



Estandarización del aislamiento y caracterización de células estromales de decidua y útero murinos[✉]

*Standardization of isolation and characterization of decidual stromal cells
and murine uterus*

*Estandarização do isolamento e caracterização de células estromales de decidua e
útero murinos*

Lina Cadavid¹, Bact, MS; Cristina Ávila¹, Biól, MS; Ángela Cadavid^{1*}, MD, MS, Dr Sci.

¹Grupo Reproducción, Carrera 53 N° 61 - 30, Sede de Investigación Universitaria (SIU), Universidad de Antioquia -
Laboratorio 534, Medellín-Colombia. Teléfono: 57-4-2196476, Fax: 57-4-2106470.

(Recibido: 9 octubre, 2008; aceptado: 11 agosto, 2009)

Resumen

Las células estromales son las células más abundantes presentes en la decidua y juegan un papel muy importante durante la implantación, la nutrición fetal y el mantenimiento del embarazo. Los procedimientos que se han descrito para el aislamiento de células estromales requieren el uso de muchos anticuerpos monoclonales ya que hay contaminación con otros tipos celulares en la decidua y además algunos marcadores característicos de células estromales, muestran variabilidad en los diferentes días de la gestación. En este estudio se estandarizó un procedimiento de aislamiento por digestión enzimática, gradiente de densidad y adherencia al plástico y se caracterizaron las células estromales murinas por exclusión de marcadores que se expresan en macrófagos (F4-80), células epiteliales y trofoblasto (citoqueratina-7), obteniéndose un 98% de células negativas para estos marcadores que correspondería a las células estromales. Esta técnica de aislamiento permite obtener células estromales con métodos menos costosos y altamente eficientes que facilita el acceso a un modelo celular de gran utilidad en el estudio de la fisiología de la gestación en diferentes especies.

Palabras clave: células BeWo, células estromales, células HeLa, decidua murina, macrófagos deciduales.

Summary

Stromal cells are the most abundant cell population present in decidual tissue; they are involved in key processes during embryo implantation, fetal nutrition and the pregnancy maintenance. Described

✉ Para citar este artículo: Cadavid L, Ávila C, Cadavid A. Estandarización del aislamiento y caracterización de células estromales de decidua y útero murinos. Rev Colomb Cienc Pecu 2009; 22: 632-641

* Autor para correspondencia: Grupo Reproducción, Carrera 53 N° 61 - 30, Sede de Investigación Universitaria (SIU), Universidad de Antioquia - Laboratorio 534, Medellín-Colombia. Teléfono: 57-4-2196476, Fax: 57-4-2196470. e-mail: angelap.cadavid@gmail.com

procedures for stromal cells isolation require the use of many monoclonal antibodies due to contamination with another cell types in the decidua; besides, some markers of stromal cells show variability during the days of gestation. In this study, we standardized a procedure for isolation by enzymatic digestion, density gradient and adherence to plastic. Murine stromal cells were characterized by exclusion of markers that are expressed in macrophages (F4-80), epithelial cells and trophoblast (cytokeratin-7), yielding a 98% of negative cells for these markers that correspond to stromal cells. This isolation procedure permits to obtain stromal cells with less expensive and high efficiency methods that provide a useful cellular model to study the physiology of gestation in different species.

Key words: *BeWo cells, decidual macrophages, HeLa cells, murine decidua, stromal cells.*

Resumo

As células estromales são as células mais abundantes presentes na decídua e tem um papel muito importante durante a implementação, a nutrição fetal e a manutenção da gravidez. Os procedimentos descritos para o isolamento das células estromales necessitam o uso de muitos anticorpos monoclonais já que há contaminação com outros tipos celulares na decídua e demais alguns marcadores característicos das células estromales que tem variabilidade nos diferentes dias de gestação. No presente trabalho foi estandardizado um procedimento de isolamento por digestão enzimática, gradiente de densidade e aderência ao plástico e foram caracterizados as células estromales murinas por exclusão de marcadores que expressão em macrófagos (F4-80), células epiteliais e trofoblasto (citoqueratina-7), obtendo-se um 98% de células negativas para estes marcadores que corresponderia às células estromales. Esta técnica de isolamento permite obter células estromales com métodos menos custosos e altamente eficientes que facilita o acesso a um modelo celular de grande utilidade no estudo da fisiologia da gestação em diferentes espécies.

Palavras chave: *células BeWo, células estromales, células HeLa, decídua murina, macrófagos deciduales.*

Introducción

Durante la fase lútea del ciclo menstrual, la progesterona y los estrógenos inducen la decidualización, que comprende la diferenciación bioquímica y morfológica del estroma endometrial que lleva a la formación de las células estromales decidualizadas, a la proliferación del epitelio uterino, de las glándulas y del tejido conectivo estromal y, además, a la proliferación de una abundante cantidad de células provenientes de médula ósea. Esta decidualización es un proceso necesario para que se lleve a cabo la implantación del embrión y una adecuada evolución del embarazo (King, 2000).

Las células estromales, son las células más abundantes presentes en la decidua humana y murina; juegan un papel muy importante en la implantación, en la nutrición del feto y en el mantenimiento del embarazo debido a que:

1. Cumplen funciones endocrinas por la producción de hormonas como la prolactina (Oliver *et al.*,

1999); además poseen receptores de hormonas esteroideas que al interactuar con su ligando, promueven el desarrollo, el crecimiento y la diferenciación del epitelio (Fazleabas y Strakova, 2002).

2. Participan en la implantación embrionaria porque expresan integrinas requeridas para la adherencia del blastocisto (Hwang *et al.*, 2002); producen ciclooxigenasa-2 y prostaglandinas que favorecen la implantación (Bany y Kennedy, 1999), y metaloproteinasas que facilitan el proceso de invasión trofoblástica (Chou *et al.*, 2003).

3. Secretan diversas citoquinas y quimioquinas como IL-1 β (interleuquina -1 β), IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, IL-15, MIP-1 α (factor inflamatorio de macrófagos-1), LIF (factor inhibidor de la leucemia) y PAF (factor activador plaquetario) que participan activamente en la implantación y el embarazo temprano, con la atracción y activación de células en la interfase materno fetal (Dunn *et al.*, 2002; Nasu *et al.*, 1998; Nasu *et al.*, 2001; Nasu *et al.*, 2003; Vigano *et al.*, 2002).

4. Producen factores de crecimiento, como el factor de crecimiento de queratinocitos necesario durante el ciclo menstrual y el embarazo temprano (Nasu *et al.*, 2002) y el factor de crecimiento de monocitos y granulocitos (Nasu *et al.*, 1999). Las células estromales además producen el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) que regenera el tejido endometrial, aumenta la permeabilidad vascular y la angiogénesis durante la menstruación, la implantación del embrión y la placentación (Kawano *et al.*, 2002).

Si bien las células estromales son el principal componente de la decidua y el útero, no son las únicas células presentes; otros elementos celulares como las células epiteliales, los leucocitos y las células trofoblásticas se encuentran como contaminantes en el aislamiento de células estromales y los marcadores que se han utilizado en su caracterización muestran variabilidad en la expresión.

Por tal razón, en el presente estudio se estandarizó un método para aislar células estromales de decidua y útero murinos. Las células se caracterizaron por exclusión de otros marcadores presentes en las células remanentes después de los procedimientos de digestión enzimática, gradiente de densidad y adherencia al plástico.

Materiales y métodos

Aval de comité de ética

La realización de este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de Animales de Experimentación de la Universidad de Antioquia en el marco del proyecto "Mecanismos de modulación de la actividad de células NK en un modelo murino" (comunicación CPT-8840-01-331 de septiembre 20 del 2001).

Tipo de estudio

Es un estudio descriptivo para aislar y caracterizar las células estromales de decidua murina.

Animales

Se utilizaron ratonas de 8 a 12 semanas de edad de la cepa CD1/swiss obtenidas del Bioterio SPF (Specific Pathogen Free) del Grupo Gripe

de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, y mantenidas en condiciones de un bioterio convencional. El ciclo estral de un grupo de 5-7 ratonas fue sincronizado por superovulación inducida mediante la inyección intraperitoneal de 5 UI de eCG (gonadotropina coriónica equina, Folligon®) y 47 horas después, de 5 UI de hCG (gonadotropina coriónica humana, Chorulon®). Se realizó un cruce semialógénico a razón de 1 hembra por un macho F1 (C57BL/6 x CD1 swiss) los cuales se aparearon durante toda la noche; en la mañana siguiente el tapón vaginal fue evaluado y si estaba presente, se designó como el día 0.5 de la gestación.

Obtención de las células estromales de decidua

Las ratonas en los días 6 a 11 de la gestación fueron sacrificadas en cámara de CO₂ y los cuernos uterinos removidos bajo condiciones estériles y lavados con PBS precalentado a 37 °C. Posteriormente el útero se abrió por la cara antimesometrial, las unidades fetoplacentarias fueron disecadas y las deciduas obtenidas de cada ratona preñada separadas con tijeras de iridectomía y mantenidas en 5 ml de medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co, St Louis, MI, U.S.) sin suplementar. Las deciduas fueron fragmentadas en pequeños trozos con una cuchilla y sometidas a digestión enzimática con una solución de 1.2 mg/ml de dispasa (Sigma Chemical Co, St Louis, MI, U.S.) a 37 °C/30min/5%CO₂ con agitaciones periódicas para eliminar las células epiteliales. La suspensión fue filtrada en un cedazo estéril y los fragmentos de tejido pasados a un tubo con medio RPMI-1640 y centrifugados a 460 g/10 min; posteriormente para disgregar los fragmentos, éstos fueron resuspendidos en una solución de colagenasa tipo IV (Sigma Chemical Co, St Louis, MI, U.S.) precalentada a 37 °C a una concentración de 1mg/ml por cada decidua. La suspensión del tejido fue incubada a 37 °C/60min/5%CO₂ con agitación ocasional, filtrada en un cedazo estéril, centrifugada a 460 g/10 min/4 °C y la suspensión de células lavada tres veces con RPMI-1640.

Para eliminar las células multinucleadas se hizo un gradiente de densidad en una dilución 1:1 de la suspensión de células y de ficoll-hypaque (Sigma Chemical Co, St Louis, MI, U.S.), luego

se centrifugó a 460 g/15min/20 °C. Las células de la interfase fueron recuperadas, lavadas tres veces con RPMI a 460 g/10min/4 °C y resuspendidas en RPMI-1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina, 1.5 ug/ml de anfotericina B y 10% de suero bovino fetal (SBF) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad U.S.). Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer y la viabilidad evaluada por exclusión del colorante vital azul tripano; se sembraron en frascos de cultivo a 37 °C/90 min 5%CO₂ para permitir la adherencia de los macrófagos y el sobrenadante fue pasado a otro frasco de cultivo para permitir la adherencia de las células estromales. A las 24 horas el medio se reemplazó por medio RPMI-1640 suplementado y las células permanecieron en cultivo por 3 días.

Como control, se realizó el aislamiento de las células estromales sin utilizar la dispasa, para comparar el porcentaje de pureza en el aislamiento de las células estromales en ausencia de esta enzima.

Obtención de las células estromales de útero

Éstas se obtuvieron de los úteros de las mismas hembras de las que se separaron las deciduas; los úteros fueron lavados y cortados en pequeños fragmentos con bisturí y las células fueron aisladas con el mismo procedimiento descrito para las células deciduales.

Obtención de macrófagos de bazo

Los bazos de las ratonas gestantes fueron removidos y colocados en 5 ml de RPMI sin suplementar, se les realizó perfusión con una jeringa de tuberculina, se hizo un gradiente de densidad a una dilución 1:1 de la suspensión de células y del ficoll-hypaque y se centrifugó a 400 g/30min/20°C. La capa de células de la interfase fue recuperada y lavada una vez con RPMI-1640 a 350 g/10min/4°C y dos veces a 460 g/10min/4 °C. La viabilidad celular por exclusión del azul tripano fue verificada y las células sembradas en una caja de 8 pozos con laminillas de vidrio a una concentración de 5 x 10⁶ células; se dejaron toda la noche en incubación y los pozos fueron lavados con PBS precalentado a 37 °C después de lo cual fue adicionado el RPMI-1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina, 1.5 ug/ml de anfotericina B y 10% de SBF.

Líneas celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares provenientes de la ATCC (Global Bioresource Center, Manassas, VA, U.S.): a) células epiteliales de cáncer de cérvix humano (HeLa) que fueron cultivadas en medio MEM suplementado con 2 mM de L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina, 1.5 ug/ml de anfotericina B y 10% SBF; b) células de coriocarcinoma humano (BeWo) que fueron cultivadas en el mismo medio MEM pero con 20% de SBF.

Caracterización de las células estromales

Las células estromales adherentes a los frascos de cultivo fueron disgregadas con tripsina, sembradas sobre una laminilla de vidrio en platos de seis pozos a una concentración de 150.000 cel/pozo e incubadas durante 24 horas/37 °C/5%CO₂.

La pureza de las células estromales se determinó evaluando la morfología celular en un microscopio invertido y se diferenciaron de los otros tipos celulares presentes en la decidua mediante una marcación negativa del F4-80 y la citoqueratina-7. Se utilizó el anticuerpo anti-F4/80 que es específico de macrófagos y el anticuerpo anti-citoqueratina 7 que identifica trofoblasto y células epiteliales. Adicionalmente, el anticuerpo anti-vimentina fue usado para determinar si las células aisladas expresaban la vimentina el cual es un marcador reconocido de células estromales.

Detección del marcador F4/80. Se realizó por inmunofluorescencia directa con el anticuerpo de rata anti-ratón F4/80 (macrophages, Ly-71, Caltag, Laboratories, Burlingame, CA, U.S.) conjugado con isotiocianato de fluoresceína y como isotipo se usó una IgG2b de rata (Caltag Laboratories Burlingame, CA, U.S.). Las células en la laminilla fueron fijadas con paraformaldehído al 4% precalentado a 37 °C e incubadas durante 20min/T°amb, se lavaron 5 veces con PBS a 37 °C, luego se bloqueó con PBS más 5% de suero murino durante 60 minutos/37 °C. A una de las laminillas se agregó el anticuerpo anti-F4/80 a una dilución de 1:40 y en la otra el isotipo a una dilución 1:240 y se incubó 90 min/37 °C en la oscuridad. Para teñir los núcleos, fue adicionado el yoduro de propidio frío

a una concentración de 5 ug/ml por 45 min/T°amb, protegido de la luz. Las placas fueron lavadas cinco veces con PBS y se realizó un montaje entre lámina y laminilla con glicerina para ser observada al microscopio de fluorescencia a una longitud de onda de 480 nm con un aumento de 40x. Como control positivo se utilizaron macrófagos murinos de bazo y como control negativo células epiteliales de la línea celular HeLa.

Determinación de la expresión de citoqueratina-7. Se realizó por inmunofluorescencia indirecta para lo cual las laminillas fueron fijadas en metanol a 4 °C/20 min, lavadas cinco veces y bloqueadas con PBS/SBF al 10% durante 90 minutos; posteriormente se adicionó el primer anticuerpo IgG1 de ratón contra citoqueratina-7 de diversas especies a una dilución de 1:100 y se incubó a 37 °C/90 min. Después de 5 lavados con PBS, fue agregado el segundo anticuerpo de conejo contra IgG de ratón marcado con FITC a una dilución de 1:200 e incubado a 37 °C/90 min. Posterior a los cinco lavados, se realizó el mismo procedimiento descrito para el F4/80. Como control positivo de células epiteliales fueron usadas las células HeLa, y como control positivo de trofoblasto, las células BeWo.

Determinación de la expresión de vimentina. Las laminillas fueron fijadas en metanol a 4 °C/20 min, lavadas cinco veces y bloqueadas con PBS/SBF al 10% durante 30 minutos; posteriormente se adicionó el primer anticuerpo IgG1 de ratón,

anti-vimentina (Dako, Denmark) a una dilución de 1:100 y se incubó a 37 °C/60 min. Después de 5 lavados con PBS, el segundo anticuerpo de conejo contra IgG de ratón marcado con FITC a una dilución de 1:200 fue agregado e incubado a 37 °C/60 min. Las células fueron lavadas cinco veces y se realizó el mismo procedimiento descrito para el F4/80.

Análisis estadístico

Es un estudio descriptivo donde se documenta en fotografías los resultados de la caracterización de las células y se informa el porcentaje de pureza y de expresión de los diferentes anticuerpos utilizados. No se realizó ningún análisis estadístico.

Resultados

Las células estromales aisladas de útero y decidua observadas en un microscopio invertido mostraron una morfología fibroblástica (Figura 1). El 98% de las células estromales uterinas y deciduales fueron negativas para el F4-80, y sólo un 2% eran macrófagos deciduales que expresaban el F4/80. Por su parte, el 100% de los macrófagos murinos derivados de bazo, utilizados como control positivo, expresaron el marcador F4/80 y no se observó expresión de éste en las células epiteliales HeLa, utilizadas como control negativo. Las células estromales uterinas y deciduales fueron positivas en un 98% para la expresión de vimentina, (Figura 2).

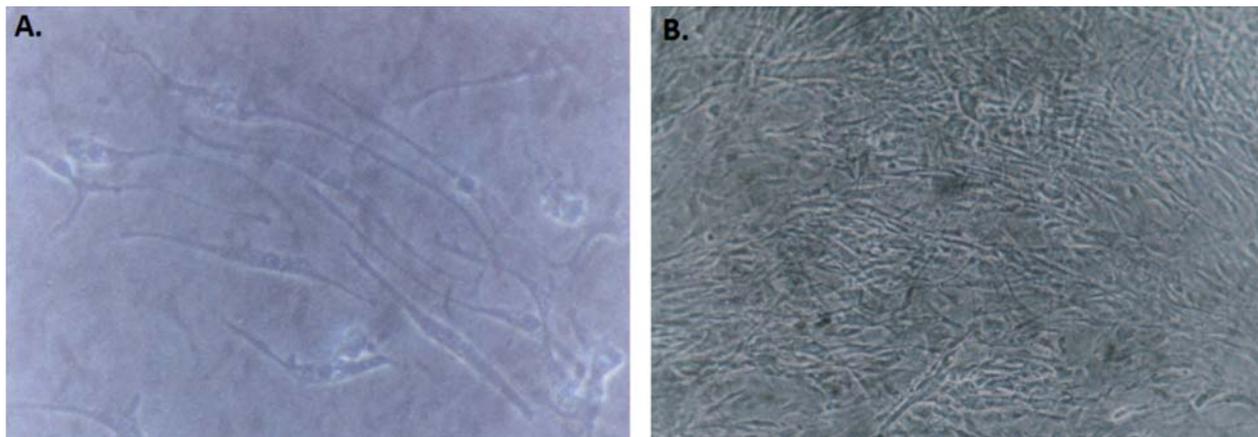


Figura 1. Cultivo de células estromales murinas: a) provenientes de decidua, b) de útero. (Fotografía en 10X).

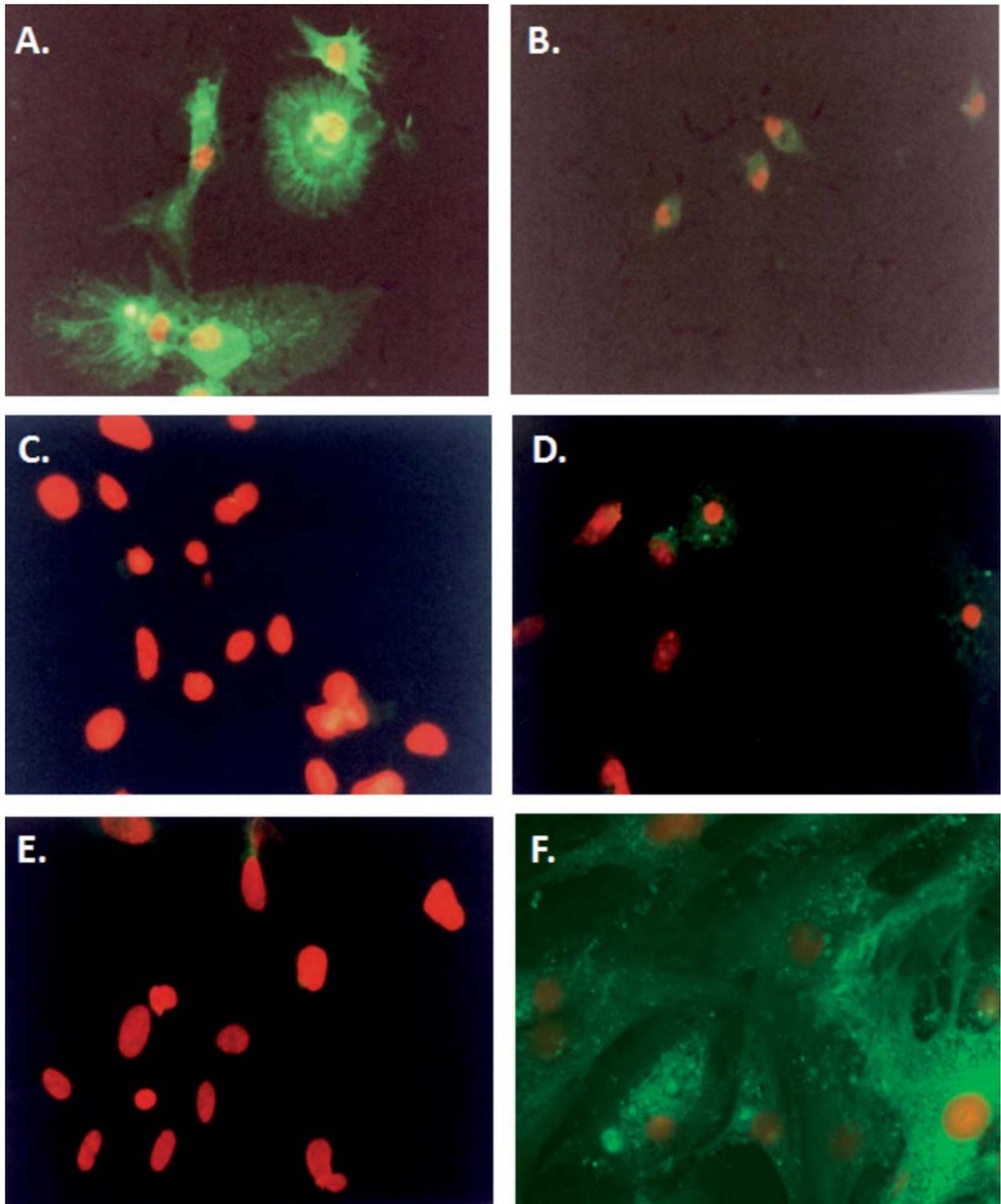


Figura 2. Determinación de la expresión del F4/80 y vimentina. a y b: macrófagos de bazo; c: células epiteliales HeLa; d y e: células estromales uterinas; a, c y d: con el anticuerpo F4/80; b y e: control de isotipo; f: células estromales con anti-vimentina (Fotografía en 40X). En color rojo se observan los núcleos teñidos con yoduro de propidio y en color verde, las células expresando los marcadores de F4/80 o vimentina.

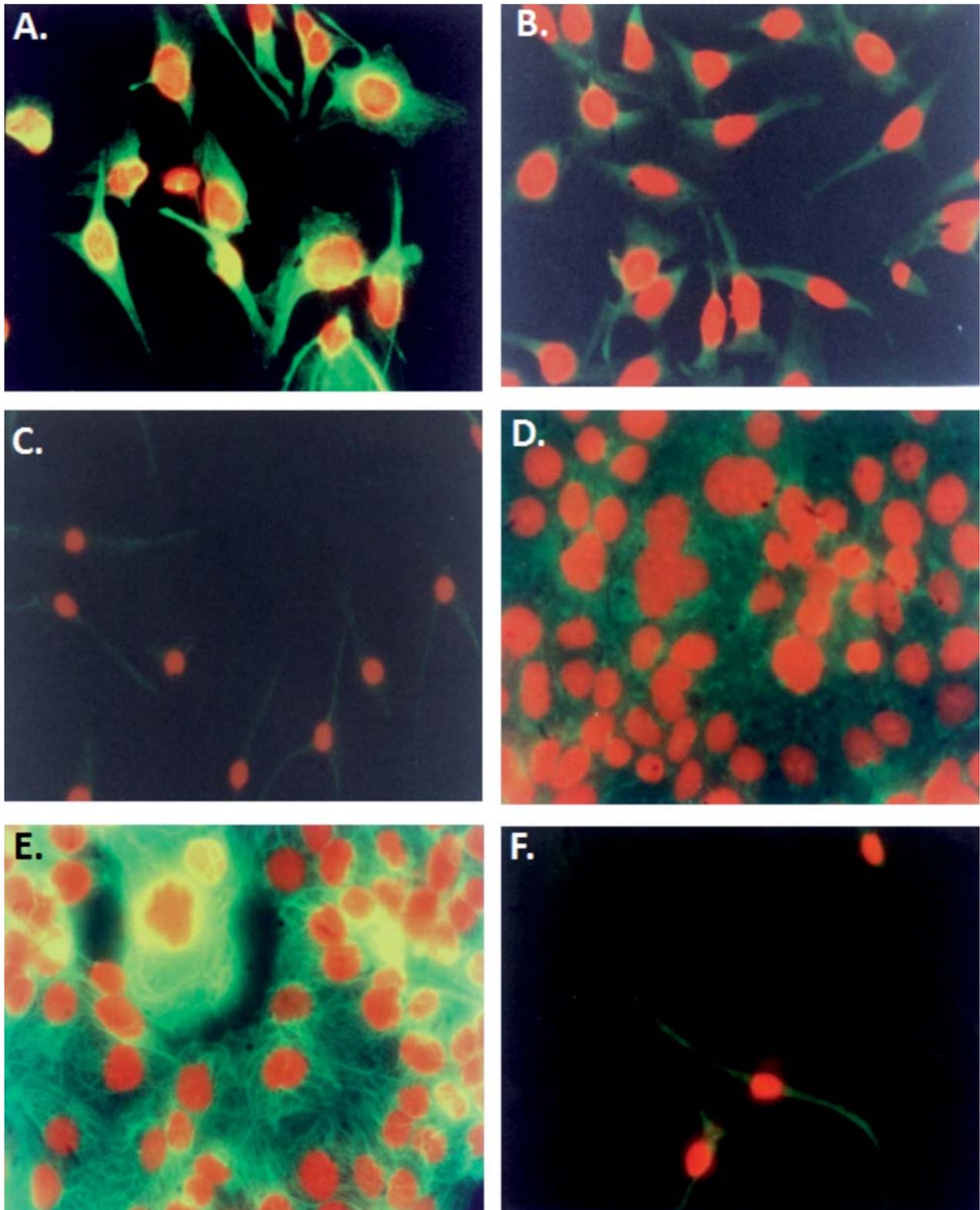


Figura 3. Determinación de la expresión de citoqueratina-7. a y b: células HeLa; c y d: células BeWo; e y f: células estromales uterinas; a, c y e: con el anticuerpo anti-citoqueratina 7; b, d y f: control de isotipo. (Fotografía en 40X). En color rojo se observan los núcleos teñidos con yoduro de propidio y en color verde, las células expresando los marcadores de citoqueratina-7.

Las células estromales uterinas y deciduales fueron negativas en un 98% para la expresión de citoqueratina-7, es decir, un 2% de las células eran células trofoblásticas o células epiteliales; además el 100% de las células trofoblásticas BeWo y las células epiteliales HeLa, utilizadas como control positivo, expresaron la citoqueratina-7, (Figura 3).

Adicionalmente, cuando se aislaron las células estromales en ausencia de dispasa se observó que el porcentaje de pureza fue del 90%, lo cual corrobora que con esta enzima se logra una mayor pureza (98%) en el aislamiento de las células estromales.

Discusión

La caracterización de las células estromales de decidua y útero por la expresión de antígenos en la membrana es compleja y se requieren de muchos marcadores que permitan excluir las células que puedan ser fuente de contaminación en el aislamiento de las células estromales ya que hay variación a través del embarazo en los marcadores utilizados convencionalmente para identificarlas. Por esta razón, es indispensable mejorar y establecer nuevos procedimientos de aislamiento y caracterización de las células estromales como una alternativa más económica y segura que garantice la pureza de las mismas.

Tradicionalmente las células estromales han sido identificadas por las características morfológicas, sin embargo actualmente es conocido que los macrófagos tienen una morfología fibroblástica similar y que las células estromales presentan cambios morfológicos en los diferentes estadios del embarazo lo cual dificulta su identificación. Para caracterizar las células estromales en roedores y humanos, se han utilizado marcadores como la desmina que se encuentra en células estromales decidualizadas, y la vimentina que se expresa tanto en células estromales decidualizadas como no decidualizadas, pero su nivel de expresión varía en el transcurso de la gestación; adicionalmente se ha usado la detección de la prolactina como un marcador de decidualización (Oliver *et al.*, 1999). Otros marcadores antigénicos utilizados que están expresados en células estromales, también lo están en otras subpoblaciones celulares presentes en la decidua

y no todas las células estromales los expresan, además hay variación según el estadio de diferenciación. Entre estos antígenos se pueden mencionar el CD10 que además está presente en granulocitos, y el CD21, el CD23 y el CD80 que también lo expresan las células dendríticas (Oliver *et al.*, 1999).

En el presente trabajo se usó la combinación de diferentes técnicas descritas en la literatura para lograr un adecuado aislamiento de las células estromales. Siguiendo la metodología descrita fue obtenido un alto porcentaje de células estromales y sólo un 2% de contaminación con otros elementos celulares. Varios autores sólo utilizan colagenasa en la digestión enzimática para disgregar el tejido pero no están excluyendo otras poblaciones como las células epiteliales. (Arnold *et al.*, 2001; Yoshino *et al.*, 2003). Para sobrepasar esta dificultad, en nuestro procedimiento la dispasa fue utilizada adicionalmente para liberar las células epiteliales (Bowen *et al.*, 1996; Corver *et al.*, 2005; Geggel y Gipson, 1985) lo cual permitió disminuir el grado de contaminación de las células estromales con células epiteliales.

Otras posibles fuentes de contaminación que se pueden presentar en el cultivo de células estromales son las células multinucleadas, como los neutrófilos y las subpoblaciones trofoblásticas; estas células lograron ser eliminadas usando un gradiente de densidad con ficoll hypaque, el cual ha sido utilizado por algunos autores en células de decidua humana (Arnold *et al.*, 2001; Oliver *et al.*, 1999). Los macrófagos y las células no adherentes como linfocitos T, células dendríticas y células NK se eliminaron en la fase final del aislamiento: las primeras por adherencia al plato de cultivo durante 90 minutos y las segundas fueron descartadas del sobrenadante 24 horas después de la adherencia de las células estromales. Algunos autores utilizan la adherencia al plato por 60 minutos para eliminar los macrófagos humanos en una primera etapa; en nuestro protocolo se dejaron adherir por 90 minutos encontrando un mayor grado de pureza comparada con la adherencia de 60 minutos descrita en la literatura (Arnold *et al.*, 2001; Oliver *et al.*, 1999).

Para corroborar la calidad de nuestro cultivo de células estromales y la eficacia del proceso

de aislamiento, se hizo una exclusión de los marcadores celulares específicos para los mayores contaminantes observados durante el aislamiento de las células estromales como son los macrófagos, las células epiteliales y el trofoblasto y se utilizó anticuerpo anti-F4/80 y anticuerpo anticitoqueratina-7 observándose que un 98% de las células fueron negativas para estos marcadores; también se determinó la expresión de la vimentina en los cultivos de células estromales encontrando igualmente un porcentaje de pureza del 98%.

Un adecuado aislamiento y caracterización de las células estromales es de gran importancia, porque pueden ser utilizadas como fuente de factores de crecimiento, de citoquinas y de

hormonas. Además, sería interesante conocer su papel en la tolerancia materna al feto, porque aunque expresen HLA y moléculas coestimuladoras, estas células no tienen capacidad de presentación antigénica durante la gestación, son productoras de diversas moléculas que inducen el mantenimiento y el desarrollo fetal y adicionalmente expresan CTLA-4 que podrían regular la aloreactividad de los LT presentes en la decidua humana y de esta manera evitar el rechazo del feto (Komatsu *et al.*, 1998; Oliver *et al.*, 1999).

Agradecimientos

A Colciencias, por el apoyo financiero a través del proyecto 1115-05-11491.

Referencias

- Arnold JT, Kaufman DG, Seppala M, Lessey BA. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. *Hum Reprod* 16 (5): 836-45, 2001.
- Bany BM, Kennedy TG. Role of interleukin 1 in the regulation of cyclooxygenase gene expression in rat endometrial stromal cells. *J Reprod Fertil* 1999; 115: 125-31.
- Bowen JA, Newton GR, Weise DW, Bazer FW, Burghardt RC. Characterization of a polarized porcine uterine epithelial model system. *Biol Reprod* 1996; 55: 613-9.
- Chou CS, Tai CJ, MacCalman CD, Leung PC. Dose-dependent effects of gonadotropin releasing hormone on matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 and tissue specific inhibitor of metalloproteinases-1 messenger ribonucleic acid levels in human decidual stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 680-8.
- Corver WE, Ter Haar NT, Dreef EJ, Miranda NF, Prins FA, *et al.* High-resolution multi-parameter DNA flow cytometry enables detection of tumour and stromal cell subpopulations in paraffin-embedded tissues. *J Pathol* 2005; 206: 233-41.
- Dunn CL, Critchley HO, Kelly RW. IL-15 regulation in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1898-901.
- Fazleabas AT, Strakova Z. Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 186: 143-7.
- Geggel HS, Gipson IK. Removal of viable sheets of conjunctival epithelium with dispase II. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26: 15-22.
- Hwang JH, Park MI, Hwang YY, Yoo HJ, Mardon HJ. The characteristics of integrins expression in decidualized human endometrial stromal cell induced by 8-Br-cAMP in vitro. *Exp Mol Med* 2002; 34: 194-200.
- Kawano Y, Nakamura S, Nasu K, Narahara H, Miyakawa I. The effect of epidermal growth factor on vascular endothelial growth factor secretion by endometrial stromal cells. *Clin Exp Med* 2002; 2: 69-75.
- King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 28-36.
- Komatsu T, Konishi I, Mandai M, Mori T, Hiai H, Fukumoto M. Expression of class I human leukocyte antigen (HLA) and beta2-microglobulin is associated with decidualization of human endometrial stromal cells. *Hum Reprod* 1998; 13: 2246-51.
- Nasu K, Matsui N, Narahara H, Tanaka Y, Miyakawa I. Effects of interferon-gamma on cytokine production by endometrial stromal cells. *Hum Reprod* 1998; 13: 2598-601.
- Nasu K, Narahara H, Matsui N, Kawano Y, Tanaka Y, Miyakawa I. Platelet-activating factor stimulates cytokine production by human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 548-53.
- Nasu K, Sugano T, Fujisawa K, Arima K, Narahara H, Miyakawa I. Effects of interleukin-4 on the in-vitro production of cytokines by human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 265-70.
- Nasu K, Arima K, Fujisawa K, Nishida M, Kai K, Miyakawa I. Secretion of keratinocyte growth factor by cultured human endometrial stromal cells is induced through a cyclic adenosine monophosphate-dependent pathway. *Fertil Steril* 2002; 77: 392-5.
- Nasu K, Fukuda J, Sun B, Nishida M, Miyakawa I. Interleukin-13 and tumor necrosis factor-beta differentially regulate the production of cytokines by cultured human endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2003; 79: 821-7.

- Oliver C, Cowdrey N, Abadia-Molina AC, Olivares EG. Antigen phenotype of cultured decidual stromal cells of human term decidua. *J Reprod Immunol* 1999; 45 (1): 19-30.
- Vigano P, Somigliana E, Mangioni S, Vignali M, Di Blasio AM. Expression of interleukin-10 and its receptor is up-regulated in early pregnant versus cycling human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5730-6.
- Yoshino O, Osuga Y, Hirota Y, Koga K, Hirata T, *et al.* Endometrial stromal cells undergoing decidualization down-regulate their properties to produce proinflammatory cytokines in response to interleukin-1 beta via reduced p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2236-41.