninas desempeñan un papel más activo en la regulación del microambiente inmunológico placentario, promoviendo una respuesta antiinflamatoria más eficiente. Además, considerando que la eferocitosis no solo está mediada por marcadores celulares específicos, sino que también depende del estado metabólico de la célula, fue relevante explorar si existen diferencias metabólicas dependientes del sexo del neonato que puedan modular esta función. Tales diferencias podrían influir en la capacidad de los HBC para regular el equilibrio inmunológico placentario y, potencialmente, en el desarrollo de complicaciones gestacionales asociadas a un desbalance en la respuesta inflamatoria.

Fue llamativo encontrar que los HBC tienen distinta dependencia metabólica según el sexo del neonato. Mientras que los HBC masculinos utilizan una vía más glucolítica, los HBC femenino utilizaban preferencialmente la oxidación de ácidos grasos. Esto podría ser un hallazgo importante que permita entender la

susceptibilidad de los fetos masculinos frente a agentes biológicos y químicos, ya que variaciones en la concentración de glucosa materna podría afectar el metabolismo no solo de los HBC sino de la unidad placentaria. En línea con esto, la respuesta diferencial frente al LPS observada ~~no~~^{solamente} en las células aisladas también en la vellosidad evidencia una necesidad de explorar mecanismos celulares según el sexo. Recientemente un trabajo publicado en el 2022 demostró que los HBC femenino tienen mayor expresión de TLR4 y que estos resuleven mejor tanto una infección bacteriana como viral. A su vez siguen montando una respuesta robusta ~~en~~ la secreción de mediadores antiinflamatorios como proinflamatorios. [91]

Este estudio enfocado en las diferencias asociadas al sexo en los HBC, en particular en lo referido a perfiles metabólicos celulares, aporta evidencias originales a los hallazgos previos acerca de diferencias fenotípicas de HBC y diferencias en el curso del embarazo asociadas al sexo del feto. En particular abren nuevas perspectivas no sólo para comprender las complicaciones de la gestación asociadas a déficit placentario por compromiso inflamatorio y vascular, sino también por eventos nutricionales o trastornos metabólicos de la madre previos o que aparecen en la gestación. Los resultados de este estudio comprendieron a una población pequeña de mujeres con gestación normal, segregada según el sexo del neonato. Estos estudios están siendo ampliados con N mayores y en distintas poblaciones con el objetivo de aportar nuevo conocimiento y validar nuestras observaciones iniciales.

Referencias

- [1] Loke, Y. W., *Human trophoblast antigens. Immunology of Pregnancy and its Disorders*. 1995.
- [2] A. Moffett y C. Loke, «Immunology of placentation in eutherian mammals», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, n.º 8, pp. 584-594, ago. 2006, doi: 10.1038/nri1897.
- [3] E. R. Norwitz, D. J. Schust, y S. J. Fisher, «Implantation and the Survival of Early Pregnancy», *N. Engl. J. Med.*, vol. 345, n.º 19, pp. 1400-1408, nov. 2001, doi: 10.1056/NEJMra000763.
- [4] Á. Martín y M. J. De Los Santos, «The first choice of the preimplantation embryo: How compaction and polarity build cell identity», *Med. Reprod. Embriología Clínica*, vol. 7, n.º 1, pp. 23-32, ene. 2020, doi: 10.1016/j.medre.2020.01.001.
- [5] A. Gabory, T. J. Roseboom, T. Moore, L. G. Moore, y C. Junien, «Placental contribution to the origins of sexual dimorphism in health and diseases: sex chromosomes and epigenetics», *Biol. Sex Differ.*, vol. 4, n.º 1, p. 5, dic. 2013, doi: 10.1186/2042-6410-4-5.
- [6] V. A. Fontana, *Citoquinas: el lenguaje del diálogo materno-embionario*. en Quim Viva. Buenos Aires, 2008.
- [7] S.-M. Kim y J.-S. Kim, «A Review of Mechanisms of Implantation», *Dev. Reprod.*, vol. 21, n.º 4, pp. 351-359, dic. 2017, doi: 10.12717/DR.2017.21.4.351.
- [8] J. Muter, V. J. Lynch, R. C. McCoy, y J. J. Brosens, «Human embryo implantation», *Development*, vol. 150, n.º 10, p. dev201507, may 2023, doi: 10.1242/dev.201507.
- [9] A. L. Fowden, A. J. Forhead, P. M. Coan, y G. J. Burton, «The Placenta and Intrauterine Programming», *J. Neuroendocrinol.*, vol. 20, n.º 4, pp. 439-450, abr. 2008, doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01663.x.
- [10] V. M. Abrahams *et al.*, «Divergent Trophoblast Responses to Bacterial Products Mediated by TLRs», *J. Immunol.*, vol. 173, n.º 7, pp. 4286-4296, oct. 2004, doi: 10.4049/jimmunol.173.7.4286.
- [11] K. Racicot, J. Kwon, P. Aldo, M. Silasi, y G. Mor, «Understanding the Complexity of the Immune System during Pregnancy», *Am. J. Reprod. Immunol.*, vol. 72, n.º 2, pp. 107-116, ago. 2014, doi: 10.1111/aji.12289.
- [12] G. Gaunt y K. Ramin, «Immunological Tolerance of the Human Fetus», *Am. J. Perinatol.*, vol. 18, n.º 06, pp. 299-312, 2001, doi: 10.1055/s-2001-17861.
- [13] G. Mor, P. Aldo, y A. B. Alvero, «The unique immunological and microbial aspects of pregnancy», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 17, n.º 8, pp. 469-482, ago. 2017, doi: 10.1038/nri.2017.64.

- [14] R. H. Choudhury, C. E. Dunk, S. J. Lye, J. D. Aplin, L. K. Harris, y R. L. Jones, «Extravillous Trophoblast and Endothelial Cell Crosstalk Mediates Leukocyte Infiltration to the Early Remodeling Decidual Spiral Arteriole Wall», *J. Immunol.*, vol. 198, n.º 10, pp. 4115-4128, may 2017, doi: 10.4049/jimmunol.1601175.
- [15] B. Peng, K. Koga, I. Cardenas, P. Aldo, y G. Mor, «Phagocytosis of Apoptotic Trophoblast Cells by Human Endometrial Endothelial Cells Induces Proinflammatory Cytokine Production», *Am. J. Reprod. Immunol.*, vol. 64, n.º 1, pp. 12-19, jul. 2010, doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00815.x.
- [16] H. Tao *et al.*, «Immunomodulatory effect of efferocytosis at the maternal–fetal interface», *Cell Commun. Signal.*, vol. 23, n.º 1, p. 49, ene. 2025, doi: 10.1186/s12964-025-02055-9.
- [17] G. Mor, I. Cardenas, V. Abrahams, y S. Guller, «Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site», *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1221, n.º 1, pp. 80-87, mar. 2011, doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x.
- [18] S. Fest *et al.*, «Trophoblast–Macrophage Interactions: a Regulatory Network for the Protection of Pregnancy», *Am. J. Reprod. Immunol.*, vol. 57, n.º 1, pp. 55-66, ene. 2007, doi: 10.1111/j.1600-0897.2006.00446.x.
- [19] V. Plaks *et al.*, «Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice», *J. Clin. Invest.*, p. JCI36682, nov. 2008, doi: 10.1172/JCI36682.
- [20] F. Gao *et al.*, «Myeloperoxidase-mediated immature dendritic cell promotes vascular remodeling and functional placenta formation», *Placenta*, vol. 161, pp. 1-13, mar. 2025, doi: 10.1016/j.placenta.2025.01.006.
- [21] C. Nagler-Anderson, A. K. Bhan, D. K. Podolsky, y C. Terhorst, «Control freaks: immune regulatory cells», *Nat. Immunol.*, vol. 5, n.º 2, pp. 119-122, feb. 2004, doi: 10.1038/ni0204-119.
- [22] Y. Zhang, Z. Liu, y H. Sun, «Fetal-maternal interactions during pregnancy: a ‘three-in-one’ perspective», *Front. Immunol.*, vol. 14, p. 1198430, jun. 2023, doi: 10.3389/fimmu.2023.1198430.
- [23] M. Andreeescu, «Correlation Between Maternal-Fetus Interface and Placenta-Mediated Complications», *Cureus*, jun. 2024, doi: 10.7759/cureus.62457.
- [24] P. Parham, «NK Cells and Trophoblasts», *J. Exp. Med.*, vol. 200, n.º 8, pp. 951-955, oct. 2004, doi: 10.1084/jem.20041783.
- [25] M. H. Abumaree, P. R. Stone, y L. W. Chamley, «The effects of apoptotic, deported human placental trophoblast on macrophages: Possible consequences for pregnancy», *J. Reprod. Immunol.*, vol. 72, n.º 1-2, pp. 33-45, dic. 2006, doi: 10.1016/j.jri.2006.03.001.
- [26] G. Mor y I. Cardenas, «REVIEW ARTICLE: The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity», *Am. J. Reprod. Immunol.*, vol. 63, n.º 6, pp. 425-433, jun. 2010, doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x.

- [27] C. W. G. Redman y I. L. Sargent, «REVIEW ARTICLE: Immunology of Pre-Eclampsia», *Am. J. Reprod. Immunol.*, vol. 63, n.º 6, pp. 534-543, jun. 2010, doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00831.x.
- [28] B. Huppertz, G. Weiss, y G. Moser, «Trophoblast invasion and oxygenation of the placenta: measurements versus presumptions», *J. Reprod. Immunol.*, vol. 101-102, pp. 74-79, mar. 2014, doi: 10.1016/j.jri.2013.04.003.
- [29] Y. Seval, E. T. Korgun, y R. Demir, «Hofbauer Cells in Early Human Placenta: Possible Implications in Vasculogenesis and Angiogenesis», *Placenta*, vol. 28, n.º 8-9, pp. 841-845, ago. 2007, doi: 10.1016/j.placenta.2007.01.010.
- [30] L. Reyes y T. G. Golos, «Hofbauer Cells: Their Role in Healthy and Complicated Pregnancy», *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 2628, nov. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.02628.
- [31] K. Ingman, V. J. K. W. Cookson, C. J. P. Jones, y J. D. Aplin, «Characterisation of Hofbauer Cells in First and Second Trimester Placenta: Incidence, Phenotype, Survival in vitro and Motility», *Placenta*, vol. 31, n.º 6, pp. 535-544, jun. 2010, doi: 10.1016/j.placenta.2010.03.003.
- [32] M. León-Juárez *et al.*, «Cellular and molecular mechanisms of viral infection in the human placenta», *Pathog. Dis.*, vol. 75, n.º 7, sep. 2017, doi: 10.1093/femspd/ftx093.
- [33] R. Shepherd, A. S. Cheung, K. Pang, R. Saffery, y B. Novakovic, «Sexual Dimorphism in Innate Immunity: The Role of Sex Hormones and Epigenetics», *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 604000, ene. 2021, doi: 10.3389/fimmu.2020.604000.
- [34] J. R. Thomas *et al.*, «Primitive haematopoiesis in the human placenta gives rise to macrophages with epigenetically silenced HLA-DR», *Nat. Commun.*, vol. 14, n.º 1, p. 1764, mar. 2023, doi: 10.1038/s41467-023-37383-2.
- [35] M. Z. Zulu, F. O. Martinez, S. Gordon, y C. M. Gray, «The Elusive Role of Placental Macrophages: The Hofbauer Cell», *J. Innate Immun.*, vol. 11, n.º 6, pp. 447-456, 2019, doi: 10.1159/000497416.
- [36] J. R. Thomas *et al.*, «Phenotypic and functional characterization of first-trimester human placental macrophages, Hofbauer cells», *J. Exp. Med.*, vol. 218, n.º 1, p. e20200891, ene. 2021, doi: 10.1084/jem.20200891.
- [37] C. Megli y C. B. Coyne, «Gatekeepers of the fetus: Characterization of placental macrophages», *J. Exp. Med.*, vol. 218, n.º 1, p. e20202071, ene. 2021, doi: 10.1084/jem.20202071.
- [38] L. A. J. O'Neill, R. J. Kishton, y J. Rathmell, «A guide to immunometabolism for immunologists», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 16, n.º 9, pp. 553-565, sep. 2016, doi: 10.1038/nri.2016.70.
- [39] M. N. Artyomov y J. Van Den Bossche, «Immunometabolism in the Single-Cell Era», *Cell Metab.*, vol. 32, n.º 5, pp. 710-725, nov. 2020, doi: 10.1016/j.cmet.2020.09.013.

- [40] I. Tabas y K. E. Bornfeldt, «Intracellular and Intercellular Aspects of Macrophage Immunometabolism in Atherosclerosis», *Circ. Res.*, vol. 126, n.º 9, pp. 1209-1227, abr. 2020, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315939.
- [41] A. Viola, F. Munari, R. Sánchez-Rodríguez, T. Scolaro, y A. Castegna, «The Metabolic Signature of Macrophage Responses», *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 1462, jul. 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.01462.
- [42] E. L. Mills *et al.*, «Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages», *Cell*, vol. 167, n.º 2, pp. 457-470.e13, oct. 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.08.064.
- [43] E. L. Mills y L. A. O'Neill, «Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal», *Eur. J. Immunol.*, vol. 46, n.º 1, pp. 13-21, ene. 2016, doi: 10.1002/eji.201445427.
- [44] I. L. M. H. Aye, C. E. Aiken, D. S. Charnock-Jones, y G. C. S. Smith, «Placental energy metabolism in health and disease—significance of development and implications for preeclampsia», *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 226, n.º 2, pp. S928-S944, feb. 2022, doi: 10.1016/j.ajog.2020.11.005.
- [45] A. L. Magnusson-Olsson, S. Lager, B. Jacobsson, T. Jansson, y T. L. Powell, «Effect of maternal triglycerides and free fatty acids on placental LPL in cultured primary trophoblast cells and in a case of maternal LPL deficiency», *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.*, vol. 293, n.º 1, pp. E24-E30, jul. 2007, doi: 10.1152/ajpendo.00571.2006.
- [46] K. Kolahi, S. Louey, O. Varlamov, y K. Thornburg, «Real-Time Tracking of BODIPY-C12 Long-Chain Fatty Acid in Human Term Placenta Reveals Unique Lipid Dynamics in Cytotrophoblast Cells», *PLOS ONE*, vol. 11, n.º 4, p. e0153522, abr. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0153522.
- [47] A.-M. Dobri, M. Dudău, A.-M. Enciu, y M. E. Hinescu, «CD36 in Alzheimer's Disease: An Overview of Molecular Mechanisms and Therapeutic Targeting», *Neuroscience*, vol. 453, pp. 301-311, ene. 2021, doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.11.003.
- [48] J. Mayrink, D. F. Leite, G. M. Nobrega, M. L. Costa, y J. G. Cecatti, «Prediction of pregnancy-related hypertensive disorders using metabolomics: a systematic review», *BMJ Open*, vol. 12, n.º 4, p. e054697, abr. 2022, doi: 10.1136/bmjopen-2021-054697.
- [49] D. Detraux y P. Renard, «Succinate as a New Actor in Pluripotency and Early Development?», *Metabolites*, vol. 12, n.º 7, p. 651, jul. 2022, doi: 10.3390/metabo12070651.
- [50] S. G. S. Verberk, K. E. De Goede, F. S. Gorki, X. A. M. H. Van Dierendonck, R. J. Argüello, y J. Van Den Bossche, «An integrated toolbox to profile macrophage immunometabolism», *Cell Rep. Methods*, vol. 2, n.º 4, p. 100192, abr. 2022, doi: 10.1016/j.crmeth.2022.100192.
- [51] S. K. Wculek, G. Dunphy, I. Heras-Murillo, A. Mastrangelo, y D. Sancho, «Metabolism of tissue macrophages in homeostasis and pathology», *Cell. Mol.*

Immunol., vol. 19, n.º 3, pp. 384-408, mar. 2022, doi: 10.1038/s41423-021-00791-9.

- [52] Y. Sheng *et al.*, «An imbalance of the IL-33/ST2-AXL-efferocytosis axis induces pregnancy loss through metabolic reprogramming of decidual macrophages», *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 79, n.º 3, p. 173, mar. 2022, doi: 10.1007/s00018-022-04197-2.
- [53] F. Merech *et al.*, «Monocyte immunometabolic reprogramming in human pregnancy: contribution of trophoblast cells», *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.*, vol. 326, n.º 3, pp. E215-E225, mar. 2024, doi: 10.1152/ajpendo.00357.2023.
- [54] S. Jaillon, K. Berthenet, y C. Garlanda, «Sexual Dimorphism in Innate Immunity», *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, vol. 56, n.º 3, pp. 308-321, jun. 2019, doi: 10.1007/s12016-017-8648-x.
- [55] S. L. Klein y K. L. Flanagan, «Sex differences in immune responses», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 16, n.º 10, pp. 626-638, oct. 2016, doi: 10.1038/nri.2016.90.
- [56] J. G. Eriksson, E. Kajantie, C. Osmond, K. Thornburg, y D. J. P. Barker, «Boys live dangerously in the womb», *Am. J. Hum. Biol.*, vol. 22, n.º 3, pp. 330-335, may 2010, doi: 10.1002/ajhb.20995.
- [57] K. J. Baines y R. C. West, «Sex differences in innate and adaptive immunity impact fetal, placental, and maternal health», *Biol. Reprod.*, vol. 109, n.º 3, pp. 256-270, sep. 2023, doi: 10.1093/biolre/ioad072.
- [58] J. Weng, C. Couture, y S. Girard, «Innate and Adaptive Immune Systems in Physiological and Pathological Pregnancy», *Biology*, vol. 12, n.º 3, p. 402, mar. 2023, doi: 10.3390/biology12030402.
- [59] L. Aibar, A. Puertas, M. Valverde, M. P. Carrillo, y F. Montoya, «Fetal sex and perinatal outcomes», *jpme*, vol. 40, n.º 3, pp. 271-276, abr. 2012, doi: 10.1515/jpm-2011-0137.
- [60] N. Melamed, Y. Yogeved, y M. Glezerman, «Fetal gender and pregnancy outcome», *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, vol. 23, n.º 4, pp. 338-344, abr. 2010, doi: 10.3109/14767050903300969.
- [61] J. G. Markle y E. N. Fish, «SeXX matters in immunity», *Trends Immunol.*, vol. 35, n.º 3, pp. 97-104, mar. 2014, doi: 10.1016/j.it.2013.10.006.
- [62] M. E. Rodríguez, «Complicaciones maternas», *Rev. Soc. Argent. Diabetes*, vol. 57, n.º 3Sup, pp. 15-15, ago. 2023, doi: 10.47196/diab.v57i3Sup.670.
- [63] «Fetal sex-specific differences in gestational age at delivery in pre-eclampsia: a meta-analysis», *Int. J. Epidemiol.*, p. dyw178, sep. 2016, doi: 10.1093/ije/dyw178.
- [64] D. Crisol-Deza, J. Zurita-Borja, Y. Crisol-Deza, y M. Zurita-Borja, «Relación entre preeclampsia y parto prematuro: Impacto en la vida del feto y la madre», *Rev. Int. Salud Materno Fetal*, pp. c4-c6, ene. 2023, doi: 10.47784/rismf.2023.8.1.225.

- [65] B. Wetzka, D. E. Clark, D. S. Charnock-Jones, H. P. Zahradník, y S. K. Smith, «Isolation of macrophages (Hofbauer cells) from human term placenta and their prostaglandin E2 and thromboxane production», *Hum. Reprod.*, vol. 12, n.º 4, pp. 847-852, abr. 1997, doi: 10.1093/humrep/12.4.847.
- [66] D. Paparini *et al.*, «Growth impairment, increased placental glucose uptake and altered transplacental transport in VIP deficient pregnancies: Maternal vs. placental contributions», *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.*, vol. 1867, n.º 10, p. 166207, oct. 2021, doi: 10.1016/j.bbadi.2021.166207.
- [67] D. Paparini *et al.*, «Acetylcholine contributes to control the physiological inflammatory response during the peri-implantation period», *Acta Physiol.*, vol. 214, n.º 2, pp. 237-247, jun. 2015, doi: 10.1111/apha.12494.
- [68] A. Appios, J. Thomas, y N. McGovern, «Isolation of First-Trimester and Full-term Human Placental Hofbauer Cells», *BIO-Protoc.*, vol. 11, n.º 11, 2021, doi: 10.21769/BioProtoc.4044.
- [69] G. Calo *et al.*, «Trophoblast cells inhibit neutrophil extracellular trap formation and enhance apoptosis through vasoactive intestinal peptide-mediated pathways», *Hum. Reprod.*, p. humrep;dew292v1, dic. 2016, doi: 10.1093/humrep/dew292.
- [70] G. Calo *et al.*, «Interplay between neutrophils and trophoblast cells conditions trophoblast function and triggers vascular transformation signals», *J. Cell. Physiol.*, vol. 235, n.º 4, pp. 3592-3603, abr. 2020, doi: 10.1002/jcp.29247.
- [71] J. Svensson, M. C. Jenmalm, A. Matussek, R. Geffers, G. Berg, y J. Ernerudh, «Macrophages at the Fetal–Maternal Interface Express Markers of Alternative Activation and Are Induced by M-CSF and IL-10», *J. Immunol.*, vol. 187, n.º 7, pp. 3671-3682, oct. 2011, doi: 10.4049/jimmunol.1100130.
- [72] F. Merech *et al.*, «Vasoactive Intestinal Peptide induces glucose and neutral amino acid uptake through mTOR signalling in human cytotrophoblast cells», *Sci. Rep.*, vol. 9, n.º 1, p. 17152, nov. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-53676-3.
- [73] D. E. Paparini *et al.*, «Sex-specific phenotypical, functional and metabolic profiles of human term placenta macrophages», *Biol. Sex Differ.*, vol. 15, n.º 1, p. 80, oct. 2024, doi: 10.1186/s13293-024-00652-w.
- [74] P. E. Verburg, G. Tucker, W. Scheil, J. J. H. M. Erwich, G. A. Dekker, y C. T. Roberts, «Sexual Dimorphism in Adverse Pregnancy Outcomes - A Retrospective Australian Population Study 1981-2011», *PLOS ONE*, vol. 11, n.º 7, p. e0158807, jul. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0158807.
- [75] E. Elsmén, K. Källén, K. Maršál, y L. Hellström-Westas, «Fetal gender and gestational-age-related incidence of pre-eclampsia», *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, vol. 85, n.º 11, pp. 1285-1291, nov. 2006, doi: 10.1080/00016340600578274.
- [76] D. E. Zazara y P. C. Arck, «Developmental origin and sex-specific risk for infections and immune diseases later in life», *Semin. Immunopathol.*, vol. 41, n.º 2, pp. 137-151, mar. 2019, doi: 10.1007/s00281-018-0713-x.

- [77] K. H. Beilby *et al.*, «Offspring physiology following the use of IVM, IVF and ICSI: a systematic review and meta-analysis of animal studies», *Hum. Reprod. Update*, vol. 29, n.º 3, pp. 272-290, may 2023, doi: 10.1093/humupd/dmac043.
- [78] A. Maxwell *et al.*, «Intrinsic sexual dimorphism in the placenta determines the differential response to benzene exposure», *iScience*, vol. 26, n.º 4, p. 106287, abr. 2023, doi: 10.1016/j.isci.2023.106287.
- [79] S. Falahi, A. Abdoli, y A. Kenarkoohi, «Maternal COVID-19 infection and the fetus: Immunological and neurological perspectives», *New Microbes New Infect.*, vol. 53, p. 101135, jun. 2023, doi: 10.1016/j.nmni.2023.101135.
- [80] T. Forsen, J. G. Eriksson, J. Tuomilehto, C. Osmond, y D. J. P. Barker, «Growth in utero and during childhood among women who develop coronary heart disease: longitudinal study», *BMJ*, vol. 319, n.º 7222, pp. 1403-1407, nov. 1999, doi: 10.1136/bmj.319.7222.1403.
- [81] B. D. Taylor *et al.*, «The impact of female fetal sex on preeclampsia and the maternal immune milieu», *Pregnancy Hypertens.*, vol. 12, pp. 53-57, abr. 2018, doi: 10.1016/j.preghy.2018.02.009.
- [82] H. Miremberg *et al.*, «Placental vascular lesions differ between male and female fetuses in early-onset preeclampsia», *Arch. Gynecol. Obstet.*, vol. 306, n.º 3, pp. 717-722, nov. 2021, doi: 10.1007/s00404-021-06328-9.
- [83] I. Capone, P. Marchetti, P. A. Ascierto, W. Malorni, y L. Gabriele, «Sexual Dimorphism of Immune Responses: A New Perspective in Cancer Immunotherapy», *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 552, mar. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00552.
- [84] L. Reyes y T. G. Golos, «Hofbauer Cells: Their Role in Healthy and Complicated Pregnancy», *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 2628, nov. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.02628.
- [85] S. Gordon y F. O. Martinez, «Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions», *Immunity*, vol. 32, n.º 5, pp. 593-604, may 2010, doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.007.
- [86] S. Buckberry, T. Bianco-Miotto, S. J. Bent, G. A. Dekker, y C. T. Roberts, «Integrative transcriptome meta-analysis reveals widespread sex-biased gene expression at the human fetal-maternal interface», *Mol. Hum. Reprod.*, vol. 20, n.º 8, pp. 810-819, ago. 2014, doi: 10.1093/molehr/gau035.
- [87] P. Yu, Y. Chen, C. Ge, y H. Wang, «Sexual dimorphism in placental development and its contribution to health and diseases», *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 51, n.º 6, pp. 555-570, jul. 2021, doi: 10.1080/10408444.2021.1977237.
- [88] A. E. Braun *et al.*, «Sex at the interface: the origin and impact of sex differences in the developing human placenta», *Biol. Sex Differ.*, vol. 13, n.º 1, p. 50, sep. 2022, doi: 10.1186/s13293-022-00459-7.
- [89] U. Holmlund *et al.*, «Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta»,

Immunology, vol. 107, n.º 1, pp. 145-151, sep. 2002, doi: 10.1046/j.1365-2567.2002.01491.x.

- [90] P. Firmal, V. K. Shah, y S. Chattopadhyay, «Insight Into TLR4-Mediated Immunomodulation in Normal Pregnancy and Related Disorders», *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 807, may 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.00807.
- [91] P. Pantazi *et al.*, «Placental macrophage responses to viral and bacterial ligands and the influence of fetal sex», *iScience*, vol. 25, n.º 12, p. 105653, dic. 2022, doi: 10.1016/j.isci.2022.105653.

Los resultados se publicaron parcialmente en:

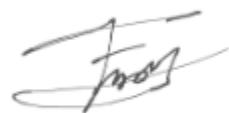
La siguiente lista de producción demuestra mi contribución como pasante (2023) y luego tesista de grado (2024) en el Laboratorio Inmunofarmacología, bajo la dirección del Dr. Daniel Paparini.

Revista (cita): Daniel E. Paparini, Esteban Grasso, **Franco Aguilera**, M. Agustina Arslanian, Victoria Lella, Brenda Lara, Ana Schaffir, Soledad Gori, Fátima Merech, Vanesa Hauk, Claudio Schuster, Marcelo A. Martí, Cesar Meller, Rosanna Ramhorst, Daiana Vota & Claudia Pérez Leirós. Sex-specific phenotypical, functional and metabolic profiles of human term placental macrophages. *Biology of Sex Differences*. 2024 Oct 17;15(1):80. doi: 10.1186/s13293-024-00652-w.

Comunicaciones a congresos:

1. **Aguilera, F.**; Avalos, J.; Lara, B.; Grasso, E.; Castagnola, L; Schafir, A.; Ríos, D.M.; Britos, C.; Schapira, M.; Mariani, C.; Meller, C.; Charó, N.; Ramhorst, R.; Hauk, V.; Martí, M.; Vota, D.; Pérez Leirós, C. & Paparini, D. **Sex differences in the effect of extracellular vesicles from human term placental villi on macrophage immunometabolism and endothelial cell function.** Latin American and Caribbean Immunology Congress, SAI, AINCA & IUIS. Buenos Aires Argentina. 2024.
2. Avalos, J.; **Aguilera, F.**; Lara, B.; Grasso, E.; Schafir, A.; Ríos, D.M.; Britos, C.; Schapira, M.; Mariani, C.; Meller, C.; Ramhorst, R.; Merech, F.; Hauk, V.; Martí, M.; Vota, D.; Pérez Leirós, C. & Paparini, D. **Diferencias sexuales en el efecto de vesículas extracelulares placentarias humanas en el inmunometabolismo de macrófagos.** Grupo Argentino de Vesículas Extracelulares (GAVE). Buenos Aires, Argentina 2024.
3. D. Paparini, E. Grasso, **F. Aguilera**, B. Lara, M. A. Arslanian, V. Lella, V. Hauk, F. Merech, C. Schuster, S. Gori, C. Meller, M. Martí, R. Ramhorst, D. Vota & C. Pérez Leirós. **Sexual dimorphism in the immunometabolic profile of Hofbauer cells.**, LXXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología, San Luis, Argentina 2023. **Premio al mejor trabajo presentado**
4. D. Paparini, E. Grasso, **F. Aguilera**, B. Lara, V. Hauk, F. Merech, C. Schuster, M. A.

Arslanian, V. Lella, C Meller, M. Martí, R. Ramhorst, D. Vota & C. Pérez Leirós. **Extracellular vesicles of first trimester trophoblast cell line induced anti-inflammatory signals in HB cells and circulating monocytes: Regulation of VIP/VPAC2 system.** GAVE. Buenos Aires, Argentina 2023



Julio Franco Aguilera
Tesisista



Dr. Daniel Esteban Paparini
Director



Dr. Marcelo Adrián Martí
Co-Director