

Tesis de Posgrado

Mecanismos inmunológicos involucrados en la prevención del rechazo semi-alogénico fetal

Ramhorst, Rosanna Elizabeth

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ramhorst, Rosanna Elizabeth. (2003). Mecanismos inmunológicos involucrados en la prevención del rechazo semi-alogénico fetal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3601_Ramhorst.pdf

Cita tipo Chicago:

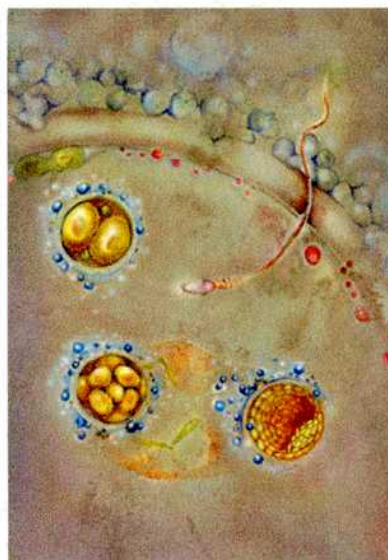
Ramhorst, Rosanna Elizabeth. "Mecanismos inmunológicos involucrados en la prevención del rechazo semi-alogénico fetal". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3601_Ramhorst.pdf

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires, Argentina

Tesis de Doctorado

***Mecanismos inmunológicos involucrados en la prevención del
rechazo semi-alogénico fetal***

Lic. Rosanna Elizabeth Ramhorst



316011

Director:

Prof. Dr. Leonardo Fainboim

Director Asistente:

Dra. Verónica García

Lugar de realización:

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas "José de San Martín"

Universidad de Buenos Aires. Argentina.



Buenos Aires, Julio 2003

A la memoria de Biby y Leito

A Pablo, compañero de todos mis sueños y proyectos

A Ignacio, Bianqui y Ani, los soles de mi vida

A las abuelas con mayúsculas, Lina y Marga

Agradecimientos

Al Dr. Leonardo Fainboim, Director de este trabajo, por su esfuerzo y orientación que me brindó durante la realización del mismo. Gracias Leo por confiar en mí !!

Al Dr. Gabriel Rabinovich, por el tiempo y todo el aporte intelectual que realizó en el presente trabajo desinteresadamente. Gaby, realmente siempre valoré mucho toda tu ayuda. Fue una experiencia muy linda y muy productiva trabajar con vos y con tu grupo !!!!

A la Dra. Verónica García, la Directora Asistente, quien me brindó su apoyo y sus consejos a lo largo del presente trabajo. Vero, me enseñaste actitudes que no se pueden aprender leyendo papers o en cursos, gracias !!!

A Bibi Achino, una amiga del alma que dejó para siempre su huella en mi vida en todos los sentidos. Profesionalmente me enseñó amar a la ciencia y a los cultivos celulares. En lo personal me enseñó a mirar la vida con una sonrisa y una carcajada y que el día de hoy hay que vivirlo a pleno.

A Leito Satz, el profesor sangre, que gracias a sus clases magistrales decidí trabajar en Inmunología clínica. Leito, no solamente me abriste las puertas a la investigación sino también al laboratorio de Inmunogenética.

A Chulu y a Lore, mi cuñado y mi hermana del alma, porque siempre están allí en todos los momentos de mi vida, ya sean buenos o malos, dandome buenos consejos o simplemente acompañandome. Gracias por contenerme en los momentos difíciles. Realmente, no puedo concebir la idea de tenerlos lejos. Los quiero !!!!!

A Pablo, el copiloto de mi vida, porque no solamente me acompañas en cada sueño de mi vida, sino porque también siempre sos parte de él. Por crecer a tu lado y por ayudarme a alcanzar cada meta poniendole energías para que las pueda alcanzar. Sin ti pierdo el camino !!!

A mis hijo, lo más hermoso y valioso de mi vida.
A Nachito, la dulzura con piecitos. Gracias por todos tus mimos y energía contagiosa, por hacerme sentir una Diosa y la persona mas importante en tu vida.
A Bianqui, una personita con una personalidad y fuerzas que la hacen única. Sos un sol que todos los días iluminas la vida a todos los que estamos a tu alrededor.
A Anita, por acompañarme en todo momento. Tenerte en mi panza mientras que escribía esta tesis, no solamente fue un placer sino que también me sentí feliz de compartirlo con vos.

Nacho, Bianqui y Ani, quiero darles las gracias por entender, a pesar de sus pocos añitos, lo importante que es este momento para mamá y quiero decirles una vez más que son y serán la prioridad de mi vida !!!!!.

A mi mamá, a quien amo profundamente y marcó mi vida enseñándome a amar y a valorar los conocimientos. Mami, me inculcaste con fuego el instinto de superación y que puedo lograr cada meta que me proponga. Gracias mami, Te quiero !!!

A la abuela Marga por ayudarme con mis enanos. Gracias a tu tiempo pude hacer todos los cursos que necesitaba y al Abuelo Carli quien te viene a buscar a mi casa religiosamente.

A Adry, por acompañarme en mi locura, porque siempre estas al pie del cañón en todos los aspectos desde lo profesional hasta lo personal. Adry realmente, gracias a tu trabajo yo puedo estar hoy presentando la Tesis. Gracias Adry por estar a mi lado!!!

|
A Evange y a Sandrita por compartir las tareas de todos los días, desde papers, resultados, hasta mates. Con ustedes pasé momentos únicos, compartiendo desde el experimento que no dió nada hasta ser las primeras en enterarse que iba a ser mamá una vez más !!! Gracias amigotas, las extraño!!!

A Nati, mi hermanita menor, por todo lo que me enseñaste en la mesada y por hacerme reír con tus ocurrencias. Gracias por ayudarme en cualquier cosa que necesite, pero por sobre todo por ser mi amiga. Sé que puedo contar con vos incondicionalmente en cualquier cosa !!!

A Alejandra C. Marcelo G., Norberto Z. y María del Carmen S. porque han colaborado en mi formación ayudándome en distintos puntos de este trabajo. Gracias a todos por estar ahí cuando los necesité !!!

A Vrigi, por su dulzura y paciencia única de todos los días

A Gus (el Chuiqui) porque siempre está dispuesto a colaborar con una sonrisa.

A Flor, por bancarme todos los días y por todo el soporte profesional que brindó en las citometrías de este trabajo.

A Luciana, la típica científica siempre dispuesta a ayudar en lo que seall.

A Marta y a Merce genias !!!, siempre con una sonrisa y una solución a cualquier problema.

A Juli, voy siguiendo tus pasos y tus consejos!!!

A Guille, el showman del laboratorio por hacerme reír y hacer divetido hasta lo mas aburrido.

A toda la gente linda del Lab Satz, Astrid, Viky, Laura, poque todos los días están allí acompañándome y escuchándome con ricos mates!!

A toda la gente del Lab de Inmunogénética, todos de una u otra forma contribuyeron y permitieron que haya llegado a este punto: Yani M., Graciela T. , Mónica C. , Livio S., Vivi L., Nora H., Ceci M., Yoli, Nelly y Gaby M.

Al Dr. Rossi J y al Tucu por aguantarse horas pasando células por el citómetro haciendo los “famosos sortings”

A todos los que ya no trabajan mas en el lab, pero que sin embargo por su paso por el lab, también contribuyeron de una u otra forma, Kolkito, Marcelo P, Nancy L.y Popi.

A todas las Pacientes y Doctores que confiaron en estos resultados y contribuyeron a continuar con la investigación de los Abortos Recurrentes Espontáneos.

A todos quiero decirles de corazón mil GRACIAS!!!!!!!

***Deja que tus sueños sean olas que se van libres como el viento en mitad del mar creo que la vida es un tesoro sin igual de los buenos tiempos siempre quiero más.....
(Sueños: Diego Torres)***

Acs.: Anticuerpos

Ag.: Antígeno

APC: Célula presentadora de antígeno

ARE: Aborto recurrente espontáneo

CCR5: Receptor de quimioquina tipo 5 de la familia CC

CCR7: Receptor de quimioquina tipo 7 de la familia CC

CD: Cluster de diferenciación

CFDA: Diacetato de carboxi fluoresceína

CML: Cultivo mixto linfocitario

CMXC: Corss-match por citometría

CMXM: Corss-match por microlinfocitotoxicidad

CSF-1: Factor estimulador de colonia de tipo 1

CXCR4: Receptor de quimioquina tipo 4 de la familia CXC

DTT: ditionitrosol

EGLs: Linfocitos granulares endometriales

FB: Factores bloqueantes

Gal-1: Galectina-1

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

HLA: "Human leukocyte antigen"

HRP: "Horseradish peroxidase"

IFM: Intensidad de fluorescencia media

Ig: Inmunoglobulina

INF γ : Interferón γ

IGIV: Inmunoglobulina intravenosa

IL: Interleuquina

IP: Ioduro de propidio

LAK: Células NK activadas por IL-2

MCP-1: proteína quimiotractante de macrófagos

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MIP-1 α : Proteína inflamatoria de macrófagos tipo α

MIP-1 β : Proteína inflamatoria de macrófagos tipo β

MNT: Mononucleares totales

NK: "Natural killer"

PBS: Buffer fosfato

PHA: Fitohemaglutinina

PMA: "phorbol myristate acetate"

RANTES: "Regulated on activated normal T-cell expressed and secreted)

SAP: Proteína asociada a SLAM

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SFB: Suero fetal bovino

SLAM: Molécula de activación linfocitaria para la señalización

TBE: Tris borato EDTA

TCR: Receptor de linfocito T

TDG: Tiodigalactósido

TGF β : Factor transformante β

TNF α : Factor de necrosis tumoral tipo α

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

ZVAD-fmk: benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone

Foto en la tapa: Jilian O' Malley
Fine Art and Design
"Fertilization"

INTRODUCCIÓN

Generación de la interfase materno-fetal

1. Decidualización

El proceso que transforma el endometrio en decidua involucra una serie de eventos coordinados que afecta a varias poblaciones celulares presentes en la mucosa uterina. Luego de la menstruación, bajo la influencia de estrógenos se produce una rápida proliferación de células epiteliales y estromales (fase proliferativa). Posteriormente a la ovulación, cuando los niveles de progesterona comienzan a aumentar, cesa la proliferación y comienza la diferenciación (fase lútea o secretoria). Este proceso se inicia en el ciclo menstrual normal y eventualmente termina junto con él. Si ocurre la fertilización, los cambios en las células estromales son más evidentes y llevan a la diferenciación de la decidua en capas con funciones más especializadas. La principal función de la misma será la de soporte sólido para la nutrición y desarrollo del feto (1).

2. Desarrollo del trofoblasto e implantación del blastocisto

Una vez producida la fecundación, entre el oocito y el espermatozoide, la célula huevo comienza a dividirse en forma desigual dando lugar a los blastómeros. En el estadio de 8 células los blastómeros comienzan a compactarse formando la mórula. Los 4 blastómeros periféricos darán lugar al trofoectodermo mientras los 4 internos darán origen al macizo celular interno (embrión propiamente dicho).

Mientras las divisiones continúan, en la mórula se genera una cavidad interna (blastocelo) y el macizo celular interno quedará ubicado en el polo apical, dando lugar entonces al blastocisto. Cuando éste llega al útero, luego de 6 o 7 días de la ovulación se producirá un contacto inicial entre el trofoectodermo y el epitelio uterino. Al momento de la implantación, el epitelio se encuentra “receptivo” bajo la influencia de hormonas esteroideas. El período de receptividad o “ventana de

implantación” en el hombre dura aproximadamente 7 días e involucra cambios estructurales como pérdida de las vellosidades y alteraciones en las uniones celulares estrechas. Las bases moleculares de la ventana de implantación todavía no son muy claras. Sin embargo las evidencias sugieren que el estado receptivo del útero esta sincronizado con el estado de activación del blastocisto (1,2). En ese momento el trofoectodermo pasa a ser el trofoblasto que posteriormente se diferenciará en dos capas. Una más externa multinucleada llamada **sinciciotrofoblasto** y la otra más interna conteniendo células monucleares llamada **citotrofoblasto primitivo**. Este último se diferencia siguiendo 2 caminos: el citotrofoblasto viloso y el extraviloso (ver Figura 1). Ambos poseen tipos celulares fenotípicamente y funcionalmente distintos e interaccionan con distintas células maternas. El trofoblasto viloso cubre la placenta definitiva y participa en funciones de oxigenación y transporte de nutrientes. Por el contrario, el citotrofoblasto extraviloso migra profundamente en la mucosa uterina contactándose con células maternas. Finalmente el blastocisto queda incluido en el endometrio uterino. Así, el trofoblasto está programado para invadir cualquier tejido y la decidua esta especializada en controlar la sobre invasión del mismo (1).

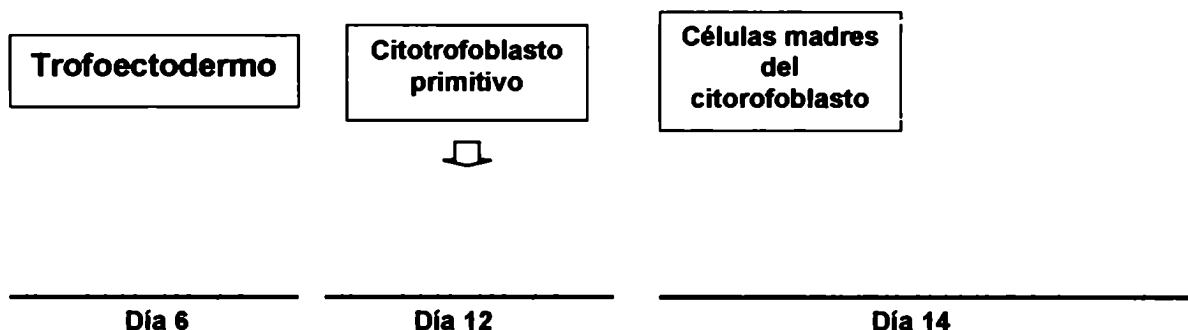


Figura 1: Esquema representativo de los caminos de diferenciación del trofoblasto.

Tolerancia inmunológica materna

1. Generalidades

Durante el embarazo las células fetales que expresan antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad, ocupan las estructuras del útero y son capaces de sobrevivir al rechazo inmunológico materno (3). La tolerancia fetal por el sistema inmune materno constituye un enigma que ha estimulado a la investigación durante los últimos 50 años. En 1953 Medawar y Billingham publicaron un artículo tratando de explicar como el embrión evita el ataque materno (4). En esa ocasión postularon 4 posibles mecanismos:

- La separación anatómica entre la madre y el feto
- La inmadurez antigénica del feto, o sea falta de inmunogenicidad
- Disminución de la respuesta inmune materna y
- La tolerancia inmunológica materna.

Hoskin y Murguía (5) evidenciaron la generación de una respuesta inmune materna hacia células fetales demostrando que el embrión es inmunogénico. Por otra parte, observaciones médicas y la evaluación de la respuesta inmune de mujeres embarazadas sometidas a distintos estímulos, mostraron que la respuesta inmune materna no se encuentra disminuida durante el embarazo. Finalmente, la posibilidad de embarazos ectópicos demuestran que el útero no es el único sitio inmunológicamente privilegiado. Por estos motivos se ha postulado a la tolerancia materna como el mecanismo de mayor relevancia, en el cual la placenta tendría un papel activo en la generación de la misma.

El feto constituye un semi-injerto (ya que posee antígenos maternos propios y paternos alogénicos). La tolerancia a los antígenos paternos, involucraría mecanismos activos que evitarían el reconocimiento y rechazo fetal.

Existen evidencias que el repertorio de linfocitos T maternos con especificidades hacia antígenos de histocompatibilidad de clase I paternos se encuentran durante el embarazo en un estado de tolerancia transitoria. La presencia de células fetales en la circulación materna demuestra que el sistema inmune materno entra en contacto con las moléculas inmunogénicas fetales. Se ha tratado de explicar este estado de tolerancia a través de la participación de diversas poblaciones celulares presentes en la decidua materna, por citoquinas producidas por estas células o por factores aún no caracterizados. Por lo tanto se desprende que los mecanismos son múltiples y pueden actuar en forma sinérgica (6,7).

2. Factores regulatorios locales

2.1 Balance de la respuesta Th1/Th2

Los leucocitos son un constituyente importante del endometrio humano. Durante la fase proliferativa del ciclo menstrual llegan a formar el 10% de las células estromales, en momentos previos a la implantación constituyen el 20% y en las etapas tempranas del embarazo, cuando el endometrio se convierte en decidua, los leucocitos llegan a constituir el 30% de las células deciduales (8). Las poblaciones celulares presentes en la decidua son: macrófagos, células Natural Killer (NK), linfocitos B y linfocitos T (LT). En particular los linfocitos T y las células NK constituyen poblaciones heterogéneas, ya que pueden identificarse subpoblaciones de acuerdo al patrón de citoquinas que secreten.

Las células T vírgenes caracterizadas por la expresión de la molécula CD45RA en su superficie, al reconocer su antígeno específico y luego de recibir las señales coestimuladoras necesarias, se diferencian en células efectoras y de memoria que adquieren la molécula CD45RO; producen distintas citoquinas y proliferan (9). Las

citoquinas son moléculas de bajo peso molecular con muy variados efectos locales. Según el patrón de producción de citoquinas que producen los linfocitos T pueden identificarse 4 patrones. Los más relevantes en la tolerancia local son los patrones T helper 1 (Th1) y T helper 2 (Th2). Las células Th1 secretan interleuquina 2 (IL-2) e interferón gama (INF γ), que generan respuestas inmunes inflamatorias y citotóxicas. En cambio, las Th2 secretan IL-4 e IL-10 promoviendo respuestas humorales y anti-inflamatorias (9).

Durante un embarazo normal estarían involucradas células T de tipo Th2, que a través de la producción local de IL-4, IL-10, IL-3, factor estimulador de colonia de monocitos y granulocitos (GM-CSF) y el factor estimulador de colonia tipo 1 (CSF-1) permitirían el crecimiento y supervivencia fetoplacental. Por el contrario, y de acuerdo a esta misma hipótesis, una respuesta de tipo Th1 ocasionaría la reabsorción fetal durante el embarazo mediada por células NK (activadas por INF γ) o células LAK (células NK activadas por IL-2) (10,11).

La decidua materna evidencia un patrón de citoquinas tipo Th2 dominante, cuya causa radica en que la producción de citoquinas en la decidua no se limita a los leucocitos infiltrantes, siendo el trofoblasto la principal fuente de IL-4 e IL-10 (12,13).

Si bien un balance entre las citoquinas Th1/Th2 se ha utilizado para explicar un embarazo exitoso, este paradigma puede constituir una sobre simplificación. Estudios recientes realizados en modelos murinos muestran que la expresión de nuevas citoquinas como IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL17 e IL-18, no encajan perfectamente en el paradigma clásico Th1/Th2 (14). Por ejemplo la citoquina pro-inflamatoria IL-12 (característica del patrón Th1 asociado con efecto abortivo) fue encontrada en los sitios peri-implantacionales (14). Asimismo, la IL-18 si bien

potencia el efecto deletéreo de la IL-12, se la encontró fuertemente expresada por células de linaje linfoideo luego de la implantación fetal (14). Estas evidencias sugieren una intrincada participación de citoquinas que estarían involucradas no solamente en su rol inmunológico, sino que también participarían en eventos de remodelación vascular, tisular y angiogénesis.

En la generación de la tolerancia materna, también se ha postulado la participación de la población T tipo Th3 con funciones reguladoras de la respuesta inmune (10,11,12). Estas células son productoras del factor transformante $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$), una citoquina que participa en la inducción de tolerancia hacia antígenos ingeridos oralmente y que también es producida por la subpoblación linfocitaria tipo gama delta (LT $\gamma\delta$). En los roedores, la población LT $\gamma\delta$ es mayoritaria en la decidua. Utilizando un modelo murino, se demostró que un anticuerpo anti-TGF- β aumentaba el porcentaje de reabsorción fetal y este aumento se correlacionaba con un aumento en la expresión de TNF α (7). Sin embargo en humanos, la población LT $\gamma\delta$ en la decidua se encuentra en baja proporción, cuestionándose su relevancia en la inhibición del patrón Th1.

2.2 Balance entre células NK citotóxicas y productoras de factores de crecimiento.

Los linfocitos granulares endometriales (LGEs) constituyen la población leucocitaria predominante en el endometrio humano. Estas células aumentan su frecuencia en la fase secretoria del ciclo menstrual, llegando a constituir en el momento de la implantación un 70-80% de los leucocitos endometriales. Su número aumenta aún más si la concepción progresa, para descender rápidamente durante el segundo trimestre del embarazo (15).

Los LGEs expresan intensamente un marcador característico de las células NK, la molécula CD56 (CD56^{brigh}) pero no la molécula CD16, y al igual que las NK, aumentan su actividad lítica por acción de la IL-2. Por estas características, son consideradas una subpoblación de células NK capaz de producir citoquinas como GM-CSF (factor estimulador de colonia de monocitos y granulocitos), la cual promueve el crecimiento del trofoblasto y controla su invasión. Las células LGEs CD16⁻CD56^{brigh} solo se encuentran en un 2% en la sangre periférica, donde es mayoritaria la población CD16⁺CD56^{dim} que tiene función citotóxica (16). Durante las fases tempranas de un embarazo, la mucosa uterina muestra un reclutamiento selectivo de la población NK productora de citoquinas y una disminución de la población NK citotóxica. Recientemente se ha identificado a MIP-1 α (proteína inflamatoria de macrófagos) como la quimioquina responsable del reclutamiento selectivo de dicha población (17). El sinciciotrofoblasto produciría MIP-1 α y las células CD16⁻CD56^{brigh} serían atraídas a través de un gradiente quimiotáctico. Se ha postulado que dicha población sería capaz de proliferar en el útero bajo la presencia de ciertos estímulos como por ejemplo la prolactina secretada por las células estromales (18).

2.3 Expresión selectiva de moléculas de histocompatibilidad

El complejo mayor de histocompatibilidad de vertebrados superiores codifica para glicoproteínas que se expresan en la superficie celular de determinadas células de un individuo. Estas moléculas se descubrieron por el papel que desempeñan en el rechazo de un trasplante de tejido entre individuos no relacionados de la misma especie (19,20,21). Dado que la unidad fetoplacentaria se comporta como un semi-injerto, debe existir una expresión selectiva de dichas moléculas en células trofoblásticas para evitar el rechazo materno.

La función principal de las moléculas de histocompatibilidad es la de presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T, los cuales iniciarán una respuesta inmune. El receptor del linfocito T reconoce simultáneamente epitopes del antígeno y de la molécula de histocompatibilidad que lo presenta (9,20). En humanos este complejo se lo denomina sistema HLA. Según las características estructurales y funcionales de los genes del sistema HLA, se los puede clasificar en tres categorías. Las dos primeras incluyen genes cuyos productos están involucrados en la presentación antigénica: codifican para las glicoproteínas de clase I y de clase II. Los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C, que codifican para las cadenas alfa de las moléculas de histocompatibilidad de clase I son muy polimórficas y se expresan en todas las células nucleadas del organismo.

Estas moléculas presentan péptidos endógenos derivados de proteínas intracelulares propias o de proteínas extrañas de agentes microbianos que infectaron la célula. Los linfocitos T CD8 (citotóxicos) reconocen a la molécula de histocompatibilidad y el péptido presentado. Otros productos no clásicos de clase I son los genes HLA-E, HLA-F y HLA-G, poco polimórficos, cuya expresión varía en los diferentes tipos celulares y su función es poco conocida (23,23).

La región de clase II codifica para las moléculas HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP, que son presentadoras de antígenos proteicos que fueron endocitados y procesados en células presentadoras de antígeno. Dichas moléculas presentan una distribución celular muy restringida, expresándose constitutivamente en la superficie de linfocitos B, monocitos, precursores eritroides, células de Langerhans, células de Kupffer como así también en linfocitos T activados.

Tanto las moléculas de clase I como las de clase II, se expresan en forma codominante, esto significa que cada individuo expresa tanto las moléculas HLA heredadas del padre como las de la madre (9).

Las células trofoblásticas expresan selectivamente moléculas de histocompatibilidad Clase I clásicas y no clásicas (24,25) (ver Tabla I). El sinciotrofoblasto no expresa moléculas de clase I en la superficie celular y los niveles de ARNm son bajos o casi indetectables, por lo tanto la subpoblación de células trofoblásticas expuestas a la sangre materna desarrolló una estrategia muy eficiente para evitar el reconocimiento y lisis celular.

Subpoblación	HLA Clase I	mARN de Clase I	Exposición materna
Sinciotrofoblasto	-	-	sangre
Citotrofoblasto viloso	-	+	ninguna
Citotrofoblasto extraviloso	+	+	decidua

Tabla I: Expresión selectiva de moléculas HLA clase I y de sus ARNm en subpoblaciones de células trofoblásticas

En el citotrofoblasto, no se detecta la expresión de moléculas HLA pero puede detectarse el ARN que las codifica. En las células del citotrofoblasto extraviloso se detecta una débil expresión de HLA-C pero no de las otras moléculas clásicas HLA-A y HLA-B (24,25). Además, expresa moléculas HLA no clásicas, como son HLA-G y HLA-E, a las que se le atribuye un papel en la inhibición de la capacidad citotóxica de los LGEs a través de la interacción con la molécula CD94, expresada por las células NK (26,27,28).

Entonces, la expresión selectiva de moléculas clásicas de histocompatibilidad permitiría al trofoblasto resistir la lisis celular por parte de las células maternas anti-moléculas de HLA paternas, las cuales se comportarían como aloantígenos

(antígenos que si bien tienen una estructura en común varían de individuo a individuo).

2.4 Expresión selectiva de proteínas regulatorias del complemento.

En las etapas tempranas de cualquier respuesta inmune, la activación del sistema complemento es un mecanismo importante para controlar una infección. En esta activación se genera una cascada de proteínas catalíticas que provoca la lisis de la célula infectada. El reconocimiento de antígenos paternos sobre la superficie del sinciciotrofoblasto, podría inducir la activación de la cascada del complemento resultando en la lisis de células trofoblásticas. Ciertas moléculas son capaces de reducir este fenómeno bloqueando los sitios de unión de las proteínas del complemento o elevando la tasa de destrucción de las mismas, logrando así inhibir la cascada proteolítica del complemento sobre células fetales (24,29).

2.5 Producción de quimioquinas.

Las quimioquinas constituyen otro grupo de moléculas involucradas en la formación de la red celular en la interfase materno-fetal. Son moléculas con capacidad quimioattractantes, que a través de la interacción con sus receptores específicos, median la migración celular. Uno de estos ejemplos, lo constituye la producción de MIP-1 α por el sinciciotrofoblasto, que a través de un gradiente quimiotáctico contribuyen al reclutamiento de las células CD16-CD56^{brigh} (17).

Las quimioquinas participan, entre otras actividades, en reacciones inflamatorias, en la angiogénesis y en la hematopoyesis. Además, pueden tener efectos diferentes de acuerdo a la etapa del ciclo menstrual, por ejemplo, la IL-8 producida por el estroma endometrial, participa durante la fase proliferativa en la neovascularización y crecimiento del endometrio más que en la atracción de neutrófilos (30).

2.6 Factor Inhibidor de Leucemias y su receptor.

En biopsias de endometrio, obtenidas durante la fase secretoria del ciclo menstrual de mujeres fértiles, se ha detectado la expresión del ARNm que codifica para una molécula hidrosoluble denominada factor inhibidor de leucemias (LIF). Durante el embarazo, esta proteína es sintetizada por la decidua y por los linfocitos Th2, mientras el sinciciotrofoblasto expresa el receptor para LIF durante el primer trimestre de embarazo (31). Cuando LIF interacciona con su receptor favorece el crecimiento y diferenciación del trofoblasto. En humanos se ha reportado que defectos en la producción de LIF se asocian con esterilidad ya que es imprescindible para la implantación de blastocisto (31,32). Sin embargo, la producción de LIF no es un mecanismo de todo o nada, ya que su expresión se regula específicamente según cada tejido y además presenta distintas isoformas cada una de ellas con distintas actividades biológicas (33).

2.7 Rol del sistema endocrino.

En la formación de esta red de citoquinas y quimioquinas también participa el sistema endocrino, particularmente la progesterona, la cual se acumula durante el embarazo y es imprescindible para el mantenimiento del mismo. Por acción de la progesterona secretada por el cuerpo lúteo luego de la ovulación, el endometrio se diferencia pasando de la fase proliferativa a secretoria, preparando al útero para la recepción del óvulo fertilizado. Como se describió mas arriba, junto con estos cambios se induce en el endometrio la diferenciación de células precursoras hacia un patrón tipo Th2. Simultáneamente, en la sangre periférica los linfocitos T $\gamma\delta$ son inducidos a expresar receptores para progesterona. Se ha descrito que estos linfocitos T producen una proteína de 34 KD llamada PIBF (factor bloqueante

inducido por progesterona), cuya función es inhibir la actividad citotóxica de las NK, favoreciendo de esta manera un embarazo exitoso (34).

En la decidua, la progesterona inhibe la producción de la IL-8, un potente quimioattractante de neutrófilos, evitando el reclutamiento de los mismos. De este modo la progesterona tendría un efecto anti-inflamatorio que coincidiría con el momento de la implantación (30).

Por otra parte cuando se logra un embarazo, los linfocitos T infiltrantes y el epitelio glandular del endometrio producen citoquinas como la IL-4, la IL-6 y LIF, mientras que las células CD16-CD56^{bright} estromales producen GM-CSF y M-CSF (factor estimulador de colonia de monocitos) (10,11,12,35). El conjunto de estas citoquinas y factores de crecimiento promueven la liberación por parte del trofoblasto de gonadotropina coriónica humana (GCh), previniendo la apoptosis del cuerpo lúteo y este a su vez mantiene la producción de progesterona (30,36,37).

2.8 Indolamina 2,3 di-oxigenasa.

Otro factor supresor de la respuesta celular materna es la enzima Indolamina di-oxigenasa (IDO). Esta enzima expresada por el trofoblasto y por macrófagos cataboliza triptofano, cuya ausencia o disminución resulta en una pérdida de la actividad de linfocitos T protegiendo a la placenta del ataque citotóxico materno. El trofoblasto es el único tejido que produce IDO, lo cuál podría explicar porque el feto logra sobrevivir a pesar de ser un semi-injerto (6,38).

2.9 Expresión de CD95 y su ligando.

La interacción de CD95 (Fas) con su ligando (CD95L) constituye un camino apoptótico fisiológico ampliamente utilizado por el sistema inmune durante la linfopoyesis. Esta principalmente implicado en la regulación del recambio celular y en la homeostasis de la respuesta inmune. Este sistema funciona de la siguiente

manera: cuando CD95L expresado en las células efectoras, interacciona con el CD95 presente en la célula "blanco" se induce el reclutamiento de varias proteínas citosólicas, denominadas caspasas que inician una cascada proteolítica que da como resultado final la fragmentación del ADN (muerte celular programada o apoptosis) (39,40). El CD95L se expresa en células trofoblásticas (*in vivo* e *in vitro*) con capacidad de matar células CD95⁺ provenientes de la sangre materna. Este mecanismo también se ha reportado en otros órganos inmunológicamente privilegiados como por ejemplo en el ojo y en testículos. Curiosamente las células trofoblásticas también expresan CD95, pero aparentemente no tendrían consecuencias apoptóticas sino que limitaría la proliferación del trofoblasto (6).

El Figura 2 se muestran las posibles interacciones, en la interfase materno-fetal, de los mecanismos detallados previamente permitiendo la sobrevivencia fetal.

3. Mecanismos involucrados en la respuesta inmune sistémica.

El suero materno de mujeres con embarazos a término tiene la capacidad de bloquear la respuesta materna que ocurre en el curso de un cultivo mixto linfocitario (CML) cuando se enfrentan a los aloantígenos paternos. Los factores bloqueantes del CML (FB del CML) se generan durante el embarazo y aumentan con los sucesivos embarazos (41,42,43).

En el pasado se identificó en el suero de mujeres la presencia de anticuerpos preformados que presentaban diferentes especificidades; por ej. Acs. anti-moléculas de histocompatibilidad paternas, Acs. anti-receptores Fc, Acs. anti-TLX o CD46 (proteína reguladora del complemento). A muchos de estos Acs. se les atribuyó la capacidad de inhibir la respuesta alógena en el CML (28,42,43,44).

3.1 Anticuerpos Linfocitotóxicos

La detección de Acs. anti-antígenos de histocompatibilidad paternos en el suero de mujeres embarazadas constituye una fuerte evidencia del reconocimiento por parte de la madre del feto como un semi-injerto. Estos Acs. solo están presentes en el 4% de las mujeres nuligrávidas, mientras que están presentes en el 75% de las mujeres que tuvieron cuatro o más embarazos a término (42).

Se ha descrito la incidencia de Acs. anti-moléculas de clase I y clase II paternas en mujeres fértiles en función del número de nacimientos sucesivos (43). La incidencia de estos Acs. (evaluados por la técnica de Cross-Match por microlinfocitotoxicidad) hacia antígenos HLA A, B y C y hacia antígenos HLA DR fueron respectivamente: luego del primero hijo 18.2% y 9%, luego del segundo 27.3% y 4.4% y luego del tercero 50% y 27.3%. Se desprende entonces que los Acs. anti-HLA paterno aumentan proporcionalmente según el número de embarazos y representarían un fenómeno secundario asociado al embarazo mas que la causa del éxito del mismo (44,45).

3.2 Anticuerpos anti-idiotipo

Existe una gran variabilidad de receptores en los linfocitos T maternos y en las inmunoglobulinas. Esta variabilidad genera en cada individuo miles de idiotipos diferentes, los cuales son reconocidos por clones anti-idiotípicos. De este modo se forman redes de idiotipos/anti-idiotipos que interconectarían distintas poblaciones de células específicas. En particular en las mujeres embarazadas, al generarse un aumento de Acs. dirigidos hacia antígenos HLA paternos habría un incremento en la producción de Acs. anti-idiotipo. Estos Acs. se unirían al paratope exactamente igual al antígeno presentes en linfocitos B y T inhibiéndolos por citotoxicidad o por fijación de complemento (46). Estos Acs. anti-idiotipo están presentes tanto en el

suero materno de mujeres que producen Acs. anti-HLA paternos como en los que no lo producen, sugiriendo que los Acs. anti-idiotipo constituyen un fenómeno general durante el embarazo (28,42,46).

3.3 Anticuerpos Bloqueantes

La definición de Acs. bloqueantes se basó en el efecto inhibitorio que ejercen estos Acs. en distintos ensayos funcionales. Originalmente se los describió en un modelo tumoral, por la capacidad del suero de bloquear la destrucción de células tumorales del animal original por parte de los linfocitos específicos para el tumor. (44). Más recientemente se los identificó en el suero de mujeres con embarazos exitosos por su capacidad de suprimir la respuesta alogénica hacia antígenos paternos. Al igual que los Acs. leucocitotóxicos, los Acs. bloqueantes son más frecuentes en el suero de mujeres con embarazos a término y están asociados en número y duración del embarazo. Sin embargo, a diferencia de los Acs. leucocitotóxicos pertenecen a isotipos IgG1 e IgG4 no fijadores de complemento y su presencia estaría asociada a la respuesta Th2 inducida durante el embarazo (47,48).

Su presencia se detecta en el suero de la mayoría de las mujeres con embarazos exitosos. Sin embargo mujeres con agamaglobulinemia pueden llevar un embarazo a término, por lo que su presencia puede representar un fenómeno secundario asociado al embarazo más que la causa del éxito del mismo. Tampoco se han identificado los antígenos que se reconocerían para generar el bloqueo de la respuesta alogénica. Las moléculas de clase II no se expresan en ninguna población de células trofoblásticas, pero entre los posibles responsables de este fenómeno podrían incluirse distintas especificidades HLA-G.

3.4 Anticuerpos asimétricos

Los Acs. asimétricos presentan 2 sitios de combinación con el antígeno con distinta afinidad debido a modificaciones postraduccionales que afectan la parte hidrocarbonada, es por ello que se comportan como univalentes. Debido a la capacidad que tienen para unirse firmemente al antígeno por el sitio de combinación de alta afinidad, constituyen excelentes Acs. bloqueantes. Se ha reportado durante la preñez un aumento de las moléculas IgG asimétricas específicas hacia antígenos parentales y no específicas, llegando a valores 25-30% en suero y 35-60% en los eluidos de placenta. La actividad anti-paterna, medida por fijación de complemento usando linfocitos paternos como blanco, es 3 veces mayor en eluidos de placenta que en suero (46). Este hecho y el efecto bloqueante de los Acs. asimétricos sugieren que podrían participar en la protección del feto.

Aborto Recurrente Espontáneo

Lograr un embarazo no implica necesariamente llevarlo a término con éxito, ya que el 31% de los embarazos se pierden en forma inexplicable luego de la implantación fetal (49). Existe una entidad clínica denominada Aborto Recurrente Espontáneo (ARE) (41,48) definido como parejas que sufren 2 o más abortos consecutivos. El ARE es una complicación del embarazo que afecta aproximadamente al 2 % de las mujeres entre la cuarta y décimo-segunda semana de gestación (49,50,51).

Existen 2 grandes grupos de problemas inmunológicos que pueden causar la pérdida de un embarazo, fallas de fertilizaciones *in vitro* e infertilidad. Estos grupos se definen según la presencia o ausencia de un factor autoinmune asociado (50,51).

1. ARE con Factor Autoinmune asociado

Esta patológica se asocia con la presencia de diversos tipos de autoanticuerpos:

1.1 Anticuerpos anti-fosfolípidicos: Los abortos recurrentes, las fallas en las fertilizaciones *in vitro*, la endometriosis y cualquier otra causa que produzca una injuria en tejidos, permitiría la formación de Acs. anti-fosfolípidos. Existen 6 tipos de fosfolípidos: cardiolipinas, etanolaminas, glicerol, inositol, ácido fosfatídico y serina. La muerte celular o la injuria celular permite la producción de anticuerpos hacia todos o hacia alguno de los fosfolípidos mencionados. Durante la implantación, la serina y la etanolamina sirven como moléculas de anclaje de la placenta al útero y permiten que el citotrofoblasto se diferencie a sinciciotrofoblasto, encargado del transporte de nutrientes desde la madre hacia el feto. Los Acs. anti-fosfolípidos impedirían la implantación fetal.

1.2 Anticuerpos anti-núcleo: Las mujeres que presentan Acs. dirigidos hacia el ADN de doble cadena, simple cadena, polinucleótidos o histonas, producirían inflamación alrededor del embrión en el momento de la implantación, o inflamación de la placenta en etapas posteriores.

En un primer momento los Acs. generados son tipo IgM, pero cuando cambian hacia isotipo IgG e IgA tienen efectos sobre el útero.

1.3 Anticuerpos anti-espermatozoides: La presencia de Acs. anti-espermatozoides se asocian generalmente con la presencia de Acs. anti-fosfolípidicos, específicamente anti-serina y anti-etanolamina.

2. ARE sin Factor Autoinmune asociado

2.1 Participación de alelos del sistema HLA

Existe una controversia sobre el papel de compartir alelos HLA y su asociación con ARE. Estudios realizados en grupos étnicos homogéneos y con un tamaño de muestra poblacional importante mostraron una asociación entre compartir antígenos HLA B, DR y DQ y ARE (52,53,54,55,56). Cada una de estas asociaciones dependió del grupo étnico estudiado.

Por otra parte, existen evidencias en contra de esta hipótesis. En una comunidad cerrada llamada Hutterits, donde comparten con alta frecuencia alelos HLA, no se reportó un aumento en la tasa de ARE, si bien se observó una demora en el tiempo para lograr el embarazo (57).

2.2 Patrón de secreción de citoquinas

Un posible “defecto” en mujeres con ARE estaría relacionado con la incapacidad de generar una respuesta Th2 hacia antígenos fetoplacentales. En estas condiciones, la respuesta inmune generada regularía en forma negativa la poderosa respuesta proinflamatoria Th1 responsable del rechazo materno. Según este modelo, la generación de citoquinas tipo Th1 (INF γ , IL-2 y TNF α) promoverían la activación de células potencialmente deletéreas como células NK, LAK y macrófagos (10,58). Por otra parte, ciertas citoquinas tienen la capacidad de dañar directamente a las células trofoblásticas. Por ejemplo, en cultivos de monocapa de sinciotrofoblasto humano se ha reportado que el TNF α produce un daño directo sobre el mismo que se incrementa con la presencia de INF γ (14).

2.3 Células Natural Killer

Se ha propuesto que la activación de las células NK en presencia de un microambiente de citoquinas tipo Th1 podría explicar los ARE. Según esta hipótesis,

el INF γ induciría la activación de las NK CD16⁺CD56^{dim} citotóxicas y la IL-2 o TNF α convertirían células NK en células LAK. En ratones con alta tasa de abortos recurrentes (CBA x DBA/2), estas poblaciones mediarían en forma directa el daño a las células trofoblásticas. Sin embargo en humanos la susceptibilidad del trofoblasto a las células LAK no fue convincentemente demostrado *in vivo* (6,18).

2.4 Participación de células regulatorias.

Como se mencionó previamente, el epitelio glandular y el estroma endometrial del útero humano, contienen un gran número de células linfoideas con la capacidad potencial de reconocer y activarse frente a la presencia de estímulos antigénicos. Estudios previos mostraron la presencia inusual en el endometrio y en la decidua normal de leucocitos expresando marcadores de activación tempranos, lo cual sugiere un estado de activación permanente (59,60). Se han descritos en modelos animales de tolerancia, la participación de poblaciones celulares con diversas funciones regulatorias, algunos de ellos expresando el marcador de activación CD25 (61). Dichas funciones, estarían mediadas por la producción citoquinas y/o quimioquinas o mediante la interacción célula-célula. Se ha sugerido que fallas en estas funciones regulatorias podrían ser responsables en la pérdida de la tolerancia materno-fetal.

2.5 Disminución de factores bloqueantes

Los FB del CML están presentes en el 90% de las mujeres con embarazos exitosos y no se detectan en la mayoría de las mujeres que sufren ARE, por lo que se ha asociado la presencia de estos FB con el éxito de un embarazo. Sin embargo, se desconoce hasta la fecha la naturaleza los mismos. Lo que es aún mas importante, se desconoce si su presencia en el suero de mujeres constituyen un

epifenómeno asociado a un embarazo exitoso o cumplen un papel protagónico en el control de la respuesta alógena materna¹ (47,51,62,63).

En la Figura 3 se muestran algunos de los posibles mecanismos que podrían estar involucrados en el rechazo materno y el ARE.

Opciones para el tratamiento de ARE de causa inmunológica

Basándose en los criterios unificados por la Sociedad Americana de Inmunología de la Reproducción (50), se recomienda terapia con inmunosupresores y/o anti-coagulantes a mujeres con ARE que presentan un factor autoinmune asociado. De este modo se busca disminuir la producción de autoanticuerpos, permitiendo la implantación fetal. Como agentes inmunosupresores los más utilizados son corticoesteroides y en cuanto a los anti-agregantes/ anti-coagulantes son bajas dosis de aspirina y heparina de bajo peso molecular.

Un análisis reciente de distintos ensayos clínicos, en este grupo de pacientes, mostró que el tratamiento con aspirina no reduce significativamente el riesgo relativo (RR 1.05) de un nuevo aborto, en cambio, la aspirina combinado con heparina reduce significativamente la pérdida de embarazos (RR 0.46) (64,41).

En cambio, para aquellos pacientes con ARE sin factor autoinmune asociado y que a pesar de embarazos previos no han generado actividad bloqueante del CML, se ha sugerido como tratamiento efectivo el empleo de la inmunoglobulina intravenosa o de la inmunización con leucocitos paternos (65,66,67).

1. Terapia con inmunoglobulinas intravenosas (IGIV)

No existen estudios multicéntricos que avalen el éxito de la IGIV. Un meta-análisis realizado en 2 centros norteamericanos y en 2 europeos, mostraron grandes

discrepancias y concluyeron que la tasa de éxito para lograr un nuevo embarazo es un 10% mayor que la observada en el grupo control (68,69,70). El único efecto observado fue la capacidad de disminuir la expresión de moléculas de adhesión en linfocitos T activados afectando así la interacción con los principales componentes de la placenta humana (fibronectina, elastina y colágeno tipo IV) (71). De este modo las pacientes con ARE que recibieron IGIV sufrirían una disminución de la migración de linfocitos activados potencialmente deletéreos hacia la placenta.

2. Terapia con leucocitos paternos

2.1 Bases inmunológicas y posibles mecanismos de acción

La racionalidad de este tratamiento radica en estimular el sistema inmune materno para generar una respuesta inmune adecuada hacia antígenos semi-alogénicos fetales (65,66,67).

Las bases inmunológicas para explicar el éxito de este tratamiento no son claras. Un estudio reciente demostró que al mes de la aloinmunización se detecta un aumento significativo de una actividad supresora mediada por β quimioquinas: RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β . Para detectar esta actividad supresora se obtuvieron sobrenadantes de linfocitos CD8⁺ previamente enriquecidos, provenientes de sangre de mujeres inmunizadas con leucocitos paternos (72). Este sobrenadante fue capaz de suprimir la replicación de la cepa de VIH con tropismo para macrófagos. La inmunoterapia también indujo la pérdida de expresión de los receptores de quimioquinas CCR5 y CXCR4, siendo CCR5 un coreceptor para el VIH. Esta investigación constituye la primera evidencia de un efecto modulador in vivo de la respuesta inmune de mujeres inmunizadas con leucocitos parentales.

Se ha postulado que la inoculación de dosis muy altas o muy bajas de células alogénicas producen tolerancia mediada por linfocitos T reguladores. Esta tolerancia

afecta tanto la respuesta humoral como la celular. Tratando de explicar los mecanismos de la inducción de esta actividad reguladora, Behar et al (73) incubaron linfocitos de sangre periférica obtenidos de mujeres previa y posteriormente a la inmunoterapia. Así, luego del tratamiento con leucocitos paternos, detectaron una actividad supresora caracterizada por un aumento de los linfocitos CD8⁺ y por el fracaso de la ciclosporina A en su capacidad para inhibir la proliferación en respuesta a fitohemaglutinina, células alogénicas o antígenos paternos. Estos cambios inducidos por la inmunoterapia con leucocitos paternos reflejarían aquellos que ocurrirían en mujeres fértiles durante un embarazo normal.

Por otra parte, se ha reportado que las inmunizaciones con células mononucleares activarían células CD8 que expresan el receptor de progesterona y secretarían el factor PIBF capaz de inhibir la actividad citotóxica de células NK (84,85,74). Al mismo tiempo se generarían citoquinas como por ej. TGFβ, IL-10 e IL-4 las cuales, como se discutió previamente, se relacionarían con un embarazo exitoso.

2.2 Riesgos de la inmunoterapia

Los riesgos de la inmunización incluye transmisión de infecciones como citomegalovirus, hepatitis B y C, HIV y sífilis. A pesar de que las parejas deben descartarse estas posibles infecciones, existen virus que no pueden ser detectados por los estudios convencionales, como por ejemplo el virus de células T de linfoma/leucemia.

En cuanto a las complicaciones obstétricas del embarazo podemos destacar que luego de las inmunizaciones hay un 7% de incidencia de crecimiento intrauterino retardado; también se evidencia un leve aumento en el labor pre-término en estas pacientes (65).

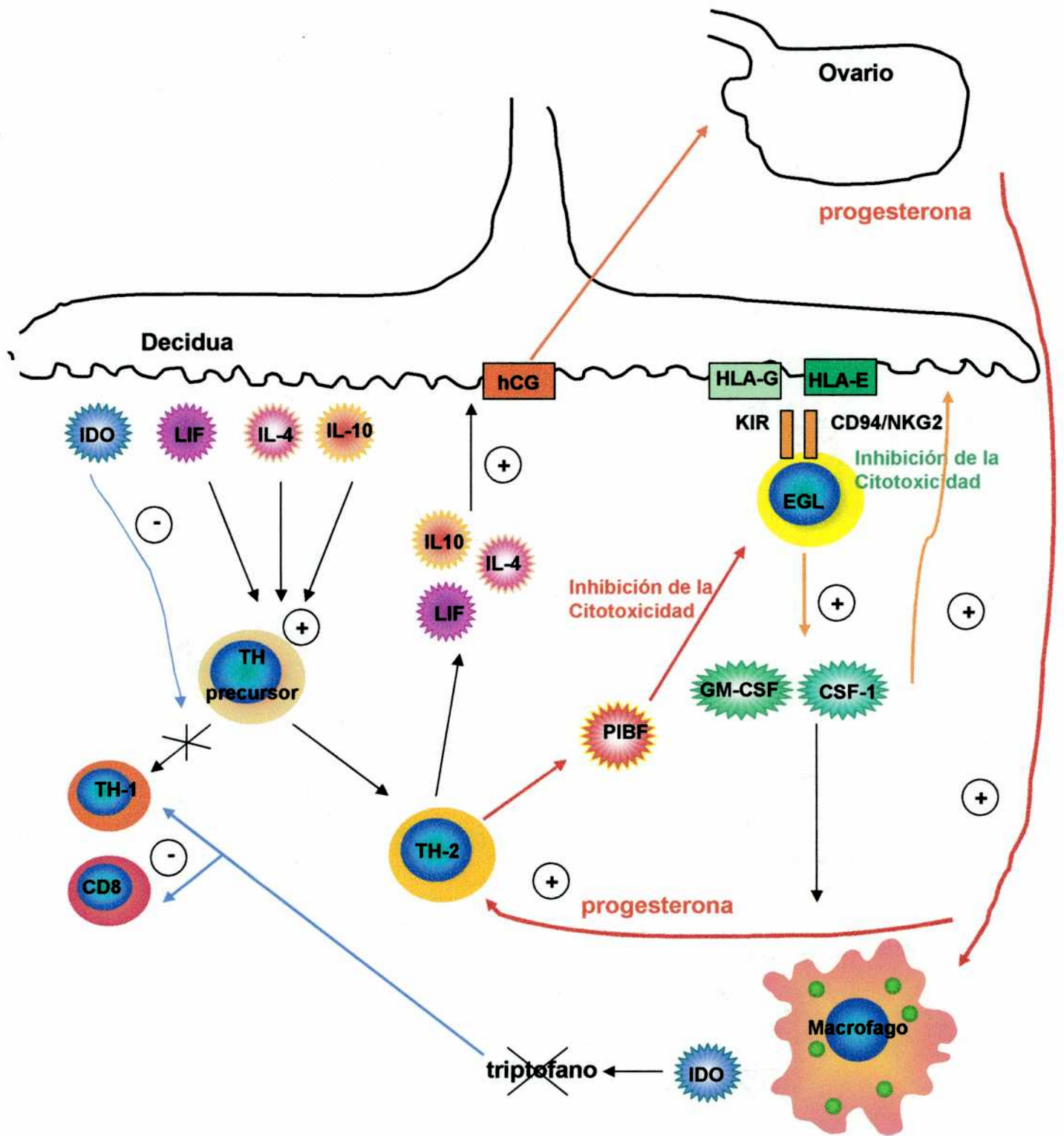


Figura 2: Posibles interacciones de mecanismos inductores de tolerancia en la interfase materno-fetal durante un embarazo normal.

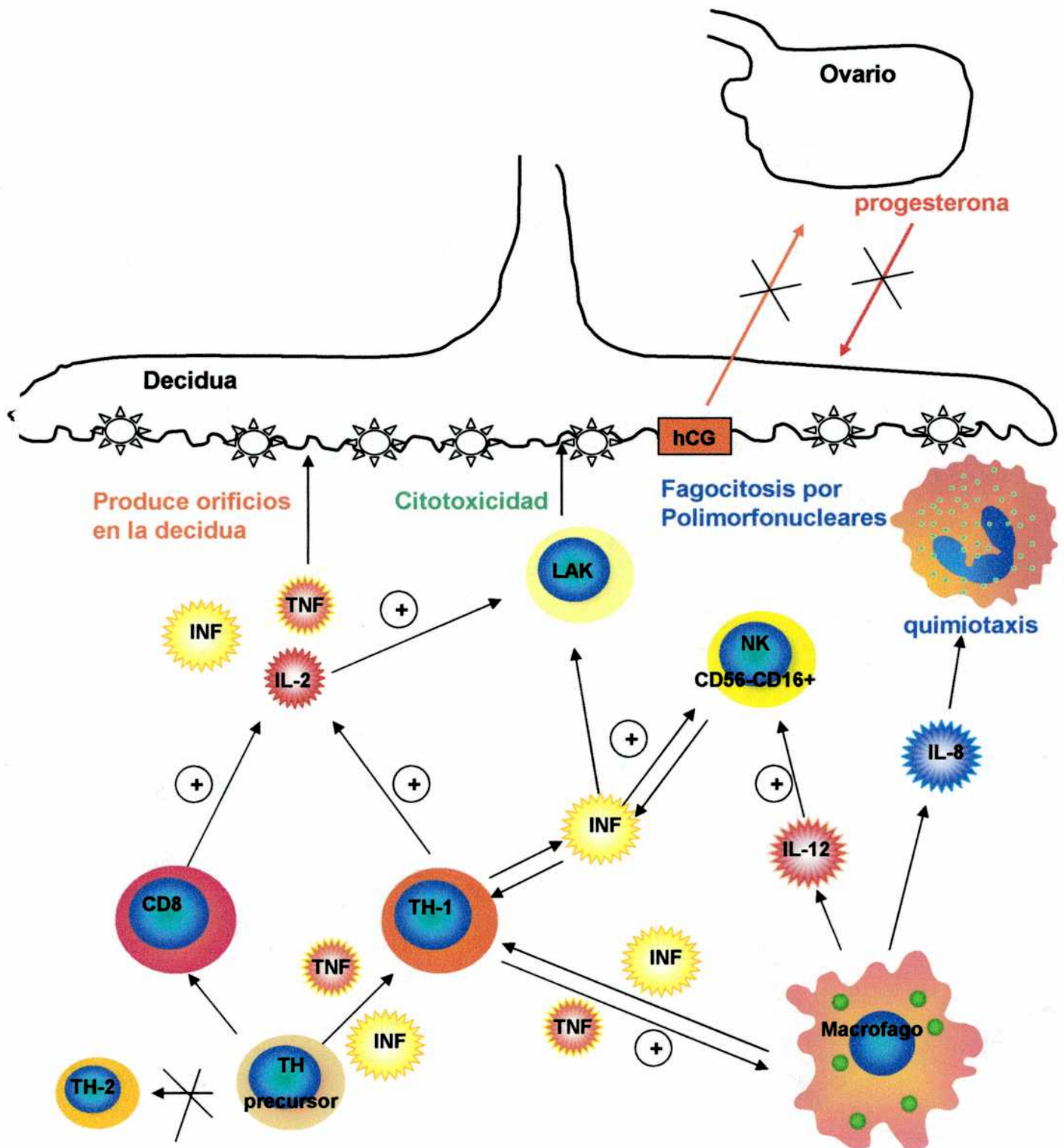


Figura 3: Posibles mecanismos involucrados en los abortos recurrentes espontáneos de cuasa inmunológica.

OBJETIVOS

Objetivo General

Teniendo en cuenta que el útero es considerado un órgano inmunológicamente privilegiado, en este trabajo se propuso estudiar las características de la inmunidad local y sistémica durante el embarazo normal y en el aborto recurrente espontáneo.

Objetivos Particulares**Capítulo 1:**

Caracterización de diferentes factores bloqueantes del cultivo mixto linfocitario a fin de identificar mecanismos celulares y moleculares que participan en un embarazo exitoso. Para esto se propusieron los siguientes objetivos particulares:

1. Establecer la correlación entre la presencia de factores bloqueantes (FB) del cultivo mixto linfocitario (CML) y la presencia de anticuerpos anti-parentales en el suero materno, mediante la técnica de Cross-match por microlinfocitotoxicidad y citometría de flujo.
2. Investigar las propiedades inmunoregulatorias, mecanismos de acción y regulación de la expresión de Galectina-1 en el curso de una respuesta alógena normal.
3. Estudiar la capacidad de RANTES como potencial factor inmunosupresor de la respuesta alógena normal y marcador característico presente en el suero de pacientes con ARE.
4. Investigar posibles interacciones entre Galectina-1 y RANTES a lo largo de la respuesta alógena normal.

Capítulo 2:

Identificación de potenciales marcadores útiles a nivel local y sistémico para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con ARE. Para esto se propusieron los siguientes objetivos particulares:

1. Estudiar la expresión del marcador de activación leucocitario CD69 en linfocitos T de sangre periférica y en linfocitos endometriales durante la fase secretoria del ciclo menstrual (etapa preimplantatoria) en pacientes con ARE y en mujeres con embarazos a término.
2. Estudiar la expresión de SLAM (molécula linfocitaria activadora de señales) y citoquinas características del patrón Th1 y Th2 en pacientes con ARE y en mujeres con embarazos a término.

Capítulo 3:

1. Evaluar la tasa de éxito en respuesta a la inmunoterapia con células mononucleares paternas en pacientes con ARE y en los correspondientes grupos controles.
2. Investigar la modulación de nuevos marcadores inmunológicos maternos en respuesta a la inmunización semialogénica en pacientes con ARE.

MATERIALES & MÉTODOS

Aislación de células Mononucleares Totales

Las células mononucleares totales (MNT) fueron obtenidas a partir de sangre periférica anticoagulada provenientes de donadores y pacientes adultos. Luego de realizar un gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque™ (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) el halo correspondiente a las MNT se recupera, se lava extensamente con solución fisiológica y se resuspende en medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suplementado con 10% de suero AB humano (inactivado por calor), 2 mM glutamina (Life Technologies, UK) y gentamicina 20 µg/ml.

Aislación de leucocitos endometriales

Las biopsias endometriales se colocaron en medio RPMI 1640 (Life Technologies, UK) suplementado con 10% suero AB humano, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 U/ml estreptomina. Posteriormente se procesaron mecánicamente con un homogenizador de tejido y la suspensión celular recuperada se resuspendió en medio suplementado.

Cross-match

La técnica de Cross-match permite detectar en el suero materno Acs. que reconocen antígenos presentes en los leucocitos paternos. Según el sistema de detección que se utilice, citotoxicidad dependiente de Ac. y de complemento o citometría de flujo, se obtendrá distinta información acerca de los Acs. maternos.

1-Cross-match por microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento (CMXM)

En una microplaca se siembran 0.5 μ l de distintas diluciones del suero materno previamente tratado o no con DTT 0.1 M (ditiotreitól) por incubación a 37°C durante 30 min., con el objeto de romper los enlaces disulfuro que unen al pentámero de IgM. A las células MNT del hombre se les adiciona 250 μ l del colorante CFDA 0.004% (diacetato de carboxi floresceína) que es captado por las células vivas. Luego de 10 min. de incubación a 37°C se separan los linfocitos B utilizando perlas magnéticas (Dyneabeads HLA Cell PREP II), con Acs. que reconocen la región monomórfica de la cadena β de las moléculas de clase II. Luego de la separación utilizando un magneto, la fracción enriquecida en linfocitos T se lleva a una concentración de 3×10^6 células/ml en RPMI 1640+3% de SFB y se adicionan 0.5 μ l a las microplacas previamente sembradas. Posteriormente se agrega 2 μ l de suero de conejo como fuente de complemento exógeno y se incuba durante 60 min. a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se agrega 2 μ l de buffer fosfato-EDTA 5%-bromuro de etidio para teñir células muertas y se procede a la lectura de las microplacas en un microscopio de fluorescencia invertido. Se considera que el CMXM es positivo cuando hay entre 51%-80% de mortalidad. Si el CMXM es positivo sin DTT y negativo con DTT se considera que los Acs. presentes son de tipo IgM. En cambio si en presencia o ausencia de DTT el CMXM es positivo entonces, se considera que los Acs. presentes son de tipo IgG.

2- Cross-match por citometría de flujo (CMXC)

Las células MNT del hombre se incuban con el suero materno durante 30 min. a temperatura ambiente, seguido de una incubación por 30 min. a

temperatura ambiente con un Ac. anti-IgG humana total y finalmente con un Ac. anti-CD3 por 30 min. para determinar la reactividad del suero materno sobre linfocitos T paternos. Luego de cada incubación se realizan lavados con buffer fosfato (PBS). En los controles negativos el primer Ac. fue reemplazado por un Ac. monoclonal del mismo isotipo.

Como controles positivos y negativos se utilizaron mezclas de sueros con CMXC positivos o negativos respectivamente. Finalmente se analiza en un Citómetro de Flujo Ortho Cytoron Absolute cytometer® (Ortho Diagnostic, Raritan, NJ) y se adquirieron 10 mil eventos. Los resultados se interpretaron utilizando el programa WinMDI® versión 2.5. El CMXC para linfocitos T se considera positivo cuando se detecta una reactividad mayor al 5% con respecto a la mezcla de sueros negativos según describió Stepheson et al (75).

Cultivo Mixto Linfocitario

Esta técnica consiste en la medición de la proliferación celular T en respuesta a aloantígenos presentes en células MNT de un individuo no relacionado.

Las células MNT se resuspenden en medio completo RPMI-1640 (1×10^5 células por pocillo) y se enfrentan con células estimuladoras previamente tratadas con mitomicina C (1×10^5 células por pocillo) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). La mezcla de células respondedoras y estimuladoras se cocultivan en distintas combinaciones durante 5 días en placas de poliestireno de 96 pocillos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) a 37 °C en estufa con 5% CO₂. Como controles se utiliza la respuesta autóloga de cada individuo (respuesta basal) y la respuesta hacia un tercer dador no relacionado.

Luego de 5 días de cultivo o a los correspondientes períodos indicados se agrega un pulso de ^3H -timidina (NEN, Boston, MA) de 1 μCi /pocillo y se continúa la incubación por 18 hs más para permitir su incorporación al ADN. Finalmente las células se cosechan en papel de fibra de vidrio (Wathman, Maidstone, UK) utilizando un cosechador celular (Packard Instruments, LaGrange, IL). La incorporación de radioactividad se cuantifica utilizando un contador de centelleo líquido β (Packard Instruments, LaGrange, IL).

1- Galectina-1 como factor supresor de la respuesta alógena

Las células MNT de los distintos individuos se cultivaron durante 5 días en presencia o ausencia de Gal-1 (2, 4, 40 o 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La Gal-1 recombinante de placenta humana fue producida según se describió (76), almacenada en 8 mM DTT a -70°C y utilizada en el medio correspondiente o en PBS conteniendo 1.0 mM DTT (PBS/DTT). Los cultivos celulares se utilizaron para realizar ensayos de proliferación, de citometría de flujo, de apoptosis, Western Blot y detección de TGF- β .

Con el objeto de testear la especificidad del efecto inhibitorio de Gal-1, las células fueron expuestas a distintas concentraciones de Gal-1 en presencia de 0.1 M tiodigalactósido (TDG) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). La participación de la galectina endógena durante la respuesta alógena T se exploró incubando las células con el Ac. específico anti-Gal-1 (1:100). Para investigar si la actividad supresora de Gal-1 involucra mecanismos dependientes de TGF β , se agregó a los cultivos alógenos un Ac. neutralizante pan-específico anti-TGF β que reconoce TGF β_1 , β_2 , β_3 y β_5 (R&D Systems, Palo Alto, CA) a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

En otro juego de experimentos, las células fueron expuestas a Gal-1 en presencia de 20 U/ml de IL-2 recombinante agregada a los CML a diferentes períodos de tiempos. Como control se realizaron cultivos celulares en presencia de IL-2 sola para asegurarse que esa concentración es submitogénica.

Los porcentajes de inhibición de la proliferación celular fueron calculados de la siguiente forma: $100 - 100 \times (\text{cpm } \mathbf{x} - \text{cpm}_{\text{autologo}}) / (\text{cpm}_{\text{alogeneico}} - \text{cpm}_{\text{autologo}})$, donde " \mathbf{x} " representa las diferentes combinaciones descriptas previamente.

2- RANTES como factor supresor de la respuesta alogénica

Las células MNT de los distintos individuos se cultivaron durante 5 días en presencia y en ausencia de RANTES recombinante (desde 3.5 pg/ml a 10 ng/ml) (R&D Systems, Palo Alto, CA). Los cultivos celulares se utilizaron para realizar ensayos de proliferación, de citometría de flujo, de apoptosis y Western Blot.

Con el objeto de testear la especificidad del efecto inhibitorio de RANTES, las células fueron expuestas al Ac. neutralizante anti-RANTES 10 µg/ml (R&D Systems, Palo Alto, CA) así como a la presencia de sueros con y sin actividad bloqueante del CML.

3- Ensayo de Caspasas

Con el objeto de estudiar la participación de la vía de las caspasas en la supresión de la respuesta alogénica inducida tanto por Gal-1 (4 µg/ml) como por RANTES (60 pg/ml) se realizaron CML en presencia y en ausencia de 10 µM ZVAD-fmk (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone) (Enzyme System Products, Livermore, CA), un inhibidor de cistein proteasas de amplio espectro. Luego de 5 días de cultivo se agregó un pulso de [^3H]TdR durante 18 hs y la

proliferación se determinó en un contador de centelleo líquido β , como se describió previamente.

4- Ensayo de la actividad bloqueante del suero materno

Se realizó según el protocolo descrito en el componente de reproducción de 11^{avo} Workshop Internacional de Histocompatibilidad (77). Las células MNT de la mujer se mezclan con las células estimuladoras del hombre en una placa de 96 pocillos fondo en U. Esta combinación se realizó tanto en presencia como en ausencia de 50 μ l/pocillo suero materno (suero a testear). Luego de 5 días de cultivo a 37 °C y 5% de CO₂ se agregó un pulso de [³H]TdR y se cuantificó la proliferación como se describió. Los resultados se expresan como un porcentaje de la actividad bloqueante calculado por la siguiente fórmula:

$$\text{Bloqueo del CML (\%)} = (1 - \text{cpm}_{\text{alógeno}} + \text{suero materno} / \text{cpm}_{\text{alógeno}}) \times 100.$$

La presencia de factores bloqueantes del CML se confirmó cuando la supresión lograda en el CML por adición del suero materno a testear superó el 50%.

Ensayos de Apoptosis

1- Análisis del contenido del ADN subdiploide

Luego de la estimulación alógena en presencia o en ausencia de Gal-1 (4 μ g/ml) o RANTES (60 pg/ml), las células fueron cosechadas a distintos periodos de tiempo, lavadas en PBS frío, fijadas en 1 ml de etanol al 70% y procesadas para el análisis del contenido subdiploide del ADN por tinción con Ioduro de propidio (IP) según describió Nicoletti *et al* (78). Brevemente, luego de un extenso lavado, los botones celulares se resuspendieron vigorosamente en 1 ml de una solución hipotónica (50 μ g/ml IP diluido en 0.1% (p/v) citrato de sodio y 0.1% (v/v) Triton X-100) y se deja durante 3 horas en oscuridad a 4°C. La

emisión de fluorescencia del IP de los núcleos individuales se cuantificó utilizando un filtro de un rango correspondiente a 585/42 nm. Se adquirieron 10 mil eventos en un Citómetro Absoluto Cytoron[®] (Ortho Diagnostic, Raritan, NJ). Los resultados se analizaron utilizando el software WinMDI[®]. La frecuencia de células apoptóticas fue ensayada para evaluar el porcentaje del contenido subdiploide en el pico correspondiente a <2N ADN.

2- Apoptosis temprana y tardía en células CD45R0⁺

La sensibilidad de las células CD45R0⁺ a la apoptosis inducida por Gal-1, RANTES y sueros con o sin actividad bloqueante se determinó a través de una triple marcación por inmunofluorescencia utilizando un Ac. anti-CD45R0 PE, anexina-V FITC e IP, según las recomendaciones del fabricante (Immunotech, Marseille, France). La adquisición por citometría de flujo y el análisis de la misma se realizó como se describió. Para estudiar solamente la población de células apoptóticas tempranas, se trabajó con una población de células anexina-V positivas seleccionada electrónicamente.

Ensayos de Western Blot

Los ensayos de Western Blot se realizaron como se describió (79,80). Las células cultivadas bajo distintas condiciones se lavaron con PBS a temperatura ambiente. Luego los botones celulares se mezclaron con 1 ml de solución fría, conteniendo 5 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 142.5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.2, junto con un cocktail de inhibidor de proteasas (0.2 mM PMSF, 0.1% aprotinina, 0.7 µg/ml pepstatina y 1 µg/ml leupeptina) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y se incubó por 30 min. en hielo. Las muestras se centrifugaron a 15,000 x g por 20 min. a 4°C y los

sobrenadantes, representando el lisado celular total, se almacenaron a -70°C hasta su uso. La concentración de proteínas se estimó utilizando el equipo de micro-BCA™ (Pierce, Rockford, IL).

Los geles de poliacrilamida con SDS se corrieron en un aparato de electroforesis Miniprotean II (Bio Rad, Richmond, CA) como describió previamente (79,80). Cantidades iguales de proteínas (30 μg por cada calle) se diluyeron en buffer de siembra y se resolvió en un gel de poliacrilamida cuyo porcentaje de resolución dependiera de la proteína a estudiar. Luego de la electroforesis, las proteínas separadas y transferidas a membranas de nitrocelulosa se incubaron en presencia del 1er. Ac. policlonal. Luego de realizar 2 lavados con buffer TBE, se incubaron con un 2do. Ac. conjugado con HRP y se detectó por reacción de quimioluminiscencia (ECL) según indicaciones del fabricante (Amersham, Uppsala, Suecia). La carga de equivalente de proteínas en cada calle y la ausencia de degradación de proteínas se verificó realizando la tinción con Ponceau S (Sigma, St. Louis, MO) y un Ac. monoclonal anti- α -tubulina (DM1A) como se describió (81). El marcador de peso molecular de proteínas utilizado fue Bio Rad (Richmond, CA). Las bandas inmunoreactivas se analizaron con el Analizador de imágenes Fotodyne® (Fotodyne, Inc., Hartland, WI). Los resultados se expresaron como unidades densitométricas relativas obtenidas de la cuantificación de software Image Quant.

1-Modulación de la expresión de Bcl-2 durante la respuesta alogénica

Las células cultivadas en ausencia o en presencia de Gal-1 (4 µg/ml) o RANTES (60µg/ml) se recolectaron en diferentes períodos de tiempo a lo largo de una respuesta alogénica normal. Los extractos protéicos se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 15%. Luego de realizada la transferencia y el bloqueo de la membrana de nitrocelulosa, esta se incubó con el 1er. Ac. anti-Bcl-2 (Bcl-2 ΔC21) (Santa Cruz Biotechnol Co., Santa Cruz, CA) (dilución 1:2000) y como 2do. Ac. se utilizó una dilución 1:3000 de un Ac. anti-conejo IgG conjugado con HRP (Bio Rad, Richmond, CA).

2- Modulación de la expresión de Gal-1

Con el fin de estudiar la producción endógena de Gal-1, las células aloreactivas se recolectaron en diferentes períodos de tiempo a lo largo del CML. Por otra parte, para estudiar la modulación de la expresión de Gal-1 por RANTES durante la respuesta alogénica las células cultivadas en ausencia o en presencia de RANTES (60 µg/ml) y de RANTES más Sulfasalacina (0.5M) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) se recolectaron en diferentes períodos de tiempo a lo largo del CML.

En ambos casos los extractos protéicos se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 15%. Luego de realizada la transferencia y el bloqueo de la membrana de nitrocelulosa, esta se incubó con el 1er. Ac. anti-Gal-1 policlonal (80,81) (dilución 1:2000) y como 2do. Ac. se utilizó un Ac. anti-conejo IgG conjugado con HRP (Bio Rad, Richmond, CA) (dilución 1:3000). Como control positivo para detección del Western Blot se utilizó Gal-1 recombinante (1 µg).

3- Modulación de la expresión de TGF β durante la respuesta alogénica

La expresión de TGF β (TGF β_1 , β_2 , β_3 y β_5) fue analizada por Western Blot en células aloreactivas obtenidas luego de diferentes períodos de incubación con Gal-1, utilizando el equipo de detección de TGF β de R&D Systems (Palo Alto, CA) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

4- Expresión de SLAM en endometrios de pacientes con ARE y de mujeres fértiles

Las biopsias de endometrio se colocaron en Trizol (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y se conservaron a -70°C hasta su uso. Posteriormente se disgregaron y se procedió a la aislación de la fase protéica siguiendo las instrucciones del fabricante. Los extractos protéicos se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10%. Luego de realizada la transferencia y el bloqueo de la membrana de nitrocelulosa, esta se incubó con el 1er. Ac. anti-SLAM policlonal (Santa Cruz Biotechnol Co., Santa Cruz, CA) (dilución 1:500) y como 2do. Ac. se utilizó un Ac. anti-cabra IgG conjugado con HRP (Santa Cruz Biotechnol Co., Santa Cruz, CA) (dilución 1:5000).

Bioensayo de TGF β

Los sobrenadantes de cultivo alogénicos se ensayaron para determinar la actividad de TGF β , por su habilidad de inhibir el crecimiento celular de la línea epitelial de pulmón de mink sensible a TGF β (Mv1Lu), según describió Danielpour et al (82). Brevemente los sobrenadantes de los CML cultivados en ausencia y en presencia de Gal-1 (4 y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se recolectaron a diferentes períodos de tiempo. Las células Mv1Lu se sembraron a una concentración de 2×10^4 células/50 μl /pocillo en una placa de 96 pocillos (Corning, NY) en medio DMEM

suplementado con 0.4% SFB. Una hora después, 50 μ l de diferentes diluciones de los sobrenadantes sin tratamiento se ensayaron para medir solamente la bioactividad del TGF β . Alternativamente, los sobrenadantes tratados con HCl 5N y con NaOH/HEPES para medir el TGF β total (bioactivo y latente). En paralelo, células tratadas con diferentes concentraciones de TGF β_1 purificado se utilizaron para realizar una curva estandar desde 0.05 hasta 5 ng/ml. Las placas se incubaron por 20 horas y posteriormente se pulsaron con 1 μ Ci/pocillo de [3 H]TdR (NEN, Boston, MA) por 4 hs. Finalmente las células se lisaron con 6M de cloridio de guanidinio, se cosecharon y se cuantificó la proliferación.

Marcaciones por Inmunofluorescencia

1- Inmunofluorescencia de superficie directa

Las células MNT, endometriales o aloreactivas que se desean marcar se incuban con Acs. monocloanales conjugados con distintos fluorocromos durante 30 min. a temperatura ambiente. Según la cantidad de Acs. monoclonales que se utilicen serán marcaciones simples, dobles o triples. Posteriormente las células se lavan con buffer fosfato (PBS) y se analizan por citometría de flujo. En los controles negativos los Acs. anti humano fueron reemplazados por controles de isotipo.

2- Inmunofluorescencia intracitoplasmática para proteínas

Para la detección de Acs. intracitoplasmáticos las células se incuban con Brefeldina A (10 μ g/ml) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO) durante 4 horas para promover la acumulación intracitoplasmática de proteínas. Luego las células se fijan con 4% paraformaldehído durante 20 min. a temperatura ambiente y posteriormente se permeabilizan con 0.5% (p/v) de saponina (Sigma Chemical Co., St. Louis MO) durante 30 min. a temperatura ambiente. Durante la

permeabilización se agregan el o los Acs. monoclonales para los Acs. citoplasmáticos buscados. Luego de cada incubación las células se lavan con PBS-2% SFB (Life Technologies, Paisley, UK). En los controles negativos los Acs. anti-humano fueron reemplazados por controles de isotipo.

3- Inmunofluorescencia intracitoplasmática para citoquinas

Para determinar la producción de citoquinas (INF γ e IL-4), las células se estimularon durante 4 horas con PMA (10 ng/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis MO) y Ionomicina (1 μ M) (Sigma Chemical Co., St. Louis MO) en presencia de Brefeldina A. Las células se marcaron en su superficie con un Ac. anti-CD3 o anti-CD45R0 y posteriormente se realizó la marcación intracitoplasmática para las citoquinas. En los controles negativos los Acs. anti-humano, ya sean de superficie o intracitoplasmáticos, fueron reemplazados por controles de isotipo.

Todas las muestras se analizaron en un Citómetro de Flujo Ortho Cytoron Absolute cytometer® (Ortho Diagnostic, Raritan, NJ) y se adquirieron 10 mil eventos. Los resultados se interpretaron utilizando el programa WinMDI® versión 2.5. Los resultados se expresan como porcentajes de células positivas usando los correspondientes controles para determinar en cada caso el cuadrante o punto de corte.

4- Ensayo de remoción de CD69 de la membrana celular (“shedding”)

Para investigar un posible mecanismo de autodegradación de CD69 de la membrana celular, las células MNT de pacientes con ARE se preincubaron 1 hora a 37°C en presencia o ausencia de leupeptina (10⁻⁴ M, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO). Luego de lavar con PBS-2% SFB, las células MNT se marcaron con

CD69 y CD3 (ambos de superficie) y se analizaron por citometría de flujo como se describió mas arriba.

5- Purificación de células CD3⁺CD69⁺ por citometría de flujo (“sorting”)

Luego de la aislación de células MNT de pacientes con ARE, 100×10^6 células se incubaron con leupeptina a 37°C durante 1 hora. De este modo, se busca que las células expresen la molécula CD69 en la superficie celular y al mismo tiempo queden viables para realizar estudios funcionales luego del procedimiento de purificación. Seguidamente se agrega el Ac. anti CD69 durante 30 min. a temperatura ambiente y posteriormente se marca con el Ac. anti-CD3 de superficie. Las ventanas se diseñaron para seleccionar las poblaciones CD3⁺CD69⁺ y CD3⁺CD69⁻. La aislación se realizó en un Citómetro de Flujo FACS star Plus® (Becton Dickinson, San José, CA). Ambas poblaciones celulares se cultivaron bajo distintos estímulos y posteriormente se realizaron determinaciones de citoquinas y de proliferación.

En la tabla siguiente se muestran todos los Acs. monoclonales conjugados con los distintos fluorocromos empleados en las técnicas de inmunofluorescencias.

Especificidad	Isotipo	Especie	Flourocromo conjugado	Procedencia
anti-CD3	IgG1	ratón	preCP	Becton Dickinson
anti-CD3	IgG1	ratón	PE	
anti-CD69	IgG1	ratón	preCP	
anti-CD69	IgG1	ratón	FITC	
anti-INFγ	IgG1	ratón	FITC	
anti-INFγ	IgG1	ratón	PE	
anti-IL-4	IgG1	ratón	PE	
anti-CD45RO	IgG1	ratón	PE	
anti-CD62L	IgG1	ratón	FITC	
anti-CD4	IgG1	ratón	PE	
anti-CD25	IgG1	ratón	FITC	
anti-CD95	IgG1	ratón	PE	
Anexina-V			FITC	
SLAM	IgG1	ratón	PE	
IgG1	IgG1	ratón	PE	
	IgG1	ratón	preCP	
	IgG1	ratón	FITC	
anti-CCR7	IgG1	ratón		Donado por la Dra. Sallusto
anti-Ig totales humanas	F(ab') ₂	cabra	FITC	Sanofi Diagnostic
anti-CD8	IgG1	ratón	PE	Caltag
2do. Ac anti-IgG ratón	F(ab') ₂	cabra	PE	DAKO
2do. Ac anti- IgG ratón	F(ab') ₂	cabra	FITC	DAKO

Determinaciones de β -quimioquinas y citoquinas secretadas**1- ELISA para β -quimioquinas**

Para el estudio de las β -quimioquinas (RANTES, MIP-1 α y MCP-1) presentes en el suero o en sobrenadantes de cultivos, se utilizaron equipos de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D System, Minneapolis, USA). Consiste en un ELISA sandwich en donde el Ac. específico para cada citoquina esta adsorbido a la placa. Los estándares provistos por los equipos y las muestras (sueros o sobrenadantes de cultivos) se incuban en el soporte sólido durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se agrega el Ac. policlonal conjugado con HRP para cada quimioquina en la dilución correspondiente durante 1 hora. Finalmente se agrega el sustrato (peróxido de hidrógeno y tetrametilbenzidina) durante 20 min. y luego H₂SO₄ 4N para detener la reacción. La densidad óptica se leyó a 450 nm mediante un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS) y los resultados se expresaron en pg/ml.

2- ELISA para INF γ

Para la determinación de la secreción de INF γ de la población CD3⁺CD69⁺ se realizó un ELISA sandwich empleando un Ac. de captura (2 μ g/ml, 16 horas a 4°C) y otro de detección biotinilado (0.5 μ g/ml, 1 hora a temperatura ambiente). A continuación se incubó con avidina conjugada a peroxidasa (0.4 μ g/ml, 30 min. a temperatura ambiente, ImmunoPure Steptavidin, Horseradish peroxidase Conjugated, Pierce, USA) y se reveló utilizando o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Gibco BRL, NY, USA). La reacción se detuvo con una solución de H₂SO₄ 4N y la densidad óptica se leyó a 492 nm mediante un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS). La curva estándar se realizó haciendo diluciones seriadas de INF γ recombinante humano (Endogen, MA, USA). La

determinación de INF γ se realizó en los sobrenadantes de cultivos de células CD3⁺CD69⁺ purificadas que fueron recuperadas a los 4 días de cultivo (previo a la incorporación de timidina tritiada).

3-ELISA para IL-10

Para la determinación de la secreción de IL-10 de la población CD3⁺CD69⁺ se realizó un ELISA sandwich empleando un Ac. de captura (2 μ g/ml, 16 horas a 4°C) y otro de detección biotinilado (0.5 μ g/ml, 1 hora a temperatura ambiente). A continuación se incubó con avidina conjugada a peroxidasa (0.4 μ g/ml, 30 min. a temperatura ambiente, ImmunoPure Steptavidin, Horseradish peroxidase Conjugated, Pierce, USA) y se reveló utilizando o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Gibco BRL, NY, USA). La reacción se detuvo con una solución de H₂SO₄ 4N y la densidad óptica se leyó a 492 nm mediante un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS). La curva estándar se realizó haciendo diluciones seriadas de IL-10 recombinante humano (Endogen, MA, USA). La determinación de IL-10 se realizó en los sobrenadantes de los cultivos de células CD3⁺CD69⁺ purificadas que fueron recuperadas a los 4 días de cultivo (previo a la incorporación de timidina tritiada).

Determinaciones de citoquinas

1-Síntesis del ADN complementario y reacción polimerasa en cadena (RT-PCR)

La obtención de la cadena complementaria y del ADN copia (ADNc) se realizó utilizando un equipo Clontech (Palo Alto, CA). Los ADNc se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización. La reacción de polimerasa en cadena se realizó en un ciclador térmico PTC-100 MJ Research Inc. El programa de

amplificación consistió en 35 ciclos, cada uno de los cuales incluyó desnaturalización por 1 min. a 94°C, hibridación 30 seg a 55°C y extensión a 72°C por 1 min. Cada PCR se realizó en un volumen final de 50 µl, conteniendo 36.6 µl de agua (DEPC), 3 µl del ADNc, 5 µl del buffer de reacción 10x (Promega Inc.), 0.5 µl de mezcla de 2'-deoxynucleosidos 5'-trifosfatos (2.5 mM de cada uno), 4 µl de Mg (50mM, Promega Inc.), 1 µl de primers 3' y 5' correspondiente (Sigma Genosys) y 1 U de Taq ADN polimerasa (Promega Inc.). La secuencia de cada uno de los pares de cebadores utilizados para la amplificación de citoquinas humanas (INF γ , IL-4, IL-5 e IL-10), CD3 y β -actina se muestra en Tabla II.

2-Electroforesis en gel de agarosa y semi-cuantificación de los productos de RT-PCR

Después de realizada la amplificación por RT-PCR, se analizaron 10 µl de cada producto en un gel de agarosa al 2% conteniendo 0.5% de bromuro de etidio en buffer Tris-Borate-EDTA (TBE). Se utilizó una escalera de peso molecular de 1-kb de ADN (Promega Inc.) como marcador de peso molecular. La electroforesis se realizó en TBE a 100 V por 20 min. La identidad de los productos se confirmó por sus respectivos tamaños y por Southern blot, utilizando sondas específicas de ADNc marcadas radiactivamente con ^{32}P . El área de las bandas fue cuantificada utilizando: "NIH Image 1.59 software" (disponible en el sitio [Http://rsb.info.nih.gov/nih-image](http://rsb.info.nih.gov/nih-image) de la Word Wide Web).

Especificidad	Cebador	Secuencia
β -actina	5' cebador 3' cebador	TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG
CD3	5' cebador 3' cebador	AGATGGGAAGATGATCGGCT CAGTCGAGAGCTTCAGACAA
INF γ	5' cebador 3' cebador	AGTTATATCTTGGCTTTTCA ACCGAATAATTAGTCAGCTT
IL-4	5' cebador 3' cebador	CTTCCCCCTCTGTTCTTCT TTCCTGTGCGAGCCGTTTCAG
IL-5	5' cebador 3' cebador	CTTTACGTCTTCGTAGGAGTA CATTACTTGTGGCTCACCTATTAT
IL-10	5' cebador 3' cebador	ATGCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA TCTCAAGGGGCTGGGTCAGCTATCCA

Tabla II: Secuencia de los cebadores utilizados para la reacción de polimerasa en cadena.

Protocolo de Inmunización

Las pacientes elegibles para el ensayo clínico de inmunoterapia siguieron los requisitos detallados en el capítulo 1.

La inmunoterapia con leucocitos paternos, consiste en aislar las células MNT del esposo a través de un gradiente de Ficoll-Hypaque a partir de 100 ml de sangre periférica heparinizada. La suspensión de leucocitos obtenida (de 80 a 120x 10⁶ células/ml) se inyecta intradermicamente en el brazo de la esposa. El número de dosis depende de la capacidad de la mujer de generar actividad bloqueante en el CML, capaz de suprimir el 50% de la capacidad aloestimuladora del esposo. En aquellas pacientes que no se logró la generación de FB del CML luego de la sexta inmunización el tratamiento se dio por finalizado.

Análisis estadísticos utilizados

Para la comparación entre medias se utilizaron los tests de Student, Chi cuadrado y para el análisis de muestras apareadas se utilizó el test Mann Whitney empleando el software GraphPad (GraphPad, San Diego, CA). Se consideró como valor significativo $*p < 0.05$ y altamente significativo a los valores $**p < 0.001$.

Capítulo 1

**Caracterización de factores bloqueantes de la respuesta alógena
materna: mecanismos moleculares y celulares involucrados**

**Caracterización y evaluación inmunológica de pacientes con Abortos
Recurrentes Espontáneos y de mujeres fértiles**

Existe una gran controversia acerca de la evaluación y el tratamiento apropiado para parejas en las cuales la mujer ha experimentado abortos recurrentes espontáneos, ya que son múltiples las posibles causas del aborto recurrente. De este modo y a fin de lograr la unificación de criterios y protocolos para el tratamiento de las pacientes con ARE, la Sociedad Americana de Inmunología de la Reproducción confeccionó una guía de recomendaciones clínicas en 1997 (50).

El diagnóstico de ARE se basa tanto en la información clínica como en las pruebas de laboratorio. En la tabla I se detallan algunas de las características presentes en las pacientes con ARE.

1- Características que identifican a mujeres con ARE durante el primer trimestre.

- A- Mujeres que experimentaron 3 o más abortos consecutivos con el mismo patrón sin lograr nunca un embarazo a término.
- B- Mujeres mayores de 35 años con 2 o más abortos previos.
- C- Mujeres con 2 o más abortos previos con el cariotipo normal documentado de las pérdidas fetales sufridas.
- D- Mujeres que no lograron un nuevo embarazo luego de múltiples ciclos de transferencia embrionaria.

2- Antecedentes que aumentan los riesgos de ARE.

- A- Edad materna
- B- Historia de infertilidad
- C- Historia obstétrica
- D- Historia de enfermedades autoinmunes

3- Factores de riesgo asociados con exámenes complementarios

- A- Genéticos
 - B- Anatómicos/uterinos
 - C- Microbiológicos
 - D- Endocrinológicos
 - E- Inmunológicos
 - F- Metabólicos
-

Tabla I: Parámetros Clínicos utilizados para el Diagnóstico de ARE.

Requisitos de las parejas incluidas en el presente trabajo

Las pacientes incluidas en este trabajo cumplieron con los siguientes requisitos:

- 1- *Mujeres con 2 o más abortos consecutivos ocurridos antes de las 12 semanas de gestación y con el mismo patrón de pérdida..*
- 2- *Edad materna entre 25 y 42 años.*
- 3- *Ausencia de actividad bloqueante evaluada en el Cultivo Mixto Linfocitario (CML).*

El criterio de exclusión de las pacientes estudiadas se basó en :

- A) *Causas anatómicas:* cualquier anomalía anatómica, ya sea congénita o adquirida.
- B) *Infecciones:* Si bien no existen evidencias que asocien algún microorganismo con la inducción de abortos recurrentes, deben descartarse la presencia de infecciones transmisibles vía sanguínea como por ejemplo: hepatitis B o C, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), citomegalovirus o por *Tripanosoma curzi*.
- C) *Causas endocrinológicas:* principalmente deben descartarse deficiencias durante la fase lútea tardía y alteraciones en la producción de progesterona, presente en el 16 al 60% de los abortos espontáneos.
- D) *Causas genéticas:* cualquier anomalía cromosómica incluyendo translocaciones e inversiones, principales causas de pérdidas fetales.
- E) *Causas inmunológicas:* deben descartarse la presencia de autoanticuerpos.
 - 1.1 *Anticuerpos anti-fosfolipídicos*
 - 1.2 *Anticuerpos anti-núcleo*
 - 1.3 *Anticuerpos anti-ADN*

Las pacientes que niveles detectables de alguno de los anticuerpos mencionados, en general presentan un factor autoinmune asociado. Por lo tanto, las sucesivas fallas en los embarazos que presentan se deben a problemas en el momento de la implantación fetal o a alteraciones en la cascada de coagulación. Es por ello que este grupo de pacientes fue excluido en todos los estudios del presente trabajo.

La caracterización inmunológica de las parejas estudiadas incluyó:

- * Capacidad del suero materno de bloquear el CML.
- * Presencia de anticuerpos leucocitóxicos y anti-especificidades paternas, evaluados por la técnica de Cross-match por microlinfocitotoxicidad o por citometría de flujo.

Grupos controles participantes del estudio

A lo largo del presente trabajo se utilizaron diversos grupos controles según la necesidad del análisis a realizar. En cada caso en particular, se detallan las características de los mismos.

Por otra parte, todos las pacientes y grupos controles incluidos pertenecen a una población homogénea de Argentina, la mayoría con antecesores hispanos e italianos. Asimismo, todos los estudios y protocolos de investigación realizados contaron con la aprobación del comité de ética del Hospital de Clínicas “José de San Martín”. Más aún, todas las pacientes firmaron un consentimiento por escrito avalando la participación en dichos estudios.

PRIMERA PARTE:**Generación de Factores Bloqueantes del CML y de Anticuerpos anti-especificidades paternas en pacientes con ARE y en mujeres fértiles.**

El Cultivo Mixto Linfocitario (CML) consiste en un modelo *in vitro* que permite cuantificar la respuesta alogénica. Esta respuesta se produce debido a la presencia de moléculas de histocompatibilidad distintas, que si bien presentan una estructura en común, varían de individuo a individuo (aloantígeno). Particularmente, en el CML se evidencian diferencias en las moléculas de histocompatibilidad maternas y paternas, es por ello que resulta muy útil como modelo de estudio, ya que representa *in vitro* la respuesta durante un embarazo normal. Como consecuencia del reconocimiento materno de antígenos paternos se produce una activación y proliferación linfocitaria que puede cuantificarse por la incorporación de timidina tritiada.

Se ha reportado y puede evidenciarse claramente, que el suero materno tiene la particularidad de disminuir notoriamente *in vitro* la respuesta alogénica (42,44,62,63). Es por ello que el CML se realiza en presencia y en ausencia de suero materno, obteniéndose de este modo el porcentaje de bloqueo del suero materno (ver sección Materiales & Métodos). Se considera que si el suero materno logra bloquear más de un 50% la respuesta alogénica, posee factores bloqueantes (FB) del CML.

Con el objeto de estudiar la presencia de los FB del CML en mujeres con ARE y en mujeres con embarazo a término, se determinó el porcentaje de bloqueo del CML de un grupo de 115 parejas participantes. Ambos grupos estudiados fueron uniformes y no presentaron diferencias significativas en cuanto a la edad

materna y grupo étnico. En la Tabla II se detalla el número de abortos previos o números de hijos nacidos, con sus correspondientes rangos y desvíos.

	Parejas con ARE			Parejas Fértiles		
	Rango	Media	SD	Rango	Media	SD
Edad Materna (años)	26-43	34.7	5.1	22-56	41.8	6.2
Número de abortos/hijos	2-5	2.6	0.88	2-3	2.3	0.70

Tabla II: Valores de las medias, rangos y desvíos estándares de las pacientes con ARE y de las parejas fértiles estudiadas.

En la Tabla III se observa que el 74% de las parejas con ARE no logran generar el bloqueo del CML mientras que el 90% de las parejas con embarazos a término disminuye la respuesta alogénica en presencia del suero materno, siendo esta diferencia significativa (** p de Fisher 0.0001).

	Bloqueo en CML	Sin Bloqueo en CML	valor * p Fisher (RR)
Pacientes con ARE	30 (26%)	85 (74%)	0.0001 (0.3)
Mujeres fértiles	18 (90%)	2 (10%)	

Tabla III: Generación de factores bloqueantes del CML en pacientes con ARE y en mujeres fértiles.

Los presentes resultados coinciden publicaciones previas, en las cuales se muestra que los FB del CML se generan durante el embarazo y aumentan con los sucesivos embarazos (41,42,49). Si bien estos factores han sido asociados con el éxito de un embarazo, se desconoce hasta la fecha la naturaleza los mismos. Por tal motivo, se investigó si la capacidad bloqueante de las mujeres con ARE se

debe solamente a la presencia de anticuerpos o bien a la generación de citoquinas, quimioquinas u a otros factores solubles.

**Presencia de Anticuerpos leucocitotóxicos y anti-especificidades
paternas evaluadas por la técnica de Cross-match**

Dado que la generación de Anticuerpos anti-especificidades HLA paternas (leucocitotóxicos) constituye la mayor evidencia de un reconocimiento materno hacia antígenos fetales, se estudió la presencia de los mismos por la técnica de Cross-match. Dicha técnica se realizó utilizando microlinfocitotoxicidad dependiente de anticuerpo o citometría de flujo, ya que si bien ambas presentan el mismo fundamento, brindan distinta información.

La técnica de Cross-match por microlinfocitotoxicidad (CMXM) sólo permite cuantificar anticuerpos fijadores de complemento, de ahí el nombre de leucocitotóxicos (isotipos IgG1 e IgG4), los cuales, en general, se asocian a una respuesta de tipo Th1 (45,83). Por el contrario, la técnica de Cross-match evaluada por citometría flujo (CMXC) evidencia Anticuerpos totales en el suero materno. Esto implica que permite identificar no solamente anticuerpos leucocitotóxicos, sino también Anticuerpos no fijadores de complemento encontrándose dentro de ésta isotipos asociados a una respuesta tipo Th2 (45,75,83).

Se realizó CMXM en 33 parejas con ARE y se los comparó con un grupo de 10 parejas con embarazos a término. Al mismo tiempo se correlacionó la presencia de Anticuerpos leucocitotóxicos con la presencia o ausencia de FB del CML. Como puede observarse en la Tabla IV, solamente el 9% de las parejas con ARE mostraron Cross-match positivo, o sea presencia de Anticuerpos

leucocitotóxicos, mientras que éste fue positivo en el 40% de las parejas con embarazos a término, obteniéndose una diferencia significativa entre ambos grupos (valor $*p$ de Fisher 0.0001). Estas cifras representan valores mas elevados que los encontrados en la literatura. La diferencia podría adjudicarse al pequeño tamaño de la muestra control. El hecho que sólo el 40% de las mujeres con embarazo a término proesentam Anticuerpos linfocitotóxicos indicaría su baja relevancia en la mediación de un embarazo exitoso.

Parejas con ARE	Cross- match +	Cross- match -
Con FB del CML	1(3%)	12(36.4%)
Sin FB del CML	2(6%)	18(54.6%)
Total	3(9%)	30(91%)

Parejas Fértiles	Cross- match +	Cross- match -
Con FB del CML	3(30%)	6(60%)
Sin FB del CML	1(10%)	
Total	4(40%)	6(60%)

Tabla IV: Presencia de Anticuerpos linfocitotóxicos en Mujeres con ARE y en mujeres con embarazos a término evaluadas por CMXM.

Como se explicó anteriormente, el CMXM solamente permite medir Anticuerpos fijadores de complemento y anti especificidades HLA-paternas, por lo tanto no resulta útil para pacientes con ARE ya que los Anticuerpos que podrían asociarse con un embarazo exitoso corresponderían a Anticuerpos no fijadores de complemento, ya sean isotipos asociados a una respuesta Th2 o bien asimétricos.

Si comparamos la técnica de CMXC con la presencia de FB del CML, como parámetros para la caracterización de las pacientes con ARE, existe en general una buena correlación entre ambas (83). Sin embargo, existen casos donde a pesar de que la paciente presenta CMXC positivo, el suero materno no presenta actividad bloqueante en el CML. En el presente análisis se evaluó la actividad bloqueante de pacientes con ARE y al mismo tiempo se cuantificaron por citometría de flujo los niveles de Anticuerpos maternos anti-especificidades presentes en linfocitos T paternos. Como se describe en la Tabla V, el 80% de los individuos estudiados presentan una correlación entre la generación de actividad bloqueante y presencia de Anticuerpos anti especificidades paternas; sin embargo el 20% restante no logra bloquear el CML a pesar de presentar CMXC positivo.

Porcentaje de pacientes	Numero de pacientes	Bloqueo del CML	CMXC
80%	7	+	+
	9	-	-
20 %	4	-	+

Tabla V: Presencia de actividad bloqueante y de Anticuerpos. anti-linfocitos T paternos en 20 pacientes con ARE.

En la Figura 1 se muestran ejemplos representativos de CMXC positivos y negativos de pacientes con ARE.

Estos resultados sugieren que la actividad bloqueante del suero materno no solamente se debe a la generación de Anticuerpos, si no también a otros factores solubles presentes en el suero materno.

Esta clara evidencia nos llevó a desarrollar el objetivo del presente capítulo:

Identificación de los FB del CML.

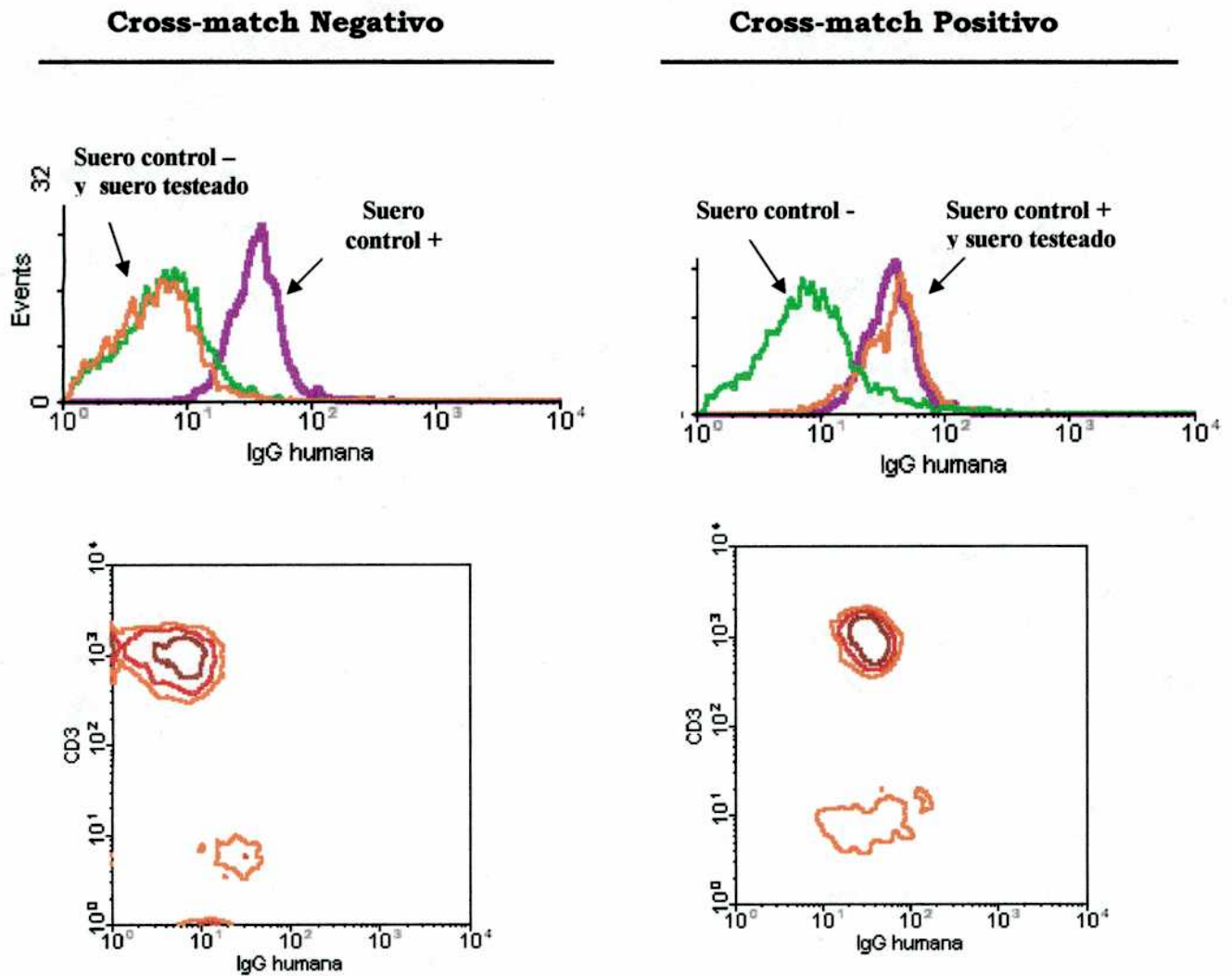


Figura 1: Ejemplos representativos de Cross-match positivos y negativos por citometría de flujo. Las células mononucleares totales paternas se incubaron durante 30 min. en presencia de suero materno. Posteriormente se incubaron con anti-IgG totale conjugado con FITC y finalmente con un anti-CD3 conjugado con PE. El análisis se realizó dentro de la ventana seleccionada electrónicamente para células CD3⁺. En el panel superior se muestran histogramas y en el inferior gráficos de contornos.

DISCUSIÓN

Una de las hipótesis actuales, destaca la relevancia de los FB del CML para generar tolerancia inmunológica en la interfase materno-fetal, otorgándole a la presencia de estos FB, un valor pronóstico para ARE.

Nuestros resultados confirman que tanto los Anticuerpos leucocitotóxicos como los factores inhibidores del CML son mas frecuentes en el suero de mujeres fértiles que en mujeres con ARE. Sin embargo, el hecho que estos anticuerpos estén presentes en el 26% de las mujeres con ARE y ausentes en el 10 % de las mujeres con embarazos a término, sugiere que éstos representan una respuesta al embarazo más que la causa del mismo.

Estos datos coinciden con los reportados por Coulam *et al* (41) quienes demostraron que los anticuerpos leucocitotóxicos y los FB del CML aumentan progresivamente durante la exposición materna a los sucesivos embarazos.

Resumiendo, nuestra conclusión es que la presencia de Anticuerpos leucocitotóxicos no resultaría un parámetro relevante para el diagnóstico de abortos recurrentes. En cambio, tanto el CML como el CMXC, evidencian la presencia de factores bloqueantes que constituyen marcadores asociados a un embarazo exitoso, motivo por el cual podrían ser utilizados como parámetros para diagnóstico de ARE.

SEGUNDA PARTE:**Galectina-1 induce una disminución de la proliferación de linfocitos T a través de mecanismos apoptóticos y no apoptóticos en respuesta a alo-antígenos**

Galectina-1 (Gal-1) es un miembro de una familia creciente de lectinas animales, que se encuentra ampliamente conservada a través de la evolución y comparte secuencias similares en el dominio de reconocimiento de carbohidratos (84) Gal-1 se expresa en células epiteliales tímicas (85), macrófagos (79), células T activadas (86), células B estimuladas (87) y en los tejidos inmunológicamente “privilegiados” como, placenta testículos y tumores (84). Esta proteína de unión a β -galactósidos se secreta como un homodímero unido en forma no covalente a través de dos sitios posibles de unión. Gal-1 es capaz de mediar interacciones célula-célula o célula-matriz extracelular a través del reconocimiento de estructuras de polilactosamina sobre glicoconjugados de la superficie celular (88-94).

Mediante el entrecruzamiento de glicoproteínas sobre la superficie de los linfocitos T (91), se evidenció que Gal-1 induce apoptosis de timocitos inmaduros activados, (pero no de linfocitos T en reposo), a través de la fosforilación Erk y de la activación de factores de transcripción específicos (79,90,95-98). Observaciones recientes sugieren que esta proteína de unión a carbohidratos modula la apoptosis mediada por el receptor del linfocito T (TCR) induciendo una fosforilación parcial de la cadena ζ del TCR (97). Los efectos inmunomodulatorios y anti-inflmatorios de esta proteína de unión a carbohidratos fue validada *in vivo* en modelos experimentales de autoinmunidad e inflamción (99-101). Se ha demostrado en un modelo murino de artritis reumatoidea, que Gal-1 disminuye

la inflamación y suprime la respuesta autoinmune (99). El tratamiento de ratones artríticos con Gal-1 aumenta la susceptibilidad de células T a la muerte celular como consecuencia de su activación y resulta en un fuerte cambio en el patrón de citoquinas virándola desde un tipo Th1 hacia uno tipo Th2 (99). Esta nueva ola de información sugiere que Gal-1 podría utilizarse como un agente inmunosupresor selectivo para “apagar” las funciones efectoras de células T.

Los linfocitos T aloreactivos representan la mayor barrera para lograr un embarazo a término (102,103) y se han reportado mecanismos capaces de inducir tolerancia materno-fetal que implican a moléculas inmunosupresoras FasL y TNF- α (104-108). Recientemente se han propuesto mecanismos alternativos que podrían participar en la muerte celular inducida por aloantígenos (109). En el presente capítulo investigamos las propiedades inmunoregulatorias, mecanismos de acción y regulación de la expresión de Gal-1 en el curso de una respuesta alogénica normal.

Modulación de la respuesta alogénica por Galectina-1

Con el objeto de investigar la función de Gal-1 en el curso de una respuesta aloinmune, se cocultivaron MNT de dadores normales con total disparidad en los alelos HLA durante 5 días, en ausencia/presencia de concentraciones crecientes de Gal-1 recombinante. Como se muestra en la Figura 1A Gal-1 induce una inhibición de la respuesta alogénica dependiente de la dosis, mostrando una reducción en la incorporación de timidina tritiada (22%, 37%, 61% y 80% de inhibición para 2, 4, 40 y 100 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente; (* $p < 0.01$ para 4, 40 y 100 $\mu\text{g/ml}$, test de Student). Como control, se utilizaron células autólogas sin estimular, las cuales no variaron su respuesta proliferativa cuando fueron

expuestas a Gal-1 en ninguna de las concentraciones estudiadas (resultado no mostrado).

Posteriormente se investigó si la inhibición de la respuesta alogénica T inducida por Gal-1 era debida en sus propiedades de unión a carbohidratos. Para ello se incubaron linfocitos aloreactivos con diferentes concentraciones de esta proteína en presencia y en ausencia de thiodigalactosido (TDG). Este azúcar, de unión específica a β -galactosidos, fue capaz de prevenir casi completamente la inhibición de la alorespuesta inducida por Gal-1 (4 μ g/ml). Sin embargo, la prevención fue parcial cuando Gal-1 fue utilizada a 40 μ g/ml (Figura 1B).

Interesantemente, la incubación de linfocitos aloreactivos con Gal-1 en presencia de su Ac. específico, no solamente previene la inhibición si no que también induce un leve pero significativo aumento en la respuesta proliferativa, en comparación con células aloreactivas cultivadas en ausencia de Gal-1 (Figura 1C; $*p < 0.05$, test de Student). Esta evidencia sugiere que la Gal-1 endógena podría inhibirse en presencia de su Ac. específico. Un efecto similar se observó cuando los linfocitos aloreactivos se cultivaron en presencia solamente de un Ac. anti-Gal-1 (Figura 1C).

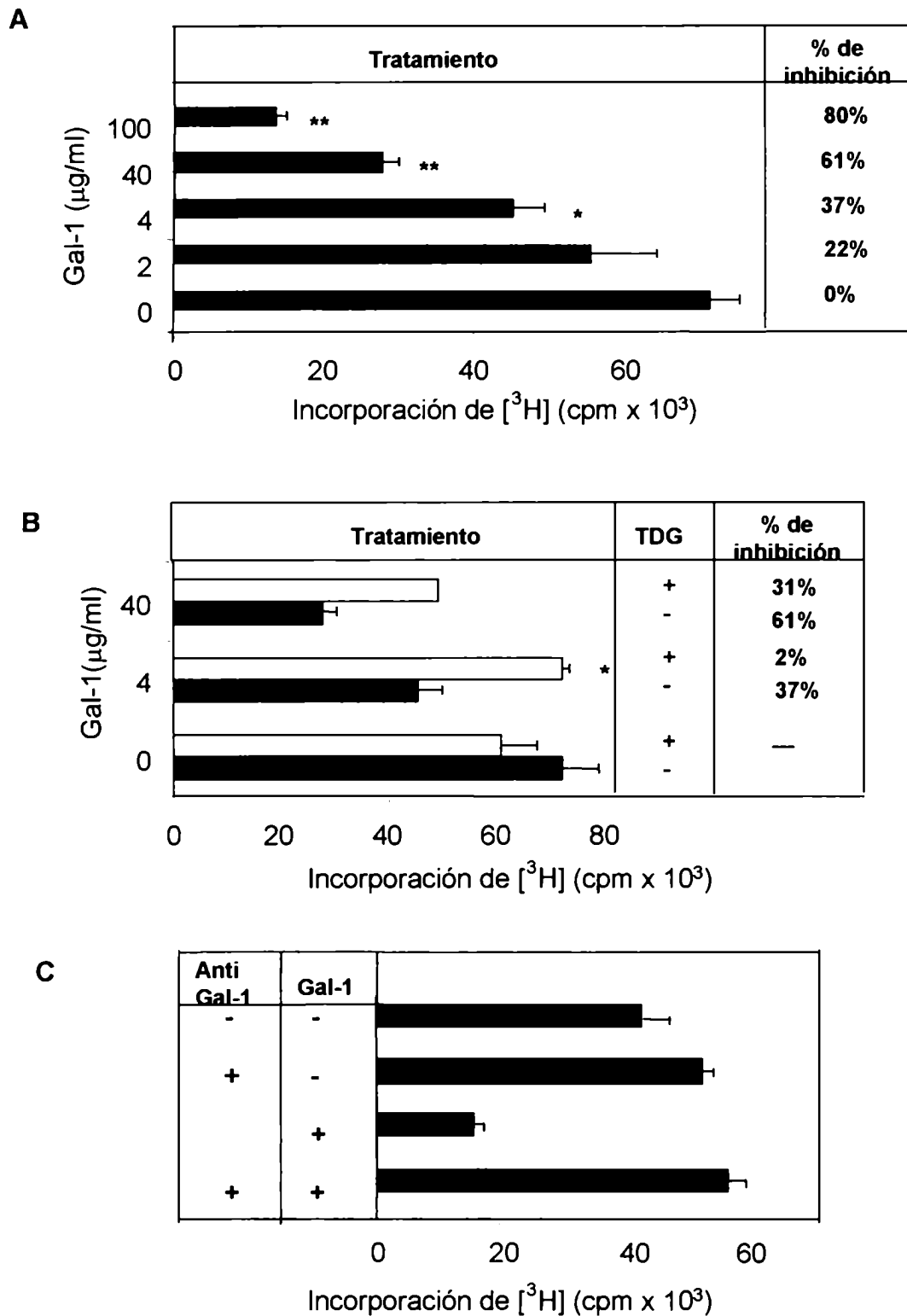


Figura 1. Gal-1 inhibe la respuesta alógena en forma dependiente de carbohidratos. (A) Células respondedoras (1×10^5 células/ml) y estimuladoras pre tratadas con mitomicina (1×10^5 células/ml) se cocultivaron en ausencia o presencia de Gal-1 (2, 4, 40 y 100 µg/ml). **(B)** Células MNT cocultivadas con Gal-1 (4 y 40 µg/ml) en ausencia (■) o en presencia (□) de 0.1M tiodigalactósido (TDG). **(C)** Células MNT cocultivadas en ausencia o presencia de Gal-1 (40 µg/ml) y anti-Gal-1 específico (1:100). Luego de 5 días de cultivo se adicionó $[^3\text{H}]\text{TdR}$ durante 18 hs y determinó su incorporación utilizando un contador de centelleo líquido β . Los resultados se expresan

como la media \pm DS de 3 experimentos independientes utilizando diferentes dadores y combinaciones alogénicas. * $P_{Gal\ 4\ \mu g/ml} < 0.01$ vs células cultivadas en medio o TDG. ** $P_{Gal\ 40\ y\ 100\ \mu g/ml} < 0.001$ vs células cultivadas en medio solamente.

**Mecanismos involucrados en la modulación de la respuesta alogénica
inducida por Galectina-1**

Para profundizar en los mecanismos celulares y moleculares implicados en la inhibición de la respuesta alogénica inducida por Gal-1, se cultivaron linfocitos aloreactivos en presencia de Gal-1 y se procesaron para la detección de apoptosis. Así, la tinción con Ioduro de propidio (IP) reveló un aumento significativo del contenido de ADN subdiploide, que dependió de la dosis y del tiempo de exposición a Gal-1. El análisis de la cinética de inducción de apoptosis de células aloreactivas en presencia de Gal-1 por 0 hs, 24 hs, 48 hs y 5 días (luego de la sustracción de los correspondientes controles en ausencia de Gal-1) se muestra en las Figura 2A y B.

Gal-1 destruye células T activadas que expresan la molécula CD45R0, enriquecidas en polilactosamina. Por este motivo, se analizó la susceptibilidad de células CD45R0⁺ a la apoptosis inducida por Gal-1 durante la respuesta alogénica. Con este propósito, se seleccionaron las células CD45R0⁺ usando anti-CD45R0, y se midió la frecuencia de células apoptóticas tempranas y tardías mediante marcación simultánea con anexina-V y con IP (Figura 2C). El tratamiento con Gal-1 resultó aproximadamente en un 25% de apoptosis temprana de los leucocitos CD45R0⁺ (anexina-V positivos, IP negativos) y un 28% de células positivas para ambos (anexina-V y IP, Figura 2C panel derecho). Como control negativo de apoptosis se utilizaron linfocitos aloreactivos cultivados en ausencia de Gal-1 (Figura 2C panel izquierdo).

Se ha demostrado previamente que Gal-1 afecta la secreción de citoquinas independientemente de sus propiedades proapoptóticas (95,99). Por ello, se analizó cómo la modulación de la producción de INF γ (una de las citoquinas tipo Th1 proinflamatorias involucradas en la respuesta alógena) contribuye al efecto inmunosupresor disparado Gal-1.

Para discriminar entre el efecto de Gal-1 sobre la producción de citoquinas o sobre la muerte celular, y para eliminar potenciales complicaciones debido a la incorporación inespecífica de Ac. por las células apoptóticas, se excluyeron del análisis los linfocitos positivos para anexina-V a través de una ventana de trabajo seleccionada electrónicamente. De este modo se determinó la producción intracelular de INF γ por citometría de flujo en la población de células no apoptóticas.

El agregado de Gal-1 a los cultivos de células alogénicas indujo una reducción del 33% en los niveles intracelulares de INF γ luego de 5 días de cultivo (Figura 2D).

El conjunto de estos resultados sugieren que Gal-1 inhibe la respuesta alógena en forma dependiente de la dosis y de la unión a carbohidratos, induciendo apoptosis de linfocitos T e inhibiendo la producción de IFN- γ . La inhibición de la producción de esta citoquina no fue el resultado de la muerte de células productoras de INF γ , dado que las células apoptóticas fueron excluidas del análisis. Por lo tanto, podemos concluir que tanto mecanismos apoptóticos como no apoptóticos contribuyen a la inmunosupresión inducida por Gal-1 durante el curso de una respuesta alógena normal.

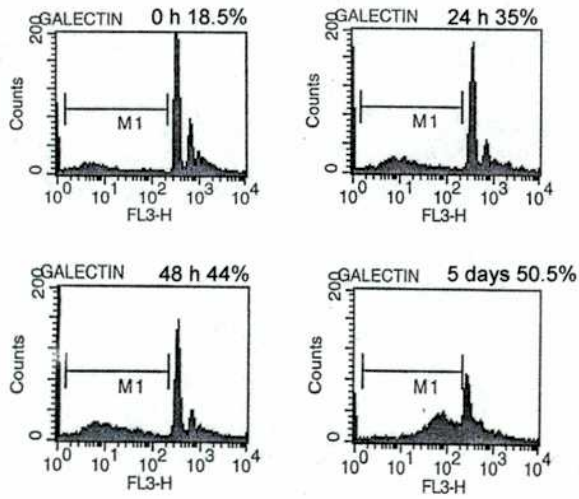
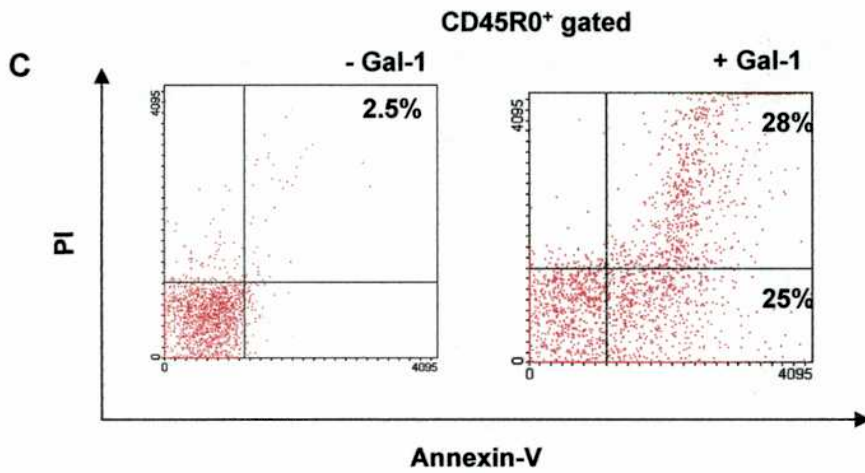
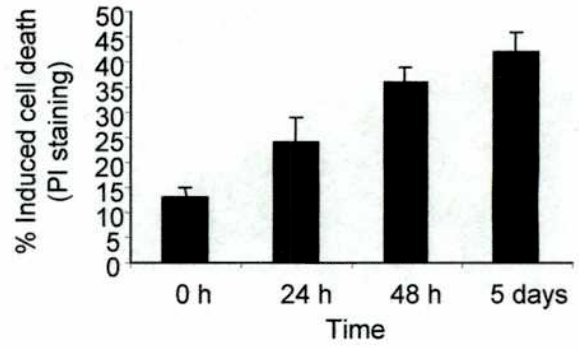
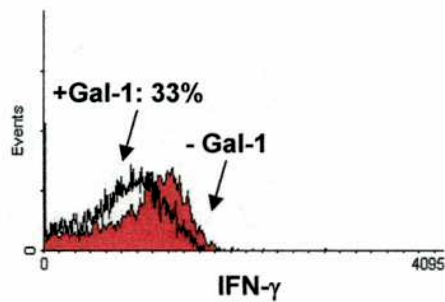
A**B****D**

Figura 2. Gal-1 induce apoptosis de células CD45RO⁺ y modula la producción de INF γ luego de la respuesta alógena. Células respondedoras (1×10^5 células/ml) y estimuladoras pre tratadas con mitomicina (1×10^5 células/ml) se cocultivaron en ausencia/presencia de Gal-1 (40 μ g/ml) durante los indicados períodos de tiempo y se analizó apoptosis y producción de INF γ . **(A)** Contenido de ADN subdiploide medido por tinción con IP. **(B)** Cinética de la incorporación de IP en linfocitos aloreactivos, luego de la sustracción de los correspondientes controles como se indicó en Materiales & Métodos. **(C)** Apoptosis de células CD45RO⁺. Las células aloreactivas se marcaron con anti-CD45RO PreCP, anexina-V FITC y con IP. **(D)** Producción intracitoplasmática de INF γ en células no apoptóticas expuestas a Gal-1. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes utilizando distintos dadores sanos.

La respuesta de una célula a las señales de muerte/proliferación están moduladas por miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (110). Por lo tanto se analizó la expresión de Bcl-2 en respuesta a Gal-1 de las células respondedoras durante el CML. Como se observa en la figura 3A, en ausencia de Gal-1 la expresión de Bcl-2 alcanza un nivel máximo a las 24 hs de aloestimulación y se mantiene hasta las 72 hs, para luego declinar. Cuando Gal-1 se adicionó a los linfocitos aloreactivos al inicio del cultivo celular, la expresión de Bcl-2 también alcanzó un pico a las 24 hs, descendiendo inmediatamente en forma dependiente del tiempo (Figura 3A). Los perfiles inmunoreactivos se muestran en la Figura 3B. Este efecto fue consistente con la cinética de apoptosis observada en la Figura 2A y 2B.

Varios estímulos apoptóticos disparan señales intracelulares de muerte a través del reclutamiento de caspasas específicas (111,112). Por este motivo, se examinó como un inhibidor específico de caspasas de amplio espectro, ZVAD-fmk, es capaz de prevenir el bloqueo de la proliferación inducido por Gal-1. Como se muestra en la Figura 4, la adición de ZVAD-fmk al inicio del cultivo fue capaz de prevenir la inhibición del crecimiento inducida por Gal-1. En ausencia de Gal-1 la adición de ZVAD-fmk no afectó la proliferación celular. Estos resultados sugieren que Gal-1

genera señales intracelulares inhibitorias a través de caminos dependientes de Bcl-2 y caspasas.

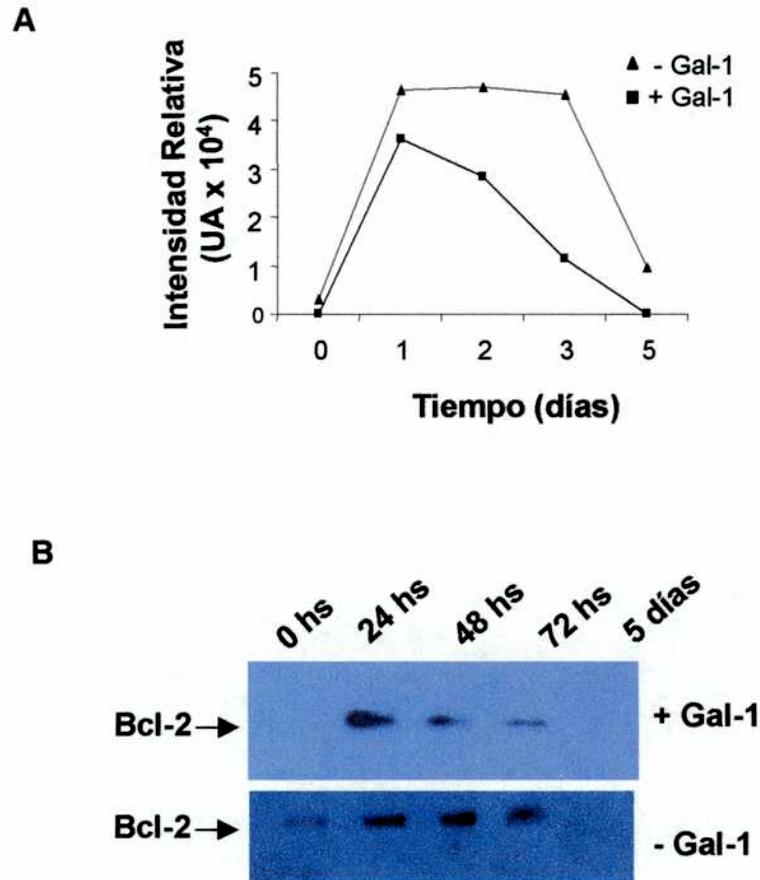


Figura 3. Gal-1 modula la expresión de Bcl-2 en el curso de una respuesta alérgica normal. Células respondedoras (1×10^5 células/ml) y estimuladoras pre tratadas con mitomicina (1×10^5 células/ml) se cocultivaron en ausencia o presencia de Gal-1 (40 $\mu\text{g/ml}$) durante los períodos de tiempo indicados. Las células fueron cosechadas y lisadas en presencia de inhibidores de proteasas. Las bandas protéicas inmunoreactivas se semi-cuantificaron por densitometría y se expresan como unidades arbitrarias relativas (UA). **(A)** Análisis de la cinética de expresión de Bcl-2 en el curso de una respuesta alérgica normal en ausencia o presencia de Gal-1. **(B)** Ensayo de Western Blot representativos de los cultivos alérgicos en presencia (panel superior) o ausencia (panel inferior) de Gal-1. Los resultados fueron representativos de 3 experimentos independientes utilizando diferentes dadores sanos.

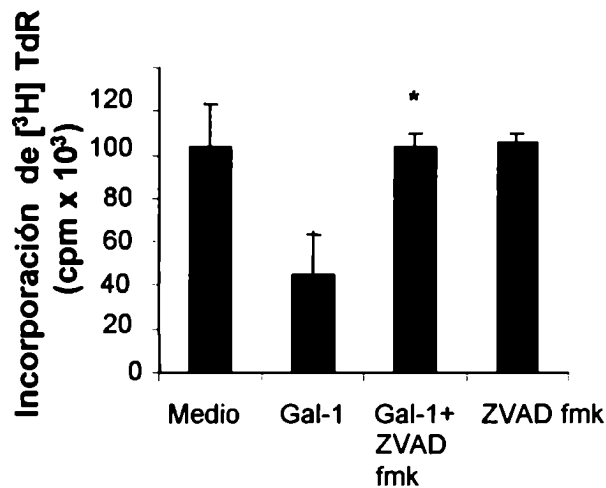


Figura 4. Gal-1 inhibe la respuesta alógena a través de un mecanismo dependiente de caspasas. Células respondedoras (1×10^5 células/ml) y estimuladoras pre tratadas con mitomicina (1×10^5 células/ml) se cocultivaron en ausencia/presencia 50 μ M ZVAD-fmk. Los resultados se expresan como la media de los triplicados en cpm \pm SEM de un experimento representativo de 2 experimentos independientes utilizando distintos dadores sanos. * $P_{\text{Gal-1} + \text{ZVAD-fmk}} < 0.05$ vs Gal-1 .

Efecto de la interleuquina 2 en la inhibición de la respuesta alógena T y de la apoptosis inducidas por Galectina-1

Fue demostrado que la interleuquina 2 (IL-2) es capaz de rescatar células T específicas de la apoptosis inducida por diferentes estímulos, como por ejemplo privación de factores de crecimiento, radiación y dexametasona (113,114). Por otro lado, se demostró que Gal-1 antagoniza la producción de IL-2 inducida por el TCR (95). Por lo tanto se investigó cómo la adición de IL-2 exógena revierte la inhibición de la respuesta aloinmune y la apoptosis inducida por esta lectina. La IL-2 fue utilizada en concentraciones submitogénicas, que no afectan la incorporación de timidina, cuando se agregó sola a los cultivos celulares a diferentes períodos de tiempo (Figura 5). La incorporación de esta citoquina a las 24 hs luego de iniciado el cultivo celular, fue capaz de revertir totalmente la inhibición de los linfocitos aloreactivos inducida por Gal-1 (* $p < 0.01$, test de

Student) (Figura 5). Este efecto no pudo observarse cuando esta citoquina se incorporó 5 días después de la aloestimulación.

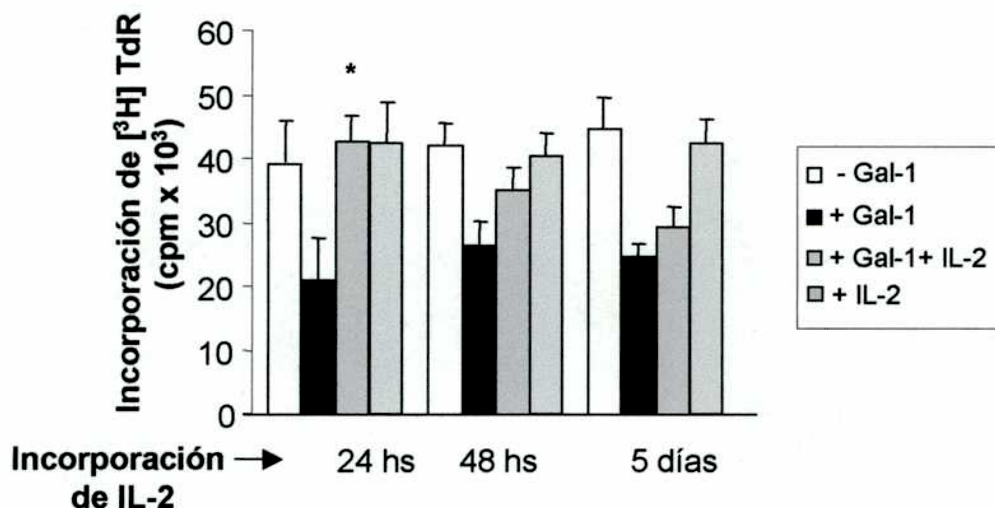


Figura 5. IL-2 revierte la inhibición de la respuesta alógena inducida por Gal-1. Células respondedoras (1×10^5 células/ml) y estimuladoras pre tratadas con mitomicina (1×10^5 células/ml) se cocultivaron en ausencia o en presencia Gal-1 (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A los indicados períodos de tiempo se incorporó IL-2 en concentraciones submitogénicas (20 U/ml). Los resultados se expresan como la media en $\text{cpm} \pm \text{SEM}$ de los triplicados.

Se investigó si el efecto de la IL-2 podría estar relacionado con la disponibilidad del receptor de baja afinidad para IL-2, el CD25, a lo largo de la respuesta alógena. En particular, se analizó, mediante marcación triple la expresión de dicha molécula en las poblaciones CD4 y CD8. Como puede observarse en la Figura 6 la expresión de CD25 durante la respuesta el CML no difiere en presencia o en ausencia de Gal-1, indicando que el receptor está igualmente disponible en ambos casos.

	CD4		CD8	
TIEMPO	con Gal-1	sin Gal-1	con Gal-1	sin Gal-1
0 hs		1		0,9
24 hs	2,6	2,4	0,4	0,3
48 hs	4	4	0,3	0,4
5 días	5	7	3	1

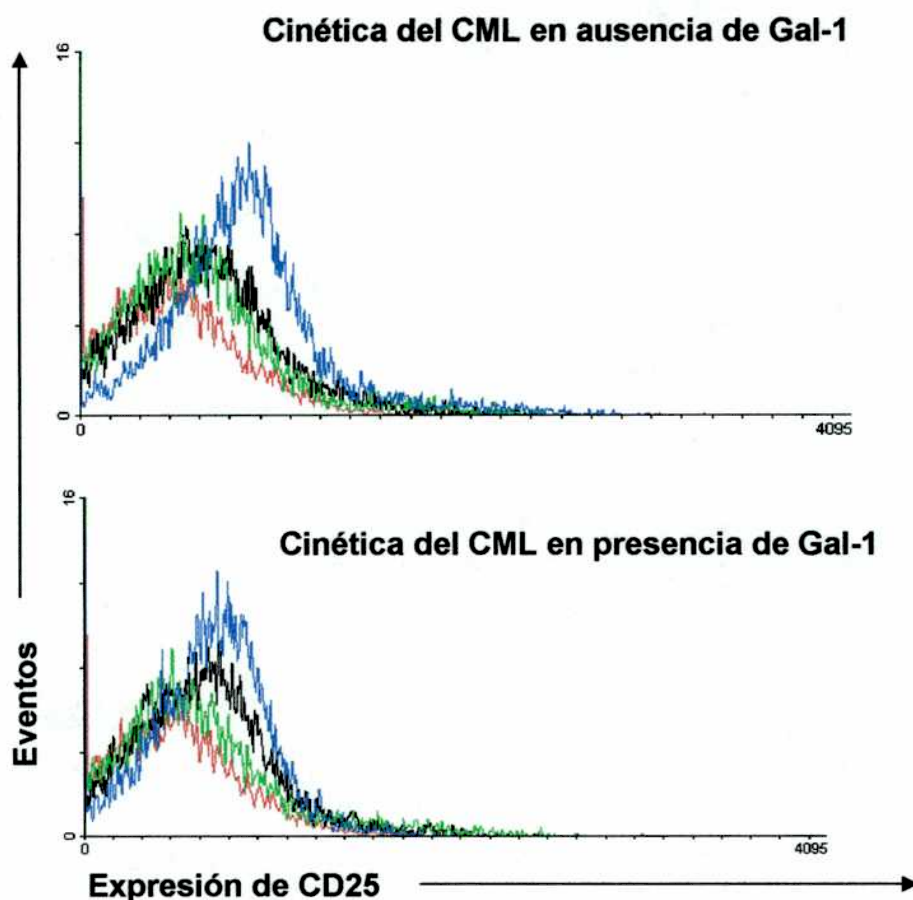


Figura 6. Disponibilidad de receptores para IL-2 a lo largo de la respuesta alógena y en las poblaciones CD4 y CD8. Células respondedoras (1×10^5 células/ml) y estimuladoras pre tratadas con mitomicina (1×10^5 células/ml) se cocultivaron en presencia/ausencia de Gal-1. A las 0, 24 hs, 48 hs y 5 días se realizó triple marcación incluyendo Acs. anti-CD25 FITC, anti-CD4 PreCP y anti-CD8 PE. Los resultados se expresan en la Tabla como porcentajes de células CD25⁺CD4⁺ y CD25⁺CD8⁺. Los histogramas son perfiles citométricos representativos mostrando la expresión de CD25 a 0 hs (color rojo), 24 hs (color verde), 48 hs (color negro) y 5 días (color azul). Esta cinética se realizó tanto en ausencia de Gal-1 (histograma superior) o como en presencia de Gal-1 (histograma inferior).

Para determinar cómo la IL-2 previene también la apoptosis inducida por Gal-1, se estimularon linfocitos por 18 hs en presencia y en ausencia de Gal-1 e IL-2. Las células se procesaron a distintos períodos de tiempo y se marcaron con anexina-V. Como se observa en la Figura 7, la IL-2 fue capaz de prevenir la apoptosis inducida por Gal-1.

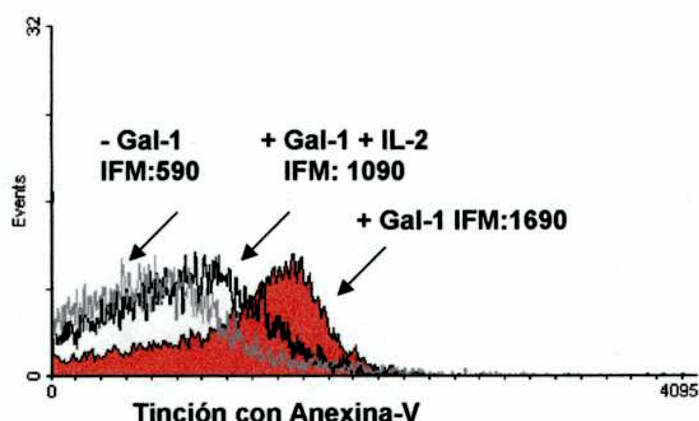


Figura 7: IL-2 previene la apoptosis inducida por Gal-1. Se incubaron linfocitos de dadores normales por 18 hs con Ac. anti-CD3 en ausencia y en presencia de Gal-1 o Gal-1 más IL-2 y se analizó el porcentaje de apoptosis por tinción con anexina-V. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes utilizando distintos dadores normales, (IFM: Intensidad de Fluorescencia Media). * $P_{Gal + IL-2}$ (a 24 h) < 0.001 vs Gal-1.

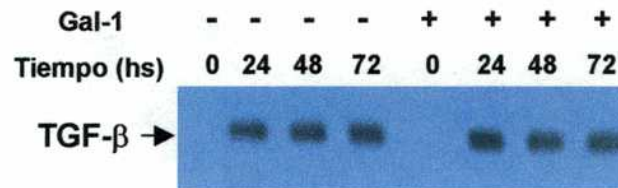
Inhibición de la respuesta alógena a través de mecanismos independientes de TGF- β

Siendo TGF- β una citoquina inmunosupresora relevante en la homeostasis de la respuesta alógena T (115,116), se analizó si los efectos supresores de Gal-1 involucraban un aumento en la expresión y bioactividad de TGF- β durante una respuesta aloinmune.

El análisis por Western Blot de la expresión de TGF- β mostró el pico de expresión a las 24 hs (o 48 hs en algunos experimentos), manteniéndose durante

los 5 días del CML. Esta expresión fue similar en presencia o en ausencia de Gal-1 (Figura 8A). La exposición de diluciones de los sobrenadantes acidificados obtenidos luego del tratamiento de los cultivos alogénicos con Gal-1 a la línea Mv1Lu (sensible a TGF- β) (82), no mostró un efecto inhibitorio aditivo al compararse con los sobrenadantes obtenidos de una respuesta alogénica control (Tabla I). Resultados similares se obtuvieron cuando los sobrenadantes no acidificados fueron testeados solamente para TGF- β bioactivo en la línea celular Mv1Lu. Además y confirmando estos resultados, el agregado de anti-TGF- β neutralizante específico al inicio del CML, no fue capaz de revertir la inhibición de la respuesta alogénica T inducida por Gal-1 (Figura 8B). Como controles se utilizaron células incubadas solamente con medio o expuestas al Ac. anti-TGF- β en ausencia de Gal-1. En esta última condición, el Ac. neutralizante aumentó levemente la incorporación de timidina comparado con células cultivadas solamente en medio (Figura 8B), indicando su habilidad para neutralizar el TGF- β endógeno generado tempranamente durante el curso de una respuesta alogénica normal (115,116). Los presentes resultados sugieren que Gal-1, al menos en el modelo alogénico, no aumenta los niveles totales de TGF- β , ya sea el latente o bioactivo, por lo tanto el efecto regulatorio negativo de Gal-1 no recae sobre mecanismos dependientes de TGF- β .

A



B

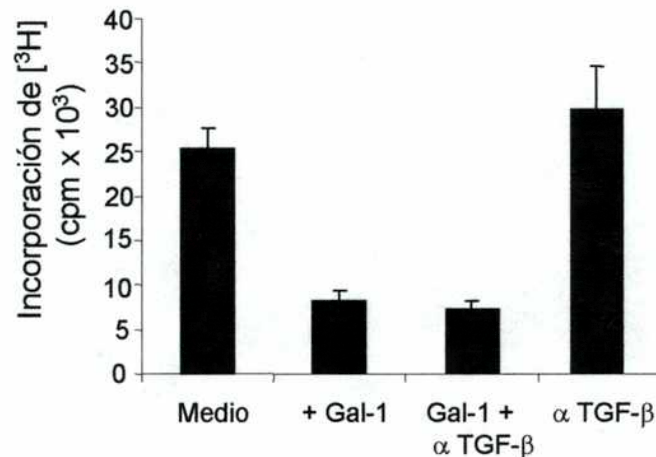


Figura 8: Gal-1 suprime la respuesta alérgica a través de mecanismos independientes de TGF-β. Células respondedoras (1×10^5 células/ml) y estimuladoras pre tratadas con mitomicina (1×10^5 células/ml) se cocultivaron en ausencia/presencia Gal-1 (40 μ g/ml). **(A)** Las células MNT de los CML se recolectaron a los períodos de tiempo indicados. Las muestras se lisaron y se realizó Western blot para la detección TGF-β. **(B)** Para los experimentos de neutralización de agregó anti-TGF-β al inicio del CML para bloquear la producción endógena de TGF-β. Los resultados se expresan como la media de los triplicados en cpm \pm SEM de 3 experimentos independientes utilizando distintos dadores sanos.

Expresión de Galectina-1 durante el curso de una respuesta alérgica normal

Las células T activadas presentes en un entorno tisular con abundante Gal-1, se vuelven sensibles a su efecto inhibitorio actuando como un mecanismo regulatorio negativo con el objeto de “apagar” las funciones efectoras T (99,100,117). Es por ello que se examinó la expresión de Gal-1 durante el curso de una respuesta alérgica normal (Figura 9). La expresión del monómero de Gal-

1 se detectó a las 24 hs de cultivo, alcanzando el máximo nivel después de las 48-72 hs de aloestimulación, donde también se detectó la presencia del dímero (29 KD). Dado que estas subunidades se asocian a través de uniones tipo puente de hidrógeno. cuando las concentraciones de Gal-1 alcanzan valores significativos, la banda correspondiente a el dímero aparece a pesar de utilizar condiciones reductoras (79,85,88). La ausencia de la banda correspondiente al tiempo de inicio del cultivo (0 hs) y el aumento sustancial durante la aloestimulación, sugieren que esta proteína podría jugar un papel central durante la fase efectora de la respuesta aloinmune.

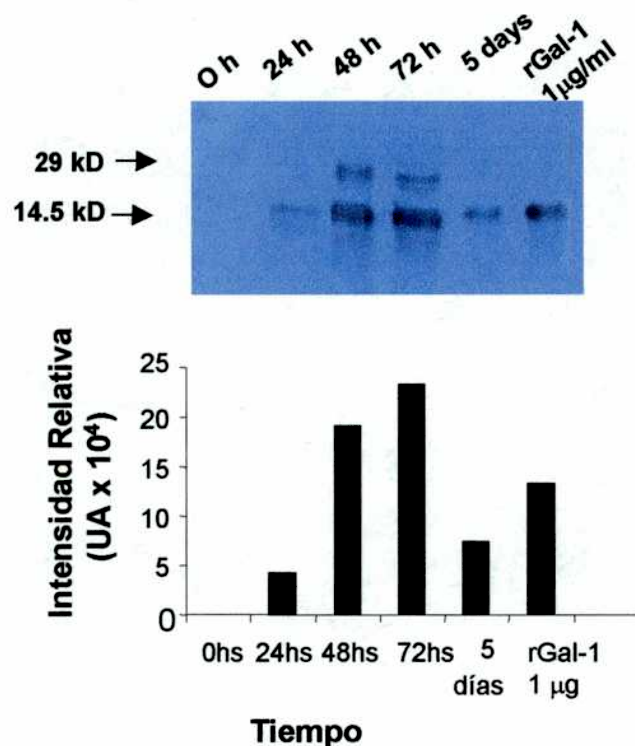


Figura 9: Producción endógena de Gal-1 durante la respuesta alógena normal.

Células respondedoras (1×10^5 células/ml) y estimuladoras pre tratadas con mitomicina (1×10^5 células/ml) se cocultivaron y recolectaron a los períodos de tiempo indicados. Las células fueron cosechadas y lisadas en presencia de inhibidores de proteasas. Las bandas protéicas inmunoreactivas se semi-cuantificaron por densitometría y se expresan como unidades arbitrarias relativas (UA). Gal-1 (1 μ g) recombinante se utilizó como control positivo de la reacción. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes utilizando distintos dadores sanos.

Tratamiento	Condición no acidificada cpm±SEM x 10 ⁴	Condición acidificada cpm±SEM x 10 ⁴
Medio	26.56±0.4	26.35 ± 2.9
Gal-1 4 µg/ml	24.88±0.8	26.49 ± 1.7
Gal-1 40 µg/ml	26.67± 1.0	23.48 ± 7.2

Tabla I: Efecto de Gal-1 en la inducción de TGF-β evidenciado en las células Mv1Lu

Los sobrenadantes acidificados o no recolectados en diferentes períodos de tiempo de aloestimulación en ausencia/presencia de Gal-1, fueron agregados en diferentes diluciones a la línea celular Mv1Lu (4x10⁵ células/ml) sensible a TGF-β. Las placas se incubaron por 20 hs y se adicionó [³H]TdR durante 4 hs. Al mismo tiempo se realizó una curva de crecimiento estandar utilizando TGF-β1 recombinante y los niveles de TGF-β total (acidificado) o bioactivo (no acidificado) se refirieron a la curva estandar y se expresa como cpm ± SEM. Los resultados mostrados corresponden a los sobrenadantes recolectados a las 72 hs de aloestimulación. Resultados similares se obtuvieron para los sobrenadantes recolectados en períodos de tiempo posteriores.

DISCUSIÓN

Los resultados presentados en esta sección fueron realizados a fin de validar el papel inmunoregulatorio de Gal-1 en el curso de una respuesta alogénica T normal. La generación en linfocitos T aloreactivos de una tolerancia parcial inducida por Gal-1 es claramente sugestivo de un mecanismo natural tendiente a permitir la sobrevida de un semi-injerto y a mantener la homeostasis en sitios inmunológicamente privilegiados.

Se demostró que Gal-1 suprime la respuesta aloinmune en forma dependiente de la dosis y de la unión a carbohidratos y se proveen evidencias de los mecanismos moleculares implicados en este proceso.

Investigaciones realizadas en la última década en modelos animales experimentales de autoinmunidad e inflamación crónica (99,101,118), identificaron propiedades inmunosupresoras específicas de esta proteína. Sin embargo, solo en los últimos años se demostró el efecto de Gal-1 actuando a

través de mecanismos apoptóticos y no apoptóticos. Se ha demostrado que Gal-1 recombinante induce apoptosis a través de un reconocimiento selectivo de receptores glicosilados (95-96). Estudios recientes muestran que esta proteína antagoniza la respuesta T actuando a través de la cascada de señalización del TCR, pero estimulando aquellas funciones que requieren solamente una fosforilación parcial de la cadena ζ del TCR, como por ejemplo la apoptosis (97).

Dado que las células aloreactivas T representan la mayor barrera para lograr la aceptación de cualquier injerto (102,103), en el presente se estudió la posibilidad que Gal-1 pueda utilizarse para lograr tolerancia aloespecífica. Se demostró que Gal-1 fue capaz de inducir apoptosis de células T activadas y de aumentar significativamente la susceptibilidad a la muerte celular durante una respuesta alógena normal, mediante modulación de los niveles proteicos de Bcl-2 y por el grado del contenido de ADN subdiploide. Sin embargo, la fuerte inhibición de la incorporación de timidina inducida por Gal-1 es suficientemente alta como para predecir que otros mecanismos no apoptóticos pueden contribuir al efecto inmunosupresor evidenciado. A este respecto, podría considerarse a la inhibición de la señalización del receptor antigénico y a la modulación de la producción de citoquinas como mecanismos alternativos.

Investigaciones realizadas en los últimos años sugieren que la inducción de apoptosis de leucocitos podría ser crucial para establecer nuevos protocolos de tolerancia alógena (104-108). En este sentido, Bittencourt *et al* (119) reportaron que inyecciones intravenosas de leucocitos apoptóticos estimulaban el éxito del trasplante de médula ósea cruzando las barreras de histocompatibilidad y Li *et al* (105) mostraron que la restauración de la actividad apoptótica dentro de la

población periférica de células T es crítica para la supervivencia y tolerancia del hígado transplantado.

Las interacciones entre Fas-Fas ligando median varios de los efectos inmunosupresores y juegan un papel importante en la modulación de las respuestas aloinmunes (105-108). Estudios recientes demostraron que la muerte de células T mediadas por Fas ligando y TNF- α no son esenciales para la aceptación del aloinjerto sugiriendo la presencia de caminos apoptóticos alternativos (109).

Además de los efectos proapoptóticos, Gal-1 modula selectivamente la producción de citoquinas (87,95,120). En la presente sección se demostró que Gal-1 induce en linfocitos aloreactivos una disminución de la producción intracelular de IFN γ . Debido a que recientemente se propuso que TGF- β jugaría un rol en la hiporespuesta de células T (115,116), se exploró si el potente efecto supresor de Gal-1 podría depender de mecanismos mediados por esta citoquina. Utilizando ensayos funcionales y de inmunohistoquímica, se demostró que Gal-1 no aumenta los niveles del TGF- β latente o bioactivo. Mas aún, la neutralización del TGF- β endógeno no previene la supresión inducida por Gal-1, sugiriendo que, al menos en el modelo alógeno, el efecto de Gal-1 involucra a TGF- β .

Uno de las principales observaciones de este trabajo fue la capacidad de la IL-2 exógena de revertir la inhibición de la alorespuesta inducida por Gal-1, cuando es agregada a 24 hs luego de iniciado el CML. Esto sugiere que la capacidad de Gal-1 para inducir apoptosis e inmunosupresión podría estar regulada no solamente por ligandos sacarídicos específicos, sino también por señales mediadas por la IL-2 sobre las células T. Concordantemente, se demostró que la IL-2 es capaz de rescatar a las células antígeno-específico de la apoptosis

inducida por radiaciones, glucocorticoides o por la deprivación de factores de crecimiento, induciendo la expresión selectiva de los genes anti-apoptóticos *bcl-2* o *bcl-xL* (113,114).

Varios estímulos apoptóticos disparan señales de muerte mediante el reclutamiento de una serie de proteasas que clivan el ácido aspártico (caspasas) (121). En la apoptosis inducida por Gal-1 el tratamiento de linfocitos aloreactivos con un inhibidor de caspasas de amplio rango (ZVAD-fmk), fue capaz de prevenir la inhibición del crecimiento inducida por Gal-1, sugiriendo que esta proteína transmite señales de inhibición/ muerte a través de la activación de caspasas.

Finalmente se investigó la regulación de la expresión de Gal-1 durante el curso de una respuesta alógena normal. Se observó que el pico de la expresión endógena de Gal-1 se produce a los 2-3 días de la aloestimulación, sugiriendo un rol para esta proteína durante la fase efectora de la alorespuesta.

Es conocida la participación de Gal-1 en el establecimiento de tejidos inmunológicamente privilegiados que tienen la habilidad de soportar aloinjertos, como testículo, ojo y placenta, (122). Se ha propuesto que los sitios inmunológicamente activos emplean mecanismos ampliamente conservados evolutivamente para inducir muerte celular y tolerancia (122). La habilidad de Gal-1 de disminuir la respuesta T efectora y su alta expresión en sitios inmunológicamente privilegiados, sugieren que esta proteína es relevante para la inducción de tolerancia y podría utilizarse potencialmente para prevenir el rechazo materno-fetal. Sin embargo es necesario desarrollar nuevas estrategias experimentales para evaluar estas interesantes aplicaciones clínicas.

TERCERA PARTE:**Identificación de RANTES como un nuevo inmunomodulador de la respuesta alogénica materna**

Las quimioquinas constituyen una familia de citoquinas quimiotractantes que están involucradas en la migración leucocitaria, la angiogénesis y en la activación celular. Se las agrupa en dos categorías: 1) las quimioquinas constitutivas que participan en funciones de mantenimiento y tráfico celular y 2) las quimioquinas inflamatorias inducidas luego de la activación celular T (123,124). El cambio de receptores constitutivos a receptores para quimioquinas inflamatorias seguiría la activación de las células T y resultaría en una polarización capaz de determinar cambios en las propiedades migratorias de estas células (125-127). Las funciones distintivas de las respuestas inmunes celulares de tipo Th1 y Th2 se correlaciona no solamente con el patrón de secreción de citoquinas sino también con una expresión diferencial de distintos receptores de quimioquinas. Las células Th1 preferencialmente expresan CCR5 y CCR1, ambos receptores para RANTES (del inglés: "regulated on activated normal T-cell expressed and secreted") que se expresa en los linfocitos T CD45R0⁺ de memoria y efectoros. Por otra parte, RANTES al unirse a los receptores CCR1, CCR3 y CCR5 inhibe la migración y quimiotaxis de las células CD45R0⁺ (128,129).

Como se mencionó previamente, se ha propuesto que la sobrevida fetal se asocia con la polarización de la respuesta inmune de un tipo Th1 a uno Th2 (6,10,31). Las citoquinas tipo Th2 como la IL-4 e IL-10 no solamente son capaces de prevenir la inmunopatología, sino que también tienen un efecto beneficioso

sobre el embarazo (14,72). También, se sugirió que ciertas citoquinas y quimioquinas tendrían un rol crítico en la patogenia de los ARE (14,72).

Continuando con uno de los objetivos del presente trabajo, investigamos si las quimioquinas podrían actuar como FB del CML y exploramos el papel de RANTES como un factor inmunosupresor de la respuesta alógena materna que permita la sobrevida fetal.

Pacientes incluidas en el presente estudio

Pacientes con ARE: se incluyeron aquellas pacientes que sufrieron 2 o más abortos consecutivos menores a las 16 semanas de gestación y cumplieron los requisitos detallados al inicio del Capítulo 1.

Grupo control: mujeres normales en edad fértil, sin antecedentes de embarazos previos.

Grupo de mujeres fértiles control: mujeres fértiles con 2 o más embarazos a término y sin pérdida de ningún embarazo en su historia clínica.

Niveles de quimioquinas en suero de mujeres con ARE y fértiles

En búsqueda de un marcador para embarazos exitosos, se investigaron los niveles de quimioquinas (RANTES, MCP-1 y MIP-1 α) en el suero de mujeres fértiles y con ARE por ELISA. Como se describe en la Figura 10A, se detectó una disminución significativa en los niveles de RANTES en el suero de pacientes con ARE comparado con los niveles presentes en los sueros de las mujeres fértiles (627 pg/ml *vs* 1126 pg/ml, $p < 0.05$, test de Student). Más aún, los niveles de RANTES en sueros de mujeres sin previos embarazos o abortos, también fue significativamente menor comparada con el de mujeres fértiles (691 pg/ml *vs* 1126 pg/ml). Estos resultados sugieren que un embarazo exitoso es acompañado

por un aumento en la producción sérica de RANTES. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de MCP-1 y MIP-1 α al compararse los 3 grupos estudiados (Figuras 10B y 10C).

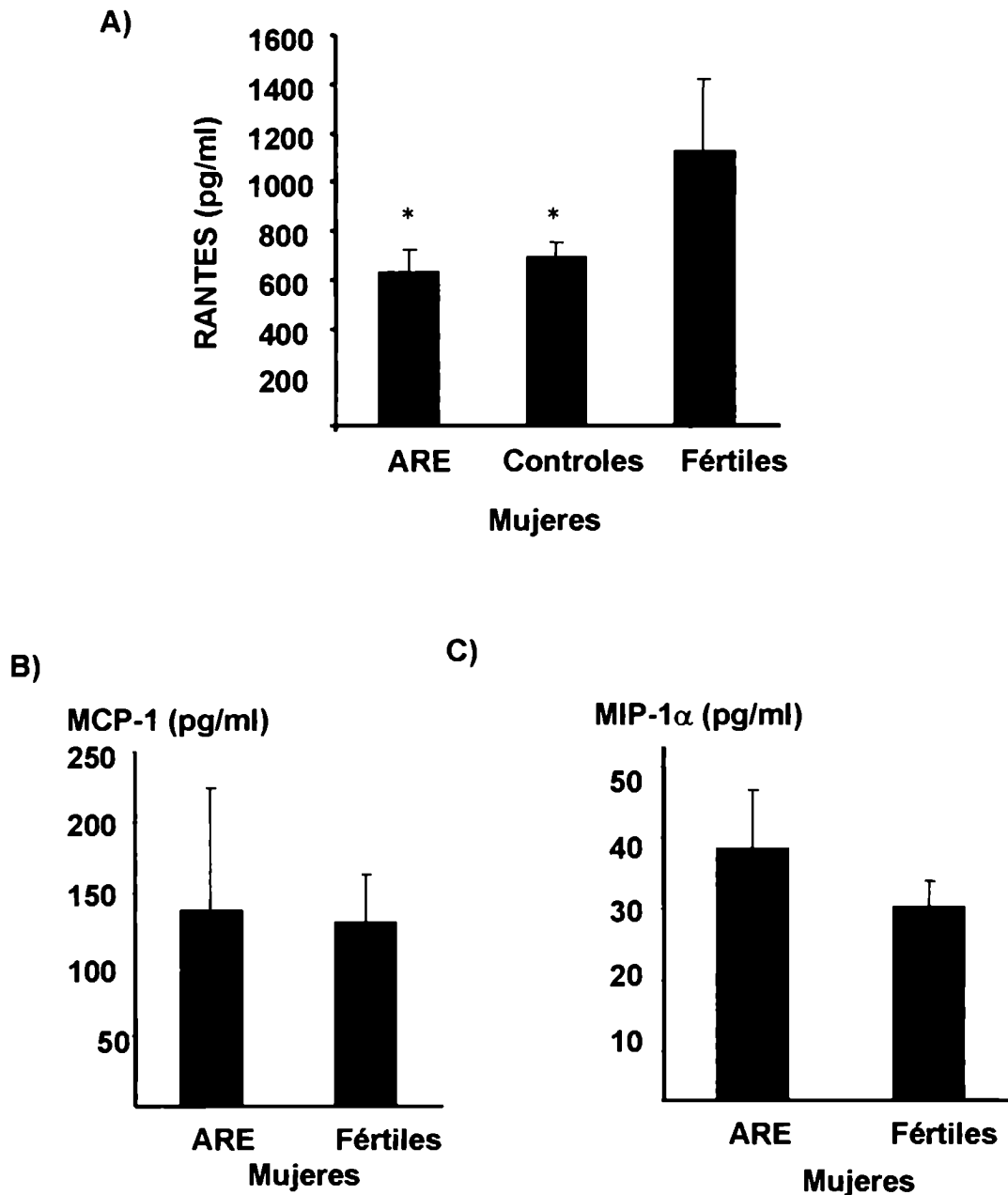


Figura 10: Modulation de las β -quimioquinas presentes en suero de pacientes con ARE, mujeres fértiles y sin embarazos previos. Se utilizaron sueros de pacientes con ARE, mujeres fértiles y mujeres control para la evaluación de las concentraciones de: **(A)** RANTES, **(B)** MCP-1 y **(C)** MIP-1 α utilizando la técnica de ELISA. Los resultados se expresaron como la media (pg/ml) \pm DS de un panel que incluyó 30 pacientes con ARE, 10 mujeres control y 15 mujeres fértiles. Las pacientes con ARE y el grupo control mostró una disminución significativa de los niveles de RANTES comparado con los niveles de mujeres fértiles (* p <0.05, test de Student).

Supresión de la respuesta alogénica inducida por RANTES

Un embarazo exitoso induce el desarrollo de FB del CML con niveles séricos que aumentan con los sucesivos embarazos (41-43). La presencia de bajos niveles de RANTES en el suero de mujeres con ARE comparado con los niveles de mujeres fértiles, nos impulsó a investigar si esta quimioquina puede actuar como un FB del CML. Se encontró una correlación entre los niveles de actividad bloqueante y los niveles de RANTES en el suero de mujeres con ARE y fértiles ($p < 0.05$). Para investigar el papel de RANTES durante el curso de una respuesta *alogénica normal*, células MNT de individuos normales se cultivaron durante 5 días en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de RANTES recombinante (rRANTES). Como se observa en la Figura 11A, concentraciones de rRANTES de 30 y 60 pg/ml inhibieron significativamente la respuesta materna proliferativa de células T (69% y 93% de inhibición respectivamente * $p < 0.05$, test de Student). Reportes previos por Taub et al (130) mostraron que RANTES era capaz de estimular la proliferación en sistemas policlonales utilizando Ac. anti-CD3 o PMA. Así, se reportó que las concentraciones óptimas para RANTES era de 10 a 100 ng/ml, por ello se realizó un CML control utilizando 10 ng/ml de rRANTES. En la Figura 11A no se evidencia una supresión significativa del CML en presencia de 10 ng/ml, mientras que sí ocurre cuando se adiciona 1 ng/ml, sugiriendo que en el modelo alogénico, concentraciones menores son supresoras de la proliferación T.

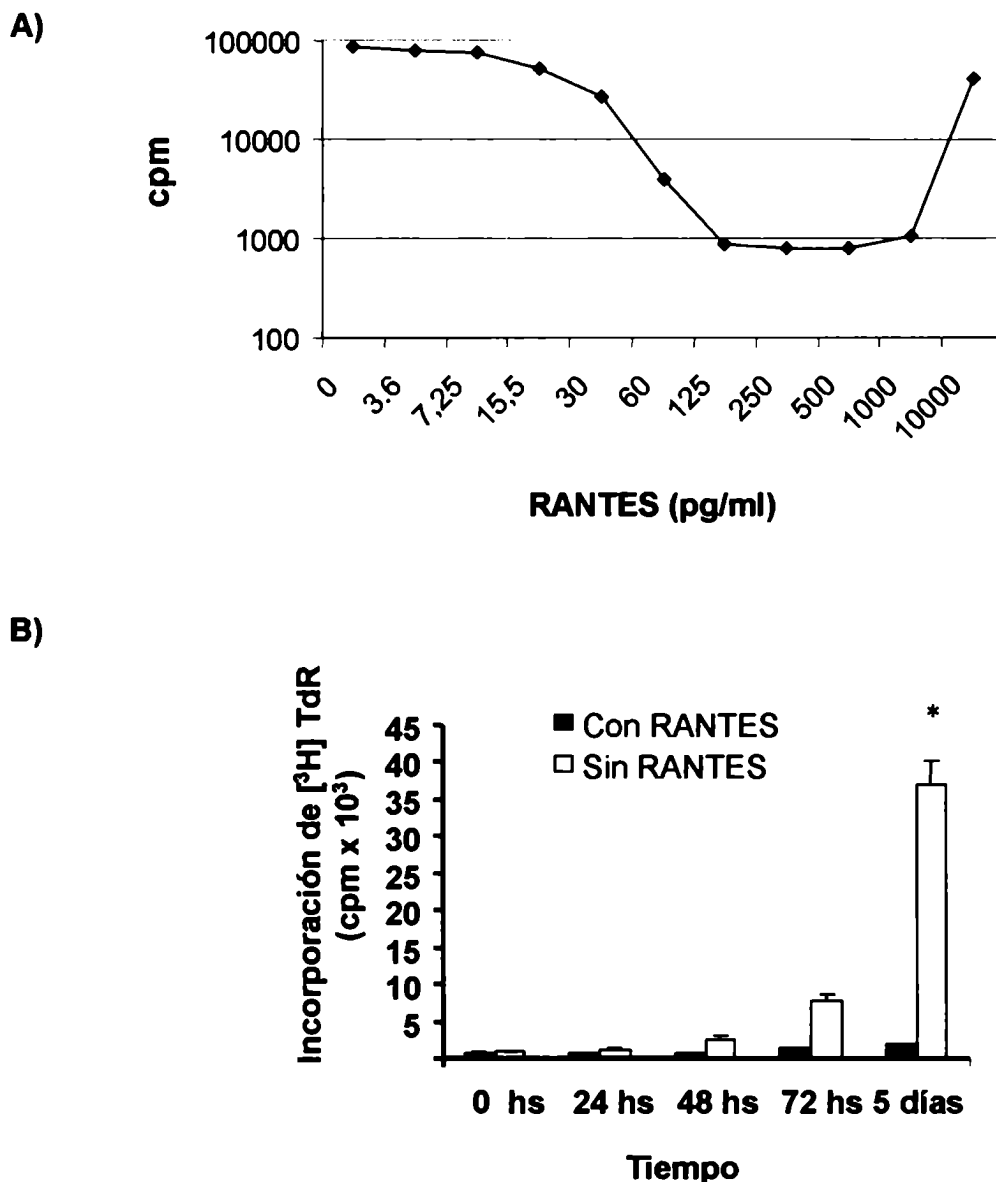


Figura 11: RANTES inhibe la respuesta alogénica materna en forma dosis-dependiente. Células MNT respondedoras de individuos sanos (1×10^5 células/ml) y células estimuladoras tratadas con mitomicina (1×10^5 células/ml) se cocultivaron en una placa de 96 pocillos en presencia de rRANTES. Luego de 5 días, se adicionó $[^3\text{H}]\text{TdR}$ por 18 hs y su incorporación se determinó utilizando un contador de centelleo líquido β . Los resultados representan las $\text{cpm} \pm \text{SEM}$ de las determinaciones realizadas por triplicado y son representativos de 3 experimentos realizados independientemente utilizando diferentes combinaciones alogénicas. **(A)** Inhibición por rRANTES en un rango de 0 a 10 ng/ml. Alcanzando 69% y 93% de inhibición con 30 y 60 pg/ml respectivamente ($*p < 0.05$ test de Student). **(B)** Inhibición por rRANTES (60 pg/ml) a lo largo de la respuesta alogénica normal.

A fin de excluir un pico de proliferación temprana inducido por bajas concentraciones de RANTES, se realizó una cinética del CML en presencia y en ausencia de RANTES. Como puede observarse en la Figura 11B, la adición de rRANTES induce cambios en la cinética del CML, observándose la supresión de la respuesta proliferativa del quinto día.

A fin de estudiar la especificidad de la inhibición de la respuesta alogénica inducida por RANTES, se agregó a los cultivos celulares Ac. anti-RANTES neutralizante. Este Ac. suprimió la inhibición del CML inducida por esta quimioquina ($*p < 0.05$, test de Student) (Figura 12). Más aún, cuando los linfocitos aloreactivos fueron pre incubados con un suero conteniendo FB junto con el Ac. anti-RANTES neutralizante, se evidenció una reversión parcial de la inhibición del CML, sugiriendo que RANTES podría ser un importante FB en el contexto de la respuesta alogénica. Por otro lado, el Ac. anti-RANTES no fue capaz de aumentar la incorporación de timidina tritiada cuando las células fueron pre incubadas con un suero sin FB. Este hallazgo apoya la observación de que la disminución de FB del CML en pacientes con ARE podría asociarse con los reducidos niveles de RANTES. El conjunto de estos resultados indican un potencial papel de RANTES como inhibidor de la respuesta alogénica, sugiriendo que esta quimioquina sería un FB del CML.

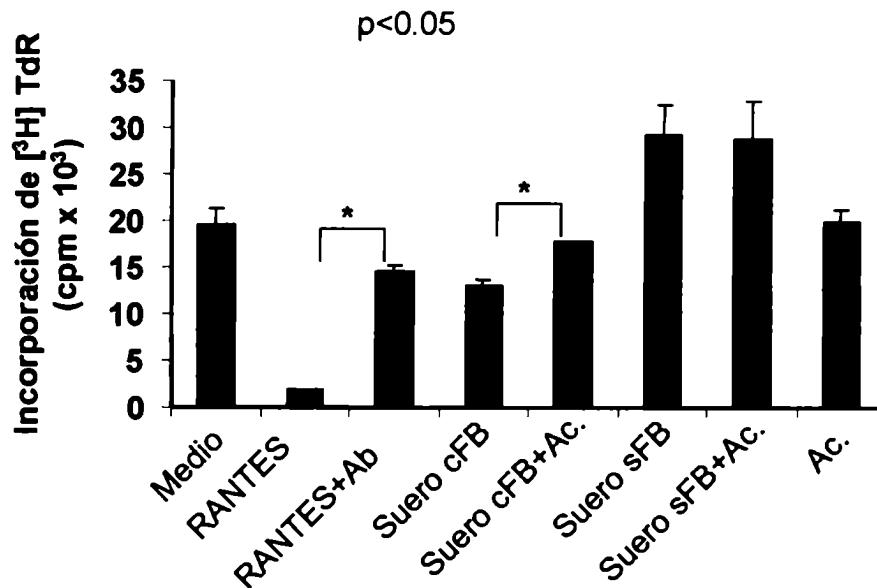


Figura 12: El Ac. neutralizante anti-RANTES previene la supresión de la respuesta alógena causada por RANTES. Células respondedoras de individuos sanos (1×10^5 células/ml) y estimuladoras tratadas con mitomicina (1×10^5 células/ml) se cocultivaron en presencia/ausencia de RANTES y/o su Ac. específico. Luego de 5 días de cultivo se adicionó [^3H]TdR durante 18 hs y determinó su incorporación utilizando un contador de centelleo líquido β . Los resultados se expresan como la media \pm DS de 3 experimentos independientes. El tratamiento con anti-RANTES previene la inhibición del CML inducida por RANTES y por el el suero con FB del CML (* $p < 0.05$ test de Student, para ambos casos).

Mecanismos involucrados en la modulación de la respuesta alógena de células T inducida por RANTES

Con el objeto de profundizar en los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la inhibición de la respuesta alógena inducida por RANTES, se cultivaron linfocitos aloreactivos en presencia y en ausencia RANTES y se procesaron para la detección de apoptosis. A distintos tiempos de aloestimulación, 0, 24, 48 y 72 hs, se realizó la tinción con IP, la cual reveló un incremento en el contenido subdiploide de ADN de los linfocitos aloreactivos (Figura 13A, cinética). En la Figura 13B se muestran los histogramas correspondientes a los diferentes períodos de tiempo del CML. Los linfocitos aloreactivos cultivados en presencia de RANTES y del Ac. anti-RANTES durante

0, 24, 48 y 72 hs disminuyeron los niveles subdiploides de ADN, previniendo de esta forma la apoptosis inducida por RANTES. Es más, los porcentajes del contenido de ADN en presencia del Ac. anti-RANTES fueron significativamente menores que los porcentajes obtenidos en medio, sugiriendo que el Ac. es capaz además de neutralizar el RANTES endógeno (Figura 13A).

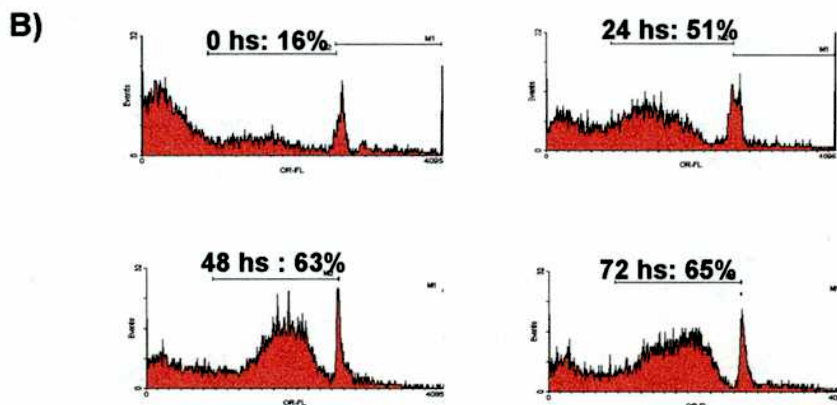
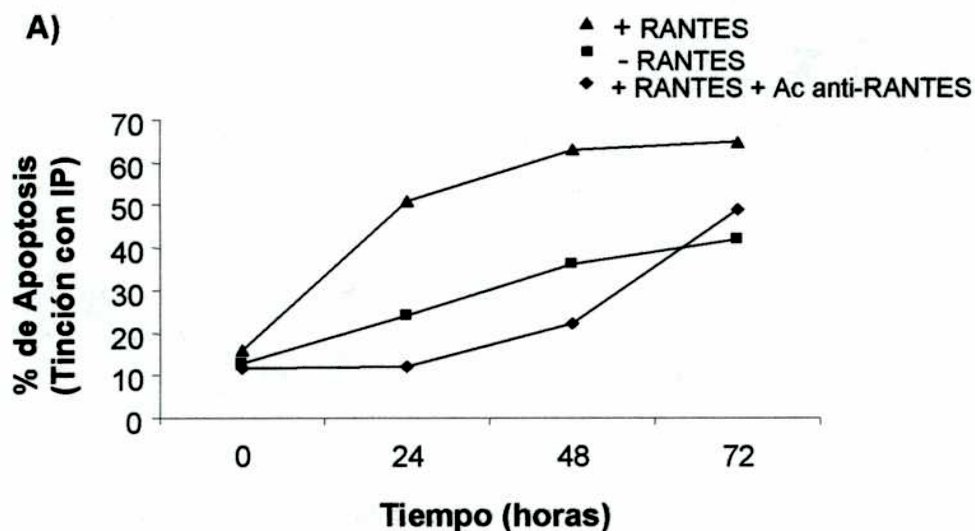


Figura 13: RANTES induce apoptosis de células CD45RO⁺ luego de la estimulación antigénica. Células respondedoras y células estimuladoras se cocultivaron en presencia de RANTES (60 pg/ml) y a los periodos indicados se analizó el porcentaje de apoptosis. **(A)** Contenido de ADN subdiploide medido por tinción con IP en el curso de una respuesta alérgica normal en ausencia/presencia de RANTES y con Ac. anti-RANTES. **(B)** Cinética del contenido subdiploide a ADN según la incorporación de IP durante la respuesta alérgica.

En búsqueda de un potencial mecanismo autoregulatorio, se investigó la susceptibilidad de células aloreactivas CD45R0⁺ a la apoptosis inducida por RANTES. Se realizó una tinción triple con anexina-V, con el Ac. anti-CD45R0 y con IP. Como se puede observar en la Figura 14 (panel superior), los linfocitos aloreactivos CD45R0⁺ luego de 5 días de cultivo mostraron un cambio de un 51% en las células teñidas con IP y anexina-V (93% con RANTES – 42% sin RANTES = 51%).

Nuestros resultados indican que RANTES sería entonces un FB del CML, que induciría apoptosis durante la respuesta alógena normal. Se exploró también como sueros con o sin FB del CML pueden inducir apoptosis y se examinó si la actividad bloqueante puede atribuirse al efecto apoptótico de RANTES. Como se muestra claramente en la Figura 14 (panel central), los linfocitos aloreactivos cultivados en presencia de un suero conteniendo FB mostraron un 55% de apoptosis temprana y tardía *vs* solo 31.4% en linfocitos aloreactivos cultivados en presencia de un suero sin actividad bloqueante (Figura 14, panel inferior). El conjunto de estos resultados sugiere que RANTES inhibe la respuesta alógena en forma dependiente de la dosis y a través de la inducción de la apoptosis de células T. Finalmente, los sueros conteniendo FB presentan mayores niveles de RANTES e inducen apoptosis de linfocitos aloreactivos dependiente de RANTES.

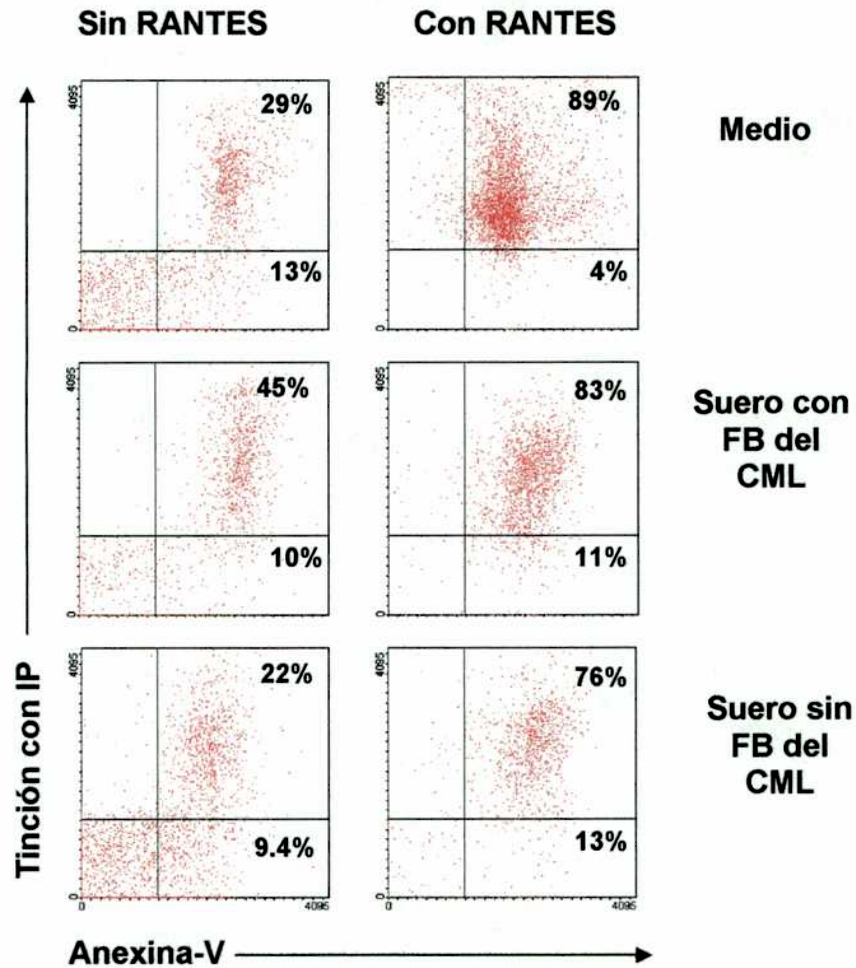


Figure 14: Apoptosis inducida por RANTES durante la respuesta alógena materna. Células aloreactivas fueron preincubadas en ausencia (panel izquierdo) o presencia (panel derecho) de RANTES con medio (panel superior), suero con FB (panel central) y suero sin actividad bloqueante (panel inferior). El porcentaje de células apoptóticas se obtuvo dentro de la ventana de trabajo correspondiente a células CD45R0⁺ electrónicamente seleccionada. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes utilizando diferentes individuos sanos. Los porcentajes corresponden a las células dobles positivas o positivas para anexina-V.

Mecanismos moleculares involucrados en la apoptosis inducida por RANTES en linfocitos T aloreactivos

Del mismo modo que se estudio la inhibición de la respuesta alógena normal inducida por Gal-1, se estudió la supresión del CML inducida por RANTES a través de la modulación de Bcl-2 (110). Como se describió previamente en presencia de medio, la expresión de Bcl-2 alcanza el máximo nivel a las 24 hs

de la aloestimulación y permanece estable hasta las 72 hs. En cambio, cuando RANTES se agrega al inicio del cultivo, la expresión de Bcl-2 decrece dentro de las primeras 24 hs de aloestimulación (Figura 15A). Los perfiles inmunoreactivos se muestran en la Figura 15B y son consistentes con la cinética de apoptosis observada en las Figuras 13A y 13B. Estos resultados sugieren que RANTES genera señales intracelulares inhibitorias a través de un camino dependiente de Bcl-2.

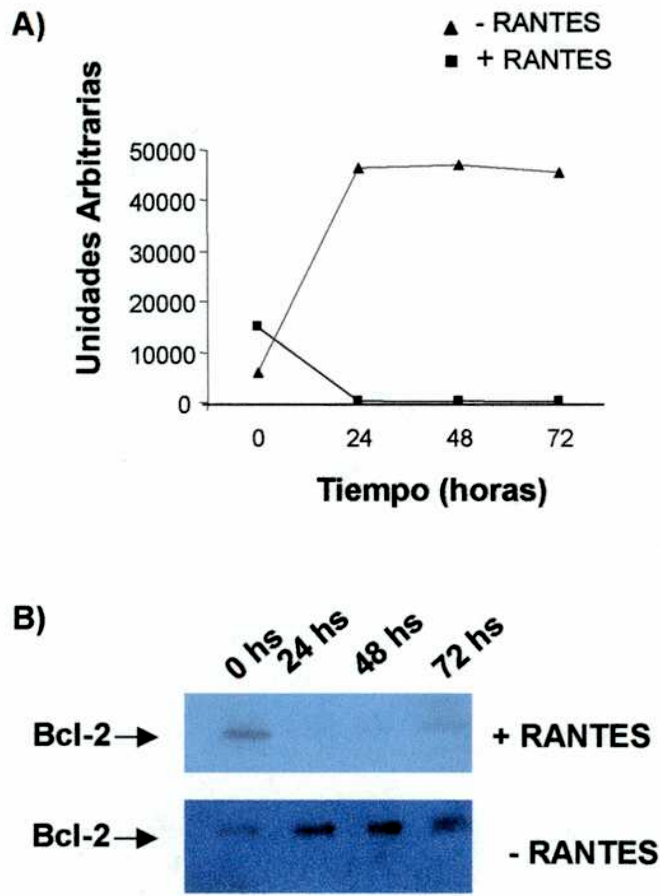


Figure 15: RANTES modula la expresión de Bcl-2 en el curso de una respuesta aloimmune. Células respondedoras y estimuladoras se cocultivaron en ausencia o en presencia de RANTES (60 pg μ g/ml) durante los períodos de tiempo indicados. Las células fueron cosechadas y lisadas en presencia de inhibidores de proteasas. Las bandas proteicas inmunoreactivas se semi-cuantificaron por densitometría y se expresan como unidades arbitrarias relativas (UA). **(A)** Análisis de la cinética de expresión de Bcl-2 en el curso de una respuesta alógena normal en ausencia o presencia de RANTES. **(B)** Ensayo de Western Blot representativo de los cultivos alógenicos en presencia (panel superior) o ausencia (panel inferior) de RANTES. Los resultados fueron representativos de 3 experimentos independientes utilizando diferentes dadores sanos.

Además, se examinó como ZVAD-fmk es capaz de revertir el bloqueo de la proliferación disparado por RANTES. Como se muestra en Figura 16A, la adición de ZVAD-fmk al inicio del cultivo induce solamente una leve reversión del efecto supresor de RANTES ($*p < 0.05$, test de Student), sugiriendo la posibilidad de que estén involucrados mecanismos independientes de caspasas en la inhibición de la respuesta alogénica inducida por RANTES. Asimismo, la adición de ZVAD-fmk no afecta la proliferación celular en ausencia de RANTES.

Se estudió también el efecto de RANTES sobre la modulación de la expresión de Fas (CD95) de superficie a diferentes períodos de tiempo durante el CML por citometría de flujo. Las células no viables y las células granulares pequeñas (células estimuladoras del CML) se excluyeron del análisis. Como se describe en la Figura 16B, la expresión de superficie de Fas no mostró diferencias significativas entre los linfocitos aloreactivos cultivados en presencia o en ausencia de RANTES, alcanzando ambos 93% de expresión de CD95 luego de 72 hs de cultivo. Este resultado sugiere que la expresión de CD95 no aumenta durante la apoptosis inducida por RANTES.

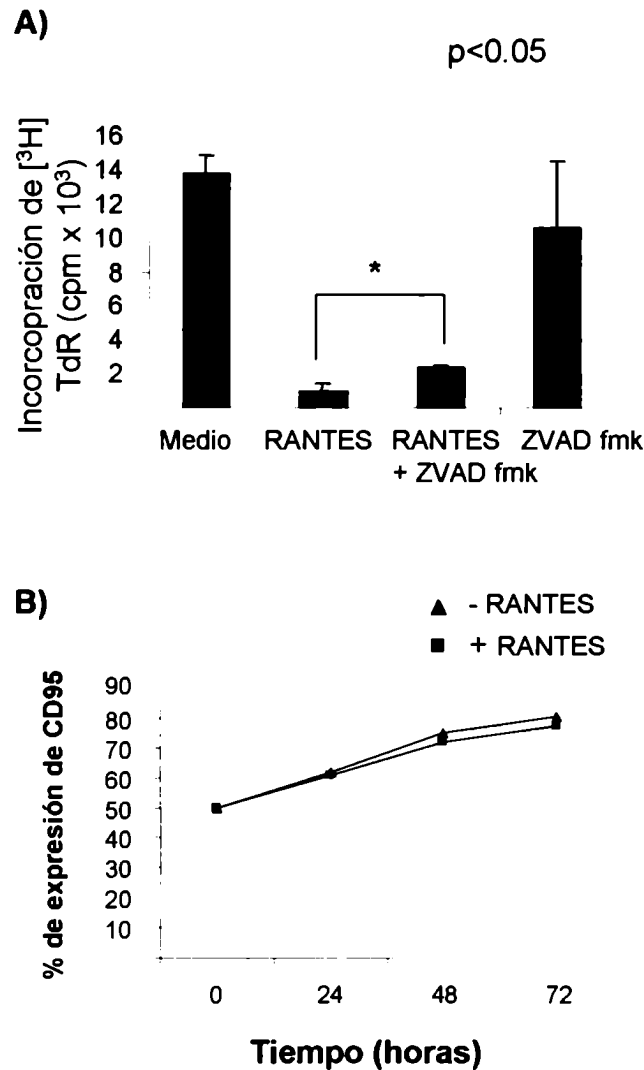


Figura 16: (A) Participación de caspasas en la supresión inducida por RANTES. Células respondedoras y estimuladoras se cocultivaron con RANTES en presencia o ausencia de 50 μ M ZVAD-fmk. Luego de 5 días de cultivo se adicionó [³H]TdR durante 18 hs y determinó su incorporación utilizando un contador de centelleo líquido β . Los resultados se expresan como la media \pm DS de 3 experimentos independientes. (* $p < 0.05$ test de Student, para ambos casos). **B) Modulación de la expresión de Fas (CD95) luego del tratamiento con RANTES.** Leucocitos aloreactivos a las 24, 48 y 72hs de cultivo se marcaron con anti-CD95 PE en superficie. Se muestran los porcentajes de células positivas a los distintos tiempos estudiados, en presencia y en ausencia de RANTES (60 pg/ml).

DISCUSIÓN

En esta sección se validó el papel inmunoregulatorio de RANTES en el curso de una respuesta alógena T y su potencial utilización como marcador de un embarazo exitoso. La inducción de tolerancia de linfocitos aloreactivos inducida por RANTES claramente sugiere un mecanismo natural que puede extenderse a la sobrevivencia del semi-injerto fetal. En este sentido, es interesante mencionar recientes aportes en un modelo murino en el cual RANTES participaría en la inducción de tolerancia periférica (61).

Uno de los hallazgos más relevantes de esta investigación es indudablemente la habilidad de RANTES para suprimir la respuesta alógena, evidenciada en el modelo *in vitro* del CML. Previamente se ha demostrado que la aloinmunización en simios aumenta significativamente las concentraciones de factores supresores derivados de linfocitos CD8, los cuales son capaces de inhibir la infección por VIH y VIS (131-133). Consistentemente con estos resultados, las inmunizaciones de simios con antígenos de VIH o VIS aumentan significativamente los niveles de RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β , los cuales están asociados con la protección contra el desafío con VIS (133).

Los disminuidos niveles de RANTES en el suero de mujeres con ARE y en mujeres sin embarazos a término con respecto a mujeres fértiles, nos permite especular que el desafío a aloantígenos debe ser suficiente como para inducir la producción de RANTES.

Dado que RANTES funcionaría como un FB del CML, también se exploraron los mecanismos moleculares implicados en la inmunosupresión mediada por RANTES. Esta β -quimioquina induce apoptosis de una proporción de células T activadas y su susceptibilidad a la muerte celular aumenta significativamente en

el curso de una respuesta alogénica, evidenciándose una modulación de la expresión de la proteína Bcl-2 y en el grado del contenido subdiploide de ADN. El hecho de que el suero conteniendo FB sea capaz de inducir porcentajes de apoptosis mayores comparados con los obtenidos con sueros sin actividad bloqueante, apoyan la idea de que RANTES podría actuar como uno de los FB activos capaz de inducir apoptosis. Asimismo, los bajos porcentajes de apoptosis encontrados en presencia de un suero sin FB con respecto a el porcentaje obtenido en medio solamente, podría explicar, al menos, en parte el efecto “estimulador” del CML observado en pacientes con ARE. Este efecto fue definido como la potenciación de la respuesta alogénica en presencia de sueros de pacientes con ARE y que carecen de FB.

Varios estímulos apoptóticos inducen señales de muerte a través del reclutamiento de caspasas (121,134), mientras que otros son independientes de las mismas (111,112). En este sentido, Mellado et al reportaron un mecanismo dependiente de quimioquina, por el cual células tumorales de melanoma escapan de la respuesta inmune. La producción de RANTES por linfocitos infiltrantes CD8⁺ activan caminos apoptóticos que involucran la liberación al citosol del citocromo c mitocondrial y la activación de las caspasas 9 y 3 (135). Bajo las condiciones experimentales descritas, el tratamiento con el inhibidor de caspasas revierte levemente la inhibición de la proliferación causada por RANTES, sugiriendo que esta β -quimioquina media señales de muerte celular por mecanismos independientes de caspasas. La habilidad de RANTES para disminuir las respuestas T sugieren que esta quimioquina tendría un papel relevante en la inducción de la tolerancia materno-fetal y potencialmente podría

utilizarse para prevenir abortos recurrentes. Sin embargo se requieren más estudios para ensayar las aplicaciones clínicas de los presentes resultados.

Investigar los mecanismos moleculares que permiten la tolerancia y la homeostasis contribuirían a delinear nuevas estrategias terapéuticas para prevenir los abortos recurrentes de causa inmunológica.

Interacción entre Galectina-1 y RANTES

Las galectinas y las quimioquinas tienen varias características en común. Al igual que las quimioquinas, las galectinas exhiben actividad quimiotractora y se unen a proteoglicanos. Finalmente, tanto las galectinas como las quimioquinas se encuentran abundantemente en el citosol y son liberadas cuando las células son estimuladas (124).

Los resultados expuestos en las anteriores secciones, demuestran que Gal-1 y RANTES son capaces de suprimir la respuesta alérgica específicamente ya que este efecto puede revertirse utilizando los correspondientes Acs. neutralizantes (Figuras 17A y 17B). Además, como se demostró previamente, ambas proteínas suprimen la respuesta alérgica induciendo apoptosis de células CD45R0 a través de mecanismos dependientes e independientes de caspasas y de la modulación de Bcl-2.

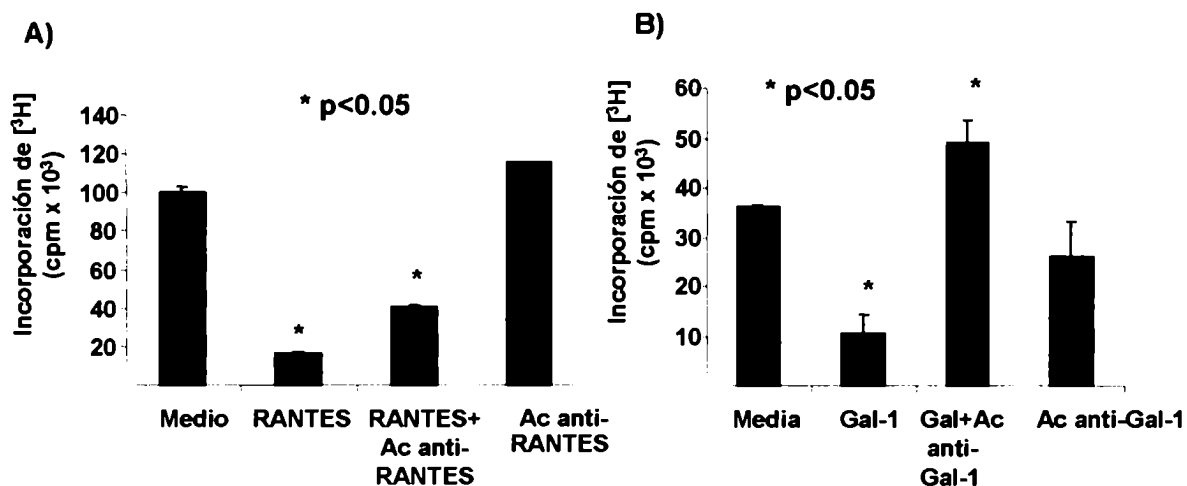


Figura 17. RANTES y Gal-1 inhiben la respuesta alérgica normal y este efecto puede revertirse con Acs. específicos. Células respondedoras y estimuladoras se cocultivaron en ausencia o presencia de (A) RANTES y anti-RANTES específico (B) Gal-1 y anti-Gal-1 específico (1:100). Luego de 5 días de cultivo se adicionó $[^3\text{H}]$ TdR durante 18 hs y determinó su incorporación utilizando un contador de centelleo líquido β . Los resultados se expresan como la media \pm SD de 3 experimentos independientes utilizando diferentes dadores y combinaciones alérgicas.

Estas semejanzas condujeron a estudiar la existencia de interacciones entre Gal-1 y RANTES. Para ello se examinó la expresión de Gal-1 por Western Blot durante el curso de una respuesta alogénica normal en presencia de RANTES exógeno. Como puede verse en la Figura 18A, RANTES fue capaz de inducir un aumento en la expresión de Gal-1 en forma dependiente del tiempo de aloestimulación en comparación con los niveles obtenidos en ausencia de RANTES. En la Figura 18B se muestran las bandas inmunoreactivas de un experimento representativo.

Evidencias recientes (136) demuestran que la expresión de Gal-1 está regulada positivamente por el Factor de activación nuclear NF κ B, por ello se estudió su participación en el aumento de la expresión generada por RANTES. Así, las células aloreactivas se cultivaron en presencia de RANTES y de Sulfasalcina (inhibidor específico de NF κ B) durante una respuesta alogénica normal. Esta droga fue capaz de inhibir casi totalmente la expresión de Gal-1 aún en presencia de RANTES exógeno, sugiriendo que en la inducción de Gal-1 por RANTES, NF κ B tendría un rol activo (Figura 18A y 18C). A las 48 hs de aloestimulación pudo detectarse una mínima expresión de Gal-1 para luego desaparecer totalmente, lo que coincidiría con la máxima expresión observada en presencia de RANTES.

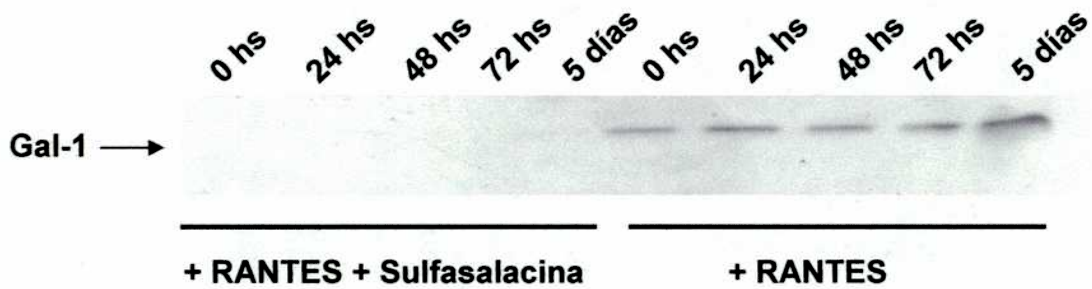
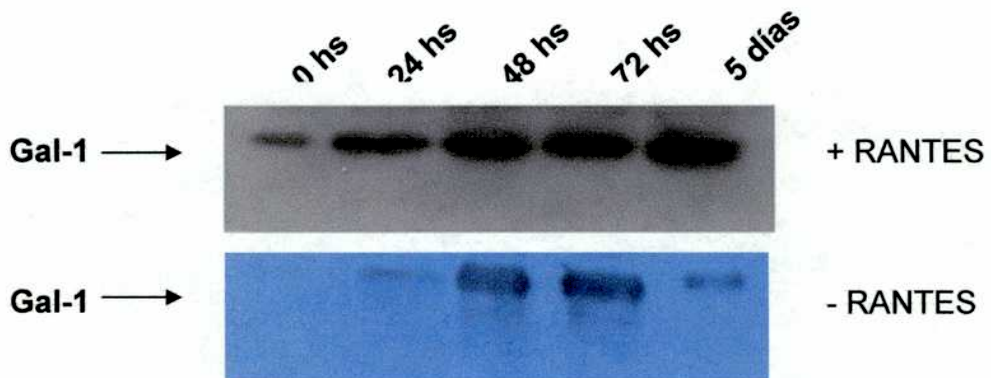
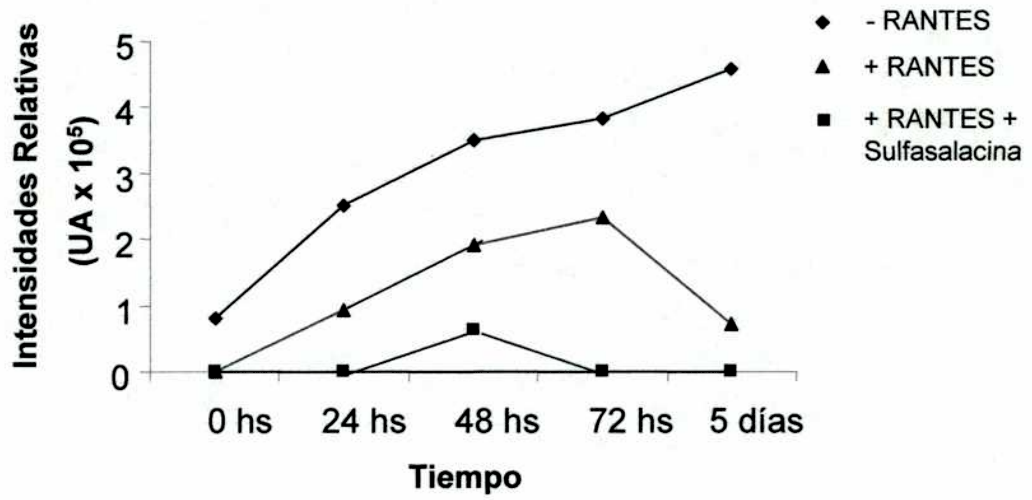


Figura 18: Producción de Gal-1 durante la respuesta alogénica normal en ausencia y en presencia de RANTES y de Sulfasalacina.

Células respondedoras (1×10^5 células/ml) y estimuladoras pre tratadas con mitomicina (1×10^5 células/ml) se cocultivaron y recolectaron a los períodos de tiempo indicados. Las células fueron cosechadas y lisadas en presencia de inhibidores de proteasas. **(A)** Las bandas proteicas inmunoreactivas se semi-cuantificaron por densitometría y se expresan como unidades arbitrarias relativas (UA). **(B)** Bandas inmunoreactivas obtenidas en presencia/ausencia de RANTES (60pg/ml) a lo largo de una respuesta alogénica normal. **(C)** Bandas inmunoreactivas obtenidas en presencia de RANTES (60pg/ml) y adicionando o no Sulfasalacina (0.5M) a lo largo de una respuesta alogénica normal.

Seguidamente se estudió la modulación de RANTES inducida por Gal-1. Se midieron los niveles de expresión de RANTES en la membrana de células CD45R0⁺ aloestimuladas en presencia de Gal-1. Además se cuantificaron los niveles de RANTES por ELISA en los sobrenadantes recolectados a los mismos tiempos de alocultivo. Como Gal-1 induce apoptosis durante la respuesta alogénica, el análisis se realizó en la ventana de trabajo correspondiente a las células CD45R0 que estaban vivas. Como se observa en la Figura 19A la expresión de RANTES en la membrana celular aumentó un 12% en presencia de Gal-1 al compararse con la expresión en ausencia de Gal-1, mientras que la expresión intracitoplasmática no sufrió cambios, luego de 5 días de aloestimulación (Figura 19B). Posteriormente se cuantificaron los niveles de RANTES por ELISA en sobrenadantes obtenidos a las 0, 24 hs, 48 hs, 72 hs y 5 días de una respuesta alogénica normal. Como se describe en la Figura 19C, solamente a las 24 hs de aloestimulación se observa un aumento en la secreción de RANTES aunque el mismo no llega a ser estadísticamente significativo.

El conjunto de estos resultados sugieren que Gal-1 y RANTES no solamente presentan características en común sino que también comparten mecanismos efectores. RANTES fue capaz de aumentar la expresión de Gal-1, así como Gal-1 fue capaz de aumentar la expresión de RANTES en la membrana de

leucocitos activados. Sin embargo para determinar si ambas proteínas tienen efectos sinérgicos o bien representan mecanismos redundantes para mantener la homeostasis de la respuesta inmune, deben desarrollarse experimentos adicionales. Así podrá evidenciarse funcionalmente el efecto de ambas moléculas y las posibles interacciones positivas y/o negativas entre las mismas.

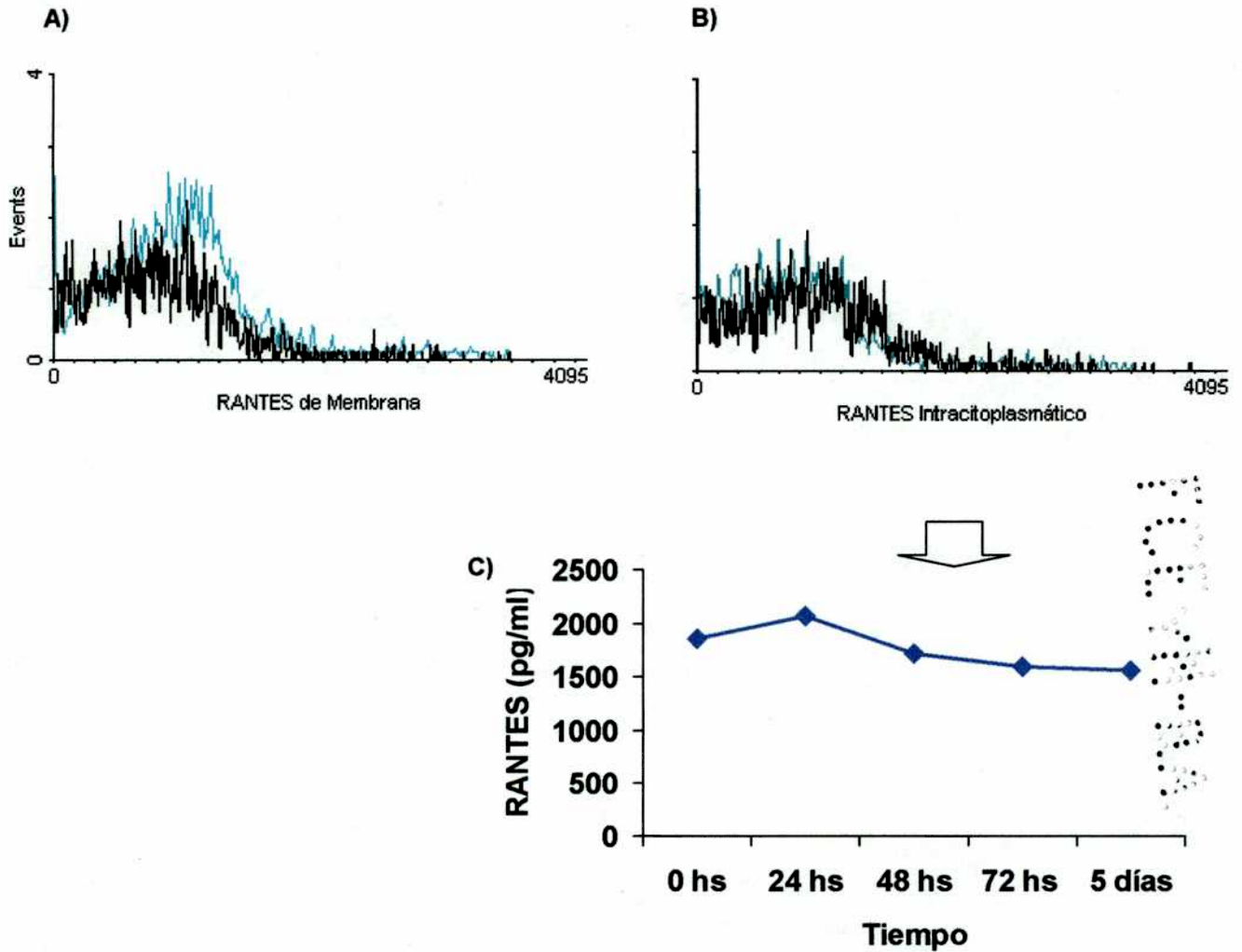


Figura 19. Gal-1 aumenta la expresión de RANTES en la membrana de células CD45R0+, pero no la expresión intracitoplasmática o la secreción durante la respuesta alógena normal. Células respondedoras y estimuladoras de donadores normales se cocultivaron en ausencia o presencia de Gal-1. Al quinto día de cultivo las células se marcaron con (A) anti-RANTES indirectamente, utilizando un 2do. Ac. anti-IgG1 conjugado con FITC y posteriormente con anti-CD45R0 conjugado con PE. En (B) para detectar la expresión intracitoplasmática, las células se fijaron, permeabilizaron y marcaron con el Ac anti-RANTES y posteriormente con el 2do. Ac. anti-IgG1 conjugado con FITC. Finalmente se realizó la marcación de superficie con el Ac. anti-CD45R0 conjugado con PE. En (C) se muestra la cinética de secreción de RANTES en los sobrenadantes obtenidos en los tiempos indicados durante una respuesta alógena normal. Los resultados son representativos de 2 experimentos realizados independientemente.

Capítulo 2

**Identificación de marcadores para el diagnóstico y seguimiento de pacientes
con Abortos Recurrentes Espontáneos**

PRIMERA PARTE:**CD69 como marcador de ARE: expresión intracelular en linfocitos T endometriales y de sangre periférica.**

Los leucocitos presentes en el endometrio humano tienen distintas características a lo largo del ciclo menstrual. Así, los linfocitos CD3⁺ predominan en la fase proliferativa y secretoria temprana del ciclo menstrual, mientras que los linfocitos granulares endometriales (LGE) constituyen la población más abundante en la fase secretoria tardía y durante el primer trimestre del embarazo (137,138). Una característica diferencial tanto de los linfocitos CD3⁺ como de células LGE infiltrantes del endometrio humano, es la expresión del marcador de activación temprano CD69 (59,60,139). Esta glicoproteína se sintetiza y se expresa en la superficie de linfocitos T y B activado, así como en células NK (140). Si bien CD69 es uno de los marcadores de activación que se expresa más tempranamente, los datos reportados en leucocitos endometriales son algunas veces contradictorios. Algunos reportes indican que más del 85% de los linfocitos CD3⁺ co-expresan CD69 (318,139), mientras que otros muestran que las células T endometriales no co-expresan CD69, aunque pueden adquirirla luego de realizar procedimientos de purificación celular *in vitro* (59,60). Por otra parte, si bien varios estudios intentaron encontrar una asociación de la expresión de CD69 en células T con otros marcadores de activación tempranos, como CD25 o CD71 durante el ciclo menstrual, esto no pudo lograrse (60,141). Estas observaciones, condujeron a la hipótesis que la expresión de CD69 en sitios inmunológicamente privilegiados, como el útero, se asociaría con una función inmunoregulatoria aún desconocida.

Mediante inmunohistoquímica fue demostrado un aumento en las células CD69⁺ de deciduas provenientes de abortos recurrentes, respecto a deciduas normales provenientes de abortos provocados durante el primer trimestre de embarazo (8,60). Sin embargo, debido a la respuesta inflamatoria generada, resulta muy difícil caracterizar poblaciones leucocitarias luego de sufrir un aborto recurrente.

En la presente sección se estudió la expresión del marcador CD69 en la superficie y en el citoplasma de linfocitos T endometriales en condiciones pre-implantatorias de pacientes con ARE y en mujeres fértiles.

Pacientes incluidas en el presente estudio

Pacientes con ARE: 12 pacientes que sufrieron 3 o más abortos consecutivos antes de las 16 semanas de gestación. Asimismo, estas pacientes cumplían con los requisitos detallados en el Capítulo 1.

Grupo control: 10 mujeres fértiles con 2 o más embarazos a término sin pérdida de ningún embarazo en su historia clínica.

A todas las mujeres participantes del estudio se les realizó una biopsia de endometrio durante la fase secretoria del ciclo menstrual, entre los días 17 y 26 (media 21.6 días), considerando un ciclo regular normal de 28 días de duración. Para cada paciente se le realizó asimismo, dosaje de estrógenos y progesterona en el momento de obtención de la biopsia, a fin de confirmar la presencia de la fase lútea tardía del endometrio.

Expresión de CD69 en linfocitos T endometriales y de sangre periférica en pacientes con ARE y en mujeres fértiles

Inicialmente se estudió la expresión de CD69 en la superficie de células endometriales CD3⁺ por citometría de flujo. En todas las muestras estudiadas, la expresión de CD69 fue inferior al 5%. En forma similar a los resultados obtenidos en endometrio, los linfocitos T de sangre periférica mujeres con ARE y fértiles no mostraron diferencias significativas en la expresión de CD69 en la superficie celular (5.4%±2.3% *vs* 2.5%±1.5%).

Seguidamente se analizó la expresión intracelular de CD69 en células T endometriales provenientes de pacientes con ARE y de mujeres fértiles. Como se muestra en la Figura 1A, la frecuencia de células T CD69 positivas resultó significativamente mayor en mujeres con ARE en comparación con mujeres fértiles (68.2±12% *vs* 23.7±22%, ***p*<0.001, test de Student). Similarmente, los linfocitos T de sangre periférica de pacientes con ARE mostraron un aumento significativo en la expresión intracelular de CD69 comparado con los porcentajes obtenidos para mujeres fértiles (20±9,5% *vs* 2,1±3,8%, **p*<0.005 test de Student, Figura 1B). En las Figuras 1C y 1D se muestran ejemplos representativos de las marcaciones mencionadas.

Los presentes resultados muestran claramente, a través de la marcación intracelular de células T, que la expresión de CD69 se encontraba completamente restringida al compartimiento intracelular, identificando de este modo una población linfocitaria característica en pacientes con ARE.

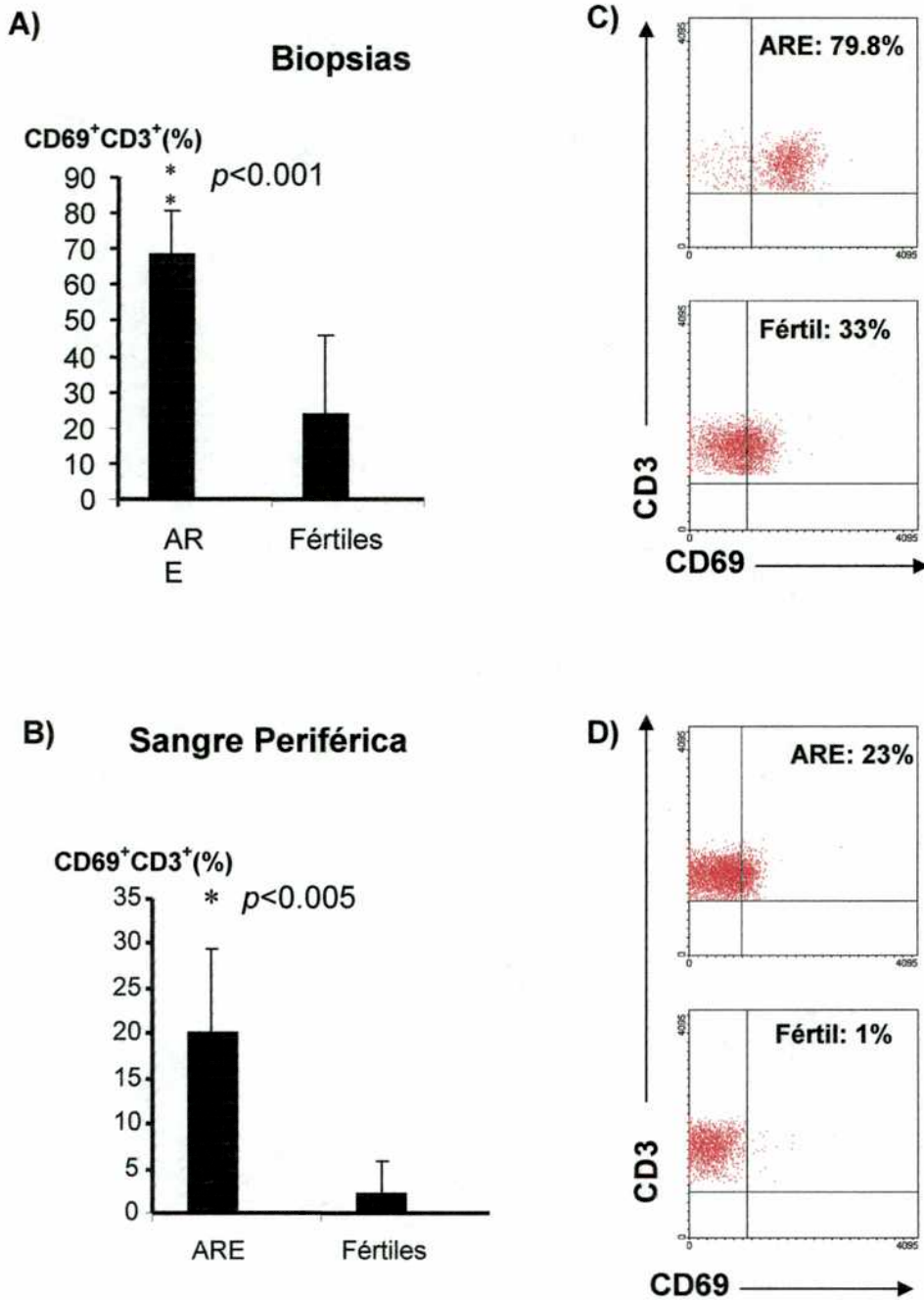


Figura 1: Frecuencia de células T CD3⁺CD69⁺ en endometrio y sangre periférica de pacientes con ARE y de mujeres fértiles. Se determinó la expresión intracelular de CD69 en pacientes con ARE y en mujeres fértiles en células T obtenidas de biopsias de endometrio (A) o de sangre periférica (células MNT) (B). Las células endometriales y MNT fueron marcadas con un Ac. anti-CD3 conjugado con PreCP. Posteriormente, las células fueron fijadas, permeabilizadas y marcadas intracelularmente con un Ac. anti-CD69 conjugado con FITC. Los porcentajes de células CD69⁺ fueron determinados dentro de una ventana correspondiente a células CD3⁺, seleccionada electrónicamente y se expresan como la media ± DS. El análisis de muestras endometriales incluyó 12 pacientes con ARE y 10 mujeres fértiles. Las muestras de sangre periférica incluyeron 30 pacientes con ARE y 12 mujeres fértiles. En la figura (C) se muestran gráficos de puntos representativos de las marcaciones en endometrio y en (D) de sangre periférica, de mujeres fértiles y con ARE. Los números indican el porcentaje de células CD3⁺ con expresión citoplasmática de CD69.

A fin de investigar el estado de activación de la subpoblación CD3⁺CD69⁺ se analizó la co-expresión de este marcador con CD25 mediante triples marcaciones. Todas las pacientes con ARE estudiadas mostraron co-expresión de CD69 y CD25 pero en porcentajes menores al 1%. En la Figura 2, se muestra un ejemplo representativo.

Los resultados expuestos muestran que la expresión de CD69 en linfocitos T de sangre periférica y endometriales se restringe al compartimiento intracelular, sin implicar un estado de activación celular, dado que no se evidenció co-expresión con otros marcadores de activación celular.

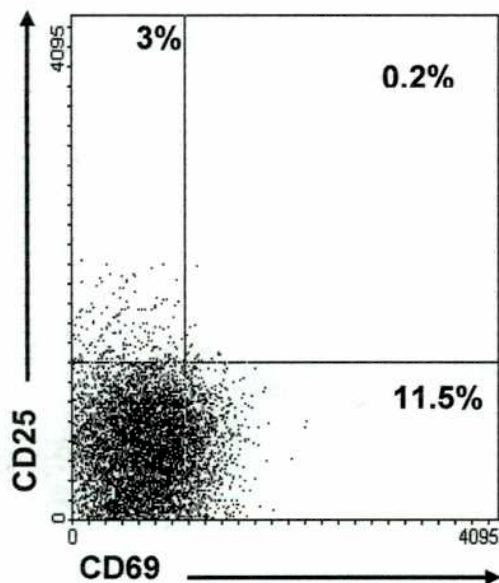


Figura 2: Co-expresión de CD69/CD25 en pacientes con ARE. Las células MNT de pacientes con ARE fueron marcadas en superficie con anti-CD3-PreCP y anti-CD25-PE. Posteriormente a la fijación y permeabilización celular, se realizó marcación intracelular con anti-CD69 - FITC. Los números muestran el porcentaje de células CD69⁺ y CD25⁺ dentro de la ventana electrónica correspondiente a células CD3⁺. El gráfico de puntos corresponde a un individuo representativo.

Caracterización fenotípica de la población CD3⁺CD69⁺ en pacientes con ARE

Los linfocitos T, luego de activarse y de recibir las señales coestimuladoras apropiadas, se diferencian a células T efectoras y de memoria. En este momento de la diferenciación, estas células dejan de expresar la isoforma RA de la molécula CD45 y expresan la isoforma RO. De acuerdo a la expresión del receptor de quimioquinas CCR7 y de la molécula CD62L, *Sallusto et al.* (142) han

dividido a las células T de memoria en 2 subpoblaciones funcionalmente distintas: 1) linfocitos T de memoria central (T_{MC}) y 2) de memoria efectora (T_{ME}). Asimismo, la expresión de la selectina L (CD62L) en los linfocitos T vírgenes y en los linfocitos T_{MC} sería esencial para su migración a los órganos linfáticos secundarios. De este modo, la subpoblación T_{MC} , representaría una población T que reconoció al antígeno previamente y que frente a un segundo desafío puede generar eficientemente una nueva población de células efectoras. Dado que estas subpoblaciones podrían estar involucradas y eventualmente participar en la respuesta hacia aloantígenos fetales, se estudió su distribución en mujeres con ARE y fértiles.

Como puede observarse en las Figuras 3A y B, las pacientes con ARE mostraron un aumento significativo de ambas subpoblaciones de memoria, $CD45R0^+CD62L^-$ y $CD45R0^+CD62L^+$, (* $p < 0.05$, test de Student).

Seguidamente se analizó si la elevada frecuencia de células $CD69^+CD3^+$ de sangre periférica evidenciada en pacientes con ARE, mostraba una distribución particular dentro de las subpoblaciones de células de memoria. Para ello se realizó una marcación de superficie para $CD45R0$, $CD62L$ o $CCR7$ y marcación intracitoplasmática para $CD69$. Como se muestra en la Figura 3C, las células $CD69^+CD3^+$ de pacientes con ARE mostraron una distribución similar entre ambas subpoblaciones de memoria T. Más aún, utilizando marcaciones triples, se evidenció que la población $CD3^+CD69^+$ esta representada tanto por linfocitos $CD4^+$ como por $CD8^+$ dentro de las células T de memoria (Figura 3D).

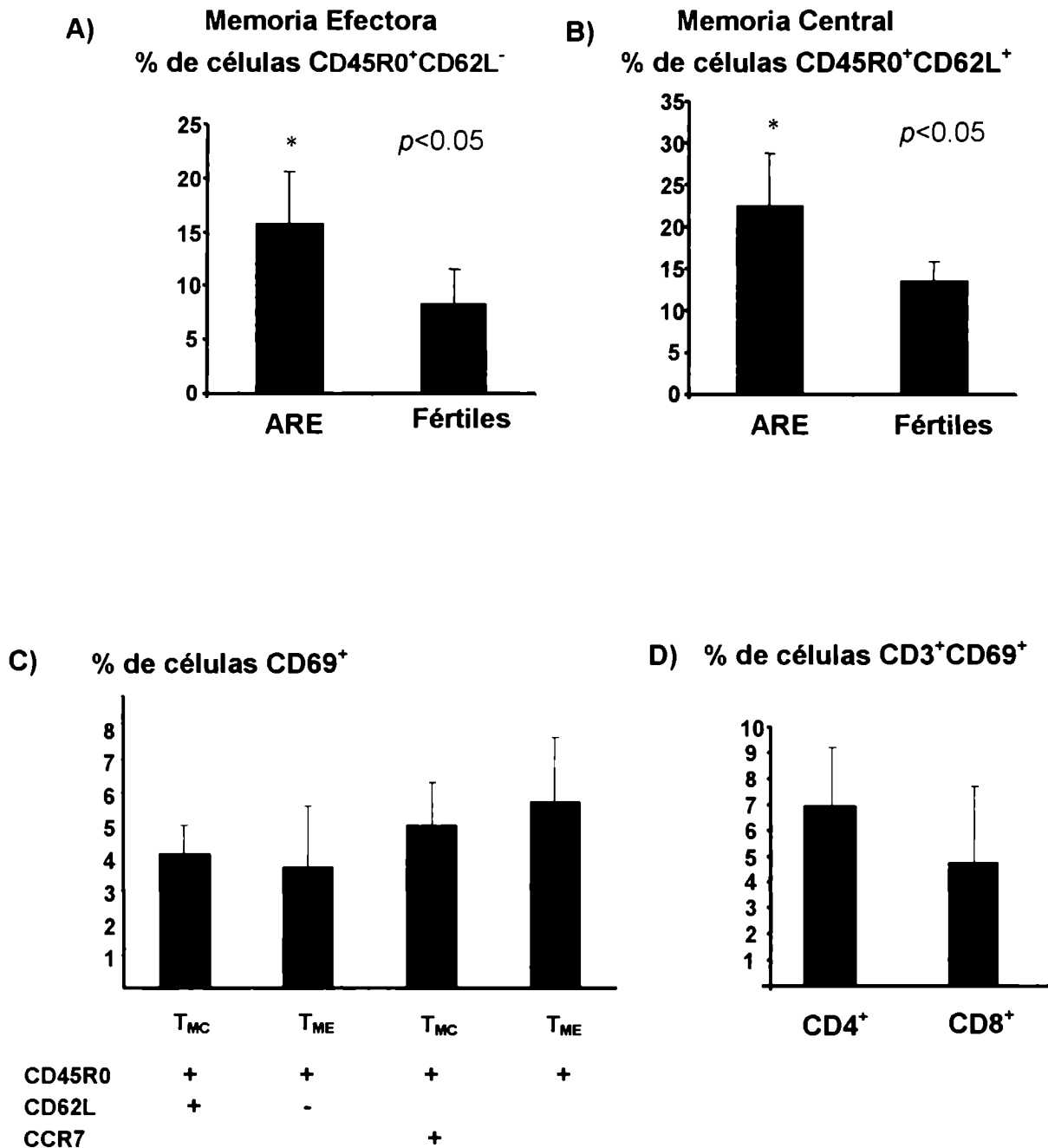


Figura 3: Caracterización fenotípica de la subpoblación CD3⁺CD69⁺ en mujeres con ARE. Las células MNT de sangre periférica de mujeres con ARE y fértiles fueron marcadas con anti-CD45RO-PE y con anti-CD62L-FITC. En **(A)** se muestra el análisis de la población CD45RO⁺CD62L⁻ y en **(B)** de la CD45RO⁺CD62L⁺ en mujeres con ARE y fértiles (**p*<0.05 para ambos análisis, test de Student). Los resultados corresponden a la media ± DS de 12 muestras de mujeres con ARE y 10 de mujeres fértiles. En **(C)** se analizó la presencia de CD69 intracelular en las diferentes subpoblaciones de memoria utilizando 2 combinaciones de marcaciones triples. Luego de la marcación de superficie con un Ac. anti-CD45RO-PE y con un Ac. anti-CD62L-FITC o con un Ac. anti-CCR7-FITC, las células se fijaron, permeabilizaron e incubaron con un Ac. anti-CD69-PreCP. En **(D)** se muestran 2 combinaciones diferentes de marcaciones triples (CD3,CD69,CD8 y CD3,CD69,CD4). Los resultados corresponden a la media ± DS de 5 pacientes con ARE.

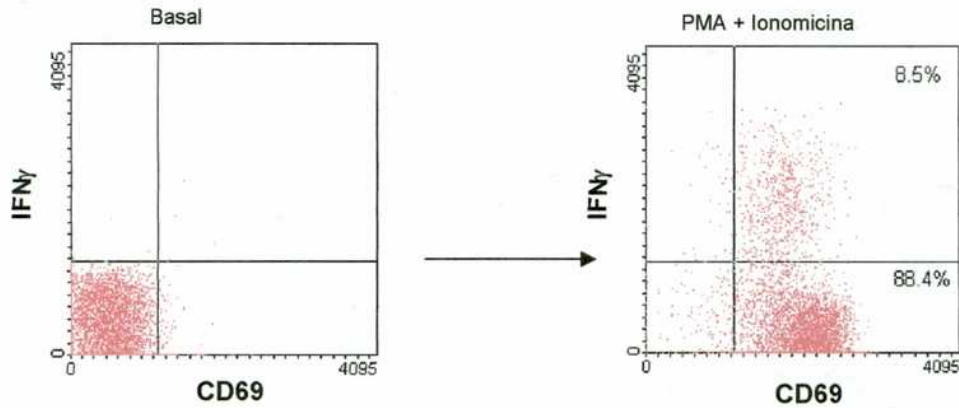
Caracterización funcional de la población CD3⁺CD69⁺ en pacientes con ARE y en mujeres fértiles

Como parte de la caracterización funcional de la población CD3⁺CD69⁺, se investigó el patrón de citoquinas producidos por linfocitos de sangre periférica luego de la estimulación policlonal. Así, las células MNT de sangre periférica de mujeres fértiles y de pacientes con ARE se estimularon con PMA + Ionomicina, y se marcaron para CD3 en superficie y para CD69 e INF γ ⁺ (como citoquina representante del patrón Th1) intracitoplasmáticamente.

Luego de la estimulación policlonal, la mayoría de las células CD3⁺ de mujeres fértiles expresaron CD69. La producción de INF γ ⁺ se detectó en el 16 \pm 5% de las células CD69⁺CD3⁺. En la Figura 4A se muestra un ejemplo representativo. Dado que la producción de INF γ no se detectó previo a la estimulación policlonal, puede asumirse que esta citoquina es producida por células recientemente activadas. En pacientes con ARE, previo a la estimulación, alrededor del 20% de las células resultaron CD3⁺CD69⁺, no detectándose en estas células producción de INF γ (Figura 4B). Luego de la activación policlonal un alto porcentaje de las células T adquirieron la expresión del marcador CD69, si bien, el número de células productoras de INF γ ⁺ fue menor que el encontrado en mujeres fértiles (5.6 \pm 1%, Figura 4B).

A fin de confirmar que las células T CD69⁺ detectadas antes de realizar la estimulación policlonal no producen INF γ , se aisló dicha población selectivamente a través de citometría de flujo (procedimiento del inglés: "sorting"). Como puede observarse en la Figura 4C, la estimulación con PMA + Ionomicina de la población CD3⁺CD69⁺ purificada no indujo producción de INF γ .

A) Mujeres Fértiles



B) Mujeres con ARE

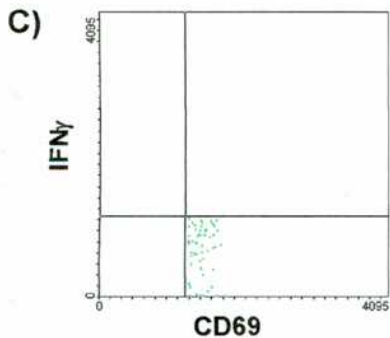
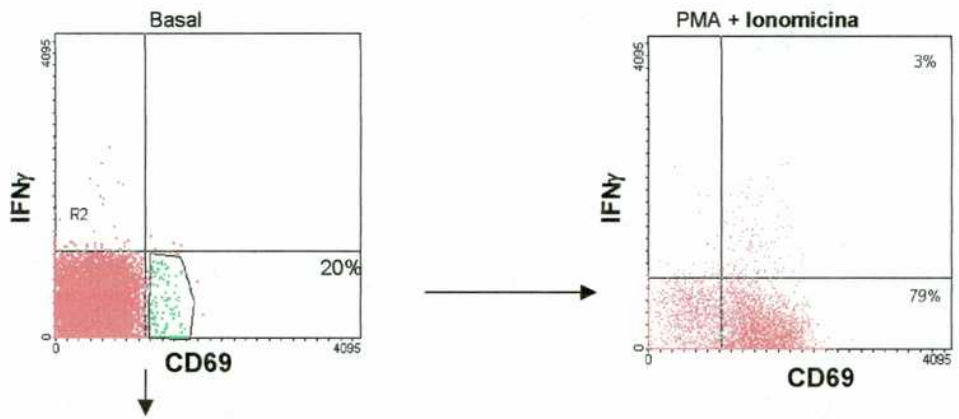


Figura 4: Producción de $INF\gamma$ en células $CD3^+CD69^+$ de pacientes con ARE y mujeres fértiles, en reposo y activadas policlionalmente.

Células MNT de pacientes con ARE se marcaron en superficie con un Ac. anti-CD3 PreCP, se fijaron, permeabilizaron y se marcaron intracitoplasmáticamente con un Ac. anti-CD69 FITC y anti- $INF\gamma$ PE. Los resultados se expresan como los porcentajes de células productoras $INF\gamma$ dentro de la ventana seleccionada electrónicamente para células $CD3^+CD69^+$. En **(A)** se muestra un ejemplo representativo de 10 mujeres fértiles y en **(B)** de 12 pacientes con ARE. En **(C)** se muestra la producción de $INF\gamma$ en células T $CD69^+$ purificadas y posteriormente estimuladas con PMA + Ionomicina.

**Respuesta proliferativa y producción de citoquinas de la población
CD69⁺CD3⁺ frente a estímulos inespecíficos**

Seguidamente se estudió la respuesta proliferativa frente a diferentes estímulos de la población CD3⁺CD69⁺ purificada de pacientes con ARE. La purificación celular se realizó a partir de células MNT por sorting en presencia de leupeptina según se describió en Materiales & Métodos. Las células CD3⁺CD69⁺ obtenidas se sembraron en presencia de PHA, IL-2 (100 U/ml, concentración que induce estimulación policlonal) o en presencia de linfocitos tratados con mitomicina C (estímulo alogénico). Como puede observarse en la Figura 5, la población CD3⁺CD69⁺ purificada presentó menor respuesta proliferativa en respuesta a PHA, IL-2 y al estímulo alogénico en comparación con la población CD3⁺CD69⁻ (**p*<0.05, test de Student para todas las condiciones).

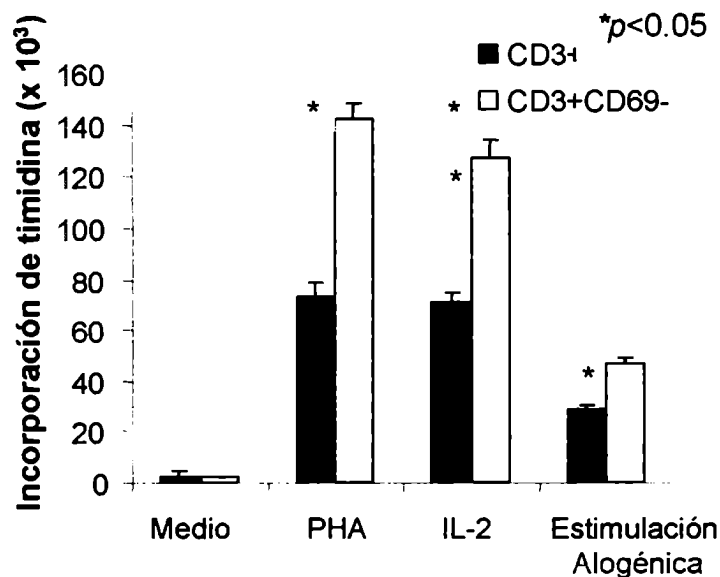


Figura 5: La población CD3⁺CD69⁺ presenta una respuesta proliferativa disminuida frente a estímulos policlonales y alogénico. Células purificadas CD3⁺CD69⁺ y CD3⁺CD69⁻ (1x10⁵ células/ml) se cultivaron en ausencia/presencia de IL-2 (100 U/ml) o PHA (2 µg/ml). Al mismo tiempo se co-cultivaron células respondedoras CD3⁺CD69⁺ o CD3⁺CD69⁻ con células estimuladoras (1x10⁵ células/ml) pre tratadas con mitomicina C. Luego de 5 días de cultivo se adicionó [³H]TdR durante 18 hs y determinó su incorporación utilizando un contador de centelleo líquido β. Los resultados se expresan como la media ± DS de 2 experimentos independientes de pacientes con ARE.

Cuando se midieron los niveles de INF γ por ELISA en los sobrenadantes obtenidos bajo los mismos estímulos, la población CD3⁺CD69⁺ secretó significativamente menores niveles de esta citoquina en comparación con la población CD3⁺CD69⁻ (* p <0.05, test de Student para todas las condiciones) (Figura 6A). En cuanto a los niveles de IL-10, cuantificados por ELISA, producidos por la población CD3⁺CD69⁺ o por la población CD3⁺CD69⁻ frente al estímulo alogénico, resultaron semejantes. En cambio, en respuesta a PHA la población CD3⁺CD69⁺ produjo menores niveles de IL-10 (* p <0.05, test de Student).

El conjunto de estos resultados sugiere que la población de linfocitos T CD69⁺ presente en pacientes con ARE es fenotípica y funcionalmente diferente, permitiendo su utilización como marcador para diagnóstico de pacientes con ARE. Asimismo, su disminuida capacidad para responder a aloantígenos y a secretar INF γ , así como su habilidad para mantener la producción de IL-10, nos permiten sugerir un posible rol regulatorio para dicha población. Sin embargo se requerirá un número mayor de estudios funcionales para determinar su principal función efectora.

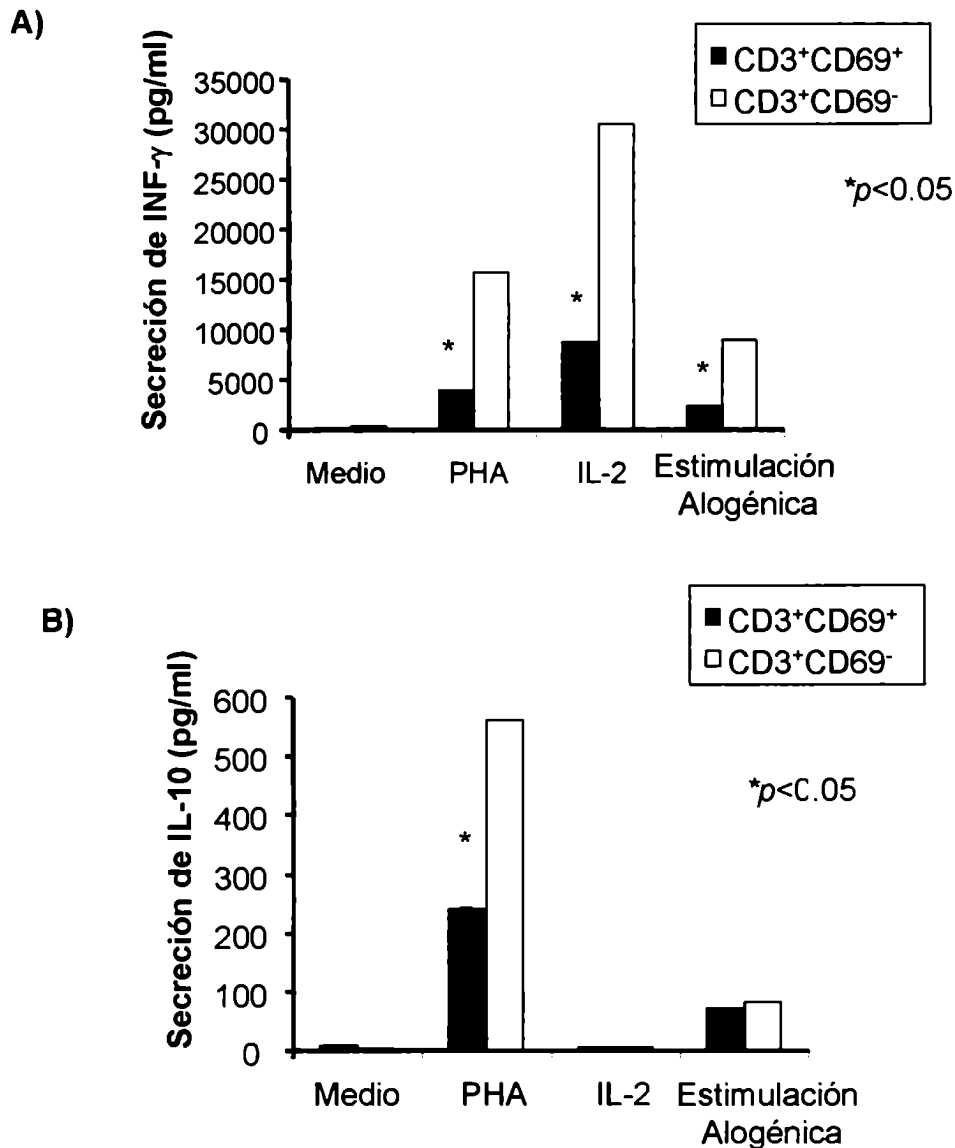


Figura 6: La población CD3⁺CD69⁺ presenta una disminución en la producción de INF γ e IL-10 en respuesta a estímulos policlonales, pero responde diferencialmente al estímulo alogénico. Células purificadas CD3⁺CD69⁺ y CD3⁺CD69⁻ (1x10⁵ células/ml) se cultivaron en ausencia y en presencia de IL-2 (100 U/ml) o de PHA (2 μ g/ml). Al mismo tiempo se co-cultivaron células respondedoras CD3⁺CD69⁺ o CD3⁺CD69⁻ y estimuladoras (1x10⁵ células/ml) pre tratadas con mitomicina C. Luego de 72 horas de cultivo se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la secreción de INF γ **(A)** y de IL-10 **(B)** por la técnica de ELISA. Los resultados corresponden a un experimento representativo de pacientes con ARE y se expresa como la media en pg/ml.

**Cinética de la población CD3⁺CD69⁺ intracitoplasmático durante
la respuesta alógena**

Una vez caracterizada la población CD3⁺CD69⁺ funcional y fenotípicamente se evaluó su modulación en el curso de una respuesta aloinmune. En un CML de parejas con ARE se co-cultivaron las células MNT de los integrantes de la pareja con total disparidad en los alelos HLA durante 72 horas. A las 0, 24, 48 y 72 hs de cultivo se recuperaron las células aloestimuladas y se realizó marcación de superficie para CD3 e intracitoplasmática para CD69. Al mismo tiempo, se realizó una marcación para estudiar la modulación de la expresión de CD69 en la superficie de linfocitos T. Como se describe en la Figura 7, la molécula CD69 intracitoplasmática estuvo presente desde el inicio del alocultivo y disminuyó significativamente en forma dependiente del tiempo, desapareciendo su expresión a las 72 horas del CML. En cambio, la expresión de CD69 de membrana aumentó durante el curso de la respuesta alógena, alcanzando su máxima expresión a las 48-72 horas de aloestimulación.

La presente cinética también se realizó utilizando dadores normales. En estos casos, la expresión de CD69 intracitoplasmática no se detectó en ninguno de los tiempos estudiados (0, 24, 48, 72 horas). Sin embargo la expresión de CD69 en la membrana de linfocitos T fue similar a la observada en pacientes con ARE (dato no mostrado). Estos resultados sugieren una vez más, que la molécula CD69 expresada en la membrana celular se comportaría como un marcador de activación, a diferencia de la expresión intracitoplasmática cuya función deberá aún ser dilucidada. La característica de las pacientes con ARE de disminuir la expresión intracitoplasmática de CD69 de los linfocitos T durante la respuesta alógena *in vitro* permite sugerir que un aumento de la población CD3⁺CD69⁺ en

pacientes con ARE podría originarse en alguna falla en el aloreconocimiento materno *in vivo*, cuya implicancia funcional espera aún ser dilucidada.

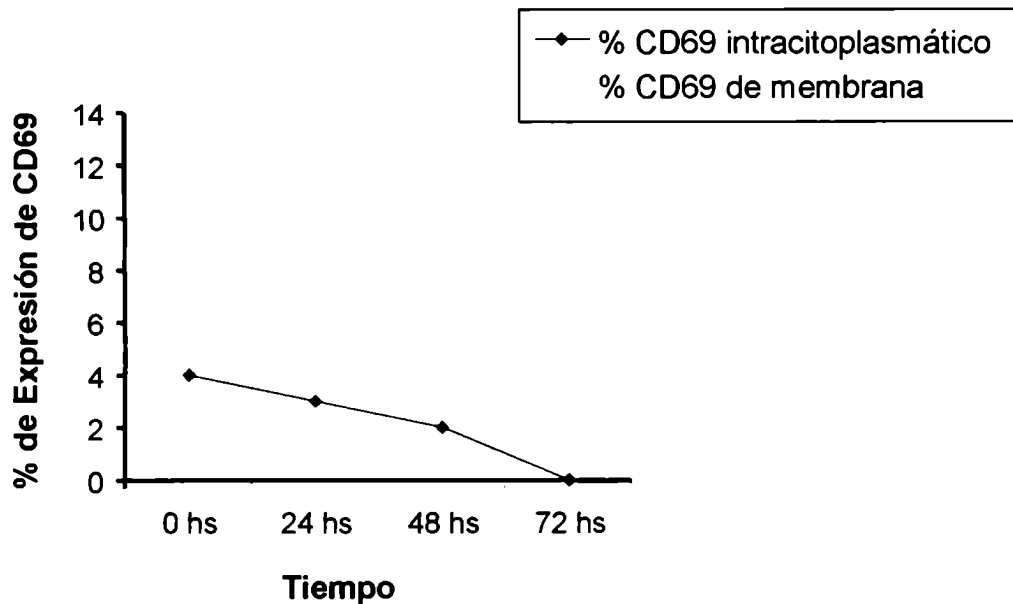


Figura 7: Disminución de la expresión intracitoplasmática y aumento de la expresión en superficie de la molécula CD69 en linfocitos T durante la respuesta alógena. Células respondedoras (1×10^5 células/ml) y estimuladoras pre-tratadas con mitomicina C (1×10^5 células/ml) se co-cultivaron y a distintos tiempos (0, 24, 48 y 72 horas) y se realizó la marcación de superficie con un Ac. anti-CD3 PE y con un Ac. anti-CD69 FITC para estudiar su expresión en superficie o intracitoplasmática. Los resultados se expresan como el porcentaje de expresión de CD69 en linfocitos T y se muestra un ejemplo representativo de 2 alocultivos realizados de pacientes con ARE.

Modulación de la expresión de CD69 por inhibidores de proteasas

Como se describió en las secciones previas, las pacientes con ARE mostraron un aumento significativo en la expresión intracelular del marcador CD69 asociado con una expresión disminuida en la superficie de linfocitos T. Para explicar este fenómeno, se consideró la posibilidad que la baja expresión en la superficie podría involucrar mecanismos de remoción de la membrana celular, mediado por proteasas. Así, se exploró la expresión de CD69 en la superficie de los linfocitos T de sangre periférica en presencia y en ausencia del inhibidor de proteasas leupeptina.

Se observó que la preincubación de las células durante 1 hora en presencia de leupeptina se asocia con un aumento significativo de la expresión en membrana de CD69 ($*p < 0.05$, test de Mann Whitney test) (Figura 8A), sugiriendo que el mecanismo de remoción de la molécula mediado por proteasas podría ser responsable de la baja expresión en linfocitos T (Figura 8B).

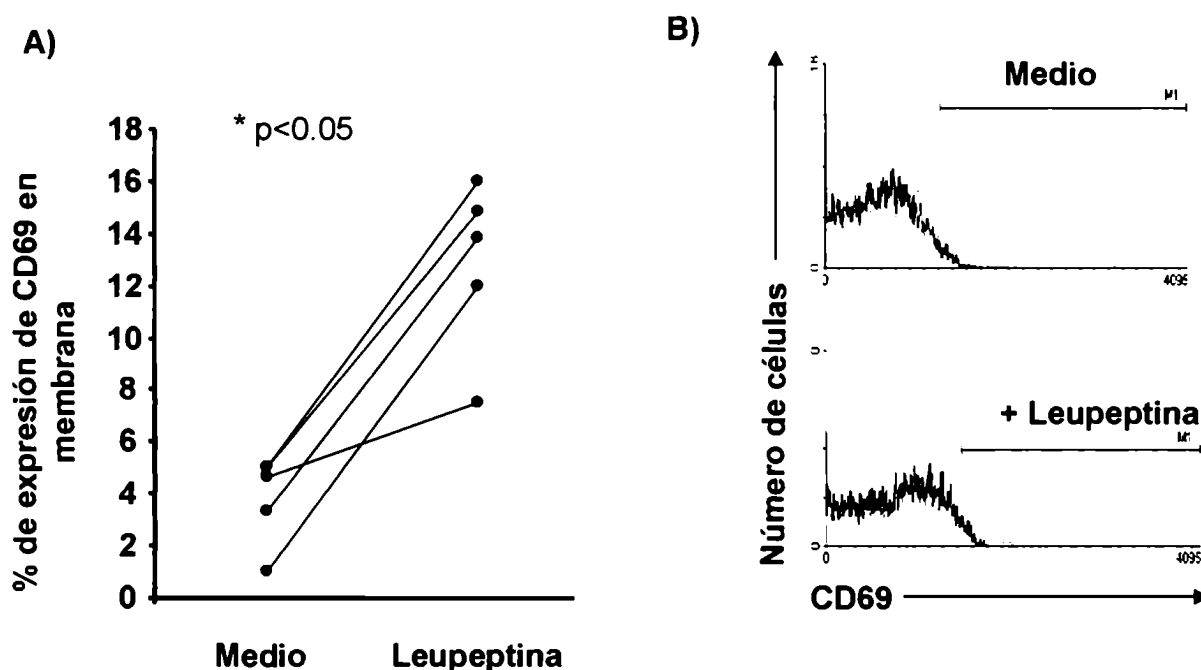


Figura 8: El tratamiento con leupeptina aumenta la expresión de CD69 en la membrana de linfocitos T. (A) Células MNT de pacientes con ARE se preincubaron 1 hora en presencia/ausencia del inhibidor de proteasas leupeptina. Posteriormente se marcaron en superficie con un Ac. anti-CD3 PE y con un Ac. anti-CD69 FITC. Los resultados se expresan como el porcentaje de células dobles positivas ($*p < 0.05$, test de Mann Whitney). En (B) se muestran ejemplos representativos de perfiles citométricos en ausencia (histograma superior) y en presencia (histograma inferior) de leupeptina.

DISCUSIÓN

Varios trabajos previos evidenciaron la expresión del marcador de activación CD69 en leucocitos endometriales (138,139). Por el contrario, un estudio reciente realizado *in situ* mostró que los linfocitos endometriales no co-expresan CD69 pero pueden adquirir a la molécula *in vitro* luego de la purificación y cultivo celular (59). Esta aparente contradicción puede explicarse por los resultados expuestos en esta sección, donde la expresión de CD69, tanto en linfocitos de sangre periférica como en linfocitos endometriales está restringida al compartimiento intracelular. El aumento significativo en la expresión superficial de CD69 por el tratamiento con leupeptina, podría explicar un camino por el cual la molécula CD69 se liberaría de la superficie de las células T y podría reincorporarse a la célula y degradarse en los lisosomas. Este posible mecanismo explicaría al menos en parte la observación realizada por Vassiliadou y Bulmer, quienes asumieron que la expresión de CD69 se adquiría *in vitro* (59,60).

Este estudio también demuestra que las pacientes con ARE presentan un aumento significativo en el número de linfocitos T endometriales que expresan CD69 intracelularmente. Estas observaciones concuerdan con el elevado número de células CD69⁺ detectadas en deciduas provenientes de abortos espontáneos con respecto a controles normales (60).

El mayor hallazgo del presente trabajo radica en la identificación de la población CD3⁺CD69⁺ en sangre periférica de pacientes con ARE. Como esta población también se encuentra aumentada en el endometrio de pacientes con ARE, podría especularse la existencia de una migración preferencial hacia el

útero, mediado por receptores específicos.

Trabajos previos han mostrado que CD69 es una glicoproteína de superficie rápidamente inducible, sintetizada de novo y expresada en linfocitos T luego de la activación celular (143). Estudios de homología comparativos en su secuencia proteica mostraron que CD69 es una proteína de membrana de tipo II con un dominio de lectina tipo C, que interacciona con carbohidratos y funcionaría como un receptor transmisor de señales (144). Dado que aún no se ha identificado su ligando fisiológico, la función de CD69 todavía es incierta. Según datos de estudios inmunohistológicos y de citometría de flujo, la expresión de CD69 se asoció con un estado de activación. Sin embargo, los resultados aquí presentados y los expuestos por otros grupos de investigación no permiten asociar la expresión de CD69 con otros marcadores de activación como CD25 o CD71 (60,141). De este modo podría especularse que la expresión de CD69, en una subpoblación de células T, se asociaría con funciones regulatorias, como por ejemplo un receptor para ligandos solubles o asociados a células. Consecuentemente, el aumento evidenciado en pacientes con ARE no solamente representaría un marcador útil, sino que también indicaría una posible forma de regular una respuesta inmune no deseada.

A través de triple marcaciones se evidenció que la subpoblación T CD3⁺CD69⁺ estaba distribuida homogéneamente entre ambas subpoblaciones de memoria y representada tanto por linfocitos CD4⁺ como por CD8⁺. Sin embargo, se detectaron diferencias en la población T CD69⁺ en cuanto a la producción de INF γ . En mujeres fértiles, la expresión de CD69 (de superficie e intracelular) es muy baja, pero virtualmente la mayoría de las células T co-expresan CD69 luego

de la estimulación policlonal y de ellas un 16% producen $\text{INF}\gamma^+$. En cambio, en las pacientes con ARE aproximadamente un 20% de las células T son CD69^+ previamente a la estimulación policlonal. Luego de la estimulación, la mayoría de las células T son inducidas a expresar CD69 , pero el porcentaje de células productoras de $\text{INF}\gamma^+$ no superó el 5%. Esto podría deberse a la hipo-reactiva capacidad de las células $\text{CD3}^+\text{CD69}^+$ de responder frente a diversos estímulos, así como a producir citoquinas. Esta observación resulta particularmente interesante, dado que recientemente se ha reportado en un modelo murino la contribución del $\text{INF}\gamma$ a iniciar la neovascularización, a modificar la integridad de la decidua y a inducir la maduración de células NK. De este modo, si bien para explicar los abortos recurrentes el modelo del desbalance Th1-Th2 es útil, al mismo tiempo resulta muy simplista encasillar las respuestas efectoras, así como también la expresión de citoquinas beneficiosas o perjudiciales (14). El $\text{INF}\gamma$, constituye un claro ejemplo, según el cual altas dosis de esta citoquina tendrían un efecto proabortivo, pero bajas dosis son necesarias para lograr la neovascularización y remodelación tisular durante el proceso de decidualización (145). Actualmente, se están desarrollando nuevos estudios para dilucidar los caminos involucrados en la inhibición de la producción de $\text{INF}\gamma$ en pacientes con ARE.

SEGUNDA PARTE:
La expresión de SLAM como un nuevo marcador
de Abortos Recurrentes Espontáneos

La activación y expansión clonal de células T requiere 2 señales, una de ellas brindada por la interacción del receptor T al contactar con el péptido antigénico específico y la segunda, brindada por moléculas coestimuladoras (146-148). Uno de los caminos más conocidos capaz de aportar la segunda señal co-estimuladora es el que involucra la interacción entre las moléculas CD28, expresada en los linfocitos T, y CD80/CD86, expresadas en las células presentadoras de antígeno (149-151). Sin embargo, se ha demostrado en ratones deficientes para CD28 que la activación celular puede ocurrir aún en ausencia de la coestimulación CD28-CD80/CD86, indicando así la existencia de vías alternativas (152). Una de las moléculas de activación temprana es la molécula de activación linfocitaria y señalización (SLAM), glicoproteína de membrana perteneciente a la subfamilia CD2 expresada en linfocitos y células dendríticas (153). Se ha demostrado que SLAM es un homoligando (153-154). Más aún, SLAM activa linfocitos T y B, induciendo la proliferación de linfocitos CD45R0⁺ de memoria independientemente de la interacción con CD28 (153-154). A través de la interacción con SLAM, se generan señales involucradas en la activación de citoquinas, principalmente de INF γ , y señales capaces de redirigir respuestas efectoras de tipo Th1 hacia Th0 o Th2 (153,156-158).

Como se describió previamente, las deciduas provenientes de abortos espontáneos, presentan un elevado infiltrado celular que incluye células LAK, NK y linfocitos T activados con un patrón de citoquinas tipo Th1 (137-141). Al mismo

tiempo, se han encontrado elevados niveles de INF γ en deciduas provenientes de pacientes con ARE (10-12). Continuando con nuestro objetivo de encontrar un marcador diferencial para pacientes con ARE, en la presente sección se investigó la expresión de SLAM y de diversas citoquinas en biopsias de pacientes con ARE y de mujeres fértiles en condiciones pre-implantatorias.

Expresión de SLAM en células endometriales

y en linfocitos de sangre periférica

Se estudió la expresión de SLAM en biopsias de endometrio obtenidas durante la fase secretoria del ciclo menstrual de pacientes con ARE y de mujeres fértiles. Las pacientes incluidas en el presente estudio fueron las mismas que las estudiadas en la primera parte del este capítulo. Las muestras fueron procesadas y la expresión de SLAM fue detectada por Western Blot. Como puede observarse en la Figura 9A, cuando se realizó la correspondiente semicuantificación de las intensidades de las bandas inmunoreactivas, las biopsias de endometrio de pacientes con ARE mostraron mayores niveles de expresión de SLAM en comparación con los obtenidos de mujeres fértiles (* $p > 0.05$ test de Student). En la figura 9B se muestran las bandas inmunoreactivas correspondientes a la expresión de SLAM en mujeres con ARE y fértiles.

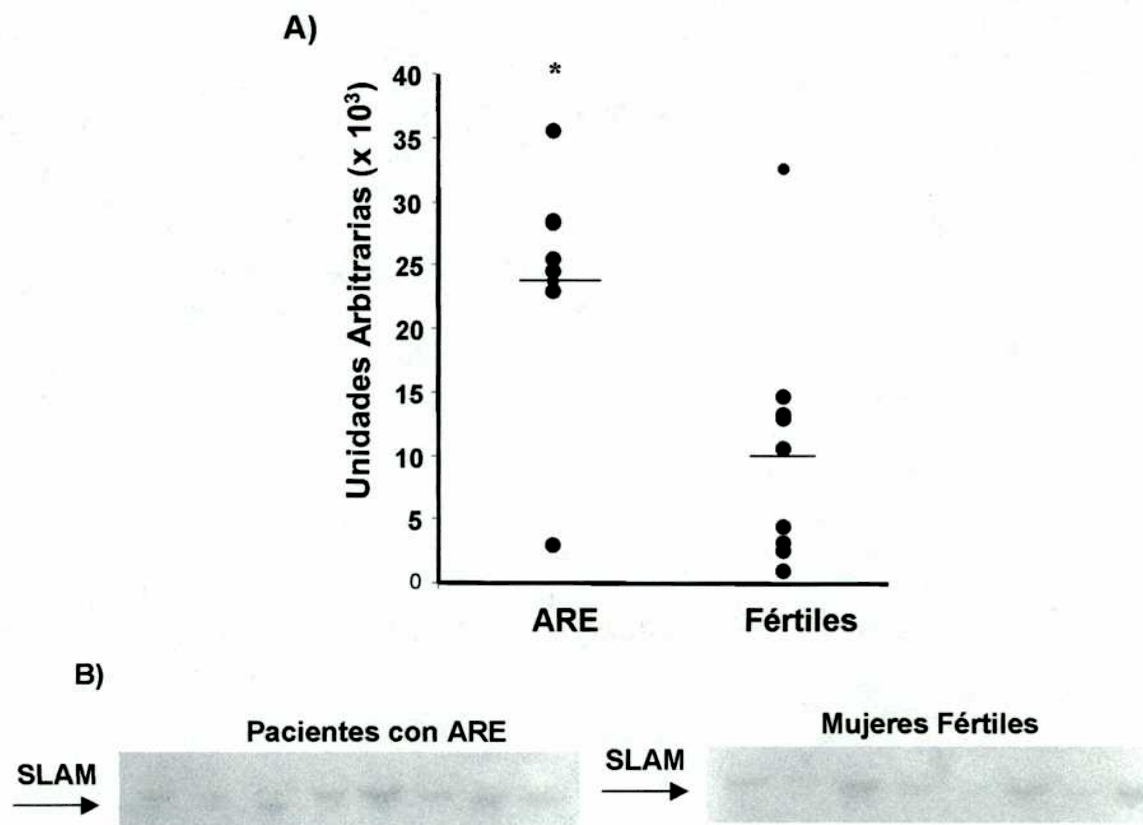


Figura 9: Expresión de SLAM en biopsias de endometrio de mujeres fértiles y con ARE. Las biopsias endometriales se disgregaron mecánicamente, se obtuvieron los correspondientes extractos celulares y se detectó la expresión de SLAM por Western Blot. **(A)** Las bandas proteicas inmunoreactivas se semi-cuantificaron por densitometría y la expresión de SLAM se expresan como unidades arbitrarias relativas (UA). **(B)** Ensayo de Western blot correspondientes a 8 pacientes con ARE y 8 mujeres fértiles.

Seguidamente, se estudió la expresión de SLAM en linfocitos T de sangre periférica de mujeres con ARE y fértiles, realizando marcaciones de superficie con Acs. anti-SLAM y anti-CD3. Como puede observarse en la Figura 10A, las pacientes con ARE mostraron un aumento significativo de la expresión de SLAM en sangre periférica en comparación con los porcentajes obtenidos para mujeres fértiles ($2.13\% \pm 1.8\%$ vs $6.9\% \pm 4.6$, $*p < 0.005$, test de Student). Estos resultados sugerirían un estado de activación basal en las pacientes con ARE previo a la implantación fetal.

Asimismo, se realizó la correlación entre la expresión SLAM y la expresión intracitoplasmática CD69 en linfocitos T de sangre periférica. Sin embargo, los resultados indicaron que no existiría asociación entre ambos parámetros (dato no mostrado).

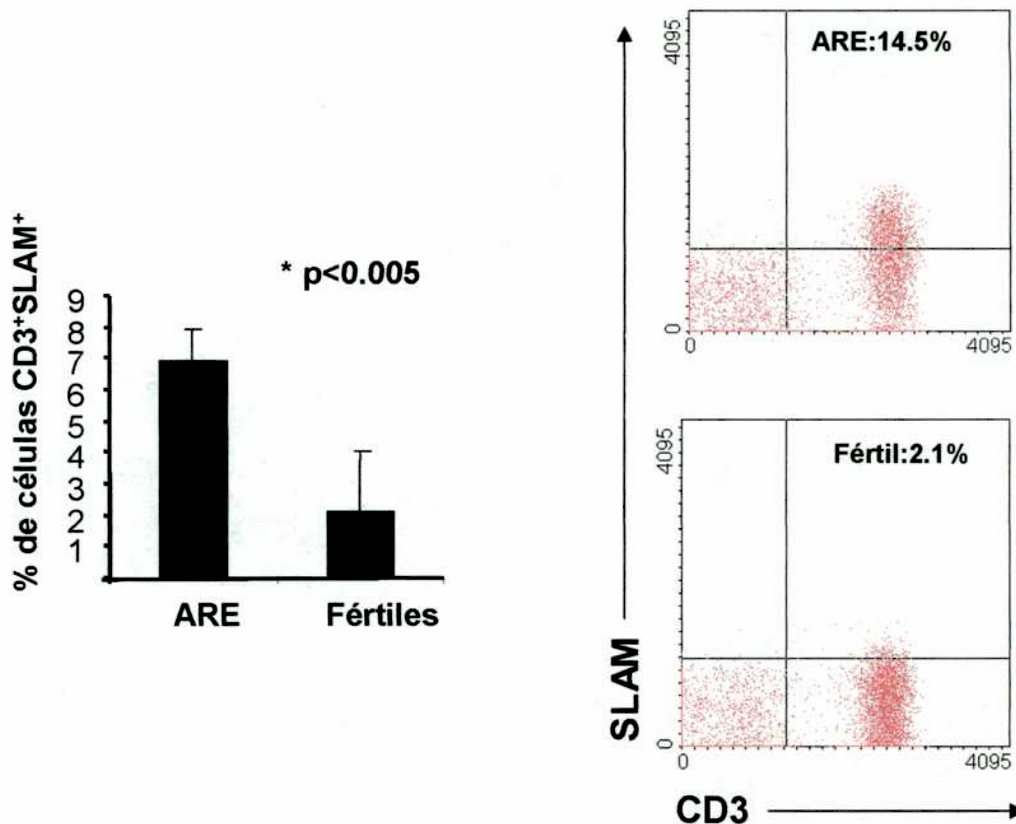


Figura 10: Expresión de SLAM en células T CD3⁺ de sangre periférica de pacientes con ARE y de mujeres fértiles. Se determinó la expresión de SLAM en células T de sangre periférica de pacientes con ARE y de mujeres fértiles, utilizando Ac. anti SLAM-PE y Ac. anti-CD3-FITC (A). Los porcentajes de células SLAM⁺ fueron determinados dentro de una ventana correspondiente a células CD3⁺, seleccionada electrónicamente y se expresan como la media \pm DS. El análisis incluyó 17 pacientes con ARE y 10 mujeres fértiles (* $p < 0.05$, test Student). En la figura (B) se muestran ejemplos representativos de la expresión de SLAM en linfocitos T de mujeres fértiles y con ARE.

Los resultados obtenidos indicarían que la expresión aumentada de SLAM podría deberse a la activación de células del endometrio y de sangre periférica en pacientes con ARE. Más aún, la expresión de SLAM en sangre periférica podría constituir un parámetro representativo de la activación local y sistémica.

**Expresión de citoquinas en endometrio
de pacientes con ARE y de mujeres fértiles**

A continuación, se investigó si la expresión diferencial de citoquinas presentes en condiciones preimplantatorias podrían correlacionarse con la falla del embarazo. Para tal propósito se estudiaron los niveles de expresión del ARNm de IL-4, IL-5, IL10, INF γ y CD3 por RT-PCR en biopsias de pacientes con ARE y de mujeres fértiles. Como se muestra en la Figura 11, si bien no se encontraron diferencias significativas en la expresión de citoquinas asociadas al patrón de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) entre mujeres con ARE y fértiles, pudo evidenciarse una tendencia a la expresión aumentada de IL-10 en mujeres fértiles. En particular, la expresión de IL-4 no se detectó en ninguno de los grupos estudiados (dato no mostrado). Del mismo modo, tampoco se encontraron diferencias significativas en la expresión de INF γ entre mujeres con ARE y fértiles, si bien pudo evidenciarse una tendencia aumentada a la expresión de INF γ en mujeres fértiles.

En conjunto, estos resultados sugieren que, en condiciones preimplantatorias, el endometrio uterino no expresa un patrón de citoquinas definido, motivo por el cual, la expresión de las citoquinas estudiadas no constituirían un parámetro útil para el diagnóstico de ARE. Al mismo tiempo, la expresión de INF γ evidenciada en pacientes con ARE, no constituiría un factor predisponente para la falla de un embarazo, ya que las mujeres fértiles presentaron niveles de expresión semejantes o incluso, en algunos casos, superiores en condiciones preimplantatorias.

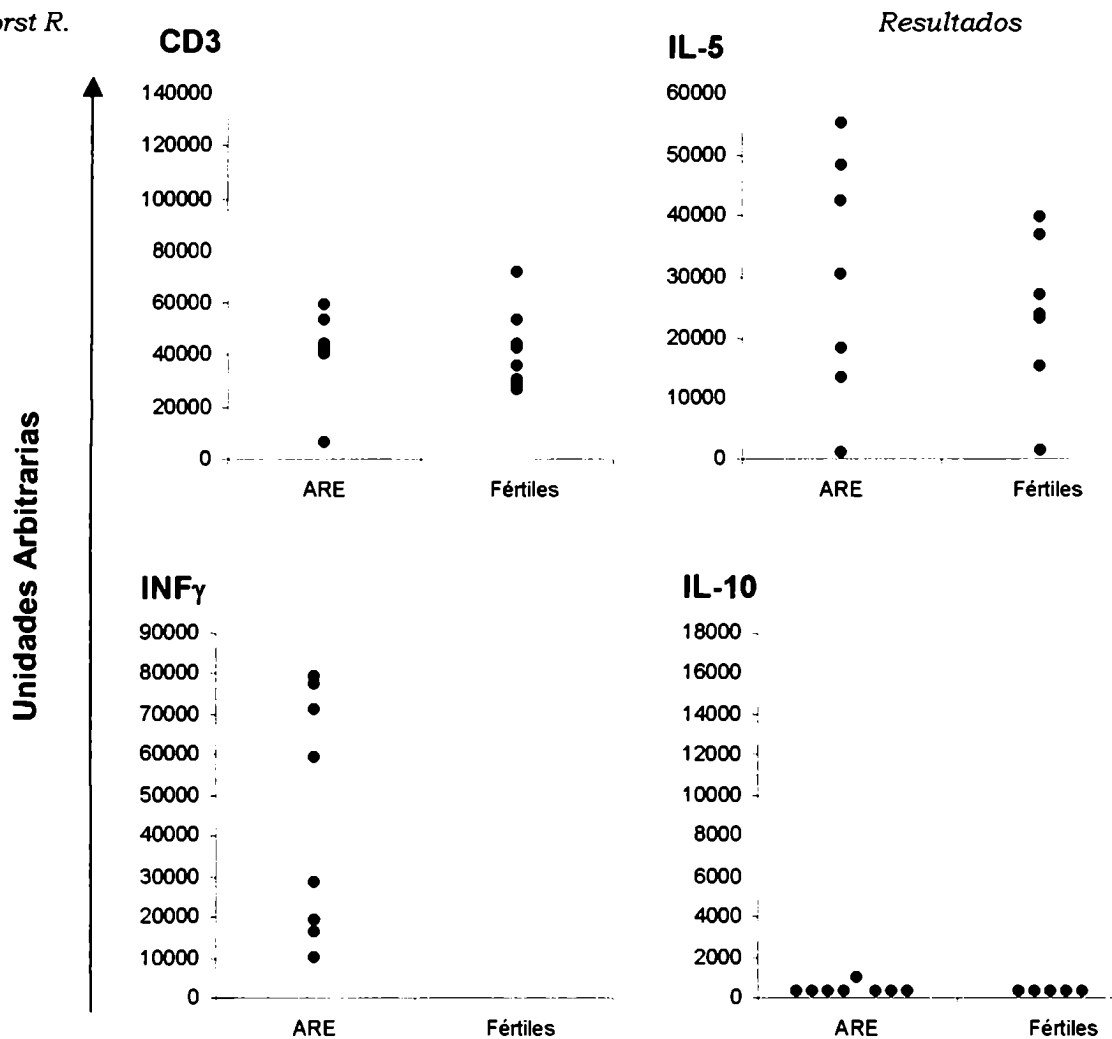


Figura 11: Expresión de ARNm de CD3, IL-5, IL-10 e INF γ en endometrio de pacientes con ARE y de mujeres fértiles. Se obtuvieron 8 biopsias de endometrio durante la fase secretoria del ciclo menstrual de mujeres fértiles y con ARE. A partir de las mismas se obtuvo el ARNm y el ADN copia. Posteriormente se realizó la reacción de polimerasa en cadena reversa para CD3, IL-5, IL-10 e INF γ utilizando cebadores y condiciones específicas para cada uno de los genes mencionados. Los productos de PCR fueron normalizados según la producción de β -actina y finalmente se semicuantificaron. Los resultados obtenidos se expresan en unidades arbitrarias (UA).

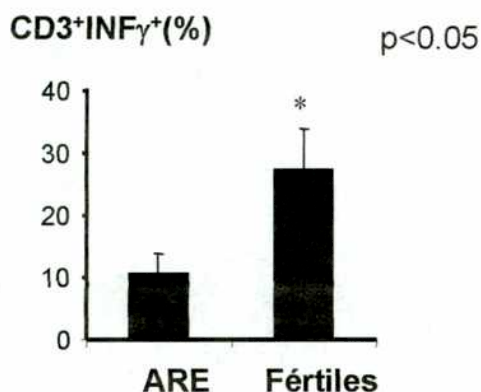
**Producción de INF γ por linfocitos T endometriales y
de sangre periférica en mujeres con ARE y fértiles**

Como se describió en el punto anterior, las células endometriales, en condiciones preimplantatorias, no mostraron la expresión de un patrón de citoquinas característico. Sin embargo, en pacientes con ARE se evidenció un mayor porcentaje de linfocitos T que expresan SLAM. Por tal motivo, se investigó la producción de INF γ en linfocitos T infiltrantes del endometrio uterino y de

sangre periférica. Para ello las células endometriales de mujeres fértiles y con ARE se estimularon con PMA + Ionomicina y se realizó marcación de superficie para CD3 y marcación intracitoplasmática para INF γ .

En pacientes con ARE se evidenció una disminución significativa en el porcentaje de linfocitos T endometriales productores de INF γ con respecto a mujeres fértiles (12.2% \pm 2.1% y 27.3% \pm 3.3%, * p <0.05 test de Student) (Figura 12A). Del mismo modo, los linfocitos T de sangre periférica también mostraron un comportamiento semejante, si bien los porcentajes de linfocitos T productores de INF γ fueron menores (7.7% \pm 5.1% y 14.1% \pm 2.4%, * p <0.05, test de Student) (Figura 12B). En las Figuras 12C y 12D se muestran perfiles citométricos representativos correspondientes a linfocitos endometriales y de sangre periférica. Los resultados expuestos sugieren que los linfocitos T de sangre periférica y endometriales de mujeres fértiles presentan una mayor capacidad de producción de INF γ en respuesta a la estimulación policlonal. En cambio, en pacientes con ARE, el porcentaje de células productoras de INF γ resultó menor, probablemente debido a la presencia de la población CD3⁺CD69⁺, no productora de INF γ . Como puede observarse en la Figura 13A, no se detectó producción de IL-4 intracitoplasmática luego de la estimulación policlonal en mujeres con ARE ni en mujeres fértiles. Para descartar probables problemas técnicos que impidan la detección de esta citoquina, se realizó la marcación intracitoplasmática de IL-4 en células CHO y CHO transfectadas con el gen de IL-4. Como puede observarse en la Figura 13B las células CHO transfectadas fueron positivas para IL-4 a diferencia de las células CHO sin transfectar.

A) Linfocitos Endometriales



B) Linfocitos de Sangre periférica

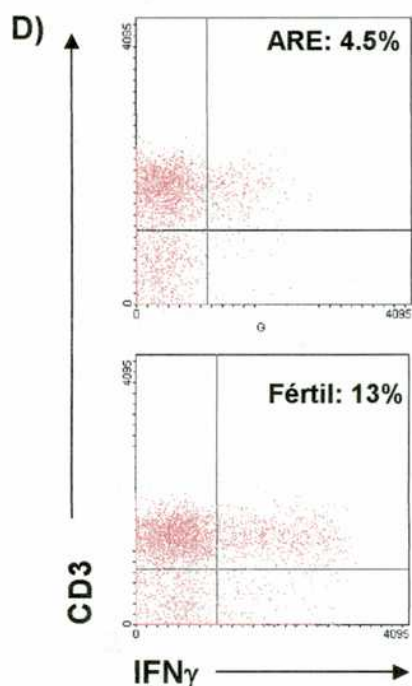
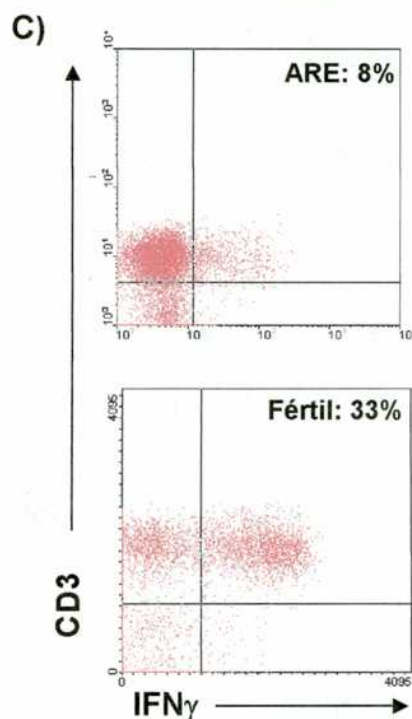
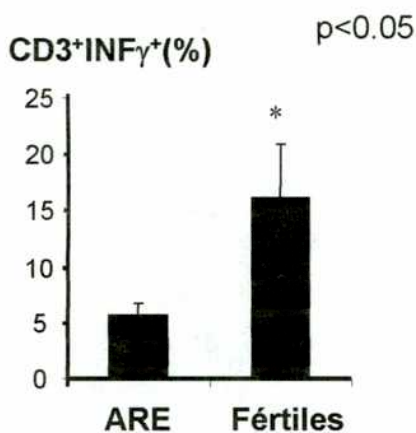


Figura 12: Producción de INF γ en células T CD3⁺ endometriales y de sangre periférica de pacientes con ARE y de mujeres fértiles. Se determinó la expresión intracelular de INF γ de células T obtenidas de biopsias de endometrio de pacientes con ARE y mujeres fértiles **(A)** o de sangre periférica **(B)**. Las células endometriales y MNT fueron marcadas con Ac. anti-CD3-PreCP, se fijaron, permeabilizaron y marcaron intracelularmente con Ac. anti-INF γ -FITC. Los porcentajes de células productoras de INF γ se expresan como la media \pm DS. El análisis incluyó 12 pacientes con ARE y 10 mujeres fértiles (* $p < 0.05$, test Student para ambos análisis). En **(C)** se muestran gráficos de puntos representativos de las marcaciones en endometrio y en **(D)** de sangre periférica. Los números indican el porcentaje de células CD3⁺ productoras de INF γ .

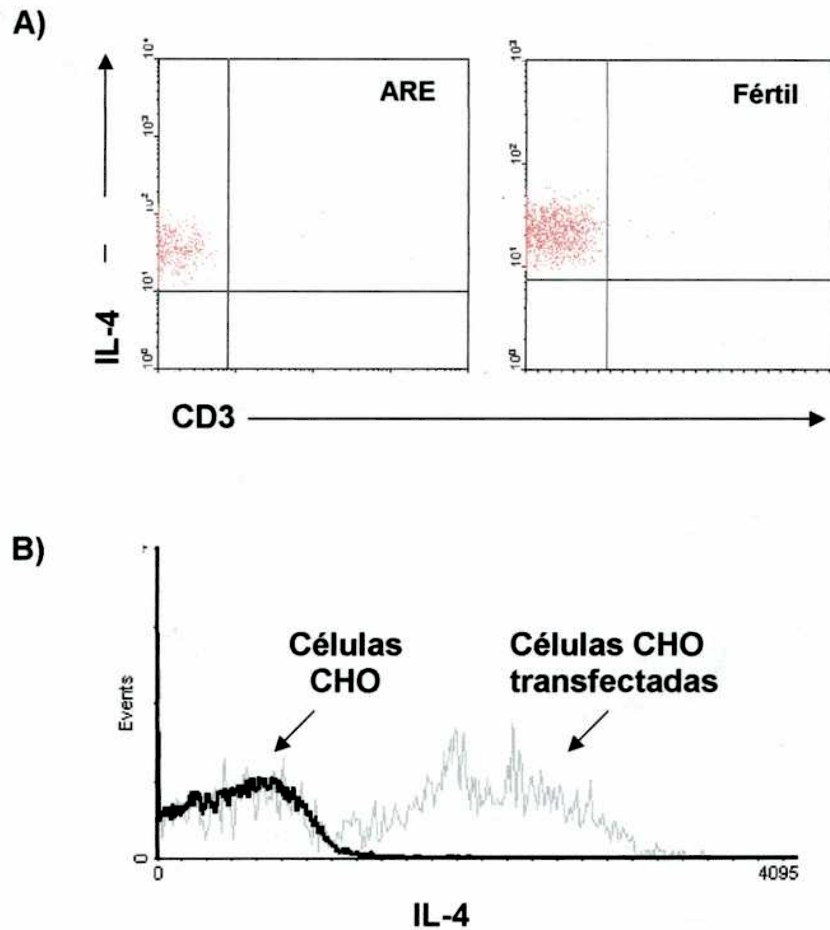


Figura 13: Producción de IL-4 en células T CD3⁺ endometriales de pacientes con ARE y de mujeres fértiles. (A). Las células endometriales de mujeres con ARE y fértiles fueron marcadas con Ac. anti-CD3-PreCP, se fijaron, permeabilizaron y marcaron intracelularmente con Ac. anti-IL-4-PE. En **(B)** se muestra la expresión de IL-4 en células CHO y CHO transfectadas con el gen de IL-4, utilizando la misma técnica de marcación intracitoplasmática que en el punto A.

DISCUSIÓN

Los resultados descriptos sugieren que las pacientes con ARE presentan un estado de activación basal a nivel local, previo a la implantación fetal y a la deciduización, superior al de mujeres fértiles. También se evidenció a nivel sistémico un aumento significativo de la expresión de SLAM específicamente en linfocitos T de mujeres con ARE con respecto a mujeres fértiles. Estos linfocitos podrían representar clones aloreactivos no “silenciados” que serían deletéreos por su participación en el rechazo fetal. La detección de células expresando SLAM a nivel sistémico y local, otorgarían a esta molécula el papel de marcador para el diagnóstico de ARE.

El estudio de la expresión de citoquinas por RT-PCR de biopsias de endometrio reveló, que previamente a la implantación y deciduización, el endometrio no expresa un patrón de citoquinas claramente definido, descartando la utilidad de las mismas como posibles marcadores en el endometrio durante la fase secretoria del ciclo menstrual (12,14,35162). Estos hallazgos coinciden con otros reportes en los cuales se muestra que la principal fuente de IL-4 la constituye el trofoblasto, o sea que la generación de un patrón de citoquinas Th2 se relacionaría con eventos posteriores a la implantación del trofoblasto (12,14,35162).

El hecho de que los linfocitos T endometriales y de sangre periférica de mujeres fértiles frente a estímulos policlonales aumenten su producción de INF γ podría relacionarse con su capacidad para favorecer la neovascularización necesaria durante el proceso de deciduización (145). De este modo, los linfocitos T de las mujeres fértiles podrían generar un microambiente

preimplantatorio adecuado favoreciendo la invasión de las células trofoblásticas, mientras que en mujeres con ARE los cambios inducidos a través de la producción de INF γ se verían afectados. Una posible explicación a la disminuida producción de INF γ se relacionaría con la presencia de la población CD3⁺CD69^{intracitoplasmática} que como se mostró en la primera parte del presente capítulo, no solamente no produce INF γ sino que además presenta un patrón de respuesta diferencial a distintos estímulos en comparación con la población linfocitaria CD3⁺CD69⁻.

Las mujeres con ARE presentan una elevada expresión de SLAM en linfocitos T de sangre periférica y al mismo tiempo presentan niveles anormales en la producción de INF γ . Estos resultados preliminares deberían confirmarse para determinar su verdadera implicancia clínica. Asimismo, actualmente se continúan las investigaciones para dilucidar la relación entre SLAM/ producción de INF γ .

Capítulo 3

**Inmunoterapia con leucocitos paternos como tratamiento exitoso para
pacientes con Abortos Recurrentes Espontáneos**

**Estudio de la tasa de éxito y de la modulación de nuevos marcadores
inmunológicos maternos en respuesta a la inmunoterapia**

Inmunoterapia para pacientes con ARE

Existen múltiples causas para explicar los abortos espontáneos y también existen múltiples propuestas terapéuticas para los mismos. Basándose en la guía confeccionada por Sociedad Americana de Inmunología de la Reproducción se han establecido dos grandes grupos de tratamientos para pacientes con ARE según la necesidad o no de “estimular” el sistema inmune materno para generar una respuesta inmune materna protectora (50).

Las terapias **inmunosupresoras** se recomiendan a mujeres que sufren ARE atribuidos a la presencia de algún factor autoinmune asociado. Este grupo de terapias involucra distintos tratamientos con drogas supresoras con el objeto de disminuir la generación de autoanticuerpos.

En cambio, en pacientes con ARE sin etiología autoinmune asociada y que a pesar de embarazos previos no han generado actividad bloqueante del CML, se ha sugerido el empleo de terapias **inmunoestimuladoras** como la inmunoterapia con inmunoglobulina intravenosa o con leucocitos paternos (50,65,67-70).

Las suposiciones que fundamentan esta forma de inmunoterapia son:

- 1) Existe una respuesta inmune materna mediada por células hacia antígenos fetales que debe ser bloqueada.
- 2) En embarazos exitosos la generación de factores bloqueantes previenen la respuesta materna mediada por células.
- 3) En ausencia de factores bloqueantes ocurre una reacción materna de rechazo hacia el feto.

Los primeros reportes sobre el empleo de la inmunoterapia para el tratamiento con ARE son de comienzos de la década del 80, seguidos por un gran número de estudios sugiriendo porcentajes de éxito que oscilaban entre 70 a

entre 70 a 80%. Sin embargo otros grupos han mostrado grandes discrepancias con estos resultados. Coulan y Clark (41) mostraron que pacientes de un grupo control sin tratamiento tenían una tasa de éxito del 31% comparando con el 60% en pacientes que recibieron placebo (solución salina o leucocitos autólogos), mientras que Ho et al en una población China étnicamente homogénea, encontraron que el número de bebés nacidos no era estadísticamente distinto entre el grupo control y el grupo inmunizado (164).

Esta variación hace extremadamente difícil comparar los resultados entre distintos grupos. Asimismo, implica seleccionar cuidadosamente los grupos de pacientes y controles a ser evaluados, evitando que las distintas variables afecten significativamente el éxito de la inmunoterapia (165). Entre los factores que deben ser estandarizados debemos mencionar:

- el número de abortos previos
- la edad materna
- presencia de Acs. leucocitotóxicos
- presencia de FB del CML
- número de pacientes en cada grupo a estudiar
- presencia de fenómenos autoinmunes asociados

La aloinmunización para el tratamiento de ARE continúa siendo controvertida debido a la falta de ensayos doble ciego al azar que permitan evaluar su efectividad. En 1996 se realizó un meta-análisis colaborativo a nivel mundial en el que participaron 15 centros de distintos lugares del mundo, el cual mostró que la inmunización con leucocitos alogénicos es un tratamiento efectivo para ARE que incrementa la tasa de embarazo a término en un 8 a 10% en las parejas afectadas (166). Este fue el primer estudio multicéntrico realizado con los

parámetros mencionados estandarizados y con suficiente cantidad de pacientes como para un estudio poblacional.

En el presente trabajo se compararon las tasas de nacimientos de pacientes con ARE con o sin tratamiento con leucocitos paternos. De este modo se reportó por primera vez la tasa de éxito de un grupo control de pacientes con ARE que no recibieron inmunoterapia y al mismo tiempo se correlacionó el éxito del tratamiento con la generación de FB del CML.

Pacientes y grupos controles estudiados

Pacientes: se incluyeron 92 parejas con al menos 2 abortos espontáneos (media 2.6 abortos), con una edad materna media de 34.7 años (rango de 26 a 43 años). De este grupo, 79 nunca tuvieron un embarazo a término (**abortadoras primarias**) y 13 tuvieron un hijo previo a los abortos sufridos (**abortadoras secundarias**).

Grupos controles: se incluyeron 37 pacientes con ARE que no recibieron inmunoterapia con leucocitos paternos. Este grupo presentó una media en el número de abortos previos de 3.0 y la edad materna media fue de 32.6 años (rango: 24 a 40 años) (ver Tabla I). Todas las pacientes con ARE siguieron los requisitos especificados en el Capítulo 1.

Este grupo se dividió en 2 subgrupos según la presencia o ausencia de FB del CML, entonces: grupo A) fue representado por 20 pacientes con FB del CML en el momento del diagnóstico y grupo B) representado por 17 pacientes con ausencia de FB del CML.

Ambos grupos fueron seleccionados al azar y no mostraron diferencias significativas en el número de abortos previos o en la edad materna, cuando se analizaron estadísticamente por el test de Student.

	Mujeres Inmunizadas			Mujeres no inmunizadas		
	Rango	Media	SD	Rango	Media	SD
Edad Materna (años)	26-43	34.7	5.1	24-40	32.6	4.2
Número de abortos sufridos	2-5	2.6	0.88	2-4	3	0.73

Tabla I: Valores de las medias, rangos y desvíos estándares de las mujeres con ARE que recibieron o no inmunoterapia.

Inmunoterapia con leucocitos paternos como tratamiento exitoso para pacientes con ARE

En el presente estudio se inmunizaron 92 parejas con ARE: 79 abortadoras primarias (AP) y 13 secundarias (AS). Cuarenta y cuatro de las PA (56%) lograron un embarazo luego de la inmunoterapia. Dentro de este grupo 39 de ellas (89%) tuvieron un embarazo a término o mayor a las 20 semanas de gestación, mientras que solamente 5 de ellas (11%) experimentaron un nuevo aborto espontáneo. En cuanto a las AS, el 78% logró un nuevo embarazo y 9 de ellas (90%) tuvieron un embarazo exitoso. (Tabla II).

	Pacientes con ARE		
	Primarias n=79	Secundarias n=13	Total n=92
Pacientes con ARE que lograron un nuevo embarazo	44 (56%)	10 (78%)	54 (58%)
Embarazos exitosos	39 (89%)	9 (90%)	43 (89%)

Tabla II: Tasa de éxito de pacientes con ARE inmunizadas con leucocitos paternos.

**Generación de Factores Bloqueantes del CML en respuesta a la
inmunoterapia**

La tasa de éxito del grupo en estudio y del grupo control se correlacionó según la presencia o ausencia de FB del CML. De las 92 pacientes incluidas en el estudio se obtuvieron los porcentajes de actividad bloqueante generada luego de la aloinmunización en 87 de ellas. La asociación entre la inmunoterapia y la generación de FB del CML fue altamente significativa (* $p=0.0041$, test de Student).

De las 69 pacientes tratadas que desarrollaron FB del CML luego del tratamiento 40 (56%) lograron un nuevo embarazo de las cuales 35 (87.5%) lo concluyó. Las pacientes que no generaron FB del CML tuvieron una tasa de éxito similar (Tabla III). Durante el seguimiento del grupo de 37 pacientes no inmunizadas, 17 lograron un nuevo embarazo (46%) y 12 de ellas pudieron finalizarlo con éxito (71%). Once pacientes del grupo control (55%) con FB del CML preformados lograron un nuevo embarazo y 8 de ellas (73%) tuvo éxito. Por otra parte, 6 de las pacientes controles con ausencia de FB del CML (35%) lograron un embarazo y de ellas 4 (64%) tuvieron éxito (Tabla III).

	Pacientes con ARE			Grupo Control		
	sin FB del CML n=18	con FB del CML n=69	Total n=87*	sin FB del CML n=17	con FB del CML n=20	Total n=37
Pacientes con ARE que lograron un embarazo	9 (50%)	40 (56%)	49 (56%)	6 (35%)	11 (55%)	17 (46%)
Embarazos a término	8 (89%)	35 (87.5%)	43 (88%)	4 (64%)	8 (73%)	12 (71%)

*El total de pacientes con ARE fue 92, pero no se pudo obtener los datos de la actividad bloqueante de 5 de ellas.

Tabla III: Tasa de éxito del grupo control y de mujeres con ARE inmunizadas con leucocitos paternos.

Dentro del grupo correspondiente de las 44 pacientes AP inmunizadas que tuvieron éxito se correlacionó la tasa de éxito con el número de abortos previos sufridos. Como se describe en la tabla IV la tasa de éxito de las pacientes que presentaron 2 abortos previos fue de 95.4% en comparación con el 80% obtenido en el grupo no inmunizado. Del mismo modo, la tasa de éxito para las mujeres inmunizadas que sufrieron 3 o más abortos fue de 81.8% *vs* 66.6% en el grupo control.

Posteriormente, se estudió la sobrevida fetal luego de finalizado el tratamiento en función de la presencia o ausencia de FB del CML. Como se muestra en la Tabla V, tanto las mujeres inmunizadas que generaron FB del CML, como las que no lo hicieron, tienen tasas de éxitos y de abortos similares (82% y 83% respectivamente).

	Grupo inmunizado		Grupo control	
	2 abortos	3 o más abortos	2 abortos	3 o más abortos
Embarazos exitosos	21	18	4	8
Abortos	1	4	1	4
Tasa de éxito	95.4%	81.8%	80%	66.6%

Tabla IV: Tasa de éxito en pacientes abortadoras primarias inmunizadas analizado según el número de abortos sufridos previamente.

	Nacimientos n=43*	Abortos n=6
Presencia de FB del CML	35 (82%)	5(83%)
Ausencia de FB del CML	8 (19%)	1(17%)

*El total de nacimientos fue de 48, pero de cinco pacientes no se obtuvo la información correspondiente a la actividad bloqueante del CML.

Tabla V: Relación entre la generación de FB del CML y el éxito de la inmunoterapia.

Modulación de la respuesta alogénica en pacientes que lograron un nuevo embarazo luego de la inmunoterapia con leucocitos paternos

Como se describió previamente, existen distintos mecanismos en la interfase materno-fetal para controlar la respuesta celular materna frente a aloantígenos, es por ello que resulta de interés evaluar como se modifica la alorespuesta materna en función de las sucesivas inmunizaciones.

Con tal motivo se cuantificó la proliferación, en valores absolutos, de los linfocitos T maternos en respuesta a la estimulación paterna observada en el CML. Se obtuvieron básicamente 2 patrones de modulación de respuesta alogénica materna (Figura 1).

El primer patrón muestra un aumento tanto en el porcentaje de bloqueo como en la respuesta alogénica materna con las sucesivas inmunizaciones recibidas. En el segundo patrón la respuesta alogénica disminuye y aumenta el porcentaje de bloqueo. Como se observa en la Tabla VI, el 60 % de las parejas mostraron el patrón 1 y el 40% restante el patrón 2. La inmunización con leucocitos paternos genera en el 60% de las mujeres un aumento de la respuesta alogénica, o sea un aumento de los clones alogénicos.

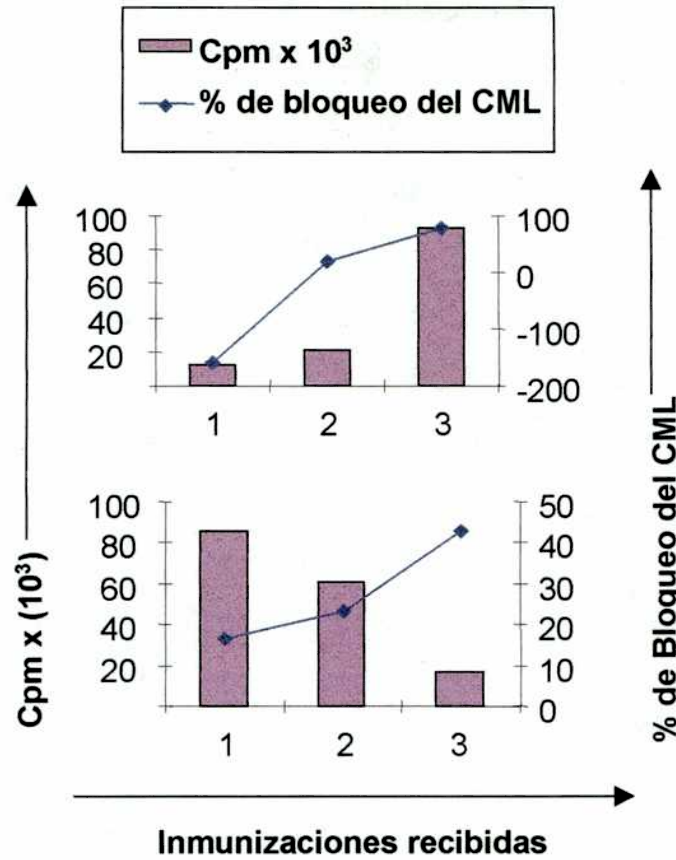


Figura 1: Modulación de la respuesta alógena materna y de la actividad bloqueante en pacientes con ARE que lograron un nuevo embarazo luego de la inmunoterapia. Células MNT respondedoras de mujeres con ARE (1×10^5 células/ml) y células estimuladoras paternas tratadas con mitomicina (1×10^5 células/ml) se cocultivaron en una placa de 96 pocillos, en presencia y en ausencia del suero materno. Luego de 5 días, se adicionó $[^3\text{H}]\text{TdR}$ por 18 hs y su incorporación se determinó utilizando un contador de centelleo líquido β . Los resultados representan las cpm \pm SEM (valores absolutos) de las determinaciones realizadas por triplicado. Los resultados son ejemplos representativos de 2 patrones encontrados en 30 parejas estudiadas.

Modificación de la respuesta Alógena	N° de pacientes que presentan dicho fenómeno
Aumento	18 (60 %)
Disminución	12 (40 %)
Total	30

Tabla VI: Modificación de la respuesta alógena absoluta en pacientes con ARE que lograron un nuevo embarazo, luego de recibir inmunoterapia con leucocitos paternos.

Posteriormente, se investigó la modulación de la respuesta alogénica de las pacientes con ARE que tuvieron éxito o que fracasaron luego del tratamiento con leucocitos paternos. Con tal motivo se cuantificó la respuesta materna a la estimulación paterna antes y después de la inmunoterapia. Además, para independizarnos de posibles variables de los CML realizados en distintos tiempos se compararon los Índices de Respuesta alogénica, obtenidos de la siguiente forma:

Índice de la respuesta alogénica materna:

Media de las cpm de la respuesta alogénica materna/
Media de las cpm respuesta autóloga materna

Como puede observarse en la Figura 2, 18 (72%) de las 25 pacientes con ARE que tuvieron éxito presentaron un aumento de la respuesta alogénica a diferencia de las pacientes que sufrieron un nuevo aborto, quienes en solo 2 de 6 (33.3%) se observó dicho comportamiento. Por el contrario, 6 de 25 (24%) pacientes que tuvieron éxito presentaron una disminución en los índices de la respuesta alogénica materna al finalizar la inmunoterapia.

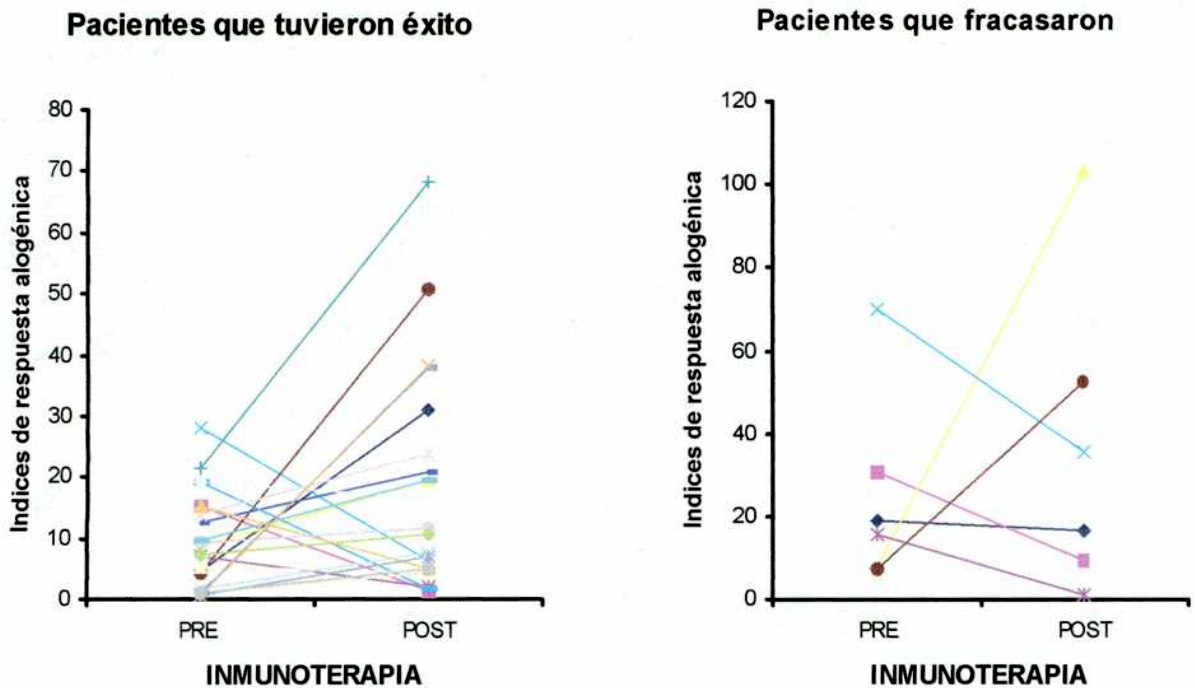


Figura 2: Índices de la respuesta alogénica materna en pacientes con ARE que tuvieron éxito o fracasaron luego de la inmunoterapia. Células MNT respondedoras de mujeres con ARE (1×10^5 células/ml) y células estimuladoras paternas tratadas con mitomicina (1×10^5 células/ml) se cocultivaron en una placa de 96 pocillos. Como control autólogo se cocultivaron MNT respondedoras y estimuladoras maternas. Luego de 5 días, se adicionó $[^3\text{H}]\text{TdR}$ por 18 hs y su incorporación se determinó utilizando un contador de centelleo líquido β . Los resultados representan los índices de la respuesta alogénica de 25 mujeres que tuvieron éxito y de 6 que sufrieron un nuevo aborto luego del tratamiento.

Número de leucocitos paternos y de inmunizaciones requeridas para la seroconversión del CML

Un análisis realizado en mujeres con ARE que recibieron células mononucleares paternas en una sola inyección vía intradérmica, subcutánea e intravenosa, mostró que dosis bajas ($50-300 \times 10^6$) o medias ($300-500 \times 10^6$) de células tienen una tasa de éxito significativamente mayor (57%) que las que recibieron altas dosis ($500-2700 \times 10^6$) de células (41%) (167).

Estos datos sugieren que existe una dosis óptima de células que oscila entre 100 a 550×10^6 para inducir una respuesta protectora materna.

En un grupo de 85 parejas que generaron actividad bloqueante del CML luego de la inmunoterapia se analizó la frecuencia de seroconversión en función del número de inmunizaciones recibidas (ver Figura 3 y Tabla VII).

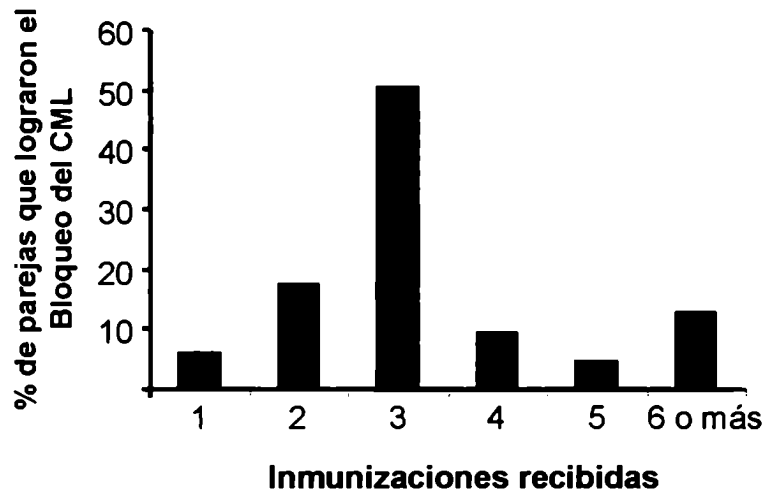


Figura 3: Generación de actividad bloqueante en función de las inmunizaciones recibidas. En un grupo de 85 parejas con ARE se obtuvo el porcentaje de las mismas que seroconvirtieron el CML en función de las inmunizaciones recibidas.

Nº de parejas	Nº de MNT paternos inyectadas
5 (5.9%)	1 dosis (80 - 120 10^6)
15 (17.6%)	2 dosis (160 - 240 10^6)
42 (49.4%)	3 dosis (240 - 360 10^6)
8 (9.4%)	4 dosis (320 - 480 10^6)
4 (4.7%)	5 dosis (400 - 600 10^6)
8 (9.4%)	6 dosis (480 - 720 10^6)
1 (1.2%)	7 dosis (560 - 840 10^6)
1 (1.2%)	8 dosis (640 - 960 10^6)
1 (1.2%)	9 dosis (720 - 108 10^7)

Tabla VII: Número de células MNT paternas necesarias para generar bloqueo del CML en pacientes con ARE.

El 73% de las parejas seroconvirtieron el CML luego de la tercera inmunización que corresponde a recibir $240-360 \times 10^6$ linfocitos paternos. Dichos resultados son concordantes con la dosis óptima reportada (167). Por otra parte, la mayoría de las mujeres inmunizadas fueron capaces de generar actividad

bloqueante del CML luego de la sexta inmunización, salvo 3 de 85 pacientes que requirieron inmunizaciones adicionales.

DISCUSIÓN

El uso de la inmunoterapia con células paternas mononucleares para el tratamiento de pacientes con ARE, todavía presenta controversias (50,65,67-70). En el presente estudio se observó un 89% de éxito luego de la inmunoterapia. Si bien este valor no es diferente significativamente al encontrado en el grupo control de pacientes con ARE no inmunizadas, la diferencia absoluta entre ambos grupos es 18%. Esta diferencia es superior a aquellos resultados obtenidos en un meta-análisis colaborativo internacional (166). Por otra parte, la tasa de éxito en pacientes con 2 abortos previos es superior a la encontrada en pacientes con 3 o más abortos, sin embargo, estas pacientes también pueden favorecerse con la aloinmunización paterna.

Uno de los mayores problemas cuando se estudia el éxito de un tratamiento es indudablemente la falta de grupos controles sin tratamiento para su comparación. Sin embargo, en este trabajo se incluyeron 2 grupos de parejas que no recibieron inmunización con leucocitos paternos. El primer grupo no se le indicó este tipo de terapia, ya que presentaron FB del CML al momento del diagnóstico y el segundo grupo a pesar de carecer de FB del CML decidieron no realizar el tratamiento. Como pudo observarse, la tasa de éxito en el primer grupo fue superior al compararse con el segundo (73% y 64%). Por otra parte, la respuesta a la inmunoterapia en pacientes con 2 o más abortos consecutivos mostraron tasas de éxito similares. Sin embargo es interesante destacar que la tasa natural de éxito en mujeres con 2 y 3 abortos (o más) es elevada.

Algunos investigadores han reportado que la presencia de FB del CML esta asociado a un embarazo exitoso (41-44). Por otra parte, se demostró en el Capítulo 1 que existe una correlación entre la generación de FB del CML y el Cross-match por citometría de flujo (83). Sin embargo este último solamente permite predecir la actividad bloqueante basándose en la presencia de anticuerpos. Por tal motivo se utilizó a la actividad bloqueante medida en el CML como parámetro, incluyendo de este modo el bloqueo producido por otros factores solubles, como citoquinas y quimioquinas. Los presentes resultados muestran que tanto las mujeres que lograron un embarazo exitoso o las que sufrieron un nuevo aborto luego de la aloinmunización fueron capaces de generar FB del CML, sugiriendo que podrían representar un epifenómeno (41-44,49,51). Sin embargo, en este último caso debería descartarse que el fracaso este asociado con alteraciones genéticas o aberraciones cromosómicas, ya que no se dispone del material de aborto en la mayoría de los casos. La búsqueda de la naturaleza de mediadores de un embarazo exitoso continúa abierta, por lo tanto la presencia de FB del CML todavía resulta útil como parámetro para el seguimiento de las pacientes con ARE.

El conjunto de resultados mostrando que la inmunoterapia con leucocitos paternos aumenta la tasa de éxito en pacientes con ARE y la respuesta alógena materna, sugieren la estimulación de clones T y/o factores solubles responsables de inducir una respuesta Th2 en la decidua materna en un próximo embarazo. Si bien este aumento de la respuesta alógena materna se evidencia a nivel sistémico, podrían activarse células regulatorias las cuales, a través de una migración dirigida hacia el útero, provocarían cambios en la decidua materna permitiendo un nuevo embarazo exitoso. Por lo tanto el hecho de generar

linfocitos aloreactivos durante la inmunización no implica que éstos tengan efectos deletéreos en un nuevo embarazo, por el contrario, podrían contribuir a la tolerancia feto-placental (168-169). De hecho, el 72% de pacientes con ARE que tuvieron éxito luego del tratamiento aumentaron la respuesta alogénica a deferencia de las pacientes que fracasaron (33%).

Uno de los posibles mecanismos responsables de la ignorancia materna hacia Ags. paternos fueron descritos por Tafuri et al (170), quienes en ratas preñadas revelaron una disminución en el número de clones T cuyos receptores reconocían determinantes alotípicos paternos. Sin embargo estos cambios no podían ser detectados fenotípicamente por la baja frecuencia de estos clones en el repertorio T normal. A pesar de esta disminución dichos clones permanecían durante la preñez, pero presentaban una disminución de la expresión de las moléculas de CD4 o CD8, postulando a este mecanismo como responsable de la ignorancia materna.

**Estudio de nuevos marcadores para el seguimiento de pacientes con ARE
bajo tratamiento con leucocitos paternos**

Los resultados mostrados sugieren que los FB del CML podrían representar un epifenómeno asociado a un embarazo exitoso más que la causa del mismo, lo cual implica la necesidad de evaluar la efectividad de la aloinmunización a través de nuevos parámetros inmunológicos. Con tal propósito se estudió la modulación de RANTES, SLAM y la población CD69⁺CD3⁺ de pacientes con ARE presentados en los capítulos 1 y 2.

Pacientes con ARE estudiadas

Se incluyeron pacientes con ARE que siguieron los requisitos detallados en el Capítulo 1.

La inmunoterapia consistió en suspensiones de leucocitos paternos inyectados intradérmicamente. El número de inyecciones (usualmente entre 4 y 6) depende de la capacidad de la mujer de generar actividad bloqueante en el CML, capaz de suprimir el 50% de la capacidad aloestimuladora del esposo. Los donantes siguieron los criterios detallados en la sección de Materiales & Métodos.

Modulación de los niveles de RANTES en respuesta a la inmunoterapia

Como se ha descrito en el capítulo 1, tercera sección, los sueros obtenidos de mujeres fértiles presentan niveles significativamente mayores de RANTES en comparación con los de pacientes con ARE. Además, se evidenció una correlación entre los niveles de RANTES sérico y la producción de FB del CML. Dado que la inmunoterapia con leucocitos paternos induce la generación de FB del CML (47-50), investigamos la modulación de RANTES en respuesta al tratamiento. Para

inmunoterapia con leucocitos paternos induce la generación de FB del CML (47-50), investigamos la modulación de RANTES en respuesta al tratamiento. Para ello se determinaron de los niveles de RANTES en sueros de pacientes obtenidos previa y posteriormente a la inmunoterapia con leucocitos paternos. Como se describe en la Figura 4, 13 de 17 pacientes estudiadas mostraron un aumento en la producción de RANTES sérico luego de la inmunoterapia ($*p < 0.05$, test de Mann Withney). Este resultado indicaría que la producción de RANTES aumenta luego de un embarazo exitoso e incluso luego de la inmunización con leucocitos paternos.

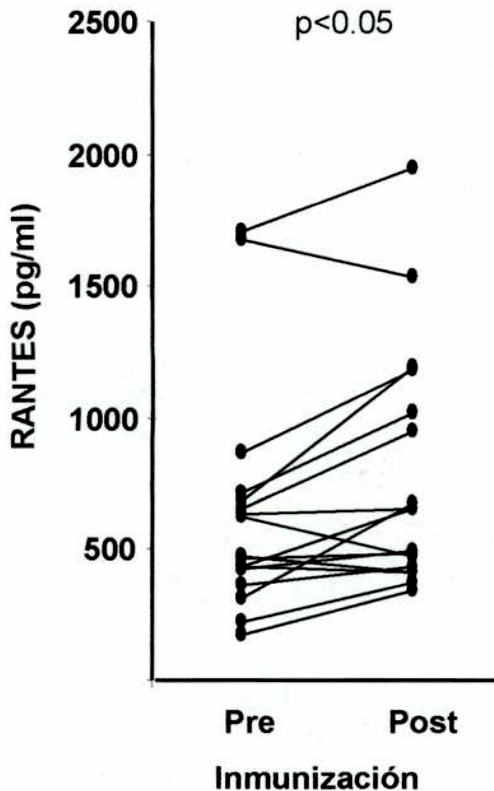


Figura 4: Modulación de los niveles de RANTES luego de la aloinmunización en pacientes con ARE. Se cuantificaron los niveles de RANTES sérico por la técnica de ELISA en 17 pacientes con ARE previa y posteriormente al tratamiento con leucocitos paternos. Los resultados se expresan como la media en (pg/ml). La producción de RANTES aumenta significativamente luego de la inmunoterapia ($p < 0.05$ test de Mann Withney).

Por otra parte, se ha descripto que el tratamiento de pacientes con ARE con leucocitos paternos aumenta la generación de factores supresores identificados como RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β en sobrenadantes provenientes de células CD8⁺ enriquecidos (132).

El conjunto de estos resultados muestran que la aloinmunización en pacientes con ARE induce un aumento sistémico de RANTES y una supresión de la respuesta alógena dependiente de la dosis, sugiriendo que esta β -quimioquina no solamente actuaría como un FB del CML, sino que también podría funcionar como parámetro en el seguimiento de las pacientes con ARE.

Modulación de la población CD3⁺CD69⁺ en respuesta a la inmunoterapia con leucocitos paternos

En el capítulo 2, se identificó una población CD3⁺CD69⁺ en sangre periférica de pacientes con ARE con características particulares fenotípicas y funcionales. Asumiendo que la expresión intracitoplasmática en células T representa un marcador para el diagnóstico de ARE, se estudió su modulación en respuesta a la aloterapia.

Para ello se estudió la frecuencia de células CD3⁺CD69⁺ por citometría de flujo, en 11 pacientes con ARE previo y posteriormente al tratamiento con leucocitos paternos. Como se muestra en la Figura 5A, todas las pacientes estudiadas disminuyeron significativamente los porcentajes de células CD3⁺CD69⁺ luego del tratamiento con leucocitos paternos (* $p < 0.005$, test de Mann Whitney). En la Figura 5B se muestra un ejemplo representativo en donde los linfocitos CD69⁺CD3⁺ disminuyen progresivamente con las sucesivas inmunizaciones (de 29% a 17% luego de la 3era. dosis, alcanzando un 9% luego de la 6ta. inmunización).

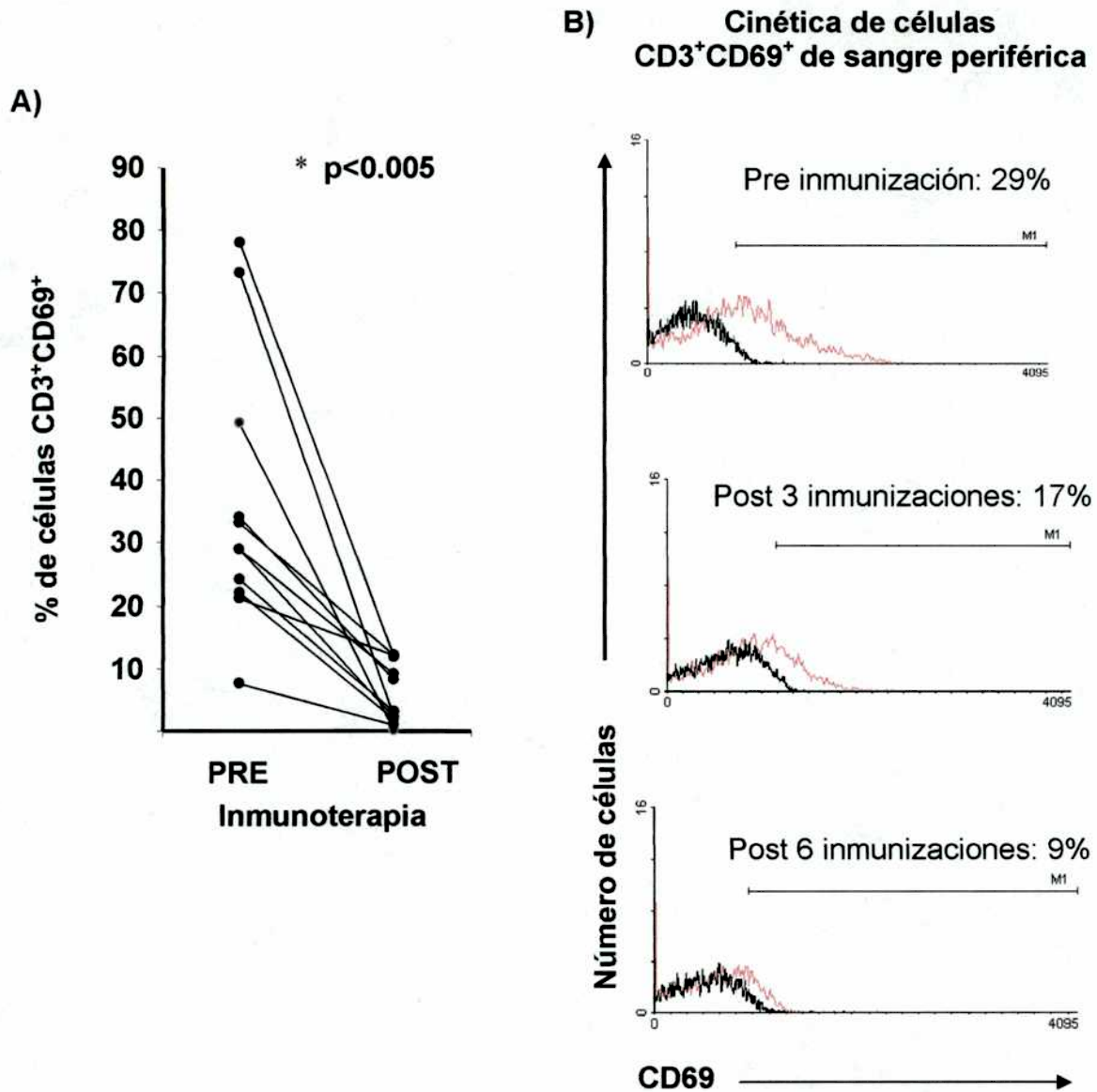


Figura 5: Modulación de células CD3⁺CD69⁺ en respuesta a la inmunoterapia. (A) las células MNT de pacientes con ARE obtenidas previa y posteriormente a la inmunoterapia con leucocitos paternos, se marcaron en superficie con un Ac. anti-CD3 PreCP e intracitoplasmáticamente con un Ac. anti-CD69 FITC. Los porcentajes mostrados fueron obtenidos dentro de la ventana seleccionada electrónicamente para células CD3⁺. Todas las pacientes con ARE (n=11) disminuyeron la expresión de células CD3⁺CD69⁺ luego del tratamiento (**p*<0.05, test de Mann Withney). (B) Ejemplo de representativo de la cinética de las células CD3⁺CD69⁺ durante la inmunoterapia en una paciente con ARE.

Estos resultados indican que la inmunización con leucocitos paternos logra revertir los altos porcentajes de células CD3⁺CD69⁺ en mujeres con ARE alcanzando los niveles observados en las mujeres fértiles, otorgando a esta

población un nuevo rol como marcador útil para el seguimiento de la respuesta materna a la inmunoterapia con leucocitos paternos.

Durante un embarazo normal, ciertos clones T se acumulan en la periferia durante el primer trimestre, alcanzando su pico máximo durante el segundo trimestre y desaparecen durante en el tercero (168). En cambio en mujeres con ARE se observó oligoclonalidad de células T en periferia. Interesantemente, la inmunoterapia con leucocitos paternos en pacientes con ARE genera una expansión clonal T altamente heterogénea como la observada en mujeres fértiles (169). Estas evidencias en el contexto de los resultados aquí mostrados, podrían interpretarse como que la aloinmunoterapia regularía una población putativamente expandida con baja oligoclonalidad.

Modulación de la expresión de SLAM en pacientes con ARE en respuesta a la inmunoterapia con leucocitos paternos

En el capítulo 2, se describió que las pacientes con ARE presentan una mayor expresión de SLAM en linfocitos T de sangre periférica en comparación con mujeres fértiles.

En esta sección, se estudió la modulación de los linfocitos T CD3⁺SLAM⁺ en pacientes con ARE previa y posteriormente al tratamiento con leucocitos paternos. Como se muestra en la Figura 6A, las pacientes estudiadas disminuyeron los porcentajes de células CD3⁺SLAM⁺ luego del tratamiento, aunque esta disminución no fue significativa. En la Figura 6B se muestran ejemplos representativos en donde los linfocitos CD3⁺SLAM⁺ disminuyen finalizada la inmunoterapia.

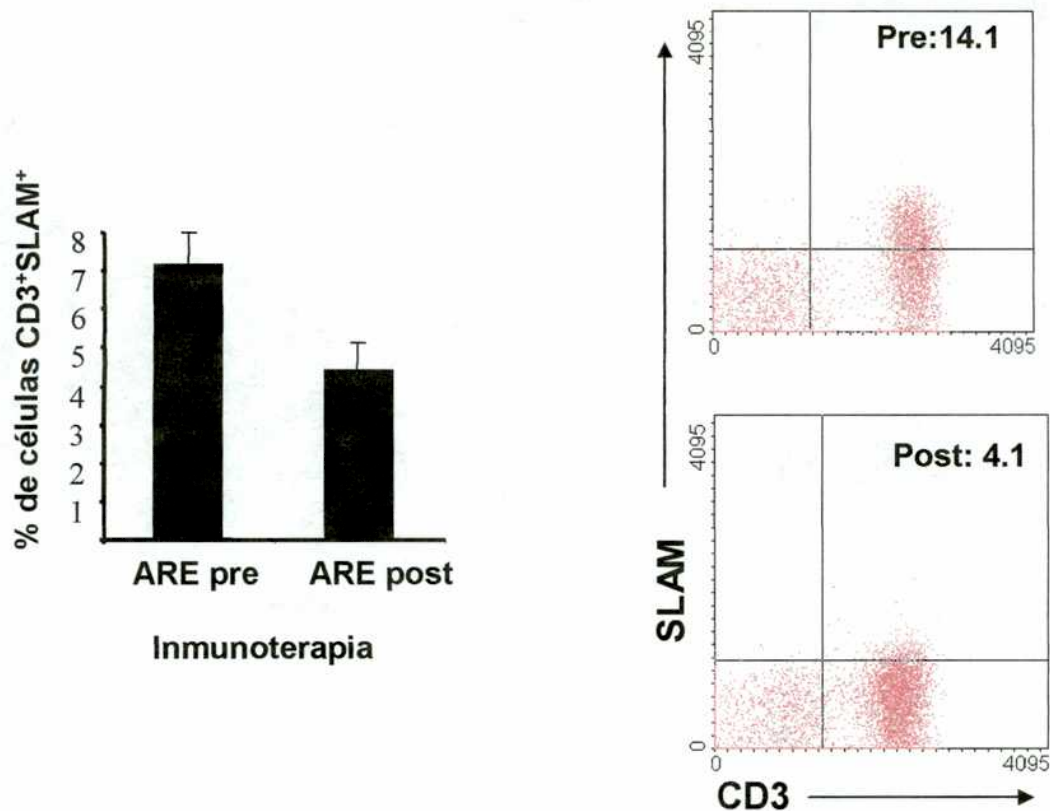


Figura 6: Modulación de linfocitos CD3⁺SLAM⁺ de sangre periférica de pacientes con ARE. Se determinó la expresión de SLAM en células T de sangre periférica de pacientes con ARE previa y posteriormente a la inmunoterapia con leucocitos paternos, utilizando un Ac. anti-SLAM PE y un Ac. CD3 FITC **(A)**. Los porcentajes de células SLAM⁺ fue determinado dentro de una ventana de trabajo correspondiente a células CD3⁺, seleccionada electrónicamente y se expresan como la media \pm DS. El análisis incluyó 20 pacientes con ARE pre y 10 post inmunoterapia. En **(B)** se muestran ejemplos representativos de una paciente con ARE previo y otra post tratamiento. Los porcentajes indican las células CD3⁺SLAM⁺.

Estos resultados indican que la inmunización con leucocitos paternos tienden a disminuir los porcentajes de linfocitos T SLAM⁺ llevándolos a los niveles observados en las mujeres fértiles.

La expresión aumentada de SLAM en endometrio y en sangre periférica podría representar la presencia de clones con funciones deletéreas o potencialmente aloreactivos. Pero también podría representar la activación de nuevos clones T necesarios para lograr un embarazo exitoso. Actualmente se esta investigando si el reconocimiento de aloantígenos inducido por la inmunoterapia

generaría una disminución de posibles células T deletéreas o bien la activación de otras poblaciones de linfocitarias necesarias para mantener la sobrevida fetal.

CONCLUSIONES

GENERALES

Una de las hipótesis actuales para explicar la sobrevida fetal, sugiere que los FB del CML tendría un papel relevante en la inducción de la tolerancia materno-fetal y potencialmente podrían utilizarse para prevenir abortos recurrentes.

A este respecto concluimos que tanto los Acs. leucocitotóxicos (evidenciados en el CMXC) y los inhibidores de la respuesta alógena (evidenciados en el CML), son más frecuentes en el suero de mujeres fértiles que en las mujeres con ARE. Sin embargo el hecho que estén presentes en el 26% de las mujeres con ARE, y estén ausentes en el 10% de las mujeres con embarazos exitosos, respectivamente, sugieren que ambos parámetros representan una respuesta al embarazo más que la causa del mismo.

Dada la naturaleza desconocida de los FB del CML, el siguiente paso consistió en la identificación de los mismos utilizando como modelo *in vitro* el CML. Así fue como identificamos a Gal-1 y a RANTES como factores supresores de la respuesta autoinmune. La supresión inducida en ambos casos fue dependiente de la dosis y en el caso de Gal-1 también de la unión a carbohidratos. El estudio de los mecanismos moleculares y celulares reveló que Gal-1 y RANTES inducían apoptosis de células T activadas durante una respuesta alógena normal, a través de la modulación de los niveles proteicos de Bcl-2 y transmitiendo señales de inhibición/muerte vía la activación de caspasas y el caso de RANTES además de mecanismos independientes de caspasas. La inhibición inducida por Gal-1 estaría regulada por señales mediadas por la IL-2 sobre las células T y según la cinética de expresión de Gal-1 endógena durante la respuesta alógena, esta podría tener un rol durante la fase efectora de la respuesta.

Por su parte, los niveles disminuidos de RANTES en el suero de mujeres con ARE con respecto a mujeres fértiles, y su significativa correlación con los FB del CML apoyan la idea de que RANTES podría actuar como un FB activo en la respuesta alógena materna. Más aún, sueros conteniendo FB del CML son capaces de inducir mayores porcentajes de apoptosis comparados con los obtenidos con sueros sin actividad bloqueante; así como también el Ac. específico anti-RANTES es capaz de revertir la inhibición de la proliferación y los niveles de apoptosis inducida por sueros con FB del CML. Estas evidencias avalan el rol de RANTES como un FB del CML activo en el contexto de la respuesta alógena.

Sin embargo, como se mencionó previamente, la ausencia de FB del CML en una minoría de mujeres fértiles, nos llevó a la búsqueda de nuevos marcadores para pacientes con ARE. Así, se identificó la población $CD3^+CD69^{\text{intracitoplasmático}}$ en sangre periférica y en endometrio de pacientes con ARE con características fenotípicas y funcionales particulares. Esta subpoblación de linfocitos T $CD3^+CD69^+$ está distribuida homogéneamente entre ambas subpoblaciones de memoria, central y efectora, y representada tanto por linfocitos $CD4^+$ como por $CD8^+$. Su capacidad proliferativa hiporeactiva frente a diversos estímulos y su selectiva producción de IL-10 frente a estímulos alógenos, sugieren una función regulatoria. Del mismo modo, se evidenció un aumento significativo en la expresión de SLAM específicamente en linfocitos T y en células endometriales de mujeres con ARE con respecto a mujeres fértiles. La producción aumentada de $INF\gamma$ por los linfocitos T endometriales y de sangre periférica de mujeres fértiles a estímulos policlonales, podría relacionarse con su capacidad para favorecer la neovascularización necesaria durante el proceso de decidualización. El estudio de las presentes poblaciones

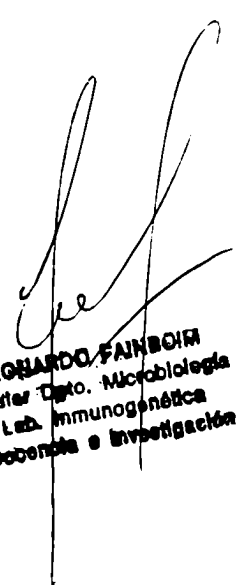
celulares y de sus posibles funciones regulatorias /supresoras continúa abierto, implicando cada una de ellas grandes ramas de investigación.

En el presente trabajo, no solamente se investigaron diversos mecanismos inmunológicos involucrados en el rechazo fetal, sin que también se buscó ofrecerles a las pacientes con ARE un tratamiento efectivo para su patología. Así, se investigó la efectividad de la inmunoterapia con leucocitos paternos utilizando diversos grupos controles y rigor estadístico correspondientes a un estudio poblacional. Este análisis reveló que la tasa de éxito luego de la inmunoterapia con leucocitos paternos es de 89%. Si bien este valor no es diferente significativamente al encontrado en el grupo control de pacientes con ARE no inmunizadas, la diferencia absoluta entre ambos grupos es 18%. Además, la tasa de éxito en pacientes con 2 abortos previos es superior a la encontrada en pacientes con 3 o más abortos, sin embargo, estas pacientes también pueden favorecerse con la aloinmunización paterna. Cuando se correlacionó el éxito de un nuevo embarazo con la generación de FB del CML, tanto las mujeres que lograron un embarazo exitoso o las que sufrieron un nuevo aborto, luego de la aloinmunización, fueron capaces de generar FB del CML sugiriendo que podrían representar un epifenómeno. De lo cual se desprende la búsqueda de nuevos marcadores para el seguimiento de pacientes con ARE bajo tratamiento.


De este modo se evidenció que la aloinmunización en pacientes con ARE induce un aumento sistémico de RANTES, revierte los altos porcentajes de células CD3⁺CD69⁺ en mujeres con ARE alcanzando los niveles observados en las mujeres fértiles y tienden a disminuir los porcentajes de linfocitos T SLAM⁺ llevándolos a los niveles observados en las mujeres fértiles. Estos resultados, al igual que el aumento de la respuesta alógena materna en el 72% de las mujeres con ARE que tuvieron

éxito luego del tratamiento, reflejan una inmunomodulación de clones T y/o factores solubles responsables de cambios sistémicos y en la interfase materno-fetal compatibles con un embarazo exitoso.


Por último, si bien estos parámetros prometen ser reveladores actuando como marcadores útiles para el seguimiento de pacientes con ARE, la identificación de poblaciones regulatorias/supresoras actuando vía interacción célula-célula o a través de la producción de factores solubles continúa abierta.



Dr. LEONARDO FAIBOIM
Prof. Titular Depto. Microbiología
Jefe Lab. Immunogenética
Area Docente e Investigación



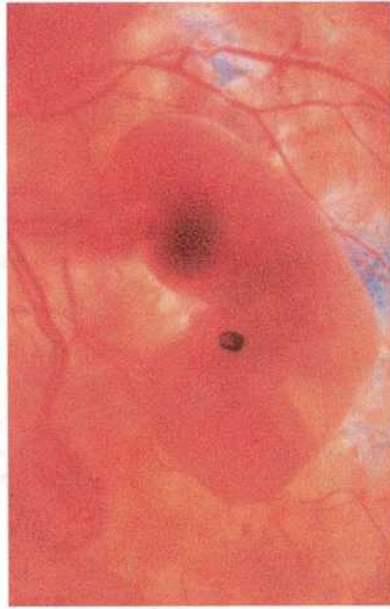
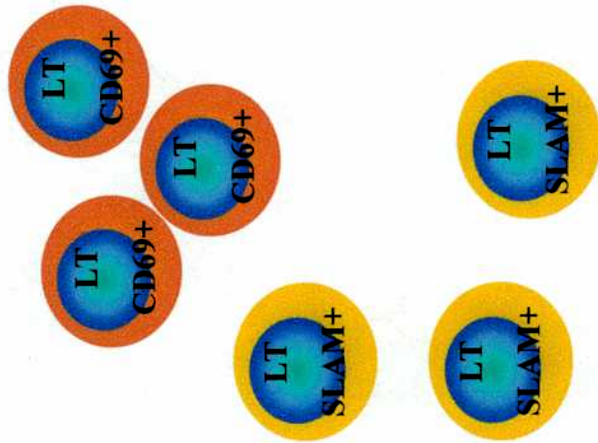
DRA. VERÓNICA GARCÍA
DIRECTOR ASISTENTE



(TESISTA)

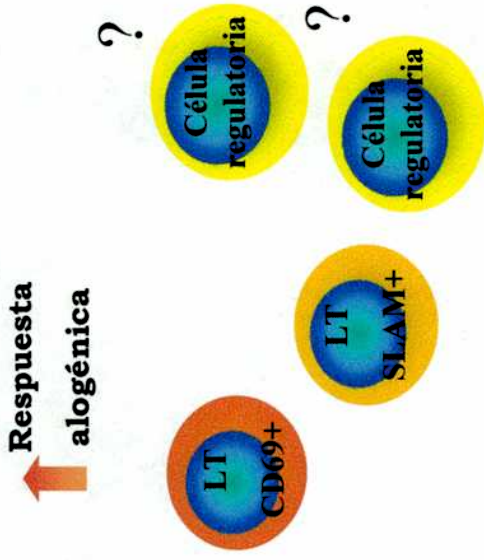
Posibles mecanismos involucrados a nivel sistémico en pacientes con ARE

Pre tratamiento con leucocitos
paternos: tasa de éxito 71%

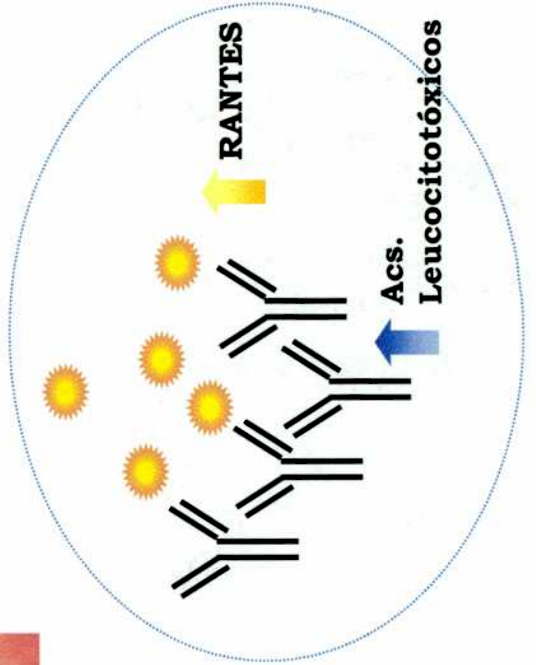
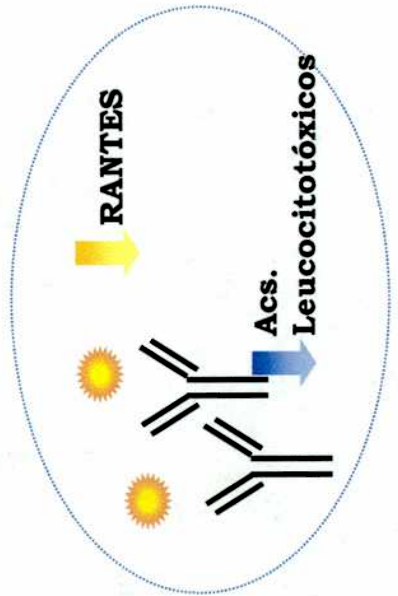


FB del CML

Post tratamiento con leucocitos
paternos: tasa de éxito 89%



Respuesta
alógena



REFERENCIAS

1. Loke YW and King A (1995) Human trophoblast development. In *Human implantation* (Cambridge University Press 1era. Edición)
2. Paria BC, Reese J, Das SK and Dey SK (2002) Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science*. 296:2185-2188
3. Mowbray JF, Gibbings C, Liddell H, Reginald PW, Underwood JL and Beard RW (1985) Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal cells. *Lancet*. 27:941-953
4. Billingham RE and Medwar PB (1953) Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172:603-606
5. Hoskin DW and Murgita RA (1989) Specific maternal anti-fetal lymphoproliferative responses and their regulation by natural immunosuppressive factors. *Clin. Exp. Immunol.* 76:262-267
6. Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A and Heinen E (2000) Tolerance to the foeto-placental "graft": ten ways to support a child for nine months. *Curr. Op. Immunol.* 12:731-737
7. Clark D, Arck P and Chaouat G (1999) Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environment selective pressure expressed at the uterine level. *Am. J. Reprod. Immunol.* 41:5-22
8. Bulmer JN, Longfellow M and Ritson A (1991) Leukocytes and resident blood cells in endometrium. *Ann N.Y.Acad. Sci.* 622:57-68
9. Fainboim L, Satz LM and Geffner J (1999) *Introducción a la inmunología Humana*.(Talleres Gráfica Patricia 4ta. Edición)
10. Raghupathy R (1997) Th1 type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol. Today* 18:478-482
11. Vives A, Balasch J, Yague J, Quintó L, Ordi J and Varrell A (1999) Type-1 and Type-2 cytokines in Human decidual tissue and trophoblasts from normal and abnormal pregnancies detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Am. J. Reprod. Immunol.* 42:361-368
12. Chaouat G, Cayol V, Mairovitz V and Dubanchet S (1999) Localization of TH2 cytokines IL-3, IL-4, IL-10 at the fetomaternal interface during human and murine pregnancy and lack of requirement for Fas/Fas ligand interaction for a successful allogeneic pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 42:1-13
13. Sargent IL, Wilkins T and Redman CW (1988) Maternal immune responses to the fetus in early pregnancy and recurrent miscarriage. *Lancet* 12:1099-1104
14. Chauat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N and Matral J (2002) A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-fetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J. Reprod. Immunol.* 53: 241-253
15. Lachapelle M, Miron P, Hemmings R and Roy D (1996) Endometrial T, B, and NK cells in patients with Recurrent Spontaneous Abortion. *The J. Immunol.* 156:4027-4034

16. Quenby S, Bates M, Doig T, Brewster J, Lewis-Jones D, Johnson P and Vince G (1999) Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage. *Human Reprod.* 9:2386-2391
17. Drake P, Gunn M, Charo I, Tsou C, Huang L and Fisher S (2001) Human placental cytotrophoblasts attract monocytes and CD56 bright Natural Killer cells via the actions of Monocyte Inflammatory Protein 1 alpha. *J. Exp. Med.* 21:1199-1212
18. Sun R, Wei H, Zhang J, Li A, Zhang W and Tian Z (2002) Recombinant human prolactin improves antitumor effects of murine natural killer cells in vitro and in vivo. *Neuroimmunomodulation* 10:169-76
19. Dausset J, Rapaport FT, Colombani J, Feingold N (1965) A leucocyte group and its relationship to tissue histocompatibility in man. *Transplantation* 3:701-5
20. Davis MM and Bjorkman PJ (1989) A model for T cell receptor and MHC/peptide interaction. *Adv. Exp. Med. Biol.* 254:13-6
21. Wucherpfenning KW and Strominger JL (1995) Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human t cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80:695-705
22. Braud V, Allan D and McMichael A (1999) Functions of nonclassical MHC and non MHC encoded class I molecules. *Curr. Op. Immunol.* 11:100-108
23. Borrego V, Jones E and McMichael A (1997) The human major histocompatibility complex class 1b molecule HLA E binds signal sequence derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur. J. Immunol.* 27:1164-1169
24. Gill TJ (1990) Evasive Strategies of Trophoblast Cells: Selective Expression of Membrane Antigens. *Am. J. Reprod. Immunol.* 23:57-63
25. King A, Boockock C, Sharly AM, Gardner L, Beretta A, Siccardi AG and Loke YW (1996) Evidence for the expression of HLA-C class I mRNA and protein by human first trimester trophoblast. *J. Immunol.* 15:2068-2076
26. Proll J, Blaschitz A, Huntter H and Dohr G (1999) First trimester human endovascular trophoblast cells express both HLA-C and HLA-G. *Am. J. Reprod. Immunol.* 42:30-36
27. Pazmany L, Mandelboim O, Valés-Gomez M, Davis D, Reyburn H and Strominger J (1996) Protection from Natural Killer Cell-Mediated Lysis by HLA-G Expression on Target Cells. *Science* 274:792-795
28. Beer A, Quebberman J, Ayers J and Haines RF (1981) Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortions in humans. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 141:987-999
29. Risk JM, Flanagan BF and Johnson PM (1991) Polymorphism of the Human CD46 Gene in Normal Individuals and in Recurrent Spontaneous Abortion. *Hum. Immunol.* 30:162-167
30. García Velasco J and Arici A (1999) Chemokines and human reproduction. *Fertility and Sterility* 71:983-993

31. Laird S (1997) The production of leukemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushing and production by cells in culture. *Hum. Reprod.* 12:569-574
32. Delage G (1995) In vitro endometrial secretion of human interleukin for DA cells leukemia inhibitory factor by explant cultures from fertile and infertile women. *Hum. Reprod.* 10:2483-2488
33. Haines BP, Voyle RB, Pelton TA, Forrest R and Rathjen PD (1999) Complex conserved organization of the mammalian leukemia inhibitory factor gene: regulated expression of intracellular and extra cellular cytokines. *J. Immunol.* 162:4637-4646
34. Szekeres-Bartho J, Barokonyi B, Polgar G, Par G and Szerrday (1999) The role of $\gamma\delta$ T cells in progesterone-mediated immunomodulation during pregnancy: A review. *Am. J. Reprod. Immunol.* 42:44-48
35. Saito S (2000) Cytokine network at the feto-maternal interface. *J. Reprod. Immunol.* 47:87-103
36. Ace CI and Okulicz WC (1995) Differential gene regulation by estrogen and progesterone in the primate endometrium. *Mol. Cell. Endocrinol.* 115:95-103
37. Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Mannetti R, Annunziato F and Livi C (1995) Progesterone favours the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J. Immunol.* 155:128-33
38. Munn D, Zhou M, Attwood J, Bondarev I, Conway S, Marshall B, Brown C and Mellor A (1998) Prevention of Allogeneic Fetal Rejection by Tryptophan Catabolism. *Science* 281:1191-1193
39. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR and Ferguson TA (1995) Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270:1189-1192
40. Dulat HJ, Von-Grumbkow C, Baars W, Schroder N, Wonigeit K and Schwinzer R (2001) Down-regulation of human alloimmune responses by genetically engineered expression of CD95 ligand on stimulatory and target cells. *Eur. J. Immunol.* 31:2217-26
41. Coulam CB (1992) Immunologic test in the evaluation of reproductive disorders: A critical review. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 167:1844-1851
42. Hwang J, Ho H, Yang Y, Hsieh C, Lee T and Gill T (1992) The role of blocking factors and antipaternal lymphocytotoxic antibodies in the success of pregnancy in patients with recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* 58:691-696
43. Beer A, Semprini A, Xiaoxyu Z and Quebbeman J (1985) Pregnancy outcome in human couples with recurrent spontaneous abortions: HLA antigen profiles: HLA antigen sharing; female serum MLR blocking factors; and paternal leukocyte immunization. *Exp. Clin. Immunogenet.* 2:137-153
44. Takeuchi S (1990) Is Production of Blocking Antibodies in Successful Human Pregnancy an Epiphenomenon?. *Am. J. Reprod. Immunol.* 24:108-119

45. Regan L and Bruade PR (1987) Is antipaternal cytotoxic antibody a valid marker in the management of recurrent abortion? *Lancet* 28:8570
46. Margni R (1996) *Inmunología e inmunología química, fundamentos* (Ed. Panamericana Bs. As. Argentina)
47. Beard RW, Braude P, Mowbray JF and Underwood JL (1983) Protective antibodies and spontaneous abortion. *Lancet* 5:1090
48. Takakuwa K, Kanazawa K and Takeuchi S (1986) Production of blocking antibodies by vaccination with husbands lymphocytes in unexplained recurrent aborters: The role in successful pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 10:1-9
48. Mills J, Driscoll S, Jovanovic-Peterson L, Van Allen M, Aarous JH and Metzger B (1988) Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin-dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. *N. Engl. J. Med.* 319:1617-1623
49. Coulam CB (1991) Epidemiology of recurrent spontaneous abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.* 26:23-27
50. Coulam CB, Clark DA, Kutteh WH, Kwak S and Stephenson M (1997) Current clinical options for diagnosis and treatment of Recurrent Spontaneous Abortions, *Am. J. Reprod. Immunol.* 38:57-74
51. Clark D (1991) Controversies in reproductive immunology. *Crit. Rev Immunol.* 11:215-247
52. Christiansen O, Mohapeloa H, Steffensen R and Jersild C (1997) HLA-C and Bw typing of couples with unexplained recurrent miscarriages. *J. Reprod. Immunol.* 37:63-77
53. Svejgaard A and Ryder L (1994) HLA and disease associations: detecting the strongest association. *Tissue Antigens* 43:18-27
54. Steffensen R, Christiansen O, Bennett E and Jersild C (1998) HLA-E polymorphism in patients with recurrent spontaneous abortion. *Tissue Antigens* 52:129-134
55. Cauchi MN, Tait B, Wilshire MI, Koh SH, Mraz G, Kloss M, Pepperell R. (1988) Histocompatibility antigens and habitual abortion. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 18:28-31
56. Gerencer M, Drazanic A, Kuvacic I, Tomaskovic Z and Kastelan A (1979) HLA antigen studies in women with recurrent gestational disorders. *Fertil Steril* 31:401-404
57. Ho H, Gill T, Nsieh R, Hsieh R and Lee T (1990) Sharing of human leukocyte antigens in primary and secondary recurrent spontaneous abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 163:178-188
58. Piccinni M, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G and Romagnani S (1998) Defective production of both leukemia inhibitory factor and Type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nature Medicine* 4:1020-1024

59. Vassiliadou N and Bulmer J (1998) Expression of CD69 activation marker by endometrial granulated lymphocytes throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Immunol.* 94:368-375
60. Vassiliadou N, Searle R and Bulmer J (1999) Elevated expression of activation molecules by decidual lymphocytes in women suffering spontaneous early pregnancy loss. *Hum. Reprod.* 5:1194-1200
61. Fraunce D and Stein-Streilein J (2002) NKT Cell-derived RANTES recruits APCs and CD8⁺ T cells to the spleen during the generation of regulatory T cells in tolerance. *J. Immunol.* 169:31-38
62. Unander A, Lindholm A and Oldinf LB (1985) Blood transfusions generate increase previously absent weak blocking antibody in women with habitual abortion. *Fertil Steril* 44:766-771
63. Johnson P, Barnes R, Risk J, Molloy C and Woodrow J (1985) Immunogenetic studies of recurrent spontaneous abortions in humans. *Exp. Clin. Immunogen.* 2:77-83
64. Empson M, Lassere M, Craig J and Scott J (2002) Recurrent pregnancy loss with antiphospholipid antibody: a systemic review of therapeutic trials. *Am. Coll. Obstetric. and Gynecol.* 99:135-143
65. Carp H, Toder V and Mashiach V (1992) Immunotherapy of Habitual Abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.* 22:281-284
66. Cauchi M, Lim D, Young D and Kloss MRJ (1991) Treatment of recurrent aborters by immunization with paternal cells. Controlled trial. *Am. J. Reprod. Immuno.* 25:16-7
67. Coulam CB (1995) Immunotherapy for recurrent spontaneous abortion. *Early pregnancy* 1:13-26
68. Daya S, Gunby J and Clark D (1998) Intravenous immunoglobulin therapy for recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis. *Am. J. Reprod.* 39:69-76
69. Ruiz J, Kwak J, Baum L, Gilman-Sachs A, Beaman K, Kim Y and Beer A (1996) Intravenous immunoglobulin inhibits natural killer cell activity in vivo women with recurrent spontaneous abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.* 35:370-375
70. Kwak J, Kwak F, Ainbider S, Ruiz A and Beer A (1996) Elevated peripheral blood natural killer cells are effectively suppressed by immunoglobulin G infusions in women with recurrent spontaneous abortions. *Am. J. Reprod. Immunol.* 35:363-369
71. Jerzak M, Rechberger T and Gorski A (2000) Intravenous Immunoglobulin therapy influences T cell adhesion to extracellular matrix in women with a history of recurrent spontaneous abortions. *Am. J. Reprod. Immunol.* 44:336-341
72. Wang Y, Tao L, Mitchell E, Bravery C, Berlingieri P, Armstrong P, Vaugham R, Underwood J and Lehner T (1999) Allo-immunization elicits CD8⁺ T cell-derived chemokines, HIV suppressor factors and resistance to HIV infection in women. *Nat Med.* 5:1004-9

73. Behar E, Carp H, Livneh A and Gazit E (1993) Differential suppressor activity induced by paternal leukocyte immunization in habitual abortion. *Gynecol. Obste. Invest.* 36: 202-207
74. Smith J and Cowchock F (1988) Immunological studies in recurrent spontaneous abortion: effects of immunization of women with paternal mononuclear cells on lymphocytotoxic and mixed lymphocyte reaction blocking antibodies and correlation with sharing of HLA and pregnancy outcome. *J. Reprod. Immunol.* 14:99-11334.
75. Stephenson M, Wu V, Mackinson M, Sadoway J and Keown PA (1995) Standardization of Flow Cytometric Crossmatch (FCXM) for investigation of Unexplained Habitual Abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.* 33:1-9
76. Hirabayashi J, Ayaki H, Soma G and Kasai KI (1989) Production and purification of a recombinant human 14 kDa β -galactoside-binding lectin. *FEBS Lett.* 250:161-165
77. Fainboim L, Achino B, Guala M, Noli M and Garay C (1991) Possible association between the sharing of HLA-DQ antigens and the presence of mixed lymphocyte reaction blocking antibodies in couples with habitual abortions and moles. *Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference*, Reproduction component: 999-1004 ((Oxford Science publications)
78. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F and Riccardi CA (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 139:271-279
79. Rabinovich GA, Iglesias MM, Modesti NM, Castagna LF, Todel CW, Riera CM and Sotomayor CE (1998) Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J. Immunol.* 160:4831-4840
80. Rabinovich GA, Alonso CR, Sotomayor CE, Durand S, Bocco JL and Riera CM (2000) Molecular mechanisms implicated in galectin-1-induced apoptosis: activation of the AP-1 transcription factor and downregulation of Bcl-2. *Cell Death Diff.* 7:747-753
81. Rabinovich GA, Castagna LF, Landa CA, Riera CM and Sotomayor CE (1996) Regulated expression of a galectin-1-like protein in activated rat macrophages. *J. Leuk. Biol.* 59:363-370
82. Danielpour D, Dart LL, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB (1989) Immunodetection and quantitation of the two forms of TGF- β (TGF- β 1 and TGF- β 2) secreted by cells in culture. *J. Cell. Physiol.* 138:79-86
83. Matzner W, Chong P, Xu G and Ching W (1995) A Comparison of Flow Cytometry and Microcytotoxicity for the Evaluation of Alloimmune Therapy in Patients With Recurrent Spontaneous Abortions. *Am. J. Reprod. Immunol.* 33:10-13
84. Rabinovich GA (1999) Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Diff.* 6:711-722
85. Baum LG, Pang M, Perillo NL, Wu T, Delegeane A, Uittenbogaart CH, Fukuda M and Seilhamer J (1995) Human thymic epithelial cells express and endogenous lectin,

- galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cell lines. *J. Exp. Med.* 181:877-887
86. Blaser C, Kaufmann M, Muller C, Zimmerman C, Wells V, Mallucci L and Pircher H (1998) Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur. J. Immunol.* 28:2311-2319
87. Zúñiga E, Rabinovich GA, Iglesias MM and Gruppi A (2001) Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. *J. Leuk. Biol.* 70:73-79
88. Cooper DNW (1997) Galectin-1: secretion and modulation of cell interactions with laminin. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 9:57-67
89. Sotomayor CE and Rabinovich GA (2000) Galectin-1 induces central and peripheral cell death: implications in T-cell physiopathology. *Dev. Immunol.* 7:117-129
90. Perillo NL, Uittenbogaart C, Nguyen J and Baum LG (1997) Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J. Exp. Med.* 185:1851-1858
91. Pace KE, Lee C, Stewart PL and Baum LG (1999) Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J. Immunol.* 163:3801-3811
92. Walzel H, Blach M, Hirabayashi J, Kasai KI and Brock K (2000) Involvement of CD2 and CD3 in galectin-1-induced signaling in human Jurkat T-cells. *Glycobiology* 10:131-140
93. Pace KE, Hahn HP, Pang M, Nguyen JT and Baum LG (2000) CD7 delivers a proapoptotic signal during galectin-1-induced T cell death. *J. Immunol.* 165:2331-2334
94. Kopitz J, Von Reitzenstein C, Burchert M, Cantz M and Gabius HJ (1998) Galectin-1 is a major receptor for ganglioside GM1, a product of the growth-controlling activity of a cell surface ganglioside sialidase, on human neuroblastoma cells in culture. *J. Biol. Chem.* 273:11205-11211
95. Vespa GNR, Lewis LA, Kozak KR, Moran M, Nguyen JT, Baum LG and Miceli MC. (1999) Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation. *J. Immunol.* 162:799-806
96. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ and Baum LG (1995) Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378:736-739
97. Chung CD, Patel VP, Moran M, Lewis LA and Miceli C (2000) Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J. Immunol.* 165:3722-3729
98. Rabinovich GA, Modesti NM, Castagna LF, Landa CA, Riera CM and Sotomayor CE (1997) Specific inhibition of lymphocyte proliferation and induction of apoptosis by CLL-I, a β -galactoside-binding lectin. *J. Biochem.* 122:365-373

99. Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, Hirabayashi J and Chernajovsky Y (1999) Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J. Exp. Med.* 190:385-398
100. Delioukina ML, Blackall DP, Emmanouilides CD, Nanigian DB, Choi R, Luo J, Territo MC, Baum LG and Baldwin GC (1999) Galectin-1 ameliorates the development and severity of GVHD in a murine model. *Blood* 94:392a
101. Santucci L, Fiorucci S, Cammilleri F, Servillo G, Federici B and Morelli A (2000) Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 31:399-406
102. Auchincloss H, Sykes M and Sacks DH (1998) *Fundamental Immunology* (Philadelphia W.E. Lippincott-Raven 4ta. Edición)
103. Sherman LA and Chattopadhyay S (1993) The molecular basis of allorecognition. *Annu. Rev. Immunol.* 11:385-402
104. Wang XY, Sun J, Wang C, France M and Sheil AG (2001) Effect of liver transplantation on islet allografts: upregulation of Fas ligand and apoptosis of T lymphocytes are associated with islet graft tolerance. *Transplantation* 71:102-111
105. Li W, Lu L, Wang Z, Wang L, Fung JJ, Thomson AW and Qian S (2001) IL-12 antagonism enhances apoptotic death of T cells within hepatic allografts from Flt3-ligand treated donors and promotes graft acceptance. *J. Immunol.* 166:5619-5628
106. Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A and Duke RC (1995) A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377:630-632
107. O'Flaherty E, Ali S, Petit SJ and Kirby JA (1998) Examination of the sensitivity of T cells to Fas ligation. *Transplantation* 66:1067-1073
108. Dulat HJ, von Grumbkow C, Baars W, Schroder N, Wonigeit K and Schwitzer R (2001) Down-regulation of human alloimmune responses by genetically engineered expression of CD95 ligand on stimulatory and target cells. *Eur. J. Immunol.* 31:2217-2226
109. Wagener ME, Konieczny BT, Dai Z, Ring GH and Lakkis FG (2000) Alloantigen-driven T cell death mediated by Fas ligand and tumor necrosis factor-alpha is not essential for the induction of allograft acceptance. *Transplantation* 69:2428-2432
110. Adams JM and Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-1325
111. Pettersen RD, Bernard G, Olafsen MK, Pourtejn M and Lie SO (2001) CD99 signals caspase-independent T-cell death. *J. Immunol.* 166:4931-4942
112. Belmokhtar CA, Hillion J and Segal-Bendirdjian E (2001) Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene* 20:3354-3362
113. Mor F and Cohen IR (1996) IL-2 rescues antigen-specific T cells from radiation or dexamethasone-induced apoptosis. *J. Immunol.* 156:515-522

114. Akbar AN, Borthwick NJ, Wickremasinghe RG, Panayoitidis P, Pilling D, Bofill M, Krajewski S, Reed JC and Salmon M (1996) Interleukin-2 receptor common γ -chain signalling cytokine regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL), but not pro-apoptotic (bax, bcl-xs) gene expression. *Eur. J. Immunol.* 26:294-299
115. Zeller JC, Panoskaltis-Mortari A, Murphy WJ, Ruscetti FW, Narula S, Roncarolo MG and Blazar BR (1999) Induction of CD4⁺ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF- β . *J. Immunol.* 163:3684-3691
116. Letterio JJ and Roberts AB (1998) Regulation of immune responses by TGF- β . *Annu. Rev. Immunol.* 16:137-161
117. Baum LG, Seilhamer JJ, Pang M, Levine WB, Beynon D and Berliner JA (1995) Synthesis of an endogenous lectin, galectin-1 by human endothelial cells is upregulated by endothelial cell activation. *Glycoconjugate J.* 12:63-68
118. Levy G, Tarrab-Hazdai R and Teichberg VI (1983) Prevention and therapy with electrolectin of experimental autoimmune myasthenia gravis in rabbits. *Eur. J. Immunol.* 13:500-507
119. Bittencourt MC, Perruche S, Contassot E, Fresnay S, Baron MH, Angonin R, Aubin F, Herve P, Tiberghien P and Saas P (2001) Intravenous injection of apoptotic leukocytes enhances bone marrow engraftment across major histocompatibility barriers. *Blood* 98:224-230
120. Zúñiga E, Gruppi A, Hirabayashi J, Kasai K and Rabinovich G.A. 2001. Regulated expression and effect of galectin-1 on *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages: modulation of microbicidal activity and survival. *Infect. Immun.* 69: 6804-6812
121. Ashkenazi A and Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-1308
122. Griffith TS (1995) Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science.* 270:1189-1192
123. Balkwill F (1998) The molecular and cellular biology of the chemokines. *J. Viral Hepat.* 5:1-14
124. Rossi D and Zlotnik A (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18:217-42
125. Ward S, Bacon GK and Westwick J (1998) Chemokines and T Lymphocytes: More than an attraction. *Immunity* 9:1-11
126. Luther SA and Cyster JG(2001) Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nature Immunol.* 2:102-7
127. Moser B and Loetscher P (2001) Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nature Immunol.* 2:123-8
128. Nelson PJ and Krenesky AM (1998) Chemokines, lymphocytes and viruses: what goes around, comes around. *Curr. Opin. Immunol.* 10:265-70

129. Weber C, Weber K, Klier C, Gu S, Wank R, Hourk R and Nelson PJ (2001) Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and Th1 like/CD45RO+ T cells. *Blood* 97:1144-6
130. Taub D, Turcqvski-Corrales S, Key M, Longo D and Murphuy W (1996) Chemokines and lymphocyte activation. *J. Immunol.* 15-:2095-2103
131. Mackewicz CE, Patterson BK, Lee SA and Levy JA (2000) CD8(+) cell noncytotoxic anti-human immunodeficiency virus response inhibits expression of viral RNA but not reverse transcription or provirus integration. *J. Gen. Virol.* 81:1261-4
132. Cocchi F (1995) Identification of RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 15:1811-5.
133. Lehner T, Wang Y, Cranage M, Bergmeier LA, Mitchell E, Tao L, Hall G, Dennis M, Cook N, Brookes R, Klavinskis L, Jones I, Doyle C and Ward R (1996) Protective mucosal immunity elicited by targeted iliac lymph node immunization with a subunit SIV envelope and core vaccine in macaques. *Nat Med.* 2:767-75
134. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR and Ferguson TA (1995) Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 17:1189-92.
135. Mellado M, Martin A, Moreno C, Martinez AC and Rodriguez-Frade J (2001) A potential immune escape mechanism by melanoma cells through the activation of chemokine-induced T cell death. *Curr. Biol.* 11:691-6
136. Toscano M (2003) *Bases moleculares de la respuesta anti-inflamatoria e inmunosupresora de Galectina-1: estudio de la participación del factor de transcripción NF- κ B* (Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A.)
137. King A, Wellings V, Gardner L and Loke Y (1989) Immunohistochemical distribution of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Human Immunol.* 24:66-73
138. Saito S, Nishikara K, Morii T, Narita N, Enomoto M and Ichijo M (1992) Expression of activation antigens CD69, HLA-DR, interleukin-2 receptor-alpha (IL-2R α) and IL-2R beta on T cells of human decidua at an early stage of pregnancy. *Immunology* 75:710-712
139. Ho HN, Chao KH, Chen CK, Yang YS and Huang SC (1996) Activation status of T and NK cells in the endometrium throughout menstrual cycle and normal and abnormal early pregnancy. *Human Immunol.* 49:130-136
140. Ullman K, Northrop JP, Verweij CL and Crabtree GR (1990) Transmission of signals from T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function. *Annu. Rev. Immunol.* 8:421-52
141. Chen CK, Huang SC, Chen CL, Yen MR, Hsu HC and Ho HN (1995) Increased expressions of CD69 but not CD25 or CD71 on endometrial T lymphocytes of nonpregnant women. *Human Immunol.* 42:227-232
142. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M and Lanzavecchia A (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712

143. Cebrián M, Yagüe E, Rincón M, López-Botet M, de Landázuri MO and Sanchez-Madrid F (1988) Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 168:1621-37
144. Lopez-Cabrera M, Santis AG, Fernandez-Ruiz E, Blacher R, Esch F, Sanchez-Mateos P and Sanchez-Madrid F (1993) Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J. Exp. Med.* 178:537-547
145. Ashkar A, Di Santo J and Croy A (2000) Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine Natural Killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J. Exp. Med.* 192:259-269
146. Liu Y and Janeway CA (1992) Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:3845-3949
147. Rudd CE (1996) Upstream-Downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function. *immunity* 4:527-534
- 148: Tivol EA, Borriello F, Schweitzer An, Lynch WP, Bluestone JA and Sharpe AH (1995) Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3:541-547
149. Linsley PS, Clark EA and Ledbetter JA (1990) T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87:5031-5
150. Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng JW, Restivo VA Jr, Lombard LA, Gray GS and Nadler LM.(1993) Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 5:909-11
151. Linsley PS et al (1994) Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1:793-801
152. Azuma M, Ito D, Yagita H, Okumura K, Phillips JH, Lanier LL and Somoza C. (1993) B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 4:76-9
153. Cocks BG *et al* (1995) A novel receptor involved in T cells activation. *Nature* 376:260-263
154. Aversa G *et al* (1997) SLAM and its role in T cell activation and Th responses. *Immunol. Cell Biol.* 75:202-205
155. Aversa G, Chang CJ, Carballido JM; Cocks BG and de Vries JE (1997) Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and INF-gamma production. *J. Immunol.* 158:4036-4044
156. Castro AG, Hauser TM, and Cocks BG (1999) Molecular and functional characterization of mouse signaling lymphocyte activation molecule (SLAM): differential expression and responsiveness in Th1 and Th2 cells. *J. Immunol.* 163, 5860-5870

157. Carballido *et al* (1997) Reversal of human allergic T helper 2 responses by engagement of signaling lymphocytic activation molecule. *J. Immunol.* 159:4316-4321
158. Isomaki P *et al* (1997) Increased expression of signaling lymphocytic activation molecule in patients with rheumatoid arthritis and its role in the regulation of cytokine production in rheumatoid synovium. *J. Immunol.* 159:2986-2993
159. Latour S, Gish G, Helgason CD, Humphries K, Pawson T and Veillette A (2001) regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nature Immunol.* 2:681-689
160. Nichols K, Koretzky GA and June C (2001) SAP: natural inhibitor or grand SLAM of T cell activation? *Nature Immunol.* 2:665-666
161. Sayos J, Wu C, Morra M, Wang N, Zhang X, Allen D, van Schaik S, Notarangelo I, Geha R, Roncarolo MG, oettgen H, De Vries JE, Aversa G and Terhorst C (1998) *Nature* 395:462-469
162. Vives A, Balasch J, Yague J, Quintó L, Ordi J and Vanrell JA (1999) Type-1 and Type-2 Cytokines in human decidual tissue and trophoblasts from normal and abnormal pregnancies detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Am. J. Reprod. Immunol.* 42: 361-368
163. Wu C, nguyen KB, Pien GC, Wang N, Gullo C, Howie D, Rodriguez M, Edwards MJ, Borrow P, Satoskar AR, Sharpe A, Biron C and Terhorst C (2001) SAP controls T cell responses to virus and terminal differentiation of Th2 cells. *Nature Immunol.* 2:410-414
164. Eleventh annual meeting of the American Society for the Immunology of Reproduction (1991) *Am. J. Reprod. Immunol.* 25:49-68
165. Tenth annual meeting of the American Society for the Immunology of Reproduction (1991) *Am. J. Reprod. Immunol.* 25:1-9
166. Clark D (1994) Worldwide Collaborative Observational Study and Meta-Analysis on Allogenic Leukocyte Immunotherapy for Recurrent Spontaneous Abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.* 32:55-72
167. Bruce J, Cowchock S, Lata J and Hankinson BT (1992) The number of cells used for immunotherapy of repeated spontaneous abortion influences pregnancy outcome. *J. Reprod. Immunol.* 22:217-224.
168. Höger TA, Tokuyama M, Yonamine K, Hayashi K, Masuko-Hongo K, Kato T, Kobata T, Mizushima Y, Nishioka K and Yamamoto K (1996) Time course analysis of alpha+beta+ T cell clones during normal pregnancy. *Eur. J. Immunol.* 26:834-840
169. Mazuko-Hongo K, Hayashi K, Yonamime K, Tokuyama M, Nishioka K and Kato T (2001) Disappearance of clonally expanded T cells after allogenic leukocyte immunotherapy in peripheral blood of patients with habitual abortion. *Human Immunol.* 63:1111-21
170. Tafuri A, Alferink J, Moller P, Gunter J and Arnold B (1995) Tcell Answareness During Pregnancy. *Science* 270: 27-30

Trabajos publicados surgidos de la presente investigación

- 1- Is the paternal mononuclear cells immunization a succesful treatment for recurrent spontaneous Abortion? (2000) R. Ramhorst, B. Achino, E. Agriello, S. Zittermann, M. Pando, J. Larriba, L. Fainboim. American Journal of Reproductive Immunology 44:129-135.

- 2- Alteraciones de la implantación embrionaria (2001) R. Ramhorst y L. Fainboim, Endocrinología y Metabolismo 38:66-68

- 3- Induction of allogeneic T-cell hyporesponsiveness by Galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms (2002) R. Ramhorst, G. Rabinovich, A. Corigliano, Cecilia Daroqui, Natalia Rubistein, E. Bal de Kier and L. Fainboim. Cell Death and Differentiation 9:661-670.

- 4- Intracellular expression of CD69 in endometrium and peripheral blood represents an useful marker in women with recurrent miscarriage: modulation after allogeneic leukocyte immunotherapy (2003) American Journal of Reproductive Immunology 49:149-158

- 5- Identification of RANTES as a novel immunomodulator of the allogeneic response, R. Ramhorst, V. García, A. Corigliano, G. Rabinovich and L. Fainboim. (Trabajo enviado para su publicación: Journal Clinical Immunology #CLIM115)

- 6- Expression of SLAM as a functional and phenotypic marker in women with recurrent miscarriage. R. Ramhorst, V. García, A. Corigliano, J.J. Etchepareborda, M. Irigoyen and L. Fainboim. (Trabajo enviado para su publicación: Journal of reproductive Immunology #)

PREMIOS RECIBIDOS

Medalla de oro del Hospital de Clínicas “José de San Martín”, Noviembre 2001
Premio al mejor trabajo del área de Ginecología y Obstetricia

PAPEL DE LOS LINFOCITOS T Y DE LAS CITOQUINAS QUE ELLOS PRODUCEN EN MUJERES FÉRTILES Y EN MUJERES CON ABORTOS RECURRENTES ESPONTANEOS
*Rosanna Ramhorst***, *Verónica García***, *Evangelina Agriello* Gómez Pasannate^ψ*, *Juan Etchepareborda^ψ*, *Marcela Irigoyen^ψ*, *Oswaldo Contreras Ortiz^ψ* y *Leonardo Fainboim***

** Laboratorio de Inmunogenética y ^ψDivisión Ginecología, Hospital de Clínicas “José de San Martín”, [#] Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires y CONICET, Argentina.*