

Inmunología de la reproducción

Melitza Iglesias, Renato Guzmán, Octavio Martínez, José Félix Restrepo,
Antonio Iglesias · Bogotá, D.C.

El feto considerado como un trasplante semialogénico que se desarrolla por nueve meses en el vientre materno, nos hace vislumbrar la idea de que existen mecanismos protectores que impiden que se induzca daño a dicho feto y permitan su sobrevivencia y su tolerancia. Estos mecanismos afinados muy sutilmente y localizados en un sitio "privilegiado" evitan que el feto sea rechazado, mientras que la madre sigue manteniendo la homeostasis perfecta de su sistema inmunológico.

La tolerancia hacia al feto semialogénico por el sistema inmune materno es un mecanismo activo. Mientras que el tejido fetal se previene de ser reconocido como tejido extraño y de ser rechazado por las células del sistema inmune materno, la placenta actúa como barrera inmunológica activa, en el sentido que permite que dos organismos antigénicamente diferentes se toleren el uno al otro. La tolerancia hacia el feto se lleva a cabo por la interacción de las células *natural killer* con sus respectivos receptores, las moléculas HLA G, HLA C, el balance de las diferentes subpoblaciones de citoquinas Th1 y Th2, mecanismos de apoptosis y la síntesis de factores reguladores como citoquinas y hormonas.

Todos estos mecanismos involucrados en la tolerancia maternofetal se correlacionan los unos con los otros, existiendo una verdadera integración de estos elementos, que aun cuando son de origen y modo de acción diferentes, resultan en la existencia de otro ser humano. (*Acta Med Colomb* 2002; 27: 170-180)

Palabras clave: *inmunología, reproducción, tolerancia materno fetal, sistema inmune materno.*

Introducción

La inmunología reproductiva es una ciencia nueva que nace de la inmunología del trasplante, ya que el feto es analogado por algunos científicos como un trasplante semi-alogénico, al poseer tanto antígenos paternos como maternos, cumpliendo con las reglas de aceptación o rechazo del mismo (1-4).

Sólo en esta última década y gracias a las técnicas avanzadas a nivel inmunológico y genético es cuando se han podido definir más claramente los mecanismos de inmunoregulación tanto en embarazos normales como en embarazos patológicos. La inmunología de la reproducción es actualmente una especialidad "madura", en el sentido que ya existe como subespecialidad en algunos lugares del mundo (1), dada su importancia no sólo para los obstetras sino también para reumatólogos, perinatólogos, genetistas, así como también para inmunólogos clínicos, por los desafíos que se presentan día a día en el entendimiento de patologías como el síndrome antifosfolípidos (SAFL), el lupus eritematoso sistémico (LES), la preeclampsia (PE), el lupus neonatal (LN) y la infertilidad.

El 85% de todos los embarazos llegan a término. Muchas parejas experimentan una o dos pérdidas y hay otras que nunca alcanzan concebir; las razones que explican estas pérdidas son: infecciones, anatomía fetal anormal, anatomía uterina anormal, niveles bajos de progesterona,

aberraciones cromosómicas y mecanismos inmunológicos; por esta última razón nace la inmunología reproductiva, disciplina que involucra ciencias básicas y clínicas cuyo objetivo fundamental es estudiar la tolerancia fetomaterna, la regulación en la expresión de genes en la interfase maternofetal y la inmunidad en los tractos reproductivos tanto femeninos como masculinos.

Actualmente existen diferentes métodos inmunológicos que han ayudado a definir más claramente los mecanismos de inmunorregulación durante un embarazo normal, un embarazo anormal y fallas durante la implantación (1, 4, 5).

El hecho de que se desarrolle un trasplante semialogénico y que éste se desarrolle por nueve meses en el vientre materno nos hace pensar que existen mecanismos protectores que evitan que se produzca daño y que permiten su sobrevivencia; estos mecanismos están afinados muy sutilmente y localizados en un sitio "privilegiado" que evitan que este feto sea rechazado o sea visto como extraño, mientras que la madre sigue manteniendo la homeostasis perfecta de su sistema inmunológico que le permitirá lu-

Dra. Melitza Iglesias-Rodríguez: Inmunóloga Clínica Universidad de Chile; Dr. Renato Guzmán: Internista Reumatólogo; Dr. Octavio Martínez: Profesor Asociado; Dr. José Félix Restrepo: Profesor Asociado; Dr. Antonio Iglesias-Gamarrá: Profesor Titular, Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C.

char contra las infecciones y otros trastornos que puedan ocasionar lesiones tisulares (6).

Los anticuerpos fosfolipídicos y los anticuerpos antinucleares son un grupo heterogéneo de anticuerpos que están asociados con un patrón de enfermedades conocidas como el síndrome antifosfolipídico primario y secundario al lupus eritematoso generalizado. Los mecanismos fisiológicos de placentamiento y la patología asociada a los diferentes anticuerpos ya mencionados que ocasionan patología a nivel de la placenta se encuentra en revisión y con una nueva concepción durante la evolución del embarazo y el postparto inmediato. Por ello pensamos que el internista, los ginecólogos, los neurólogos y los reumatólogos debemos entender los mecanismos fisiológicos normales de la inmunología de la reproducción para luego entender la patología.

Placenta: órgano inmunológico

La placenta provee un microambiente inmunológico único, donde existe un estado de tolerancia mutua entre dos tejidos antigénicamente diferentes (2, 4). Para entender la inmunología del embarazo se requiere tener familiaridad con la estructura placentaria y los tipos celulares que allí se encuentran (1,6).

La placenta es un órgano hemocorial, lo que quiere decir que el trofoblasto placentario está en contacto directo con la sangre materna formando la interfase fetomaterna, es decir, las células del trofoblasto fetal cubren las vellosidades placentarias y están en contacto directo con la sangre materna; en otros términos, la sangre materna baña directamente los tejidos coriales sin interposición de tejido materno (7).

Existen varios tipos de células trofoblásticas en la placenta que inician la homeostasis o la patología con la madre (1). El sincitiotrofoblasto se desarrolla a partir de la agregación de células citotrofoblásticas que se fusionan para formar un sincitio; este proceso de fusión involucra fosfolípidos y moléculas de adhesión; el sincitiotrofoblasto es una membrana directamente expuesta a la sangre materna, envolviendo al feto y a todas las células efectoras inmunes que allí se encuentran; funciona como diálisis biológica, donde se realiza el intercambio de moléculas que entran o salen de la circulación fetal; tiene un área de superficie de aproximadamente 25 metros cuadrados, se autorrenueva y posee un estado de privilegio inmunológico para "camuflar" y cubrir al feto de los mecanismos inmunes citotóxicos maternos (1,7).

La mucosa uterina se transforma y se prepara para la invasión del trofoblasto en un proceso llamado deciduación, como detallaremos más adelante. En este proceso el trofoblasto, que forma una cápsula fibromuscular, se deriva de las capas externas del blastocisto, conformado por células dendríticas (CD), macrófagos o células de Hofbauer: DR+ (aumenta su expresión a medida que aumenta la gestación) (6), CD4+, FcγR, las cuales son las

encargadas de transferir IgG materna al feto constituyendo el 40% de las células del estroma veloso; también posee capilares fetales. El trofoblasto en este proceso se diferencia en dos diferentes grupos celulares: el trofoblasto veloso (TV) y el trofoblasto extraveloso (TEV). El primero comprende el árbol veloso que es bañado por la sangre materna en el espacio intervelloso y el segundo comprende la subpoblación de trofoblasto invasor (8).

El TV consiste en una capa de células de citotrofoblasto, células de Langhans que cubren el sincitio de células no proliferantes que se encuentran en los espacios intervellosos; las células del trofoblasto fetal entran a la circulación materna diariamente. Para mantener la tolerancia al feto, el trofoblasto expresa HLA I no clásicas que le permiten a la placenta ser un órgano "inmunoprivilegiado" ya que la hace resistente a la lisis de linfocitos citotóxicos (1,6,7, 9). El TV aprovisiona al espacio intervelloso un epitelio continuo que crece paralelamente con la "arborización" del árbol veloso. Las vellosidades primarias son columnas de vellosidades secundarias; cuando ocurre invasión por mesodermo y aparición de vasos sanguíneos forman las vellosidades terciarias; la transformación de vellosidades primarias a terciarias ocurre hasta la quinta semana, con los primeros latidos del corazón embrionario, el cual comienza a bombear eritrocitos nucleados hacia la circulación vellosa. En este punto la circulación fetoplacentaria está en proximidad, separada sólo por la bicapa epitelial (sincitiotrofoblasto y citotrofoblasto) y en el estroma entre la superficie vellosa y los vasos fetoplacentarios.

Se ha propuesto que el trofoblasto modula la función inmune materna a través de la secreción de "factores inmunomoduladores"; estudios *in vitro* han demostrado que estos factores aumentan la proporción de anticuerpos asimétricos (glicosilados en sólo una de las regiones Fab actuando como anticuerpos bloqueadores), responden a citoquinas y factores de crecimiento como CSF, G-CSF, GM-CSF, TNF α e INF γ y se ha observado que citoquinas como la interleuquina 3 (IL-3) y factores de crecimiento como el M-CSF y GM-CSF amplifican el crecimiento placentario; el trofoblasto también expresa Fc γ RIII; en el primer trimestre estos Fc γ R se observan tanto en sincitiotrofoblasto como en citotrofoblasto y en la unión de ellos; en la segunda mitad del embarazo, estos receptores sólo se expresan en el sincitiotrofoblasto posiblemente para el transporte placentario de IgG (6).

Otras células y tejidos importantes en la placenta incluyen:

1. Células de anclaje citotrofoblásticas que forman las porciones terminales de las vellosidades. Estas células se unen a la decidua materna y están en contacto directo con ésta.
2. Citotrofoblasto extraveloso, que expresa HLA G, migra al tejido uterino localizándose allí.
3. Trofoblasto endovascular invade las arteriolas maternas modificándolas y alterando su estructura (ver

decidualización); este tejido también expresa HLA-G.

4. Trofoblasto coriónico que formará el amniocorión; estas células sirven para unir la membrana amniótica (contiene líquido amniótico) al útero (1,6).

Decidua

La decidua es el tejido derivado de la madre con diversas funciones biológicas, nutritivas, estructurales e inmunológicas. La decidua tal como el epitelio estromal del timo o la médula ósea es un sitio de migración, desarrollo y funcionamiento de un grupo de linfocitos: *natural killer* (NK), células dendríticas (CD) que funcionan como células presentadoras de antígeno (CPA) HLA DQA1+; cuando existe compatibilidad de esta molécula entre la madre y el feto, se produce una respuesta autoinmune dentro de la placenta, y tanto la madre como el feto sufren, produciéndose la pérdida de éste (1).

En humanos, a diferencia de las otras especies el proceso de decidualización comienza en la fase lútea media del ciclo menstrual con aumento de las células estromales, formando un envoltorio alrededor de las arterias espirales y aumentando de las células NK; la decidualización involucra elementos de la mucosa, células estromales, leucocitos, glándulas y matriz extracelular. Las arterias espirales también están involucradas en el proceso de decidualización, ya que éstas presentan engrosamiento de la media y aumento de las células endoteliales, pero los cambios fisiológicos verdaderos como necrosis y el reemplazo con material fibrinoide sólo ocurren en presencia de trofoblasto intersticial y sobre todo de trofoblasto endovascular, el cual es el responsable de reemplazar las células endoteliales en estas arterias transformadas (10).

Natural killer (célula asesina natural)

La principal población de linfocitos encontrados en la decidua humana en el embarazo temprano son células NK y alcanzan hasta un 70% de los leucocitos deciduales con un fenotipo CD56highCD16lowCD3-, diferente al encontrado en las NK circulantes CD56lowCD16highCD3-; tienen morfología de linfocitos grandes y granulares (LGG). Estas NK deciduales expresan muy poco CD16 o FcγR III (receptor funcional para la citotoxicidad mediada por anticuerpos ADCC) y expresan CD49a o VLA-1, a diferencia de las NK periféricas CD56+ que carecen de esta integum (1, 11).

En el endometrio no embarazado el número de estas NK varía a través del ciclo menstrual; se encuentran en escasa cantidad en la fase preovulatoria, gradualmente aumentan durante la fase lútea temprana postovulatoria y alcanzan su pico máximo en la fase secretora tardía, pero si hay embarazo, las células NK uterinas persisten en la mucosa uterina embarazada que se transformará en la decidua donde se encuentra un infiltrado denso de NK principalmente en la decidua basal, donde el trofoblasto invasor infiltra el tejido materno. La presencia de NK en la mucosa uterina es una característica sólo del embarazo temprano, ya que estas células comienzan a desaparecer después de la semana 20 de

gestación y están totalmente ausentes en la decidua a término (11-16); estas NK CD56high no se encuentran en el útero antes de la menarquia o en la postmenopausia; éstas y otras características como describiré más adelante son importantes para los procesos de implantación y en las fases tempranas del embarazo por lo que se piensa que estas células realizan un papel importante en la reproducción normal así como también en procesos patológicos como la PE y los abortos recurrentes.

Típicamente las NK deciduales tienen gránulos característicos en su citoplasma que bajo microscopía electrónica se observan unidos a membrana; estos gránulos contienen perforinas y granzimas, lo cual indica que estas células tienen una actividad citolítica importante (17). La función de las NK deciduales no está aún bien establecida, pero por encontrarse en abundancia en el útero en el momento de la implantación y estar en contacto con el trofoblasto invasor se les adjudica un papel en el proceso de implantación y el subsiguiente desarrollo y crecimiento de la placenta.

La reciente descripción de familias de receptores en las NK, los KIR (*Killer Immunoglobulin like-Receptors*), codificados por una familia de aproximadamente diez genes cuyos dominios extracelulares contienen de dos a tres dominios Ig-símil KIR2D y KIR3D respectivamente, asociándose a ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) y DAP-12 (proteínas de membrana que poseen ITAM) con variaciones en los dominios intracitoplasmáticos resultando en formas activadoras como el KIR2DS y los que se asocian a ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*) como el KIR2DL que actúa como receptor de inhibición. Los KIR2D son receptores específicos de HLA C (3). Los receptores CD94/NKG2, son moléculas tipo C lectinas símil perteneciente a la superfamilia de las lectinas tipo C. El CD94 actúa como cadena invariante, mientras que el NKG2 al igual que los KIR, dependiendo si se asocian con ITIM resultaran en un receptor de inhibición, el NKG2A, o si se asocian a ITAM resultarán en un receptor de activación, el NKG2C. El CD94/NKG2A se expresa en virtualmente todas las células NK CD56++ deciduales y se une al HLA E en asociación con HLA G (8,18,19). Los ILT (*immunoglobulin-like transcripts*), de los cuales se han descrito aproximadamente ocho miembros, poseen diferentes dominios de inmunoglobulinas y formas activadoras e inhibitorias. Sólo dos miembros de la familia de los ILT se unen a HLA G, el ILT-2 y el ILT-4 (9). Las células del trofoblasto extravascular (TEV) que expresan moléculas HLA I no clásicas (HLA E, HLA C y HLA G) interactúan con estas NK a través de estos receptores modulando la implantación, la invasión del TEV y la transformación vascular de las arterias espirales (9, 10, 12, 18, 20).

Macrófagos o células de Hofbauer

El útero contiene una gran cantidad de macrófagos en el endometrio y en el miometrio. Las hormonas ováricas regulan su concentración, ya que los macrófagos expresan

receptores de estrógenos, por lo que responden a hormonas esteroideas; los factores de crecimiento uterino estimulados por estrógenos atraen a los macrófagos, los cuales aumentan hasta un 45% entre la fase secretoria y proliferativa del ciclo menstrual.

En el sitio de implantación, los macrófagos aumentan en número y se redistribuyen en compartimientos uterinos específicos; los factores que contribuyen para la quimiotaxis de los macrófagos son: 1) la respuesta inflamatoria inducida por la invasión del epitelio uterino por el blastocisto, 2) los altos niveles de hormonas esteroideas y 3) el aumento en la concentración de péptidos estimulados hormonalmente tales como el CSF-1, el GM-CSF, el TNF α y la IL-6. Los linfocitos deciduales producen GM-CSF espontáneamente y después de la estimulación con los antígenos paternos, mientras que los linfocitos periféricos no lo hacen. Posterior a la implantación, los macrófagos se redistribuyen hacia la decidua secundaria, distante de la implantación a través de la gestación. Estos macrófagos deciduales son HLADR+; expresan bajos niveles de HLA G (el INF γ selectivamente aumenta la expresión de esta molécula (1,6).

Linfocitos T

En la decidua, la mayoría de células CD45+ se localizan en agrupaciones celulares linfoides, cerca de las glándulas endometriales o como linfocitos intraepiteliales en el epitelio glandular, estas células son CD56+ TCR gd+, CD56+CD4+ TCRab+.

Los linfocitos T (LT) derivados de la decidua y endometrio son diferentes de aquéllos derivados de sangre periférica, estos LT expresan marcadores de activación (CD45RO, CD69, CD71, HLA DR, DP o DQ) a diferencia de los LT de sangre periférica (1, 14).

Para que se establezca tolerancia fetal, el endometrio mantiene la proporción de LT CD8+, manteniendo la relación CD4:CD8; si la relación se pierde, resultaría en una activación autoinmune, que llevaría a pérdidas del embarazo recurrente; por ejemplo, en pacientes con abortos recurrentes el porcentaje de CD8+ está significativamente disminuido y la proporción CD4:CD8 aumentada. En el embarazo temprano, en sangre periférica se encuentra una población de linfocitos T supresores (LTS) aumentada en relación con los linfocitos T citotóxicos (LTC), linfocitos B (LB) CD5- y CD5+ y linfocitos T *helper* (LTH). Los LB CD5+ disminuyen marcadamente y progresivamente durante el embarazo (los LB CD5+ son células productoras de autoanticuerpos y se encuentran aumentadas en enfermedades autoinmunes) lo que explicaría en parte la disminución de enfermedades autoinmunes, especialmente aquéllas donde predomina la producción de autoanticuerpos; también es importante para la aceptación del feto como un aloinjerto (1, 21).

Decidualización

Para que se establezca un embarazo, el trofoblasto debe anclarse e invadir el endometrio decidualizado y la

vasculatura uterina debe ser destruida y modelada para establecer una suplementación de nutrientes de la madre a la circulación fetoplacentaria. El período crítico entre la implantación y la menstruación es cuando se hace la decisión entre decidualizar o menstruar según las observaciones de King (10).

La remodelación uterina comienza antes de que el trofoblasto llegue a la pared arterial y aun en ausencia de trofoblasto local, lo que implicaría que algunos aspectos de la remodelación vascular (hipertrofia endotelial que altera el contorno muscular normal del lumen y aumenta la atenuación de la media hasta el punto en que el endotelio subyacente está rodeado de fibras colágenas) pueden estar iniciados por señales maternas más que por señales fetoplacentarias como por ejemplo progesterona (8).

Normalmente se produce en el embarazo una invasión del trofoblasto en la pared de las arterias espirales; este proceso se realiza en dos etapas, la primera ocurre hacia el final del primer trimestre donde la porción decidual de las arterias espirales es invadida, siendo destruida su capa muscular y elástica reemplazándose por tejido fibrinoide y la segunda entre las semanas 14 y 16 que afecta la porción miometrial de estas arterias resultando finalmente en vasos de pared delgada, dilatados con muy baja resistencia vascular, comprometiendo la innervación autónoma de estos vasos, por lo tanto los hacen resistentes a agentes vasoactivos; el espacio intervelloso será entonces un sistema de alta capacitancia y baja resistencia (6, 10).

La función de las células NK no es aun bien conocida; se encuentran en forma abundante en el útero en la etapa de la implantación y están en contacto directo con las células del trofoblasto invasor, lo que hace suponer que tienen un papel en los procesos de implantación y en el crecimiento y desarrollo de la placenta. La asociación de concentraciones bajas de progesterona con la muerte de células NK sugiere que su sobrevida está hormonalmente regulada pero no parece ser un efecto directo, ya que no se ha comprobado que los leucocitos uterinos incluyendo la NK posean receptores de progesterona; el efecto podría ser a través de citoquinas producidas por células estromales como la IL - 15 (10). La migración de las NK al útero y el contacto entre éstas y el microambiente especializado del endometrio y la decidua (que tienen una matriz extracelular rica en fibronectina y laminina) se realiza a través de integrinas; las NK deciduales expresan diferentes b1 integrinas comparadas con las NK de sangre periférica; por lo menos tres receptores de fibronectina son expresados por las NK: a4b1, a5b1, a6b1 y también un receptor para laminina a1b1, los cuales interactúan con células estromales a través de las subunidades a4 y a5 integrinas y mecanismos de interacción a través de las moléculas HLA I no clásicas de los receptores de las NK antes descritos (10, 20). Se ha comprobado que la sobreinvasión del trofoblasto llevaría a ruptura uterina mientras que la subinvasión y la falla de las células trofoblásticas para modificar las arterias uterinas, llevaría a

un retraso del crecimiento intrauterino (RCIU), por disminución del flujo sanguíneo (10, 11).

Tolerancia maternofetal

¿Cómo la mujer embarazada, puede nutrir por semanas y meses un feto que es antigénicamente diferente a ella? (3)

Una de las características del sistema inmune (SI) es el reconocimiento de lo propio y de lo no propio. Sabemos que la tolerancia inmunológica es la no respuesta inmunológica frente a los antígenos propios y la autotolerancia es la eliminación de linfocitos que expresan receptores específicos para autoantígenos (22).

El modelo en el cual se compara al feto con un aloinjerto, compara al embarazo con el trasplante de tejido, pero claramente no son lo mismo. Un aloinjerto requiere trauma quirúrgico, produce liberación y exposición de antígenos y en la mayoría de los casos es rechazado después de que estos antígenos son presentados por las células presentadoras de antígeno pertenecientes al tejido trasplantado; ninguno de estos factores se aplica al aloinjerto fetal, como describiré a continuación.

Medawar en su clásico artículo publicado en 1953 en la revista *Nature* (4) describió cuatro hipótesis. A través de las células explicaba por qué el feto no era rechazado por el sistema inmune materno a pesar de que el genoma fetal es mitad de la madre y mitad del padre; estas hipótesis planteaban que el feto carecía de inmunogenicidad (ausencia de presentación antigénica), que existía un estado de inmunosupresión materna a través del embarazo, que el útero era un sitio inmunoprivilegiado y que la placenta actuaba como barrera inmunológica. Sin embargo, a través de los años estas hipótesis han sido abandonadas ya que se encontró por ejemplo que células fetales de ratón reaccionaban a estímulos y se demostró que estas células tenían inmunogenicidad. Posteriormente se encontró que las mujeres embarazadas respondían a estímulos antigénicos, es decir, infecciones, de igual forma que lo hace una mujer no embarazada y finalmente la posibilidad de embarazo ectópico demostró que el útero no es lo único que protege al feto del rechazo de la madre (23).

La hipótesis de la placenta como barrera inmune se considera actualmente pero de manera diferente. Originalmente se creía que esta barrera era pasiva o neutral pero posteriormente se encontró que es un sitio de tolerancia activa. La tolerancia hacia al feto semialogénico por el sistema inmune materno es un mecanismo activo mientras que el tejido fetal se previene de ser reconocido como tejido extraño y/o de ser rechazado por las células del sistema inmune materno (2, 23). La placenta actúa como barrera inmunológica activa en el sentido que permite que dos organismos antigénicamente diferentes se toleren el uno al otro, por eso el embarazo es un desafío inmunológico único donde el útero, órgano altamente especializado y la producción de hormonas tales como la progesterona, el

estriol, el Cortisol, la gonadotropina coriónica, la somatotropina, la PGE2 y las citoquinas como IL-4 e IL-10 (respuesta Th2) que aumenta durante el embarazo, disminuyen la inmunidad celular (respuesta Th1) en la interfase materno fetal, llevando la respuesta inmune hacia un perfil de citoquinas Th2, mientras el feto por su parte, por su localización anatómica, la expresión de moléculas de HLA no clásicas en el citotrofoblasto extraveloso y la producción de anticuerpos bloqueadores protectores en respuesta al reconocimiento de los diferentes HLA paternos, hace que se establezca un ambiente inmunosupresor en el útero grávido, (niveles bajos de anticuerpos bloqueadores se han asociados con similitud maternopaterna a nivel de HLA, especialmente con B, DP y DQ) (2, 24-26).

Expresión de moléculas HLA no clásicas (HLA-G, HLA-C, HLA-E)

Actualmente es bien sabido que el rechazo de un aloinjerto está mediado por genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), en el cual se encuentran los genes de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) y también se sabe que la incompatibilidad maternofetal no es deletérea durante el embarazo (2).

A pesar de que los mecanismos que inducen tolerancia durante el embarazo no están bien comprendidos, algunas características del estado inmunológico durante el embarazo se han aclarado en estos últimos años gracias a la ayuda de nuevas técnicas inmunológicas y estudios genéticos. Por ejemplo, la placenta no es una barrera inmunológica inerte, como fue sugerido por Medawar en 1953; muy por el contrario, la placenta es una barrera de intercambio celular entre la madre y el feto, transformándose en un sitio de tolerancia mutua entre madre y feto (2, 3).

El citotrofoblasto extraveloso, el cual es uno de los tejidos fetales que se pone en contacto directo con los tejidos maternos en el útero embarazado, no expresa moléculas HLA II (en trasplantes alogénicos estas moléculas son altamente inmunogénicas) ni tampoco expresa moléculas HLA I (expresadas en todas las células nucleadas); en cambio sí expresa moléculas de clase I no clásicas, como HLA-G, HLA-C y HLA-E. Otras células en las que se ha identificado mRNA HLA-G son las células columnares citotrofoblásticas, trofoblasto intersticial, trofoblasto endovascular, mientras que el sincitiotrofoblasto veloso no lo expresa (2, 9).

La asociación entre células NK deciduales y trofoblasto extraveloso (TEV), es importante para la modulación y la invasión en el proceso de la decidualización como ya se ha mencionado; esta interacción se da gracias a la unión de moléculas HLA I no clásicas y sus receptores específicos sobre las células NK deciduales como se describió anteriormente (8-10). Virtualmente todas las células NK deciduales CD56high expresan CD94/NKG2A cinco veces más que la NK de sangre periférica y estas células se unen al HLA-E a través de CD94; sin embargo, el HLA-E actúa como molé-

cula centinela sensible a la expresión de moléculas HLA-G; como describiré más adelante, las moléculas KIR2D expresadas por NK deciduals son específicas para HLA-C (9).

HLA-G

Por ser el primer gen de HLA descrito en los tejidos placentarios (clonado en 1987) y a su vez el que se produce en mayor cantidad en la interfase materno-fetal, ha despertado un gran interés en el área de la investigación en la inmunología reproductiva (27). El HLA-G tiene un polimorfismo limitado a diferencia de las moléculas HLA I clásicas, y esta naturaleza limitada y conservada es lo que permite la tolerancia del aloinjerto fetal; existe en múltiples isoformas como resultado del *splicing* alternativo, estas incluyen formas de transmembrana HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 y HLA-G4 así como también formas solubles HLA-G-5 y HLA-G6 (2, 9, 17, 18, 20).

Anteriormente se creía que el HLA-G sólo se expresaba en el tejido trofoblástico extraembrionario que invade la decidua durante la implantación del embrión. Recientemente se encontró que se expresa en las células endoteliales de los vasos sanguíneos coriónicos placentarios así como también en células del epitelio tímico y en monocitos activados en sangre periférica. Los niveles más altos de expresión de HLA-G se encuentran en células trofoblásticas, mientras que los niveles más bajos se encuentran en monocitos de sangre periférica. La IL-10 activa la transcripción de HLA-G en el trofoblasto humano durante el primer trimestre del embarazo y bloquea la expresión de moléculas de clase I y II en los monocitos y el INF γ aumenta la expresión de HLA-G en la superficie de los monocitos (20).

El HLA-G se coexpresa con el HLA-C y el HLA-E, ya que éstos son los que se unen con los receptores de las NK. En ensayos citotóxicos se ha encontrado que miembros de la familia de los ILT se unen a un amplio rango de moléculas clase I, incluyendo el HLA-G y la unión más específica se realiza a través de ILT4 con ayuda ILT2 sólo cuando este último se encuentra en altas concentraciones. El ILT2 se expresa en un 20-25% de las NK deciduals y tanto ILT2 e ILT4 en todos los macrófagos deciduals, lo que sugiere que las moléculas HLA-G modularían a los macrófagos más que a las células NK. Ultimamente se ha encontrado evidencia de que el KIR2DL4 se uniría a HLA-G cuando es expresado en altos niveles en líneas celulares NK y que estos receptores inhibirían la muerte celular en células transfectadas con HLA-G (2, 9, 27).

La coexpresión de HLA-G y HLA-C por células del citotrofoblasto extravascular y su reconocimiento por células NK a través de sus receptores KIR previene la citotoxicidad inducida por NK y junto con CD94/NK α 2 también controlan tanto el crecimiento como el rechazo del feto, siendo éste último el receptor inhibitorio predominante en el reconocimiento de HLA-G, cuando se asocia a HLA-E

(2,9,20,27). La baja expresión de HLA-G en el TEV se ha asociado con algunas patologías como la PE y abortos recurrentes (Figura 1) (1, 2, 9, 23, 28).

Expresión de antígenos paternos y producción de aloanticuerpos

La producción de anticuerpos antiantígenos paternos durante el embarazo está bien documentada. Los anticuerpos maternos antiantígenos HLA paternos se encuentran en un 20% en circulación en mujeres primigrávidas y en un 40% en multigrávidas. Presumiblemente la sensibilización es llevada a cabo por células nucleadas fetales que entran a la circulación materna durante el embarazo en el momento del parto. La presencia de estos anticuerpos es benéfica y en embarazos normales los antígenos, los anticuerpos anti-antígenos paternos y los complejos antígeno anticuerpo son detectados en forma muy temprana en las etapas iniciales del embarazo (1).

La respuesta aloinmune (diferencia inmunológica entre individuos de la misma especie) materna es contra algunos, pero no todos los antígenos HLA fetales. Estos anticuerpos también llamados anticuerpos protectores están regulados por HLA solubles (1,5); el papel de estos anticuerpos anti-antígenos paternos no está bien dilucidado aún, pero se cree que actuarían como anticuerpos antiidiotipo para evitar la respuesta inmune mediada por células, la que sería dañina para el feto; actuarían "escondiendo" los antígenos trofoblásticos o cubriendo los receptores de los LT maternos interviniendo en la respuesta inmune de la madre hacia el feto (5); además existe evidencia de que las mujeres compatibles con su pareja en los alelos HLA DQA1 fallan en la producción de aloanticuerpos y experimentan abortos recurrentes. La inmunización de estas madres con antígenos paternos con la producción subsiguiente de anticuerpos antiantígenos paternos resulta en la restauración de la compatibilidad reproductiva y se ha especulado que la formación de anticuerpos anti HLA paternos es un indicador de respuestas Th2 a los antígenos paternos (1, 5).

El R80K es un péptido de 80kDa expresado en el trofoblasto, LB y monocitos. Se ha demostrado que este péptido es una molécula clave para la actividad citotóxica de las células NK, y al parecer se expresa en placentas primigrávidas; posee una determinante aloantigénica completamente cubierta con anticuerpos maternos y se encuentra en todos los embarazos a término exitosos; parece ser que esta molécula debe estar cubierta por anticuerpos para evitar la citotoxicidad NK en el trofoblasto; si no existiesen anticuerpos anti-R80K el trofoblasto sería diana de toxicidad NK y llevaría a daño placentario (1, 29).

Ningún área de la medicina genera más controversia que la medicina reproductiva en relación con la generación de aloanticuerpos; las siguientes son algunas funciones establecidas de los anticuerpos antiantígenos paternos:

- Supresión de la inmunidad mediada por células y actividad citotóxica NK.

- Inmunotropismo del crecimiento trofoblástico y el desarrollo del mismo por la producción de GM-CSF y CSF-1.
- Crecimiento y desarrollo trofoblástico por la producción de GM-CSF y CSF (1)

La tolerancia materno-fetal es el resultado de la integración de los numerosos mecanismos de varios orígenes y modos de acción diferentes.

La tolerancia se inicia por estimulación inmunológica fetal (antígenos paternos), donde la compatibilidad entre los padres resulta en una inadecuada estimulación antigénica y falla en el establecimiento de una respuesta inmune tolerante por parte de la madre, que llevaría a un embarazo adverso, complicado, o a la pérdida del mismo, infertilidad, abortos recurrentes espontáneos, alteraciones del tubo neural y bajo peso al nacer (1, 23).

Respuesta aloinmune inadecuada: evaluación

1. Detección de anticuerpos maternos anti HLA clase I y II paternos por citometría de flujo
2. Cuantificación IgG antilinfocitos paternos:
 - 30%: normal
 - 4%: abortos recurrentes
 - 15-20%: abortos secundarios.
3. Tipificación HLA, B, C y DR / DQ
4. Tipificación molecular de HLA DQA
5. Respuestas autoinmunes:
 - a. Abortos recurrentes → 20% anticuerpos anti-fosfolípidos
 - b. Anticuerpos anti DNA y antihistonas
 - c. Anticuerpos antifosfolípidos → HLA DQ*0501
 - d. Anticuerpos antinucleares → moteado, bajos títulos
 - e. Antígeno nuclear extraíble → (+): medirlos cada dos semanas en el primer trimestre
 - f. Anticuerpos antinucleares → (+): 8% de embarazos normales, incluso con títulos de 1/80, pero no se ha correlacionado con el desarrollo de autoinmunidad o abortos recurrentes
 - g. Anticuerpos a otros fosfolípidos: fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina y ácido fosfatídico (no son aceptados universalmente para diagnósticos).
 - h. Anticuerpos antiantígenos endometriales, como causa de endometriosis (los estudios que se han hecho han encontrado antígenos de 60kD, 103kD, 71kD por Western blot, pero los anticuerpos antiantígenos endometriales serían la causa de infertilidad en mujeres con endometriosis (5, 30).

Mecanismos de tolerancia materno-fetal

Como es sabido la mitad del genoma fetal es de la madre y la otra mitad del padre; por este motivo el feto sintetiza antígenos considerados extraños para la madre, además las células fetales y las moléculas fetales potencialmente antigénicas son liberadas a la circulación materna durante

la fase proliferativa del trofoblasto como resultado de la ruptura de tejidos, evento que ocurre en el extremo terminal de las vellosidades coriónicas; en este momento se pone en contacto el sistema inmune materno con antígenos fetales, y a pesar de estos mecanismos, el feto es tolerado y el embarazo llega a término sin problemas inmunológicos ni para la madre ni para el feto. Como ya se ha descrito, este es un proceso regulado muy estrictamente por factores endocrinos (hormonas) y por factores locales en la decidua, en el momento en que se ponen en contacto células fetales con células maternas ya sea por interacciones celulares o por factores autocrinos y paracrinos.

A continuación describiré las hipótesis de mayor relevancia que se ha planteado para explicar el fenómeno de tolerancia materno-fetal (2, 13).

Interacción NK / HLA-G, HLA-C, HLA-E

Como se había analizado, la molécula de clase I no clásica del complejo mayor de histocompatibilidad, HLA G es selectivamente expresada en la interfase fetoplacentaria en la superficie de las células citotrofoblásticas, que no expresan HLA A o HLA B, pero sí se expresan bajos niveles de HLA C. El hecho de que HLA G está limitado al proceso de gestación ha llevado a plantear la hipótesis que su papel es fundamental en la tolerancia inmunológica de la madre hacia el feto.

De los receptores de las células NK, el grupo de los CD94/NKG2, está involucrado en el reconocimiento de células que expresan HLA-G. Es de notar que la mayoría de las NK deciduales son CD94+. Sobre la base de estos hallazgos se podría plantear la hipótesis que el HLA-G bloquea la actividad lítica de las NK, contribuyendo así a la tolerancia del feto (2, 10, 18-20, 23, 24, 27) (Figura 1).

LIF (*leukemia inhibitory factor*) y balance Th1/Th2

El endometrio materno sintetiza y secreta una molécula hidrosoluble llamada *leukemia inhibitory factor* (LIF), después del ciclo menstrual y está relacionado con el ciclo de la progesterona. Durante la implantación, el endometrio secreta LIF mientras que el blastocisto expresa el receptor LIF-R; esta interacción favorece el embarazo ya que el LIF es sintetizado por la decidua y por linfocitos TH2 mientras

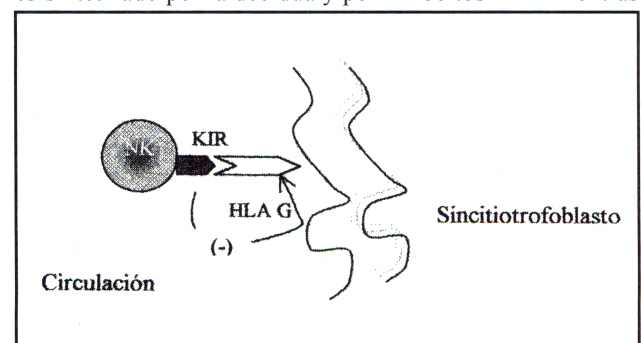


Figura 1. Interacción NK/HLA-G, HLA-C, HLA-E.

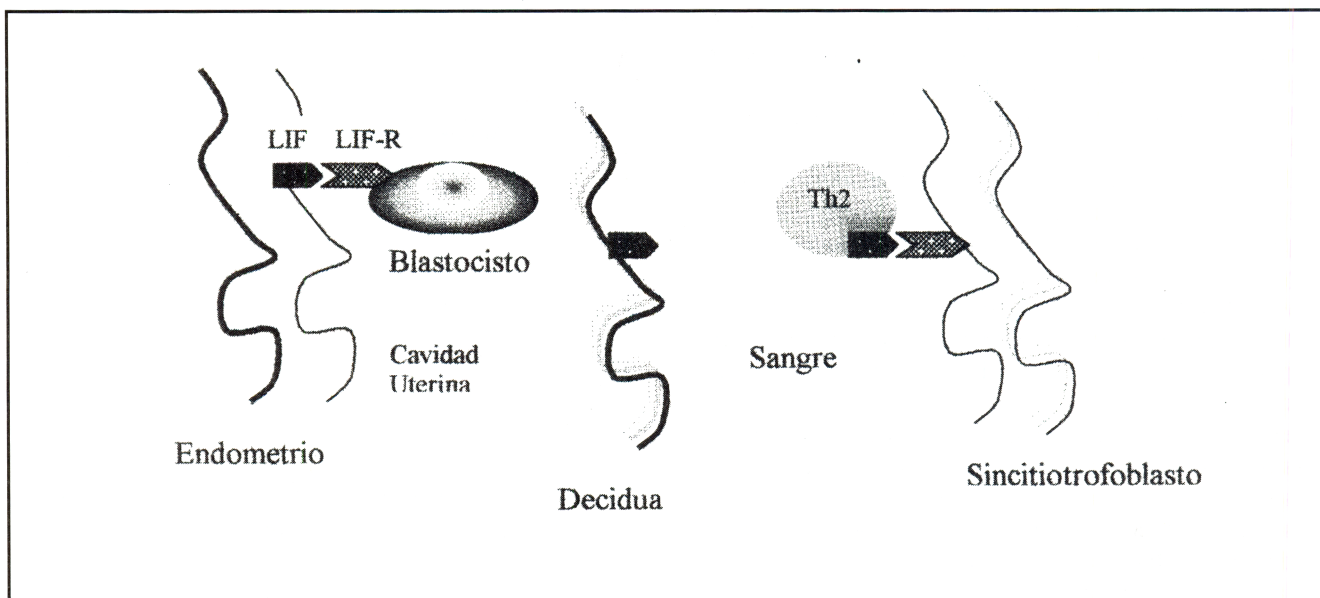


Figura 2. Leukemia inhibitory factor (LIF) y balance Th1 / Th2.

que el sincitiotrofoblasto expresa LIF-R; la unión de estas dos moléculas es requerida para el crecimiento y diferenciación trofoblástica; a su vez está implicada en el balance y regulación Th1/Th2, la cual está regulada por la progesterona como describiremos a continuación (23) (Figura 2).

Balance Th1 / Th2

El embarazo normal se caracteriza por una carencia de inmunidad antifetal mediada por células y por una respuesta humoral en forma dominante. Th1 y Th2 son las principales subpoblaciones de los LT CD4+ y sus funciones diferenciales en la respuesta inmune se correlacionan con su patrón de secreción de citoquinas.

Wegman demostró una desviación hacia una respuesta Th2 en el embarazo normal, demostrando que los tejidos

fetoplacentarios secretan espontáneamente un patrón de citoquinas Th2: IL-4, IL-5, IL- 6,y IL-10 (1, 17, 25, 26, 31, 32). El trofoblasto fetal expresa receptores de baja afinidad para las citoquinas relacionadas a un perfil Th1 tales como TNF α , INF γ , y GM-CSF. Se ha demostrado que el INF γ inhibe el crecimiento trofoblástico e inhibe la secreción de GM-CSF; el TNF α junto con el INF γ , inhiben el desarrollo embrionario, fetal y la proliferación de trofoblasto; el TNF α media la muerte apoptótica del trofoblasto y produce contracción uterina como respuesta a la necrosis de embriones implantados (1, 17, 25, 33). Uno de los mecanismos de protección fetal es el cambio de fenotipo de células Th1 a Th2; la producción de IL-2 en embarazadas es menor que en no embarazadas y se puede ver una disminución progresiva de la función Th1 a lo largo de los trimestres del embarazo. También existe un aumento de la producción de sTNF-R por

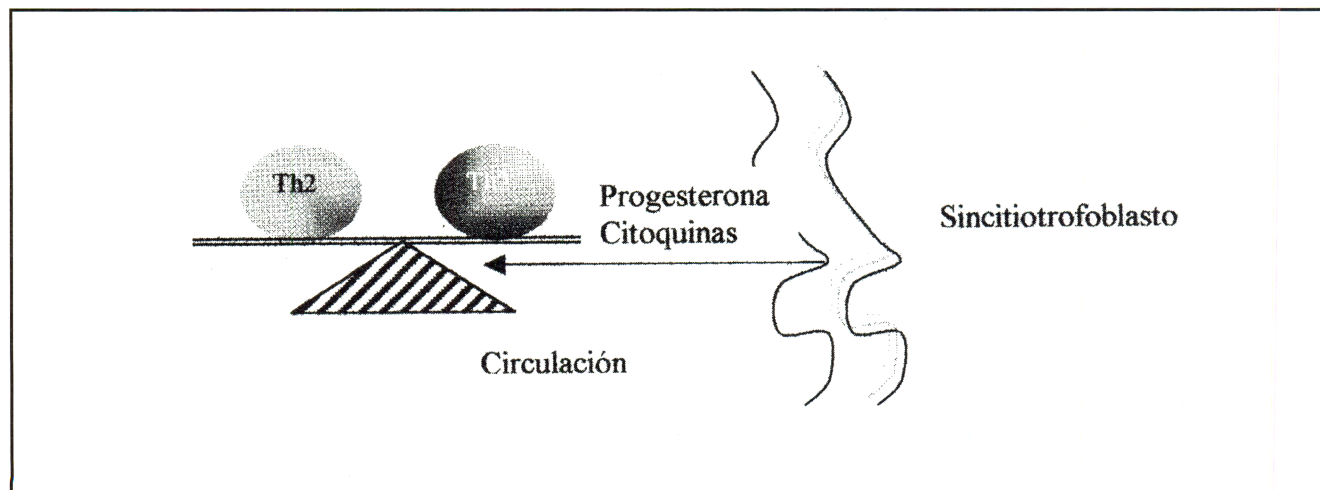


Figura 3. Balance Th1 /Th2.

parte del sincitiotrofoblasto al igual que de IL-10 e IL-4, este cambio de fenotipo no ocurre sólo a nivel fetoplacental sino también a nivel sistémico (23, 25, 31, 33, 34).

Los mecanismos propuestos para una desviación hacia Th1 son:

1. La progesterona es capaz de inducir el cambio de linfocitos Th1 a través de PIBE, este factor inhibe la proliferación de linfocitos, la activación de células NK y la producción de TNF α (26).
2. Apoptosis de células T. La eliminación de LT autorreactivos dirigidos contra el feto pueden constituir un importante mecanismo para evitar el rechazo; se ha visto que la expresión de Fas en LT aumenta durante el embarazo normal, manteniéndose invariable la expresión de la molécula antiapoptótica Bcl2; como los Th1 son los que van a apoptosis vía Fas-FasL, hay una sobrevida de los Th2. También se encuentra aumento de FAP (fosfatasa alcalina asociada a Fas) inhibidor de la vía de señalización de Fas en los Th2 (23, 25).

Los linfocitos activados producen grandes cantidades de IL-10 en presencia PIBF, el cual inhibe a la NK aumentando la síntesis de IL-10 al igual que la IL-12 producida por LT activados que inhiben la actividad citolítica de las NK (26) (Figura 3).

Apoptosis

La vía CD95/CD95L es una vía apoptótica utilizada por el sistema inmune durante la linfopoiesis e inmunopoiesis; está principalmente implicada en la regulación de los procesos de recambio celular, eliminación de células tumorales, respuesta antiviral y protección de algunos tejidos a la acción de LTC. También se encuentra esta actividad en los mecanismos de selección clonal (selección positiva y negativa) y en las vías citolíticas de las NK, Th1 y LTC. El CD95 es expresado por las células efectoras y el CD95L en las células diana, para la protección de algunos sitios inmunoprivilegiados estas moléculas están activas, por ejemplo, en el citotrofoblasto veloso, en las vellosidades de anclaje del sincitiotrofoblasto, siendo capaces de activar y matar células sanguíneas que poseen CD95 que entren en contacto con el feto. Las células trofoblásticas que expresan CD95L inducen apoptosis en LT que expresan CD95, pero también expresan CD95, este CD95 desempeña un papel importante en limitar la proliferación del trofoblasto, pero no toda la muerte por apoptosis ocurre vía CD95-CD95L, también se encuentra activada la vía de TNF-TNFR, estos sistemas activados protegerían el feto ya que se eliminarían activamente LT citotóxicos para el trofoblasto (23) (Figura 4).

Anexinas

Las anexinas son un grupo de proteínas que actúan como reguladores naturales e inhibidores naturales de la coagulación (35, 36). Actúan de manera calcio dependiente uniéndose a fosfolípidos amónicos (cargados negativamente) entre los cuales se encuentra la fosfatidilserina. Su

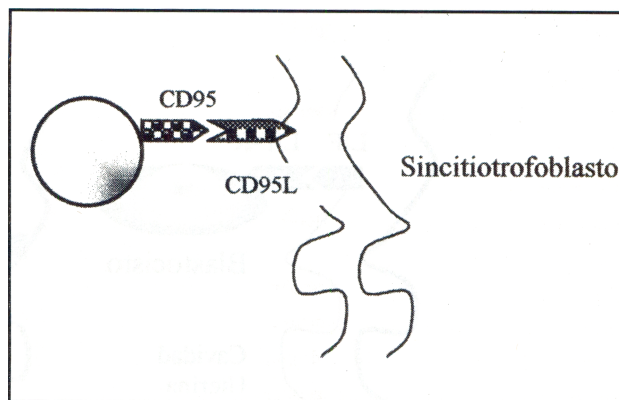


Figura 4. Apoptosis.

función principal es inhibir los pasos dependientes de fosfolípidos, haciendo a los fosfolípidos inaccesibles a los factores de coagulación (36, 37).

Las anexinas son proteínas asociadas a membrana y son expresadas en células tumorales, células normales y en la placenta; la anexina II se ha encontrado que inhibe la linfoproliferación y la secreción IgG e IgM por las células inmunes maternas, confiriéndole protección al feto (23). La anexina V, (también llamada PAP-1 por proteína anticoagulante de placenta) con potente actividad anticoagulante, ya que *in vitro* inhibe el complejo protrombinasa; se ha demostrado que es una proteína necesaria para mantener la integridad de la placenta (sobre la superficie apical de las vellosidades placentarias) que realiza un papel como trombo-regulatorio en la interfase maternofetal, ya que *in vitro* se ha observado que compite con los fosfolípidos (35-38) (Figura 5).

Conclusión

La reproducción humana comprende una paradoja fundamental: aunque es crítica para la supervivencia de las especies, el proceso es relativamente ineficiente; la fecundidad máxima es sólo del 30% y sólo el 50-60% de las concepciones alcanzan la semana 20 de gestación. De los embarazos que se pierden, el 75% ocurre por fallas en la

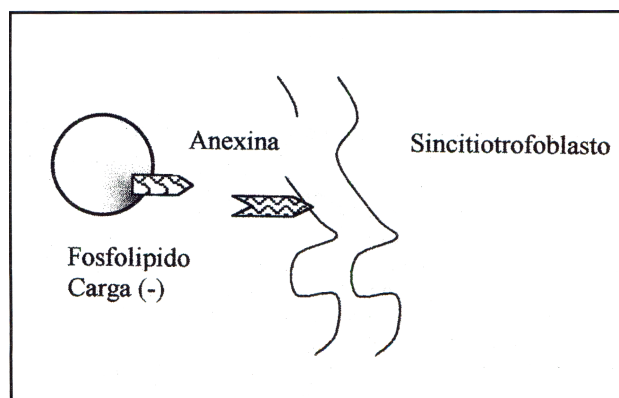


Figura 5. Anexinas.

Glosario

Ac: anticuerpo

ADCC: citotoxicidad mediada por anticuerpos

Ag: antígeno

CD: células dendríticas

CD y número; cluster of differentiation XX

CSF: factor estimulante de colonias

DAPI2: molécula adaptadora de transmembrana asociada a ITAM en las NK

FeR: receptor de la porción Fc de las inmunoglobulinas

G-CSF: factor estimulante de colonia de granulocitos

GM-CSF: factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos

HLA: antígenos de histocompatibilidad leucocitarios

Ig: inmunoglobulina

IL: interleuquina

INF: interferon

ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif

ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

LB: linfocito B

LES: lupus eritematoso sistémico

LN: lupus neonatal

LT: linfocito T

LTC: linfocito T citotóxico

LTH: linfocito T ayudador

LTh1: linfocitos T ayudadores 1

LTh2: linfocitos T ayudadores 2

LTS: linfocitos T supresor

NK: células natural killer

PGE2: prostaglandina E2

SAFL : síndrome antifosfolípido

SH2: dominio 2 homólogo a Src

TEV: trofoblasto extraveloso

TNF: factor de necrosis tumoral

TV: trofoblasto veloso

VLA-1: very late antigen (integrina B1)

PE: preeclampsia

implantación, concepto fundamental que naturalmente pasa inadvertido, en donde participan diferentes elementos como el LIF, moléculas de adhesión, metabolitos de estrógenos, citoquinas, prostaglandinas, enzimas como las ciclooxigenasa, metaloproteasas y sus inhibidores. La implantación y placenta normal son críticas para un embarazo exitoso. Un mejor entendimiento de los organismos moleculares de estos procesos mejoraría la habilidad del clínico para tratar patologías como el síndrome antifosfolípido, la preeclampsia y las pérdidas fetales tempranas.

Finalmente, podemos concluir que existen varios mecanismos involucrados en la tolerancia maternofetal (39-41), todos ellos correlacionados los unos con los otros, existiendo una verdadera integración de estos elementos, que aun

cuando son de origen y modo de acción diferente, resultan en el regalo y milagro más hermoso que se nos ha dado, la vida; sin embargo, cuando estos mecanismos pierden su homeostasis, llevarían a un desequilibrio del sistema inmune en la interfase maternofetal lo que provocaría patologías asociadas como síndrome antifosfolípido, preeclampsia, abortos recurrentes e infertilidad, entre otros.

Summary

The fetus considered as a semiallogenic transplant, who develops during nine months in the maternal womb, makes us glimpse the idea of protective mechanisms preventing damage induction to this fetus, allowing its survival and tolerance. These mechanisms, tuned very subtly and located in a privileged place, avoid this fetus of rejection, while the mother continues maintaining the perfect homeostasis of her immunologic system.

The tolerance toward the semiallogenic fetus expressed by the maternal immune system is an active mechanism. While preventing the fetus recognition as a strange tissue and being rejected by the maternal immune system cells, the placenta acts as an active immunologic barrier, in the sense that allows that two antigenically different organisms tolerate each other. The tolerance toward the fetus is carried out by the natural killer cells interaction with its respective receptors; molecules HLA G, HLA C; the different cytokine Th1 and Th2 subpopulation balance, apoptosis mechanisms and the synthesis of regulating factors such as cytokines and hormones.

All these mechanisms involved in the maternal-fetal tolerance, are correlated among themselves, existing a true integration of these elements that even having different origin and action mechanisms, result in the existence of another human being.

Key words: *immunology, maternal/fetal tolerance, maternal immune system reproduction.*

Referencias

1. Beer A, Kwak J. Immunology of ormal pregnancy. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 1998; **18**: 249-327
2. Ober C. HLA and Pregnancy. The Paradox of the Fetal Allograft. *America Journal of Human Genetics* 1998; **62**: 1-5.
3. Medawar P. Some Immunological and Endocrinological Problems Raised by Evolution of Viviparity in Vertebrates. *Symposium Society Experimental Biology* 1953; **7**: 320-328.
4. Billingham RE, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953; **172**: 603-606.
5. Scott R, Brnch W. Potential Aloimmune Factors and Immunotherapy in Recurrent Miscarriage. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 1994; **37**: 761-767.
6. Salafia C. The Normal Placenta. Immune Anatomy and Function. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 1998; **18**: 271-291
7. Pernoll M. Diagnóstico y tratamiento gineco-obstétricos. 6a. edición. Editorial el Manual Moderno, S.A de C.V. 1993, Capítulo 18.
8. Kam E, Gardner L, Loke YW, King A. The Role of Trophoblast in the Physiological Change in Decidual Spiral Arteries. *Human Reproduction* 1999; **14**: 2131-2138.
9. King A, Hiby S, Gardner L, et al. Recognition of Trophoblast HLA Class I Molecules by Decidual NK Cell Receptors-A Review. *Trophoblast Research* 2000; **14**: S81-S85.
10. King A. Uterine Leukocytes and decidualization. *Human Reproduction Update*

- 2000; 6: 28-36.
11. **King A, Burrows T, Verma S, et al.** Human Uterine Lymphocytes. *Human Reproduction* 1998; **4**: 480-485.
 12. **King A, Wai Loke Y, Chaouat G.** NK Cells and Reproduction. *Immunology Today* 1997; **18**: 64-66.
 13. **Seaman W.** Natural Killer Cells and Natural Killer T Cells. *Arthritis and Rheumatism* 2000; **43**: 1204-1217
 14. **Watanabe M, Iwatani Y, Kaneda T, et al.** Changes in T, B, and NK Lymphocyte Subsets During and After Normal Pregnancy. *Am Journal of Reproduction Immunology* 1997; **37**: 368-377.
 15. **Redline R.** Role of Uterine Natural Killer Cells and Interferon γ in Placental Development. *Journal Experimental Medicine* 2000; **192**: F1-F4 Commentary.
 16. **Guimond M, Wang B, Croy BA.** Immune Competence Involving the Natural Killer Cell Lineage Promotes Placental Growth. *Placenta* 1999; **20**: 441-450.
 17. **Rukavina D, Podak E.** Abundant Perforin Expression at the Maternal-Fetal Interface: Guarding the Semiallogenic Transplant?. *Immunology Today* 2000; **21**: 160-163.
 18. **Le Bouëtier P, Sargent L.** HLA Class I Molecules in the Placenta: Which Ones, Where and What for? - A Workshop Report. *Placenta 21 sup A, Trophoblast Research* 14, 2000; S93-S96.
 19. **Söderström K, Corliss B, Lanier L, Phillips J.** CD94/NKG2 Is the Predominant Inhibitory Receptor Involved in Recognition of HLA-G by Decidual and Peripheral Blood NK Cells. *Journal of Immunology* 1997; **159**: 1072-1075.
 20. **Carosella E, Rouas-Freiss N, Paul P, Dausset J.** HLA-G: A Tolerance Molecule From de MHC. *Immunology Today* 1999; **20**: 60-62.
 21. **Bhat NM, Mithal A, Bieber MM, Herzenberg, et al.** Human CD5+ B Lymphocytes (B-1) decrease in Peripheral Blood During Pregnancy. *Journal of Reproduction Immunology* 1995; **28**: 53-60.
 22. **Abbas A, Lichtman A, Pober J.** Cellular and Molecular Immunology, 4th edition, chapter 10 W.B. Saunders Company, 2000.
 23. **Thellin O, Coumans B, Zorzi W, et al.** Tolerance to the Foeto- Placental "Graft": Ten Ways to Support a Child for Nine Months. Current Opinion in Immunological Pregnancy Protective Effect of Progesterone is Manifested via Controlling Cytokine Production. *American Journal of Reproductive Immunology* 1996; **35**: 348-351.
 24. **Sacks G, Sargent I, Redman C.** An Innate View of Human Pregnancy. *Immunology Today* 1999; **20**: 114-118.
 25. **Raghupathy R.** Th1 - Type Immunity is Incompatible with Successful Pregnancy. *Immunology Today* 1997; **18**: 478-482.
 26. **Szekeres-Bartho J, Faust Zs, Varga P, et al.** The Immunological Pregnancy Effect of Progesterone Is Manifested via Controlling Cytokine Production. *American Journal of Reproductive Immunology* 1996; **35**: 348-351.
 27. **Van der ven K, Pfeiffer K, Skrablin S.** HLA -G Polymorphism and Molecule Function-Questions and More Questions-A review. *Placenta 21 sup A, Trophoblast Research* 2000; **14**: S86-S92.
 28. **Rouas-Freiss N, Marchal-Bras Goncalves R, et al.** Direct Evidence to Support the Role of HLA-G in Protecting the Fetus from Maternal Uterine Natural Killer Cytotoxicity. *Proceedures of Natural Academy of Science USA* 1997; **94**: 11520-11525.
 29. **Mowbray J, Jalali R, Chaouat G, et al.** Maternal response to Paternal Trophoblast Antigens. *American Journal of Reproductive Immunology*, 1997; **37**: 421-426.
 30. **Stovall D, Van Voorhis B.** Immunological test and Treatments in patients with Unexplained Infertility, IVF-ET, and Recurrent Pregnancy Loss. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 1999; **42**: 979-1000.
 31. **Rukavina D, Vince G.** Roles of Cytokines and Immune Cells at the Interface-a Workshop Report. *Placenta 21 sup A Trophoblast Research* 14, 2000; S97-S98.
 32. **Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, et al.** Cytokine Production by Maternal Lymphocytes During Normal Pregnancy and in Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion. *Human Reproduction* 2000; **15**(3).
 33. **Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, et al.** Circulating Cytokines and CD 30 in Normal Human Pregnancy and Recurrent Spontaneous Abortions. *Human Reproduction* 2000; **15**: 2011-2017.
 34. **Seth G.** Role of FasL in Conferring Immune Privilege to Non-lymphoid Cells. *Annals New York Academy of Sciences*, 1997; **26** (828 268).
 35. **Rand JH.** Antiphospholipid Antibody- Mediated Disruption of the Annexin-V Antithrombotic Shield: A Thrombogenic Mechanism for the Antiphospholipid Syndrome. *Journal of Autoimmunity* 2000; **15**: 107-111.
 36. **Gharavi A, Pierangeli S, Levy R, et al.** Mechanism of Pregnancy Loss in Antiphospholipid Syndrome. *Clinical Obstetrics & Gynecology* 2001; **44**: 11-19.
 37. **Ogawa H, Zhao D, Dlott J, et al.** Elevated Anti-Annexin V antibody Levels in Antiphospholipid Syndrome and Their Involvement in Antiphospholipid Antibody Specificities. *American Journal Clinical Pathology* 2000; **114**: 619-628.
 38. **Sugimura S, Kanayama M, Konayama M, Kobayashi T, et al.** Immunohistochemical Study of Annexin V Expression in Placenta of Pre-Eclampsia. *Gynecology Obstetrics Investigation* 2000; **49**: 17-23.
 39. **Lim K Odukoya O, Ajjan R, et al.** The Role of T-Helper. *Cytokines in Human Reproduction Fertility and Sterility* 2000; **73**: 136-142.
 40. **Borel IM, Miranda S, Freire SM, et al.** Modulation of the Humoral Immune Response by Placental Secretory Factors. *American Journal Reproduction Immunology* 1996; **35**: 529-533.
 41. **Silve R, Branch W.** Recurrent Miscarriage: Autoimmune Considerations. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 1994; **37**: 745-760.