



*DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA  
MOLECULAR 3 E INMUNOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA*

*ESTUDIO DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS  
PROCEDENTES DE DECIDUA HUMANA  
NORMAL Y DE ABORTO ESPONTÁNEO*

*Memoria presentada por Irene Tirado González para  
optar al grado de Doctor por la Universidad de  
Granada.  
Granada, 2007*





## **AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS**

**D. ENRIQUE GARCIA OLIVARES**, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

**D<sup>a</sup>. ANA CLARA ABADÍA MOLINA**, PROFESORA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

**CERTIFICAN:** que la presente tesis titulada “**ESTUDIO DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA DECIDUA HUMANA NORMAL Y DE ABORTO ESPONTÁNEO**”, de la que es autora IRENE TIRADO GONZÁLEZ, superó el programa de Doctorado “Inmunología Celular y Molecular” y que ha sido dirigida bajo su dirección en la Unidad de Inmunología del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Granada.

Revisado el presente trabajo, los directores consideran que tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el Tribunal que se designe al efecto, por lo que:

**AUTORIZAN** la presentación de la referida Tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en la legislación vigente.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expedimos la presente certificación en Granada,

Dr. Enrique García Olivares.

Dra. Ana Clara Abadía Molina.



*A mi familia*



*Todos somos muy ignorantes.*

*Lo que ocurre es no todos ignoramos las mismas cosas.*

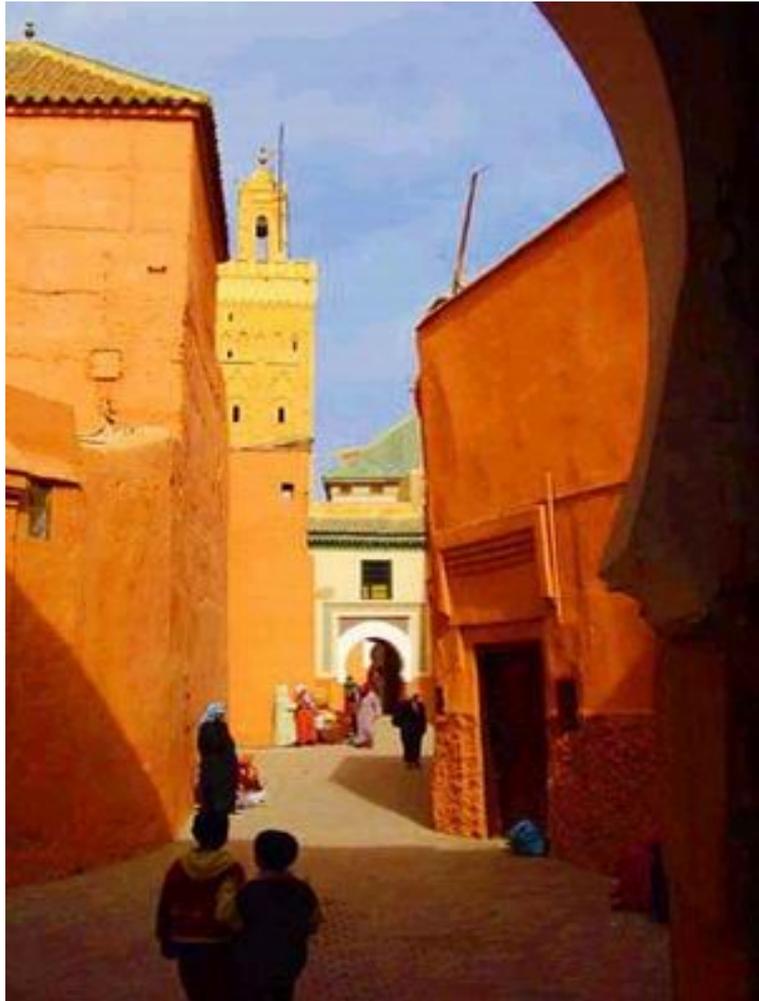
***“Albert Einstein, s. XX”***

*Hay dos cosas infinitas: el Universo y la estupidez humana.*

*Y del Universo no estoy seguro*

***“Albert Einstein, s. XX”***







## **AGRADECIMIENTOS**

Dicen que lo más complicado de una tesis es escribir los agradecimientos, que nada cuesta tanto como esto, que hay que ser respetuosa y formal. Bueno, lo de respetuosa prometo cumplirlo, pero lo de formal, ummm.... Ya veremos.

A Enrique, por esta gran tesis, por todo lo que me has enseñado, por la paciencia que has tenido, por tu ayuda en los momentos más bajos, por los consejos, por todo los buenos momentos y sobre todo, por todo lo que he aprendido durante todo este tiempo. Gracias.

A Ana, por haber codirigido mi tesis, por ayudarme a resolver mis dudas, por aconsejarme y por estar ahí. Gracias.

A Sandra y Arif por su amistad y ayuda durante mi estancia en Berlín, por lo que me enseñaron y por ser mi compañía durante todos esos meses. Gracias.

A la Dr. Petra Arck por permitirme trabajar en su laboratorio, por ponerme las cosas fáciles, por tratarme como uno más de su equipo. Muchas gracias por todo.

A Pili y Raquel, por haber estado a mi lado cuando más lo he necesitado, por tanto dolor que cabeza, por esos ratos de risas, cervecillas o más bien mostos y por saber que ya sean las dos, las tres o las cuatro de la madrugada puedo contar con vosotras. Gracias.

A Jorgito “Wapo” por tanto grito, por haberme hecho ver la gran cantidad de paciencia que puedo llegar a tener, pero sobre todo por ser como eres, que oye¡¡, también tienes cosas buenas, ¿no?.

A Ester (juro no decir megapi, uy¡¡ lo he dicho) y a Zule (la superbailarina, que mona que eres, aisch¡¡), gracias por las risas, las salidas, los buenos momentos de laboratorio y los de fuera, gracias¡¡.

A Kike y Teresa, por ser unos buenos amigos. Tanto años conociéndonos y aún no nos hemos cansado los unos de los otros, jeje, eso es una buena señal. Pedazo de indice Kike¡¡¡¡; y a Jesús, por hacerme ver que hay miles de definiciones para la palabra comer :D.

A mis compañeros de laboratorio por hacer que todos los días hayan sido diferentes, por las risas, los bailes, las canciones, y los gritos :D, que oye no todo es trabajar, ¿no?. Sí, sí, ya sé, así no se saca una tesis.... ¿o sí?

A Ceci (la presi), Ani (mediapinta) y a todos los demás amiguetes que he conocido en la asociación, olé, olééééé, y oleeeeeeeeeéé con ASIjjjj. Por haber aprendido a que luchando por lo que quieres se suelen conseguir las cosas. Sé que me quedo sin mencionar a algunos, pero es que la tinta del ordenador no da para más :P.

A José Antonio, por tus consejos, tus enseñanzas a lo largo de estos cinco años, que se dicen rápido pero....., muchas gracias.

A la artista anteriormente conocida como Maria del Carmen Ruiz Ruiz, lo siento pero ahora eres "La Mari" y a Ignacio Molina Pineda de las Infantas (sí, tiene un pasado oculto, perteneció a la nobleza). Gracias.

Por último, y no menos importante, a mi familia por todo su apoyo en estos cinco años, y todos los demás, por lo que me han dado y por lo que me han soportado. Gracias.

A la Fundación Hospital Clínico por su colaboración.



**INDICE**

**INTRODUCCIÓN..... 1**

1. LA DECIDUA ..... 1

    1.1. Las células deciduales ..... 2

    1.2. Las células epiteliales ..... 4

    1.3. Las células endoteliales ..... 4

2. CÉLULAS INMUNITARIAS EN LA DECIDUA ..... 5

    2.1. Macrófagos ..... 6

    2.2. Las células NK ..... 7

    2.3. Las células T ..... 11

    2.4. Las células B ..... 11

    2.5. Las células dendríticas ..... 12

3. TOLERANCIA MATERNO FETAL ..... 12

    3.1. HLA-G ..... 13

    3.2. Balance Th1/Th2 ..... 15

    3.3. Las células T reguladoras en decidua humana ..... 17

4. MECANISMOS DE APOPTOSIS EN LA DECIDUAS HUMANA  
DE PRIMER TRIMESTRE..... 21

5. ABORTO ..... 24

6. CÉLULAS DENDRÍTICAS..... 26

    6.1. Origen y maduración de las células dendríticas..... 27

    6.2. Fenotipo y función de las células dendríticas ..... 29

        6.2.1. Fenotipo de las células dendríticas..... 33

---

6.2.2. Capacidad de captación de antígenos y fagocitosis de las células dendríticas .....	34
6.2.3. Activación de las células T por las células dendríticas .....	39
6.2.4. Las células dendríticas como inductoras de tolerancia.....	41
6.3. Células dendríticas deciduales .....	41
6.4. Complejos DC-NK .....	45
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
<b>MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>49</b>
1. Muestras .....	49
2. Aislamiento de células .....	50
3. Determinación de marcadores en las poblaciones leucocitarias mediante citometría de flujo .....	51
4. Estudio de la capacidad fagocítica .....	52
5. Detección de apoptosis mediante Anexina-V .....	53
6. Detección de apoptosis mediante la técnica del TUNEL.....	54
7. Microscopía de fluorescencia y confocal .....	55
8. Inmunohistoquímica .....	56

9. Detección de apoptosis por la técnica del TUNEL para inmunohistoquímica .....	57
10. Purificación de células por citometría .....	58
11. Purificación de células con columnas y bolitas magnéticas.....	59
12. Tinción de diclorhidrato 4',6-Diamidino-2-fenil indol, DAPI .....	59
13. Análisis estadístico .....	60
14. Tabla 1 .....	61
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>63</b>
 FENOTIPO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS EN DECIDUA HUMANA ....	 63
1. Fenotipo antigénico de DC deciduales de aborto inducido .....	65
1.1. Marcaje simple mediante citometría de flujo .....	66
1.2. Marcaje doble mediante citometría de flujo.....	72
1.2.1. Población CD14/DC-SIGN .....	78
1.2.2. Población CD15/DC-SIGN.....	80
1.3. Actividad fagocítica de las DC de decidua normal .....	81
2. Fenotipo antigénico de DC deciduales de aborto espontáneo .....	82
2.1. Marcaje simple mediante citometría de flujo .....	83
2.2. Marcaje doble mediante citometría de flujo.....	87
2.2.1. Población CD14/DC-SIGN en decidua de aborto espontáneo .....	91
2.2.2. Población CD15/DC-SIGN en decidua	

de aborto espontáneo .....	92
3. Comparación de las DC de aborto inducido y aborto espontáneo ..	93
4 Fenotipo antigénico de las DC de placenta a término .....	99
4.1. Marcaje simple mediante citometría de flujo.....	99
4.2. Marcaje doble mediante citometría de flujo.....	101
5. Comparación de las DC de placenta respecto al aborto inducido y aborto espontáneo .....	103
ESTUDIO DE COMPLEJOS .....	108
1. Estudio de la población CD56/DC-SIGN .....	108
2. Estudio de apoptosis en los complejos CD56+/DC-SIGN+ .....	111
2.1. Estudio mediante Anexina-V .....	112
2.2. Estudio de apoptosis con la técnica del TUNEL mediante citometría de flujo .....	115
2.3. Estudio de apoptosis con la técnica del TUNEL mediante fluorescencia.....	118
2.4. Tinción con DAPI de las células de la decidua .....	122
3. Estudio de la expresión de HLA-G por las DC.....	123
3.1. Expresión de HLA-G en células DC-SIGN+ de ABI.....	123
3.2. Expresión de HLA-G en células DC-SIGN+ de ABE.....	124

---

<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>127</b>
1. Las células dendríticas de primer trimestre de embarazo son células mieloides en distinto grado de madurez .....	127
2. Presencia de otros tipos celulares en la ventana electrónica en la que se han analizado las células dendríticas .....	132
3. Las células dendríticas forman complejos con las NK .....	133
4. Las células NK inducen apoptosis a las células dendríticas deciduales .....	133
5. En el aborto espontáneo desciende la proporción de células dendríticas .....	137
6. Placenta .....	141
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>143</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>145</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>149</b>





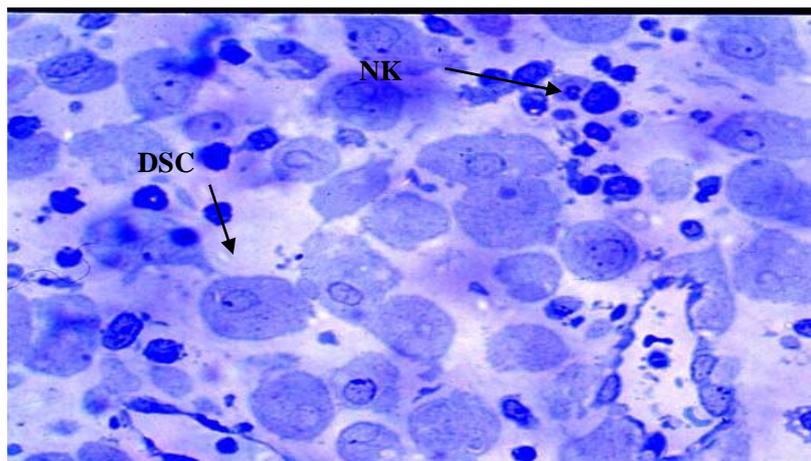
## *INTRODUCCIÓN*



## **INTRODUCCIÓN**

### **1. LA DECIDUA**

La **DECIDUA** es el tejido materno que se encuentra en más íntimo contacto con el trofoblasto fetal, constituyendo lo que se denomina interfase materno-fetal (Fig.1). Durante el primer trimestre del embarazo, la decidua humana es rica en leucocitos, los cuales constituyen en torno al 40% todas las células deciduales [Vargas et al, 1993]. Además encontramos una amplia población de células de origen no hematopoyético integrada por células epiteliales, células endoteliales y células deciduales estromales (DSC, decidual stromal cells), siendo éstas últimas aproximadamente un 50% de todas las células de la decidua del primer trimestre.



**Figura 1:** Corte histológico de decidua humana de primer trimestre en que podemos observar con claridad a las DSC y las células NK.

### *1.1. Las Células Deciduales*

Las células deciduales estromales (DSC) constituyen un tipo particular de células procedentes de la proliferación y diferenciación de un precursor estromal de carácter fibroblástico (pre-DSC). Estos precursores, ya presentes en el endometrio no gestante [Richards et al, 1995] se diferencian (decidualizan) bajo la influencia de la progesterona, una hormona ovárica, durante la fase lútea (secretora) del ciclo menstrual. Esta diferenciación se mantendrá en el tiempo si los niveles hormonales se mantienen, lo cual sucede siempre cuando se dé el estado de gestación [Bulmer y Peel, 1974]. Si esto no ocurre, debido fundamentalmente a la retirada de progesterona, se produce una descamación del endometrio que desemboca en el sangrado menstrual y regeneración subsiguiente de la mucosa.

La mayoría de las DSC expresan CD10 y CD13 [Kimatrai et al, 2003], siendo el CD10 un marcador característico de las DSC [Sumathi et al, 2002]. Las DSC presentan morfología fibroblástica, y tienen un fenotipo semejante tanto *in vivo* como *in vitro*, siendo característica la expresión de diferentes marcadores como CD34, CD35, CD21, CD23, CD29, ALP, HLA-DR y marcadores asociados a células madre estromales como STRO-1 y CD73 [Olivares et al, 1997; Montes et al, 1996; García-Pacheco et al, 2001; Oliver et al, 1999; Oliver et al, 1999; Muñoz-Fernández et al, 2006].

Aunque algunos autores proponen que las DSC son de origen hematopoyético [Lysiak et al, 1992], nuestro grupo ha podido demostrar que las DSC humanas están relacionadas con los precursores estromales de médula ósea, células multipotenciales que se diferencian a células mesenquimales [García-Pacheco et al, 2001]. En concordancia con estos datos, las DSC presentan fenotipo y morfología semejante a los miofibroblastos, de origen estromal, como demuestra el hecho de que las DSC expresen  $\alpha$ -SM-actina [Oliver et al, 1999], y tengan capacidad contráctil [Kimatrai et al, 2003].

El elevado contenido de glucógeno en la célula decidual estromal (DSC) sugieren un importante papel nutricional y endocrino (paracrino) en la interfase materno-fetal durante los primeros estadios del embarazo [Krebhiel, 1937; Riddick y Kusmisk, 1997].

Las DSC presentan funciones inmunológicas, como son la capacidad de secretar citoquinas [Montes et al, 1995; Chesney et al, 1998], co-estimulan la proliferación de las células T actuando como células presentadoras de antígeno [Chesney et al, 1997; Olivares et al 1997] y tienen capacidad fagocítica, [Ruiz et al, 1997]. También están relacionadas con la eliminación de transplantes [Pedagogos et al, 1997] y podría estar relacionadas con la expulsión del trofoblasto durante el aborto espontáneo y con la regulación del flujo sanguíneo en relación con

su capacidad contráctil [Kimatrai et al, 2003]. Estas funciones se encuentran disminuidas en condiciones de decidualización, es decir por acción de la progesterona [Blanco et al, 2007] y en cambio se ven incrementadas por la acción de citocinas inflamatorias que inhiben la decidulización [Kimatrai 2003].

### *1.2. Las Células Epiteliales*

Otras células presentes en el endometrio y en la decidua son las células epiteliales: estas participan mediante la producción de citoquinas como LIF, IL-1, M-CSF, favoreciendo el proceso de la implantación [Kojima et al, 1995].

### *1.3. Las Células Endoteliales*

Las células endoteliales se encuentran tapizado internamente los vasos, son células grandes encargadas de la captación y extravasación de linfocitos hacia la decidua, función que llevan a cabo mediante la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, ICAM2, VCAM y Selectinas [Bevilacqua et al, 1987; Osborn et al, 1989; Reiss et al, 1998; Reiss et al, 1999].

## **2. CELULAS INMUNITARIAS EN LA DECIDUA**

La población de leucocitos está compuesta principalmente por un 70% de células NK deciduales (dNK), 20% de macrófagos y un 10% de células T [Loke et al, 1995]. En menor proporción (aproximadamente un 10%) se encuentra las células dendríticas (DC, dendritic cells), además de una población casi inexistente de células B.

A pesar de que los linfocitos se consideran relevantes por su implicación en el desarrollo decidual, remodelado del sistema vascular uterino y formación de glándulas metriales (en el caso de ratones) [Adrian 2001; Dosiou et al., 2004], aún no se han dilucidado exactamente los procesos inmunológicos implicados con el embarazo en los que participan.

En el caso de gestación humana con éxito, el balance entre la actividad inmunológica y la tolerancia en la decidua, lugar de contacto entre la madre y el feto, es de vital importancia. Aunque es esencial un sistema inmunológico que proteja a la madre frente a las infecciones, también es importante que la respuesta inmunológica no ataque a los antígenos fetales. El camino por el cual los antígenos son procesados y presentados a las células T, es probablemente uno de los factores críticos para entender cómo el sistema inmunitario de la madre reacciona frente

a los antígenos fetales. Al igual que en otras superficies mucosas, la decidua presenta una amplia población de células presentadoras de antígeno HLA-DR+ (APCs) incluyendo un subtipo de células dendríticas (DC) CD83+ [Kämmerer et al, 2000]. Estas son DC maduras que se definen como presentadoras de antígenos, y que podrían estar implicadas en los fenómenos de presentación de antígenos fetales.

El número de leucocitos uterinos varia en función del ciclo menstrual [Starkey et al, 1991, van den Heuvel et al 2005]. La población de células CD45+ está concentrada predominantemente en el extracto basal, incrementando premenstrualmente [Kamat and Isaacson, 1987]. Dentro de las células inmunitarias de la decidua, a las que se les atribuyen una serie de funciones particulares, podemos distinguir las siguientes:

### *2.1. Macrófagos*

Los macrófagos deciduales constituyen aproximadamente el 20% del total de los leucocitos endometriales y su número muestra una pequeña variación durante el ciclo menstrual [Bulmer et al, 1988]. Los macrófagos expresan CD14 y antígenos MHC de clase II, aunque según algunos autores pueden actuar protegiendo de manera natural al feto [Chang et al, 1993; Lagadari et al, 2004] debido a su limitada capacidad

para presentar antígenos y por sus bajos niveles de CD86 en comparación con los monocitos CD14+ de sangre periférica, tanto de mujeres gestantes como no gestantes. Los macrófagos son esenciales para la homeostasis y remodelado tisular debido a su capacidad fagocítica para digerir tejido y células muertas [Leibovich et al, 1975; Clark et al, 1996; Mor et al, 2003]. Además, pueden tener una capacidad relevante en los procesos inmunológicos de la decidua ya que tienen la habilidad de controlar la respuesta inmunitaria por secreción de citoquinas antiinflamatorias como IL10 (interleuquina 10) y TGF- $\beta$ 1 (factor de crecimiento de transformación) [Duffield et al, 2003; Gordon et al, 2003].

## *2.2. Las células NK*

Las células dNK CD56+ son la población más importante de leucocitos endometriales en la fase secretora [Bulmer et al, 1991] constituyendo aproximadamente el 70% de los linfocitos deciduales. Se ha visto que las dNK podrían actuar como células efectoras citotóxicas o células productoras de citoquinas, jugando un papel importante en la implantación y placentación [King y Loke et al, 1991]. En el embarazo temprano, las dNK aumentan en torno al 30%. Sus altos niveles de infiltración sitúan a las dNK en íntimo contacto con las células estromales y con el trofoblasto invasivo. Después de las 20 semanas de

gestación las células dNK van disminuyendo siendo detectada en menor porcentaje en la decidua a término [Abadía et al; 1996].

Las células NK de la decidua están presentes antes de la implantación en el endometrio no gestante donde el número de células NK uterinas (uNK) varía durante el ciclo menstrual. Al final del ciclo menstrual, los niveles de progesterona descienden y aproximadamente dos días antes de la menstruación las uNK sufren una serie de cambios celulares que determinan la muerte celular por apoptosis [Trundley et al, 2004]. La presencia de células dNK también se ha podido ver en otras especies, como es el ratón, donde la decidualización es diferente y donde la invasión del trofoblasto es mucho menor [Trundley et al, 2004].

Las células uNK y dNK se caracterizan por tener un fenotipo diferente a las células NK mayoritarias de sangre periférica, pues son células NK que no expresen CD16 y en cambio expresan la molécula CD56 con alta intensidad (CD16<sup>-</sup>CD56<sup>Brigh</sup>) entre lo más destacable [Koopman et al, 2003]. El origen de esta población distintiva del endometrio gestante y no gestante está aún por determinar. Esta población podría proceder de sangre periférica, donde una pequeña proporción de linfocitos NK presenta el mismo fenotipo CD16<sup>-</sup>CD56<sup>Brigh</sup>, que específicamente infiltraran el útero [Pijnenborg R, 2002; Dosiou et al, 2004]. Recientemente varios autores han propuesto, que la población

CD16<sup>-</sup>CD56<sup>Brigh</sup> en el útero, procediera de células de sangre periférica que se diferenciaron atendiendo a un microambiente determinado. Estos autores proponen que el propio trofoblasto, podría inducir este proceso ya que es capaz de producir determinados factores que funcionan como quimioquinas de células NK deciduales que contribuirían a modular el microambiente de citocinas local [Wu et al, 2004; Moffet-King, 2002; Keskin et al, 2007].

Estas células NK CD16<sup>-</sup>CD56<sup>Brigh</sup> en el útero presentan dos posibles papeles en la reproducción. En el ciclo menstrual normal, las uNK aumentan en número durante la fase secretora y parecen morir premenstrualmente. Estas células por tanto, pueden jugar un papel importante en el remodelado, diferenciación y desglose del endometrio durante el ciclo menstrual. Por otro lado, durante el periodo de gestación se encuentran en íntimo contacto con las células del trofoblasto extravelositario, lo que sugiere que podrían reorganizar y regular la invasión del trofoblasto [Dietl et al, 2006].

Recientes estudios han demostrado la posibilidad de que las dNK pudiesen estar relacionadas con el desarrollo de la placenta [Leonard et al, 2006; Monk et al, 2005; Ashkar et al, 2001; Ashkar et al, 2000; Guimond et al, 1997]. Las dNK pueden promover el crecimiento vascular placental y la decidualización. Esta única capacidad funcional de las dNK

estaría regulada por las interacciones entre los receptores específicos de las dNK y sus ligandos expresados en el trofoblasto o en las células estromales deciduales del microambiente decidual [Hanna et al, 2006]. Las interacciones de los receptores de las dNK (que pueden ser inhibidores o activadores) con sus ligandos favorecen la activación de las dNK, mediante la producción de factores de crecimiento y quimioquinas, que protegen frente a la pre-eclampsia debido a que favorecen la invasión trofoblástica y la formación de vasos sanguíneos deciduales [Hanna et al, 2006]. Por tanto, la regulación positiva de la invasión trofoblástica por parte de las dNK permite que estas células sean capaces de controlar, de manera indirecta, el remodelado vascular. Además de la complejidad de los mecanismos de interacción entre el trofoblasto y las células dNK, el trofoblasto invasivo promueve el reclutamiento de las NK desde la interfase materno-fetal mediante la secreción de quimioquinas específicas [Hanna et al, 2003; Drake et al, 2001].

Según Hanna y col., [2006] la estimulación de los receptores activadores de las dNK podrían inducir tolerancia frente a las células fetales y sobre todo dar lugar a la producción de factores de crecimiento, que junto con la producción de citoquinas y quimioquinas específicas también favorecerían el reclutamiento de las dNK. Por tanto la combinación entre la producción de citoquinas por parte de las dNK CD16<sup>-</sup>CD56<sup>Brigh</sup> y su baja capacidad citotóxica [Cooper et al, 2001;

[Fehniger et al, 1999](#); [Rajagopalan et al, 2006](#)] hacen que este subtipo celular juegue un papel importante en los procesos inmunológicos de la interfase materno-fetal.

### *2.3. Las Células T*

Las células T constituyen en torno al 10% de los leucocitos de la decidua de primer trimestre, encontrándose a través del estroma, dentro del epitelio y también en los agregados linfoides basales. El número de células T es estático durante el ciclo menstrual y no se ven acumuladas en el lugar de implantación. Las células T son activadas mediante células presentadoras de antígeno (APC, antigen presenting cells) para dar lugar a la supervivencia o eliminación del feto [[Steinman, 1991](#)]. Las células CD3+ se encuentran principalmente en los agregados linfoides basales desde el estroma endometrial y epitelio [[Starkey et al, 1991](#)], pero la mayoría de las células T, aproximadamente la mitad pertenecen al subtipo CD8+ [[Vassiliadou and Bulber, 1996](#); [Olivares et al, 2002](#)].

### *2.4. Las Células B*

Los linfocitos B son los más escasos en el endometrio humano encontrándose en todo el endometrio durante todos los estados del ciclo menstrual [[Starkey et al, 1991](#)].

### *2.5. Las células dendríticas*

Las células dendríticas (DC, dendritic cells) son células importantes para la generación de tolerancia e inmunidad [Nagler-Anderson et al, 2001]. Estudios recientes han identificado una pequeña población de aproximadamente 1 % de DC en la decidua de primer trimestre, presentando un fenotipo de células dendríticas mieloides inmaduras [Gardner et al, 2003], otros autores han detectado una población de aproximadamente un 10% [Kämmerer et al, 2003]. El fenotipo, función y descripción de estas células se discutirá más adelante en un apartado especial por ser éstas las células objeto de estudio en la tesis.

## **3. TOLERANCIA MATERNO-FETAL**

El feto es considerado como un injerto semialogénico ya que expresa antígenos paternos que pueden ser reconocidos como extraños por el sistema inmunológico materno [Bouma et al, 1996; Loke et al, 2000; Heikkinen et al, 2004]. De hecho, células fetales y moléculas antigénicas fetales de carácter potencialmente inmunogénico han sido detectadas en la sangre materna [Reading et al, 1995]. El sistema inmunológico materno podría entrar en contacto con estas moléculas, y desarrollar una respuesta inmunitaria agresiva. Sin embargo, en el 50%

de los casos, en la especie humana, la gestación llega a término con éxito, ya que se desarrollan una serie de mecanismos inmunológicos que favorecen la tolerancia inmunológica de la madre hacia el feto.

### 3.1. HLA-G

El antígeno humano leucocitario (HLA)-G es un antígeno del complejo principal de histocompatibilidad de clase Ib expresado por el trofoblasto extraveloso (EVT: extravillous trophoblast) y que está implicado en la protección de las células fetales de la lisis por parte de las dNK [Chumbly et al, 1994; Mofett-King A, 2002]. Presenta un polimorfismo limitado, siete isoformas generadas por *splicing* alternativo del mRNA [Hiby et al, 1999]. Cuatro de ellas son moléculas de membrana y tres solubles [Ishitani et al, 1992; Fujii et al, 1994].

La expresión del HLA-G está disminuida en la pre-eclampsia [Goldman et al, 2000; Hara et al, 1996; Colbern et al, 1994], lo que podría ser un vínculo entre la expresión de HLA-G y la incapacidad de invasión de las arterias espirales por el trofoblasto extraveloso (EVT, extravillous trophoblast) que ocurre en esta enfermedad [O'Brien et al, 2000].

Las moléculas MHC de clase I, HLA-A, -B y -C, al igual que las moléculas MHC de clase II, juegan un papel importante en la inducción de la respuesta inmunitaria específica, por la presentación de péptidos antigénicos a las células T [Rammensee et al, 1993; Madden et al, 1995]. En contraste con este fenómeno de activación, las moléculas MHC de clase I no clásicas, como el HLA-G y HLA-E, está relacionadas con la tolerancia inmunitaria [Carosella et al, 1999].

Se ha visto que el HLA-G contribuye, junto con otros mecanismos, a la supervivencia del injerto semiallogénico. Este efecto inhibitorio de las moléculas HLA-G sobre las NK es mediado a través de la interacción con receptores inhibidores de muerte. El HLA-G interacciona con los receptores KIR presentes en estas dNK, como es el KIR2DL4 (CD158d) [Ponte et al, 1999], con el receptor ILT2 miembro de la familia LIR/ILT y que se expresa tanto en células mielomonocíticas, células B, células dendríticas, células T y NK [Cosman et al, 1997; Colonna et al, 1997].

Otros dos receptores pueden estar implicados en la modulación de la función de las células dNK a través del HLA-E. El HLA-E, que puede unirse al receptor activador CD94/NKG2A y al inhibidor CD94/NKG2C. Dichos receptores presentan una gran afinidad por la molécula HLA-E, dependiendo dicha unión de la secuencia del péptido líder asociado al HLA-E. La afinidad por HLA-E es mayor para el receptor inhibidor

CD94/NKG2A que para CD94/NKG2C, receptor activador. Es más, la unión depende del péptido unido a HLA-E y esta unión es máxima cuando se trata del un derivado del péptido líder del HLA-G. [Valés-Gómez et al., 1999].

### *3.2. Balance Th1/Th2*

La eliminación de un agente infeccioso invasor va a depender de que la respuesta del sistema inmunitario sea la adecuada, y son las células T CD4+ cooperadoras o helper las encargadas de dirigir u orquestar dicha respuesta. Clásicamente se vienen distinguiendo dos tipos de linfocitos Th, tipo 1 o Th1 y tipo 2 o Th2, que se diferencian por sus características funcionales y el perfil de citocinas que producen. Las células Th1 inducen activación de la inmunidad celular o citotóxica, para proteger al organismo frente a virus u otros patógenos intracelulares. Esta respuesta está definida fundamentalmente por la producción de IFN- $\gamma$ , IL-2, y TNF $\alpha$ , y la activación de macrófagos. La respuesta tipo Th2 se caracteriza por la producción de IL4, IL5, IL6, IL10, IL13 y potencian la producción de anticuerpos para hacer frente a los patógenos extracelulares [Mossman et al, 1989; Constant et al, 1997]. Este último tipo de respuesta está relacionada con la tolerancia a los xenotrasplantes o al feto durante el embarazo.

El balance de citoquinas Th1/Th2, con predominancia de Th2, es un mecanismo importante que determina la supervivencia del feto en el útero materno [Lin et al, 1993; Raghupathy et al, 1997; Raghupaty et al, 1999; Clark et al, 1999; Saito et al, 2001; Piccinni et al, 1998; Joachim et al, 2003; Krishnan et al, 1996; Zenclussen et al, 2000; Zenclussen et al, 2001; Zenclussen et al, 2003]. El cambio de citoquinas influye en las células trofoblásticas y en las células inmunitarias uterinas (macrófagos, células NK, linfocitos), los cuales contribuyen a la implantación del embrión, el desarrollo de la placenta, y supervivencia del feto. Las citoquinas predominantes en cada estado de gestación funcionan limitando el rechazo materno sobre el feto, especialmente en la interfase materno fetal, y facilitando el proceso fisiológico dentro del tracto reproductivo materno. Además, el desequilibrio de citoquinas junto con la inapropiada activación de macrófagos y células NK van en detrimento de la supervivencia del feto en modelos experimentales [Clark et al, 1999; Blois et al, 2007].

El desplazamiento hacia Th1 genera una respuesta inmunitaria que desemboca en el aborto involuntario, mientras que si es hacia Th2 supone la supervivencia del feto y progresión del embarazo [Raghupathy 1997; Piccini et al., 1998; 2001].

Las células Th2, al inhibir a las Th1, inhibirían a su vez la citotoxicidad que es estimulada por estas células. Sin embargo, se ha visto en ratones deficientes en IL-4 y IL-10, que no se muestra una interrupción del embarazo [Svensson et al, 2001], sugiriendo que las células Th2, pueden favorecer, pero no son esenciales para un embarazo normal [Margni et al, 2001; Chaouat et al, 2002; Zenclussen et al, 2002].

Las DCs mioeloides son capaces de inducir a las células T CD4+ indiferenciada para dar lugar a Th1 o Th2, e incluso a células T reguladoras, dependiendo del estímulo que las DCs reciban del medioambiente [Kadowaki et al, 2007], por lo que las interacciones entre ambos tipos celulares en la decidua puede ser crucial para el mantenimiento del embarazo o el rechazo fetal.

### *3.3. Las células T reguladoras en Decidua humana*

Las células T reguladoras (Treg) CD4+CD25+ son un subtipo de células T especializadas involucradas en la prevención de la autoinmunidad [Sakaguchi et al, 2000; Shevach et al, 2002; Read et al, 2001]. Hay estudios que han demostrado que las Treg son capaces de prevenir el rechazo de injertos [Graca et al, 2002; Word et al, 2003] indicando que estas células son potentes supresores de la respuesta T.

Aunque las Treg han sido descritas clásicamente como no proliferativas, existen datos que indican que las Treg pueden proliferar in vivo, además de ser capaces de expandir la respuesta frente a estímulos antigénicos [Walter et al, 2003]. La identificación de las Treg en humanos está asociada a la alta expresión del CD25, aunque este antígeno también es expresado por células T activadas. Debido a ello para poder diferenciarlas se ha estudiado el FoxP3, que es un gen que codifica al factor de transcripción Scurfin, y que ha sido asociada con la generación y función de las Treg murinas, el cual parece no estar expresado por las células T activadas normales [Somerset et al, 2004]. Se ha visto que el tratamiento de las células CD4+CD25- con TGF $\beta$  pueden conducir a la transcripción del factor FoxP3 y a la generación de un fenotipo regulador [Walter et al, 2003].

La prevalencia de las Treg CD4+CD25+ en el embarazo humano hace pensar que la Treg juegan un papel importante en la respuesta inmunitaria materna frente al feto, debido al rápido incremento en las Treg circulantes durante el embarazo temprano, y a la aparición del pico máximo durante el segundo trimestre, cuando la invasión del trofoblasto en la decidua es máximo [Pijnenborg et al, 1983]. Del mismo modo el descenso de las Treg después del parto es también consistente con la retracción de los estímulos inmunológicos sobre el injerto. Se ha demostrado que esta población CD25+ puede inhibir la inducción de

proliferación linfocitaria mediante estímulos alogénicos y por tanto es probable que pueda presentar dicha función in vivo [Somerset et al, 2004].

Un importante mecanismo que participa en la tolerancia materno fetal es el catabolismo del triptófano por parte de las células dendríticas (DC) mediante la participación de la enzima indoleamida 2,3 dioxigenasa (IDO). La expresión de IDO puede estar influenciada por el antígeno 4 citotóxico de los linfocitos T (CTLA-4), una molécula expresada por las células Treg [Grohmann et al, 2002; Fallarino et al, 2003].

Estudios funcionales han demostrado que las células CD4+CD25+ presentan capacidad inhibitoria sobre las células T [Somerset et al, 2004]. Los estudios de Somerset [2004] también han dado lugar a una relación entre IDO y CTLA-4 de las Treg en el embarazo. El incremento en el número de las Treg podría estimular la expresión de IDO en células presentadoras de antígeno y por tanto descender los niveles de triptófano [Somerset et al, 2004], lo cual queda patente al verse que los niveles de triptófano descienden durante el primer trimestre del embarazo normal [Schrocksnadel et al, 2003]. La expresión de CTLA-4 en la superficie de las Treg CD4+CD25<sup>Bright</sup> está incrementado en la decidua del embarazo temprano, lo que indicaría que estas células CD4+CD25<sup>Bright</sup> serían estimuladas por el TCR, quizás por antígenos fetales [Sasaki et al, 2004].

Hay autores que hablan de una subpoblación de células Treg CD4+CD25<sup>Bright</sup> las cuales están incrementadas en la decidua de embarazo temprano, y que presentan una expresión del antígeno CTLA-4 en decidua similar a la expresión de las Treg CD4+CD25+, sugiriendo que las células Treg CD4+CD25<sup>Bright</sup> presentan funciones inmunoregulatoras [Sasaki et al, 2004]. Se ha podido comprobar también que las Treg CD4+CD25+ requieren el contacto célula-célula para su función supresora. Estas características de las células T CD4+CD25+ deciduales son similares a las células Treg CD4+CD25+ de sangre periférica [Sasaki et al, 2004].

Existen diversos mecanismos que podrían explicar el enriquecimiento de las células T CD4+CD25+ en la decidua, como son las quimioquinas, sustancias que atraen a las CD4+CD25+ a través de los receptores de quimioquinas CCR4 y CCR8. Principalmente, el número de células T que está incrementado en la decidua durante el embarazo temprano humana son las que expresan CCR4 y el factor quimiotáctico para el CCR4, TARC (CCL17), que es expresado en el trofoblasto, células endometriales y células epiteliales uterinas [Tsuda et al, 2003]. Las células Treg CD4+CD25+ pueden ser reclutadas en la interfase materno fetal, en parte, a través de la ruta mediada por TARC.

Sasaki y col., [2002] han podido observar que la proporción de células CD4-CD25<sup>Dim</sup> deciduales en abortos espontáneos estaba incrementada, pero las células CD4+CD25<sup>Dim</sup> en la decidua de aborto espontáneo era igual que en la decidua de aborto inducido, por lo que podría decirse que el descenso de las Treg CD4+CD25<sup>Bright</sup> en el caso de los abortos podría inducir la activación de los linfocitos maternos frente al feto. Los datos de Sasaki muestran que la proporción de células Treg CD4+CD25<sup>Bright</sup> está incrementada en la decidua de aborto terapéutico y que está descendida en la decidua de aborto espontáneo, por lo que estas células Treg CD4+CD25<sup>Bright</sup> podrían jugar un papel en el mantenimiento del embarazo [Sasaki et al, 2002].

#### **4. MECANISMOS DE APOPTOSIS EN LA DECIDUA HUMANA DE PRIMER TRIMESTRE**

Durante el embarazo el útero y la placenta humana son lugares inmunológicamente privilegiados en los que la actividad inmunitaria está efectivamente disminuida [Streilein et al., 1995]. La apoptosis de las células inmunitarias ha sido propuesta como un mecanismo para el mantenimiento del privilegio inmunológico [Griffith et al, 1997]. Los procesos apoptóticos se caracterizan por un encogimiento celular, reorganización del núcleo celular y aparición de cuerpos apoptóticos, los cuales son posteriormente fagocitados.

El Fas (CD95), receptor de superficie celular perteneciente a la familia del Factor de necrosis tumoral (TNF), es un mediador de la apoptosis tras la interacción con su ligando FasL (CD95L, perteneciente a la familia de los receptores del TNF o TNFR), [Nagata et al, 1994; Lynch et al, 1995; Griffith et al, 1997]. El FasL es expresado por células efectoras mientras que el Fas está expresado en las células diana. La importancia del sistema Fas/FasL se puede observar en lugares de privilegio inmunitario como son por ejemplo testículos [Xerri et al., 1997] y ojos [Griffith et al., 1995; Wilson et al., 1996]. La expresión de FasL por el trofoblasto humano ha sido propuesta por Coumans y col., [1999] como un mecanismo de tolerancia frente a los tejidos fetales. De acuerdo con Coumans y col., la frecuencia de muerte celular en linfocitos T de sangre periférica Fas<sup>+</sup> es mayor cuando estas células son co-cultivadas con trofoblasto, que expresa FasL, que cuando se cultivan solas [Coumans et al, 1999]. De hecho, la expresión de FasL en la interfase materno fetal probablemente protege a la placenta frente a los leucocitos maternos. Sin embargo algunos estudios en ratones deficientes en Fas o FasL indican que este defecto no tiene efectos adversos en el embarazo [Chaouat et al, 1999; Roger et al, 1998].

En la apoptosis de células inmunitarias maternas activadas en la decidua humana, no sólo participa la señalización de Fas-FasL sino también el TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing

ligand). El TRAIL, al igual que el FasL, es un miembro de la familia TNF que se une a su receptor TRAILR controlando la ruta de señales apoptóticas [Reed et al, 1999].

Podemos decir que el fenómeno de la apoptosis de la placenta es un fenómeno fisiológico normal durante la gestación, debido a que dicho proceso aumenta conforme avanza el embarazo. Es evidente que el balance entre la muerte celular y la proliferación juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis normal de los tejidos. Esto puede ser particularmente importante en el fenómeno del embarazo humano. La apoptosis dentro de la decidua materna parece ser importante en el establecimiento del privilegio inmunitario en el útero gestante, para proteger a las células fetales frente al ataque por parte de las células maternas. Es de destacar que al parecer las células trofoblásticas también son en parte positivas para CD95L, y aunque aparentemente estas no sufren las consecuencias típicas de la apoptosis [Payne et al, 1999], esta expresión podría tener un papel crucial en la limitación de la invasión exacerbada del trofoblasto [Thellin et al, 2000]. Sin embargo, el papel exacto de las interacciones Fas-FasL o TRAIL-TRAIL-R durante el embarazo humano no se encuentran aún bien definidas. La diferenciación de la placenta depende de la incorporación continua del EVT a través de rutas apoptóticas [Huppertz et al, 1999; Huppertz et al, 1999; Huppertz et al, 1998]. Por tanto, las alteraciones en

el programa de muerte celular de la placenta parecen estar asociadas con un embarazo anormal. Recientemente se ha demostrado como el EVT de fenotipo invasivo presenta mayores proporciones de CD95 y CD95L que el EVT de fenotipo proliferativo, el cual en cambio presenta niveles más altos de Bcl-2, lo que sugeriría así mismo una regulación a este nivel [Murakoshi et al, 2003].

## **5. EL ABORTO**

El embarazo es considerado como un ejemplo de aceptación del feto semialogénico, ahora bien este embarazo no siempre es exitoso. Puede ocurrir que en el primer trimestre o primera mitad del embarazo el proceso se vea suspendido [Wilcox et al, 1988]. Aproximadamente el 50% de los embarazos terminan en aborto [Lee et al, 2000]. Hay evidencias de que el sistema inmunológico participa en mecanismos de eliminación del feto durante el aborto espontáneo [Raghupathy et al, 1997; Baker et al, 1999, García-Olivares et al 2002].

En ratones y humanos, el embarazo está relacionado con la producción de citoquinas tipo Th2 [Lin et al, 1993; Marzi et al, 1996], mientras que el aborto está relacionado con la producción de citoquinas Th1 o con una disminución de Th2 [Tangri et al, 1994; Marzi et al, 1996; Piccinni et al, 1998].

Diferentes resultados sugieren que las células T deciduales y linfocitos dNK podrían atacar al trofoblasto, y probablemente lo hacen en el aborto espontáneo, aunque su actividad citotóxica es regulada por diferentes mecanismos, e inhibida durante el embarazo normal [Lin et al, 1993; Munn et al, 1998; Jiang et al, 1998].

Durante el aborto espontáneo, el mecanismo de control sobre el trofoblasto se intensifica y es más activo, de tal forma que conduce a una destrucción masiva del trofoblasto por inducción de la apoptosis, dando lugar a la interrupción del embarazo, y por tanto al aborto. El mecanismo por el cual se induce la apoptosis de las células del trofoblasto queda aún por determinar. En este sentido, se ha propuesto que citoquinas de tipo Th1 inflamatorias, tales como TNF, son directamente citotóxicas para el trofoblasto [Knofler et al, 2000]. A su vez las células NK y los linfocitos CD8+ de la decidua, podrían ser también activados por citoquinas Th1. De hecho las pequeñas subpoblaciones de CD56+CD25+ y CD56+HLA-DR+ que se encuentran significativamente incrementadas en la decidua de abortos espontáneos, son NK activadas que podrían contribuir a la eliminación del feto [Olivares et al, 2002].

Por otro lado, la expresión de receptores inhibidores de la citotoxicidad (KIR) por parte de las células NK, que es elevada en los embarazos humanos normales [Ponte et al, 1998] se reduce en abortos

espontáneos en humanos, lo que probablemente lleva a la desinhibición de las células citotóxicas contra el trofoblasto [Chao et al, 1999].

La actividad inmunológica materna frente al feto podría ser un mecanismo biológico eficiente para eliminar fetos cuando se presente algún problema con la gestación. Este mecanismo determinaría que solo fetos que estén en un estado adecuado, llegarán a completar la gestación.

## **6. CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Las células dendríticas representan una población heterogénea de células inmunocompetentes de origen hematopoyético cuya función principal es la captación del antígeno para presentarlo a otras células del sistema inmunológico, por lo que se consideran las células presentadoras de antígeno (APC, antigen presenting cells) profesionales.

Las células dendríticas se encuentran en la mayoría de los tejidos y en los órganos linfoides primarios y secundarios. En determinados estadios de diferenciación desarrollan unas proyecciones de tipo arbóreo, dendritas, por las que reciben su nombre. Las células dendríticas inmaduras en cambio se denominan células veladas por presentar vellosidades en vez de dendritas.

Las células dendríticas fueron descubiertas por Langerhans a finales del siglo XIX (células de Langerhans), posteriormente, fueron RM Steinman y Z.A. Cohn quienes en 1973 las describieron y localizarán en distintos tejidos, denominándolas en general células dendríticas. Las células foliculares dendríticas (FDC, follicular dendritic cells) han sido clásicamente clasificadas como células dendríticas por presentar una morfología semejante a las anteriores, aunque estas se localizan principalmente en los órganos linfoides secundarios y son de origen no hematopoyético [Llanzabechia et al, 2000].

Nuestro estudio se ha centrado en la caracterización de células dendríticas en la decidua humana, tejido materno de la placenta, en el que residen los mecanismos inmunológicos responsables de la aceptación del feto en los primeros estadios del embarazo.

### **6.1. Origen y maduración de las Células Dendríticas**

En la actualidad distinguimos varios subtipos de DC que difieren entre sí en la vía de diferenciación y de activación, como en algunas de sus funciones específicas y perfiles migratorios [Brière et al, 2002]. Todos los subtipos de DC son capaces de captar, procesar y presentar el antígeno actuando como potentes estimuladores de los linfocitos T y B, o

como inductoras de respuestas de tolerancia, por lo que son consideradas las centinelas del sistema inmunitario [Banchereau, 1998; Hart et al, 1999, Shortman et al, 2007].

Todos los subtipos de DC, al igual que todas las células sanguíneas, derivan de células madres hematopoyéticas (HSC, hematopoietic stem cells). Las HSC se regeneran a si mismas en médula ósea y pueden diferenciarse en precursores hematopoyéticos mieloides, linfoides y eritroides [Takeuchi et al, 2007]. Los dos subtipos de DCs son: las DC mieloides (miDC) procedentes del linaje mieloides y las DC plasmocitoides (pDC), de origen linfoides [Shortman and Liu, 2002]. Estos dos subtipos de DC presentan diferente distribución tisular, producción de citoquinas y necesidades de crecimiento [Adams et al, 2005]. Las miDC son formadas a partir de precursores mieloides CD11c<sup>+</sup>, mientras que las pDC se originan a partir de progenitores linfoides CD11c<sup>-</sup> en los órganos linfoides [Shortman et al, 2002].

Muchos de los estudios realizados sobre las DC se han llevado a cabo mediante la obtención *ex vivo* de ambos subtipos de DC. Las miDC se obtienen a partir de monocitos de sangre periférica en presencia de IL-4 e GM-CSF, tanto en humanos como en ratón y otras especies. En cambio las células pDC humanas se obtienen mediante cultivo con IL-3 [Grouard et al, 1997; Olweus et al, 1997; Rissoan et al, 1999], INF- $\gamma$ / $\beta$  y

TNF- $\alpha$  [Kadowaki et al, 2000], mientras que las de ratón y de monos, se obtienen de los órganos linfoides y sangre periférica, tras la inoculación del factor de crecimiento hematopoyético FLT3L (FMS-related tyrosine kinase 3 ligand) [Lyman SD, Cell 1993; Bórkj P 2001, Telshova, J Leuck Biol. 2004].

## **6.2. Fenotipo y Función de las células dendríticas**

Las células dendríticas derivan, como ya hemos comentado, de HSC CD34<sup>+</sup> y emigran a los distintos tejidos como células dendríticas inmaduras (iDC) distinguiéndose por su fenotipo. Ambos tipos celulares, miDC y pDC, se encuentran estratégicamente localizadas en el organismo con objeto de llevar a cabo su función. Las miDC provienen de un progenitor mieloide y se caracterizan por la expresión de CD11c con alta intensidad (CD11c<sup>hi</sup>) [Bendriss-Vermare et al, 2001; Briere et al, 2002], y se encuentran en los órganos linfoides secundarios, tejidos periféricos y en los lugares de inflamación [Kapsenberg, 2003].

Las pDC comparte un progenitor común con los linfocitos T, B y NK [Wu et al, 1991; Ardavin et al, 1993; Galy et al, 1995; Res et al, 1996; Marquez et al, 1998; Plum et al, 1999; Traver et al, 2000; Manz et al, 2001], siendo este progenitor CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD7<sup>+</sup> y careciendo de potencial mieloide y eritroide [Hao et al, 2001]. Se encuentran principalmente los órganos linfoides secundarios y expresan el antígeno CD11c con baja intensidad o *low* (CD11c<sup>low</sup>) [Rissoan, science 1999]. En

humanos las pDC además presentan una serie de características que hacen que se diferencien claramente de las miDC, como son la falta de expresión de marcadores mieloides, la expresión de marcadores linfoides como el CD123, y la alta producción de INF tipo I tras interactuar con algunos microorganismos [Penna et al, 2002, Kapsenberg, 2003].

Las DC actúan como potentes estimuladoras de las células T, con la particular habilidad de inducir respuesta inmunológica primaria, sin estimulación previa, tras la interacción con antígenos microbianos o virales y así inducir la memoria inmunológica.

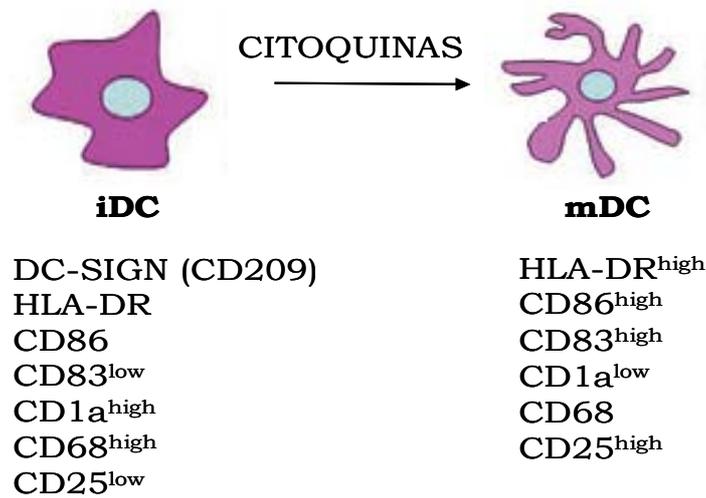
Las características funcionales de las DC varían en función de su estado de diferenciación. Así es que las DC inmaduras (a partir de ahora indicadas como iDC) permanecen en los tejidos con objeto de captar el antígeno extraño. Cuando tiene lugar la invasión de patógenos, los precursores (monocitos CD14+) de las miDC son atraídos a los lugares de inflamación mediante quimioquinas [Sallusto et al, 1999]. Estos precursores se diferencian a iDC, que son especialmente eficientes a la hora de captar el antígeno. Después de la captación del antígeno, las iDC mieloides abandonan el tejido hacia los nódulos linfáticos, durante esta migración se producen diversos pasos de maduración intermedia y la expresión entre otros del receptor CCR7 (CC-chemokine receptor 7) que favorecen ésta migración [Geissmann, 2002]. Las pDC en cambio,

permanecen en los órganos linfoides secundarios en estado inmaduro donde captan y presentan el antígeno a las células T [Wilson et al, 2003; Shortman et al, 2007].

Las DC tanto plasmocitoides como mieloides están especialmente diseñadas, tras el procesamiento del antígeno ingerido a péptidos, para llevar a cabo la activación de las células T vírgenes (sin previo contacto con el antígeno específico). Los péptidos son cargados en las moléculas de MHC I y II siendo luego transportados a la superficie celular. Se ha demostrado que las moléculas de MHC-II, después de la captación del antígeno, desaparecen del compartimento endosomal de las DC e incrementan en la membrana plasmática permaneciendo por un mayor periodo de tiempo en la misma, con objeto de inducir la estimulación de las células T [Villadangos et al, 2005]. En las áreas de células T de los nódulos linfáticos, cuando se produce la transformación definitiva a DC maduras (mDC), aparece la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86, que son cruciales para que las DC actúen como APC [Reis et al, 2006]. La presentación de los péptidos al receptor de la células T (TCR, T cell receptor) dará finalmente lugar a la activación de las células T [Inaba et al, 1990].

En contraste con las mDC, las células iDC, tanto plasmocitoides como mieloides, expresan menos cantidad de moléculas MHC II y no

expresan moléculas co-estimuladoras, siendo así incapaces de inducir la activación de las células T.



**Figura 2:** cambio de fenotipo en las DC durante el proceso de maduración.

Clásicamente las DC son células presentadoras de APC, por excelencia y tienen mayor capacidad de estimulación que otras células presentadoras de antígeno como las células B o los los macrófagos. Las células dendríticas son altamente flexibles en su función, capaces de inducir la diferenciación de las células a perfiles de tipo Th1, Th2 o células reguladoras, dependiendo de los receptores que expresen y de los factores y citocinas que haya en el tejido.

### 6.2.2. Fenotipo de las células dendríticas

Las miDC se caracterizan por ser células CD11c<sup>Hi</sup> y por expresar marcadores mieloides como son CD13, CD33 y CD11b [O`Doherty et al, 1994], son CD123<sup>Low</sup> [Shortman et al, 2002] y presentan expresión de receptores tipo toll (TLRs) como son TLR1, TLR2, TLR3 TLR4, TLR5 y TLR8 [Kadowaki et al, 2007]. Estas moléculas pertenecen al un grupo de receptores que se caracterizan por unirse y reconocer patrones de moléculas asociadas a distintos patógenos.

Las pDC, sin embargo, son células CD11c<sup>Low</sup> y no expresan marcadores mieloides [O`Doherty et al, 1994], expresan bajos niveles de MHC y moléculas co-estimuladoras [Rissoan et al, 1999; Rossi et al, 2005], además son CD123<sup>Bright</sup> [Kadowaki et al, 2001]. En cuanto a los receptores de tipo *Toll*, éstas se caracterizan por presentar la expresión de TLR7 y TLR9, que reconocen componentes virales y tras su interacción dan lugar a una gran cantidad de interferon (IFN) de tipo I [Kadowaki et al, 2007]. Las miDC, en cambio, son capaces de reconocer componentes bacterianos y dar lugar a la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 [Kawadoki et al, 2007].

Las iDC mieloides son CD14<sup>-</sup>, CD1a<sup>+</sup>, MHCII<sup>Low</sup>, CD86<sup>Low</sup>, CD80<sup>Low</sup>, CD83<sup>-</sup> [Malanga et al, 2007], mientras que las de origen plasmocitoide son CD11c<sup>-</sup>, CD13<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD123<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>Low</sup> [Brière et al, 2002]. Las mDC de origen mioide son CD83<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> CD80<sup>+</sup>

MHCII<sup>high</sup> [Malanga et al, 2007], CD11c<sup>High</sup>, CD33<sup>High</sup>, CD11b<sup>+</sup> [Brière et al, 2002], mientras que las de origen plasmocitoide son CD83<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD33<sup>Low</sup> [Brière et al, 2002].

### *6.2.3. Capacidad de captación de antígenos y fagocitosis de las células dendríticas.*

Una de las principales funciones de las mDC es que son potentes APC (antigen presenting cells, células presentadora de antígeno) capaces de activar a las células T helper memoria e indiferenciadas, células T citotóxicas y células B [Banchereau et al, 1998]. Las mDC pueden estimular a las células T por procesamiento y presentación de péptido antigénicos dentro del contexto de las moléculas HLA de clase II y I [Morelli et al, 2003].

La capacidad fagocítica de las iDC es menor que en otras células fagocíticas, como por ejemplo los macrófagos. Las iDCs tienen capacidad fagocítica aunque su función no es la de eliminar al microorganismos sino la presentación del antígeno. No obstante, necesitan de la fagocitosis y de los mecanismos de eliminación del microorganismo para procesar y presentar los antígenos en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II [Leverrier et al, 2001]. Los fagocitos profesionales han evolucionado hacia la internalización y

eliminación de bacterias. Por el contrario, las iDC limitan su capacidad fagocítica después de la ingestión del microorganismo o antígenos extraños, tanto por el programa de maduración como el de actividad migratoria [Corinti et al, 1999; Rescigno et al, 1999]. Por esta razón la capacidad fagocítica de las DC maduras está altamente disminuida. Varios estudios han demostrado que las iDC pueden fagocitar eficientemente una serie de partículas antigénicas, como pueden ser diversas bacterias como el *Saccharomyces cerevisiae* y *Corynebacterium parvum*. También fagocitan partículas de zymosan y partículas de látex de un diámetro de entre 0,5 y 6  $\mu\text{m}$  [Reis e Sousa et al, 1993]. Sin embargo su capacidad fagocítica esta disminuida frente a otros tipos de bacterias, por ejemplo *Streptococcus gordonii*, que inducen la maduración de las iDC por lo que la capacidad fagocítica se ve disminuida después de la ingestión de la misma [Corinti et al, 1999; Kold-Mäurer et al, 2000].

Las DC obviamente destruyen los patógenos ingeridos, aunque su capacidad asesina es más limitada. Es decir, aunque utilicen algunos de los mecanismos típicos de muerte propios de los fagocitos profesionales, la principal función de las células dendríticas es la captación de antígenos para su procesamiento, y así llevar a cabo la presentación de los mismos a las células T. Las iDC internalizan mayor cantidad de antígeno que las mDC, ya que actúan como centinelas para los

patógenos entrantes, mientras que la presentación del antígeno a las células T es llevado a cabo por las mDC, que tienen disminuida su capacidad fagocita en favor de su función como APCs [Nagl et al, 2002].

Para llevar a cabo el proceso de captación del antígeno las DC reconocen a las partículas microbianas mediante distintos receptores, como son, los receptores de reconocimiento de patrones incluyendo a los TLRs, receptores de manosa y receptores carroñeros (scavenger). Además las DCs son capaces de endocitar los complejos inmunológicos (ICs) que contienen antígenos opsonizados por inmunoglobulinas y productos de activación del complemento. Estos interactúan con receptores Fc para los anticuerpos, y receptores del complemento (CRs) expresados por las DCs. Los principales receptores para fagocitar inmuno-complejos son CR3, receptor para el C3 y derivados, y Fc $\gamma$ Rs, receptores para la IgG. Los microorganismos cubiertos por fragmentos derivados del C3 adquieren la capacidad de unirse eficientemente a los receptores de complemento [Erdei et al, 1991; Thieblemont et al, 1993; Gordon et al, 2002] y CR3, que junto con otras moléculas de adhesión, facilitan la entrada de diferentes tipos de células diana [Hildreth et al, 1989; Bajtay et al, 2004].

Los receptores TLRs, receptores manosa y fucosa, etc. La ingestión del antígeno por las iDC, por cualquiera de los mecanismos mencionados,

da lugar a un estímulo que induce la maduración y migración hacia los órganos linfoides secundarios.

También se han identificado diversas moléculas de superficie celular relacionadas con la captura del antígeno por parte de las DCs. En particular una amplia diversidad de receptores lectina tipo C (CLRs) que están relacionados con un amplio rango de estructuras de carbohidratos en antígenos [Fidgor et al, 2002; Drickamer et al, 1999]. Especialmente las iDC que se encuentran en el tejido, expresan una amplia variedad de lectinas tipo C, las cuales están relacionadas con el reconocimiento tanto de antígenos propios como patógenos. Aunque no se conoce demasiado sobre el reconocimiento de carbohidratos específicos y la especificidad antigénica, es evidente que algunos de estos receptores CLRs, como Dectin-1, DC-SIGN, y receptores de manosa (MRs) pueden regular la señalización y función al igual que los receptores de adhesión celular. Los CLR reconocen estructuras de carbohidratos específicas de antígenos propios o de la pared celular de los patógenos. Su principal función es la internalizar antígenos por degradación en compartimentos lisosomales para aumentar el procesamiento del antígenos y presentación por las DC [Fidgor et al, 2002; Engering et al, 2002].

Junto con el MHC, CD1 y FcR, los principales receptores de las DC relacionados directamente con el reconocimiento de patrones

moleculares característicos en antígenos son los TLR [Underhill et al, 2002; Thoma-Uszynski et al, 2001; Weis et al, 1998]. Los TLR son receptores de reconocimiento de patógenos [Janeway et al, 2002] que reconocen patrones moleculares característicos presentes en lípidos microbiales, lipoproteínas, lipopolisacáridos (LPS), ácidos nucleicos, DNA bacterial, al igual que factores secretados bajo tejido dañado como proteínas de choque térmico (Hsp 70) [Akira et al, 2003; Hemmi et al, 2000]. El reconocimiento por parte de los TLR dan lugar a una cascada de señales intracelulares que inducen la maduración de las DC y a la producción de citoquinas inflamatorias, determinando finalmente a activación de las células T [Underhill et al, 2002; Janeway et al, 2002].

Dependiendo de la localización tisular y el estado de diferenciación, las DCs expresan un único grupo de receptores TLR y CLR. Distintos CLR son expresados por las iDC mieloides [Figdor et al, 2002], como los MR (CD206) [Sallusto et al, 1995], DEC-205 (CD205) [Mahnke et al, 2000], DC-SIGN (CD209) [Geijtenbeek et al, 2000], BCDA-2 [Dzionek et al, 2001], Dectin-1 [Willment et al, 2001], DCIR [Bates et al, 1999], DCAL-1 [Ryan et al, 2002], C-LEC [Colonna et al, 2000] y DC-ASGPR [Valladeau et al, 2001]/MGL-1 [Suzuki et al, 1996]. Las pDC expresan BDCA-2, Dectin-1, y DEC-205. Diversas lectinas tipo C no son expresadas exclusivamente en las DCs sino que también son expresadas en otras APCs como son los macrófagos. Sin embargo, hay CLR que son

específicos de las DC como el DEC-205 en las DC de ratón [Jiang et al, 1995] y el DC-SIGN que se expresa en las DC humanas tanto in vivo como in vitro [Bleijs et al, 2001]. El DC-SIGN es altamente expresado por las DC derivadas de monocitos o células CD34+ [Geijtenbeek et al, 2000]. In vivo, el DC-SIGN es expresado por las iDC en tejidos periféricos como piel, mucosa intestinal, recto, placenta y pulmones, al igual que las DC presentes en los tejidos linfoides, nódulos linfoides, amígdalas y bazo [Geijtenbeek et al, 2000; Soilleux et al, 2002].

#### *6.2.4. Activación de las células T por las células dendríticas*

Las DC han sido también clasificadas como DC1 y DC2, respectivamente, debido a que se pensaba que las miDC inducían una respuesta Th1 y las pDC sólo una respuesta Th2 [Rissoan et al, 1999]. No obstante, se ha podido ver que las pDC también son capaces de inducir una respuesta Th1 [Cella et al, 1999; Krug et al, 2001]. In vitro, las pDC pueden diferenciarse a DC maduras capaces de inducir a las células T indiferenciadas CD4+ hacia una respuesta Th1 o Th2, dependiendo del estímulo [Cella et al, 1999; Rissoan et al, 1999; Kadowaki et al, 2000; Cella et al, 2000]. Por ejemplo, las pDC activadas con IL13 y CD40 inducen una respuesta Th2, mientras que las activadas con virus inducen una respuesta Th1.

Como se expone anteriormente las iDC (plasmocitoides y mieloides) son células especializadas en la captura del antígeno, sin embargo tienen disminuida la capacidad de presentar estos antígenos de manera eficiente a las células T [Wilson et al, 2004]. La captación del antígeno se ve favorecida por receptores lectina tipo I como se es el DEC205 (CD205) [Steinman et al, 2003] que se expresa tanto en miDC [Mahnke et al, 2000] como en las pDC [Jiang et al, 1995], DC-SIGN (DC-specific intracellular adhesion molecule -3 grabbing nonintegrin o CD209), es una molécula tipo lectina con una función dual. Por una parte, DC-SIGN puede actuar como receptor de adhesión uniéndose con gran afinidad a las moléculas ICAM-2 e ICAM-3 [Figdor et al, 2002] y que se expresa en las miDC inmaduras [Geijtenbeek et al, 2000] y su expresión es inducida por las IL-4, IL-13 y GM-CSF [Relloso et al, 2002]. Además funciona como receptor para algunos patógenos, como por ejemplo la proteína gp120 del HIV [Geijtenbeek et al, 2001; Soilleux et al, 2002; Cambi et al, 2003], a bacterias como *Micobacterium tuberculosis* o levaduras como *Candida albicans*, facilitando la endocitosis de estos microorganismos [Kooyk et al, 2003].

#### *6.2.5. Las células dendríticas como inductoras de tolerancia*

Tanto las iDC plasmocitoides como mieloides han sido descritas como inductores de tolerancia de las células T [Steiman et al, 2003];

[Jonuleit et al, 2001; Mahnke et al, 2002; Martin et al, 2002]. En ausencia de inflamación o infección hay evidencias de que las iDC controlan la tolerancia periférica. Se ha visto que las DC pueden inducir la producción de IL-10 dando lugar a células CD4+ y CD8+ reguladoras [Bonifaz et al, 2002]. En consonancia con esto se ha descrito que las iDC expuestas a IL-10 muestran una capacidad fuertemente reducida para estimular una respuesta de células T CD4+ [Steinbrink et al, 1997]. En cambio para que la inmunidad mediada por DC se desarrolle dichas células deben estar expuestas a estímulos de maduración, como el desencadenado por el CD40.

### **6.3. Células dendríticas deciduales**

En decidua humana las DC han sido identificadas como células de origen mieloide debido a la expresión de CD11c, no habiéndose detectado células CD11c- CD123+, marcador característico de las pDC [Gardner et al, 2003].

En el endometrio decidualizado humano se han identificado diversas poblaciones de células APC HLA-II+, incluyendo macrófagos activados, constituyendo un 20% de los leucocitos deciduales [Starkey et

al, 1988; Vince et al, 1990] de las cuales hay una población mDC CD83+, que constituyen en torno a un 1% [Kammerer et al, 2000; Gardner et al, 2003; Miyazaki et al, 2003], y una población de iDC CD83- DC-SIGN+ de aproximadamente un 10% [Kämmerer et al, 2003]. Por otra parte Gardner y col., [2003] establecen que la población de DC de la decidua presentan en su mayoría un fenotipo DC-SING-CD14-DEC205+ diferenciándose varios subtipos dependiendo de la expresión de HLA-DR+.

Como hemos mencionado, Kämmerer y col., observaron en la decidua humana la existencia de una población mDC caracterizada por la expresión de CD83+ y que se caracteriza por expresar también CD40+CD45+HLA-DR++ con morfología y funciones típicas de las mDC. Estos autores describen la existencia de una población de dDC deciduales inmaduras con un fenotipo DC-SING+, HLA-DR+, CD14+, CD4+, CD68+/-, CD83-, CD25- [Kämmerer et al, 2000]. Esta población de células DC-SIGN+ presentan una eficiente capacidad para captar antígenos y madurar hacia DC CD83+CD25+, con capacidad de estimular la proliferación de las células T indiferenciadas.

En el endometrio humano aparece una proporción de células DC-SIGN+ sólo durante la decidualización, lo que hace suponer que éstas pueden jugar un papel importante en la respuesta inmunitaria local en la interfase entre la inmunidad y la tolerancia [Laskarin et al, 2007]. En

concordancia con esta hipótesis se ha descrito que el número de células productoras de IL12 en el total de la población de las DC de la decidua es significativamente menor que el encontrado en células periféricas, sugiere que estas células podrían regular el equilibrio Th1/Th2 manteniendo un estado predominantemente Th2 y favoreciendo de esta forma la gestación [Miyazaki et al; 2003].

Las mDC son las células presentadoras de antígeno más importantes del sistema inmunitario [Steiman et al, 1991]. In vitro, las mDCs forman agregados con los linfocitos, experimentalmente tan solo una única mDC es necesaria para estimular entre 100-3000 células T. Incluso un pequeño número de DC en la decidua humana podrían ser mediadores importantes en las interacciones inmunológicas en la interfase materno-fetal.

En cuanto a las iDC deciduales, CD83-DC-SIGN+, se ha visto que están implicadas en la evasión inmunitaria, mediante la unión de virus, parásitos y patógenos bacterianos al DC-SIGN, interfiriendo en la maduración de las dDC y produciendo citoquinas anti-inflamatorias, previniendo por tanto la respuesta inmunitaria [Van Kooyk et al, 2003].

En general se piensa que el mantenimiento del embarazo y la eliminación del feto, está relacionado con la producción de distintos

perfiles de citoquinas. Las citoquinas tipo Th1, como IL2, TNF- $\alpha$ , IL12 e IFN- $\gamma$ , favorecen el aborto, mientras que las citocinas tipo Th2, como IL4 e IL10, favorecen el embarazo [Juretic et al, 2004]. Blois y col., han observado en ratones que el incremento de DC CD8 $\alpha$ + está acompañado de un descenso de la producción de IL10, lo que sugiere que los antígenos fetales podrían inducir la producción de citoquinas Th1 durante el periodo de pre-implantación, después parece ser predominante un patrón de citoquinas Th2 [Blois et al, 2004]. Por tanto, un balance adecuado entre Th1/Th2, bajo el control de las miDC y pDC en en la fase temprana del embarazo murino, parece ser crucial para el éxito del embarazo [Yoshimura et al, 2003].

La maduración de las células CD14+DC-SIGN+ deciduales hacia mDC CD25+CD83+, bajo el tratamiento de citoquinas inflamatorias, da lugar a un descenso de la capacidad de captación del antígeno y por tanto a una menor estimulación de las células T en reposo [Kämmerer et al, 2000].

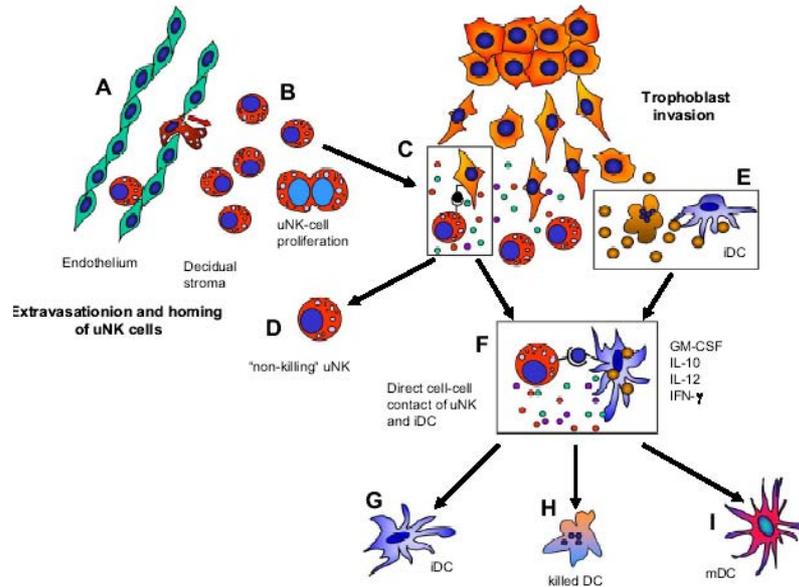
#### **6.4. Complejos DC-NK:**

Las células uNK y las iDC son las poblaciones predominantes de leucocitos en la decidua humana de primer trimestre, por lo que cabría preguntarse si la relación entre estos dos tipos celulares podría actuar en

la simbiosis entre la madre y el feto semialogénico. El contacto íntimo entre estos tipos celulares tiene lugar en la decidua humana. Este contacto célula-célula se produce probablemente entre el DC-SIGN expresado por las iDCs e ICAM-3 expresado en las células uNK [Calatayud et al, 1996; Geijtenbeek et al, 2000], pudiendo prevenir la interacción de las iDCs con las células T y la maduración de las iDCs en DCs inmunoestimuladoras [Dieta et al, 2005].

Las mDC podrían influir en las células NK por la producción de varias citoquinas, como son IL-12, IL-15, IL-1 y IL-18. La IL-12 es conocida por aumentar la citotoxicidad mediada por las NK y la producción de interferon- $\gamma$  [Trinchieri et al, 2003]. La secreción de IL-12 por parte de las dDC es significativamente menor que las de sangre periférica indicando que las dDC podrían promover el estado Th2, necesario para que el embarazo llegue a su fin [Miyazaki et al, 2003]. Las uNK son también conocidas por liberar una serie de citoquinas que podrían influenciar en las DC [Rieger et al, 2002], siendo una de ellas la IL-10. Se ha visto que la IL-10 es capaz de inhibir las funciones de las DC, como su habilidad de estimular a las células T, previniendo la inducción de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86 en las iDC [Steinbrink et al, 1997], además la IL-10 ha sido descrita por promover la apoptosis [Ludewig et al, 1995], siendo esta como ya hemos expuesto importante para el éxito del embarazo. La interacción de células NK

activadas con iDCs puede dar como resultado la maduración y activación de las iDC o causar la eliminación de las iDCs cuando las NK presentan una respuesta demasiado intensa (Fig. 3) [Dieta et al ].



**Figura 3:** esquema representativo de la interacción de células NK uterinas (uNK) y células dendríticas (DC) en la decidua humana con el trofoblasto extravellositario (EVT). Diet et al: uNK and DCs at the Feto-maternal Interface.

## *OBJETIVOS*



**OBJETIVOS**

El embarazo normal está relacionado con la respuesta Th2, mientras que el aborto espontáneo lo está con la respuesta Th1 [Raghupathy 1997; Piccini et al., 1998; 2001]. Teniendo en cuenta que la diferenciación hacia Th1 o Th2 está controlada por las DC, el objetivo general del presente proyecto es el estudio de las DC deciduales humanas de primer trimestre en embarazo normal y en aborto espontáneo. Este objetivo general está integrado por los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar el fenotipo de las dDC en aborto inducido (decidua normal) y aborto espontáneo, estableciendo si existen diferencias entre una u otra situación.
2. Conocer las proporciones de DC en decidua normal y de aborto espontáneo.
3. Estudiar la relación funcional entre las DC y las NK deciduales de primer trimestre.
4. Estudio de las variaciones de las DC deciduales a lo largo del embarazo.





*MATERIALES*  
*Y MÉTODOS*



## **MATERIALES Y METODOS**

### **1. Muestras**

Las muestras de aborto espontáneo de primer trimestre (n = 45) fueron recogidas por el Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, y por el Hospital San Agustín, Linares, Jaén. Las muestras de aborto inducido (n = 73) fueron obtenidas de la Policlínica Los Cármenes, Granada, Clínica Ginegranada, Granada, y Clínica el Sur, Málaga.

Las muestras fueron obtenidas por legrado vaginal, en el caso de los abortos espontáneos, se realizaron dentro de las 24 horas después de haber sido diagnosticado el aborto. Los abortos inducidos fueron llevados a cabo mediante aspiración. Los embarazos anembrionicos o fetos muertos fueron confirmados por ultrasonidos y excluidos del estudio. Ninguno de los abortos fue inducido farmacológicamente. Para ambos grupos de muestras se siguió el mismo criterio de exclusión, siendo excluidas las mujeres que habían recibido alguna medicación o que padecían alguna infección, enfermedad autoinmune u otra enfermedad sistémica. En todos los casos se obtuvo el consentimiento de cada paciente para el uso de la muestra. Este trabajo fue aprobado por el

comité Ético y de Investigación del Hospital Universitario San Cecilio, Granada.

## **2. Aislamiento de las células**

Las muestras de decidua de los distintos pacientes fueron procesadas de forma independiente y en ningún caso fueron mezcladas, con objeto de evitar la inducción de una reacción alógena. En primer lugar las muestras de decidua fueron lavadas con PBS (Gibco, California, USA). A continuación se eliminó de cada muestra los restos de trofoblasto existente. Posteriormente, las muestras fueron desmenuzadas con bisturí y se añadieron pequeñas cantidades de PBS con lo que se obtuvo una suspensión que posteriormente se pasó por un cedazo de 53µm de poro (Gallemkamp, Loughborough, UK). La suspensión resultante fue recogida y lavada por centrifugación. El botón de células se resuspendió en PBS y las células mononucleares fueron separadas centrifugando la suspensión sobre un gradiente de Ficoll-Histopaque (Sigma, Saint Louis, MO, USA), a 600 g durante 20 min y a 20 °C. Las células fueron recogidas de la interfase resultante, resuspendidas en PBS o RPMI 1640 (Sigma) al 10% de FCS (fetal calf serum, Gibco) y utilizadas para las distintas técnicas realizadas en este estudio.

### **3. Determinación de Marcadores en las Poblaciones Leucocitarias Mediante Citometría de Flujo**

Analizamos la expresión de distintos marcadores en las poblaciones objeto de estudio mediante citometría de flujo. Los anticuerpos Monoclonales (mAb) utilizados están descritos en la Tabla 1.

Para el marcaje directo, 100  $\mu$ l de suspensión de leucocitos deciduales, a  $1 \times 10^6$  cel/ml en PBS, fueron incubadas con 10  $\mu$ l del correspondiente mAb, en oscuridad durante 30 min a 4 °C. En el caso de mAb intracelulares, las células fueron permeabilizadas con Citofix-Citoperm (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) antes de la incubación con el correspondiente anticuerpo monoclonal. Una vez marcadas las células fueron lavadas y resuspendidas en 200  $\mu$ l de PBS siendo inmediatamente analizadas en el Citómetro (Ortho Cytoron Absolute, Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ, USA) y FACScan (Becton Dickinson). Para el doble marcaje se siguió el mismo procedimiento pero usando mAbs marcados con fluorocromos distintos. En el marcaje indirecto, después de incubar las células con el primer mAb se añadió un segundo mAb frente al primero y conjugado con una sustancia fluorescente.

El análisis de cada población, células dendríticas o linfocitos, se realizó teniendo en cuenta las características de tamaño (FSC-forward

scatter) y granularidad o complejidad citoplasmática (SSC-Side Scatter) de cada tipo de células, y seleccionándolas con la ventana correspondiente. El porcentaje de células positivas para cada anticuerpo se calculó comparando con un control negativo, para lo que se utilizó un mAb del mismo isotipo y sin especificidad para antígenos humanos.

#### **4. Estudio de la capacidad fagocítica**

Para el ensayo de fagocitosis se utilizaron bolitas de carboxilato fluorescentes verdes de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro (Polysciences.Inc, Eppelheim, Alemania). Los leucocitos deciduales fueron resuspendidos en RPMI 1640 con un 20% de FCS, ajustando la concentración a  $1 \times 10^6$  cel./ml. A 500  $\mu\text{l}$  de dicha suspensión celular se le añadieron 200  $\mu\text{l}$  de bolitas de latex, diluidas 20 veces del stock original, resuspendidas en medio RPMI 1640. La muestra se incubó durante 1h a 37 °C. Como control negativo en este ensayo se utilizó la misma muestra de células preparada en las condiciones indicadas, aunque incubada durante 1h a 4 °C. Tras la incubación centrifugamos las células a 400g durante 10 min, resuspendimos en PBS-EDTA 50 mM e incubamos durante 1 h, a 37 °C y a 4 °C respectivamente, con objeto de eliminar las bolitas que pudieran haber quedado adheridas pero no fagocitadas. Seguidamente, centrifugamos a 400 g durante 10 min y resuspendimos en un volumen final de 500  $\mu\text{l}$  de PBS. Para determinar la fagocitosis por las células DC-

SIGN+, tras el procedimiento anterior, las células fueron marcadas con el anticuerpo DC-SIGN conjugado con ficoeritrina (PE, roja). De esta forma pudimos diferenciar las células dendríticas DC-SIGN+ de otros tipos celulares con capacidad fagocítica. La capacidad de fagocitosis de las células DC-SIGN+ se determinó mediante citometría de flujo y microscopía confocal. Si la muestra iba a ser utilizada para citometría de flujo se resuspendió en 200 µl de PBS y se midió inmediatamente. Si la muestra iba a ser utilizada para microscopía confocal se procedió según se describe más adelante.

## **5. Detección de la apoptosis mediante la Anexina V**

Durante la fase de apoptosis temprana se producen cambios a nivel de la membrana celular. Uno de esos cambios consiste en la translocación de los fosfolípidos del interior de la membrana plasmática al exterior, quedando expuesta entre otros la fosfatidilserina (PS-phosphatidilserine). La Anexina-V nos permite detectar a nivel de la membrana la apoptosis temprana debido a su afinidad por PS [[Martin SJ et al, 1995](#)].

Las células necróticas también presentan la PS pero se pueden diferenciar de las apoptóticas debido a la pérdida de integridad de

membrana, permitiendo así ser diferenciadas en función de sus características de tamaño y granularidad mediante citometría.

Para determinar las células apoptóticas mediante Anexina-V tomamos 100  $\mu$ l de la suspensión celular a  $1 \times 10^6$  cel./ml en PBS, y se incubaba con 10  $\mu$ l de Anexina-V-Fluos (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) FITC y 10  $\mu$ l de DC-SIGN PE durante 30 min a 4 °C y en oscuridad. Posteriormente fueron lavadas, resuspendidas en 200  $\mu$ l de PBS y medidas en el citómetro.

## **6. Detección de apoptosis mediante la técnica de TUNEL.**

La técnica de TUNEL (Tdt-mediated dUTP nick end labelling) identifica las fases tardías de la apoptosis. Esta técnica nos permite determinar las células que se encuentran en apoptosis a nivel de ADN genómico. El ADN genómico, durante la apoptosis, da lugar a fragmentos que presentan un extremo 3'OH libre. Los extremos 3'OH son detectados mediante la incorporación en dichos extremos de nucleótidos marcados utilizando la enzima transferasa terminal (Tdt). Si el nucleótido incorporado está marcado con un fluorocromo podemos analizar las células en apoptosis mediante citometría de flujo, que a su vez permite diferenciar, como ya se ha comentado, las células que se encuentran en apoptosis de las que se encuentran en necrosis.

Una vez obtenido el precipitado celular tal y como se indica en el protocolo de extracción de células, se realizó la incubación con los correspondientes mAb durante 30 min a 4°C en oscuridad. Posteriormente se añadió 100 µl de paraformaldehído al 4% en PBS para fijar las células, incubando a temperatura ambiente durante 1h y en agitación continua. Seguidamente se centrifugaron las células a 400 g durante 10min. El precipitado se resuspendió en 100 µl de solución de permeabilización (Tritón-X-100 al 0,1% y citrato sódico al 0,1%) y se incubó 2 min en hielo. Seguidamente se lavó en PBS y se añadió la mezcla resultante del Kit (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein; Roche Diagnostic, Mannheim, Germany), consistente en una solución con nucleótidos marcados y la enzima Tdt. Siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, se incubó 1 h a 37 °C. A continuación se lavó con PBS. Si la muestra iba a ser utilizada para citometría de flujo se resuspendió en 200-400 µl de PBS y se midió inmediatamente. Si la muestra iba a ser utilizada para microscopia confocal o de fluorescencia, se procedió como se indica a continuación.

## **7. Microscopía de Inmunofluorescencia y confocal**

Las células fueron preparadas en cada caso según los procedimientos previamente descritos. A continuación cada preparación fue lavada con PBS, resuspendida en 3 µl de medio de montaje

Vectashield (Vector, Peterborough, UK) y depositada sobre el portaobjeto. Las preparaciones se observaron en el microscopio de fluorescencia (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) con 100X de aumento y/o en el microscopio confocal (Leica, Nussloch, Alemania) con un aumento de 60X.

### **8. Inmunohistoquímica**

Las muestras de decidua procedentes de abortos voluntarios, y conservadas en nitrógeno líquido, fueron cortadas en el criostato (Reichert-Jung, Cryocut 1800, Leica, Nussloch, Alemania) a un grosor de 10  $\mu\text{m}$ . Los cortes fueron situados en un portaobjeto y fijados con acetona durante 10 min a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dejando secar las muestras a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación se marcó el contorno de la muestra con un lápiz de vidrio, se hidrató con PBS durante 5 min, y se bloqueó la actividad peroxidasa con una preparación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% en metanol (1:4) a temperatura ambiente durante 30 min. Se lavó la muestra con PBS y se bloqueó la actividad avidina/biotina durante 15 min a temperatura ambiente y en cámara húmeda, según las indicaciones de la casa comercial (Avidin/biotin blocking kit, Vector). La muestra se lavó con PBS y los receptores Fc se bloquearon con suero humano AB descomplementado o bloqueante de proteína (Vector), durante 30 min y a temperatura ambiente en cámara húmeda. A

continuación se realizó la incubación con el primer mAb, a la dilución correspondiente, durante 1h a temperatura ambiente. Se lavó la muestra con PBS y se incubó con el mAb secundario biotinilado (Kit Vectastain, Vector), durante 15 min y a temperatura ambiente. Tras el correspondiente lavado con PBS, se incubó la muestra con la estreptavidina/peroxidasa durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente se lava con PBS antes de incubar con el primer sustrato. En el caso de la diaminobencidina (DAB, Sigma), se incubó con 15  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% durante 5-10 min obteniendo una coloración marrón. En el caso del sustrato para peroxidasa VECTOR® VIP™ (Vector Laboratorios) se obtiene una coloración púrpura. Para el doble marcaje en inmunohistoquímica con un segundo anticuerpo primario, realizamos el mismo protocolo utilizando combinaciones de DAB e Histogreen (Linaris-Biologische Produkte, Wertheim-Bettingen, Germany).

## **9. Detección de apoptosis por la técnica de TUNEL para Inmunohistoquímica**

Para determinar las células apoptóticas en cortes de decidua se empleó el marcaje con un kit para el ensayo de TUNEL (Roche Diagnostic, Mannheim, Alemania), siguiendo el protocolo indicado en el apartado detección de apoptosis mediante la técnica del TUNEL. Para poder observar la positividad mediante microscopía óptica se añade sobre el

corte de tejido 50 µl de Converter-POD y se incubaba en cámara húmeda a 37°C durante 30 min. A continuación se lava la muestras con PBS para posteriormente añadir 50 µl de DAB e incubar 10 min a T° ambiente, pudiendo observar los núcleos teñidos de color marrón. Para el estudio de las células dendríticas se utilizó el protocolo descrito en el apartado de Inmunohistoquímica, utilizando como anticuerpo primario el DC-SIGN y como sustrato para peroxidasa el VECTOR® VIP™ (Vector Laboratories), de coloración rosa. Finalmente se realiza el montaje con Eukitt (LaborTecnica, Granada, España) y se observan las preparaciones al microscopio óptico.

### **10. Purificación de células por Citometría.**

La suspensión de células deciduales fue marcada con el mAb DC-SIGN-PE (Caltag), de igual forma que para el análisis por citometría de flujo. El citómetro utilizado en el proceso de enriquecimiento fue un FACS-Vantage (Becton-Dickinson). El Software de control utilizado, fue CELL Quest V.3.1. El citómetro se calibró en el rango de fluorescencia de la Ficoeritrina (PE) utilizando calibradores homologados (CaliBRITE™ Beads) y estabilizado durante media hora. Posteriormente, se midió la muestra problema, marcándose la población objeto de estudio y comenzándose el ciclo de enriquecimiento, que se repitió dos veces, hasta obtener riquezas superiores al 80% en la población seleccionada.

### **11. Purificación de células con columnas y bolitas magnéticas**

La suspensión celular obtenida según se ha descrito anteriormente fue marcada para la purificación de DC siguiendo las indicaciones del kit de purificación CD209 (DC-SIGN) MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, Germany). De forma resumida, la suspensión de células marcada con el anticuerpo CD209 (DC-SIGN) unido a las bolitas magnéticas se pasó por una columna unida a un imán. Una vez pasada la muestra y lavada la columna, con un buffer de lavado, se separó la columna del imán y se volvió a lavar obteniéndose ahora una suspensión celular con un grado de purificación de células DC-SIGN+ de 50-70%.

### **12. Tinción con diclorhidrato 4',6-Diamidino-2-fenil indol, DAPI**

El DAPI (Sigma) es un colorante fluorescente del grupo del Indol que permite observar los núcleos de las células purificadas tiñendo específicamente el ADN. Para ello tomamos las células y las tratamos con 10 µl de solución de pretratamiento (Ácido Cítrico 0.2M, Tween 20 0.5 ml, Agua destilada 100 ml) durante 5 min. A continuación añadimos 90 µl de solución de DAPI a una concentración de 2 µg/ml, e incubamos 5 min a temperatura ambiente, lavamos 10 min a 400 g y realizamos en medio de

montaje con Vectashield (Vector) para posteriormente observar la preparación al microscopio de fluorescencia.

### **13. Análisis estadístico**

Para estudiar las diferencias significativas entre las distintas muestras de ABI, ABE y placenta se utilizó el test de la T de Studen. Considerando como diferencias estadística valores de  $p < 0.05$ . Los valores han sido representados como media  $\pm$  DE.

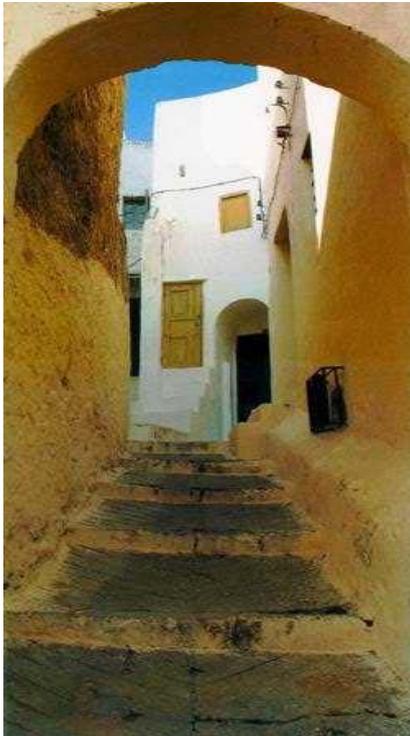
**Tabla 1.** Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.

<b>mAb</b>	<b>Clon</b>	<b>Isotipo Ig</b>	<b><sup>a</sup>Revelados con</b>	<b><sup>b</sup>Obtenidos de</b>
<b>CD1c</b>	AD5-8E7	IgG <sub>2a</sub> ratón	FITC	M&B
<b>CD10</b>	SJ5-1B4	IgG <sub>1</sub> ratón	PE	CALTAG
<b>CD11c</b>	BU15	IgG <sub>1</sub> ratón	PE	CALTAG
<b>CD14</b>	TùK4	IgG <sub>2a</sub> ratón	PE/FITC	CALTAG
<b>CD15</b>	VIMC6	IgM ratón	FITC	CALTAG
<b>CD25</b>	CD25-3G10	IgG <sub>1</sub> ratón	PE	CALTAG
<b>CD40</b>	HB14	IgG <sub>1</sub> ratón	PE	CALTAG
<b>CD45</b>	HI30	IgG <sub>1</sub> ratón	FITC	CALTAG
<b>CD56</b>	MEM-188	IgG <sub>2a</sub> ratón	FITC/PE	eBiosciences/CALTAG
<b>CD56</b>	MEM-188	IgG <sub>1</sub> ratón	--	CALTAG
<b>CD68</b>	Ki-M7	IgG <sub>1</sub> ratón	FITC	CALTAG
<b>CD80</b>	MEM-233	IgG <sub>1</sub> ratón	FITC	CALTAG
<b>CD83</b>	HB15e	IgG <sub>1,κ</sub> ratón	PE	BDBiosciences
<b>CD86</b>	BU63	IgG <sub>2</sub> ratón	FITC	CALTAG
<b>CD123</b>	9F5	IgG <sub>1,κ</sub> ratón	PE	BDBiosciences
<b>DC-SIGN</b>	120507	IgG <sub>2b</sub> ratón	FITC/PE	R&D
<b>DC-SIGN</b>	120612	IgG <sub>2a</sub> ratón	--	SIGMA
<b>HLA-G</b>	MEM-G/9	IgG <sub>1</sub>	FITC	ABCAM
<b>FAS</b>	DX2	IgG <sub>1</sub> ratón	FITC	CALTAG
<b>FASL</b>	Alf-2.1	IgG <sub>2a</sub> ratón	PE	CALTAG
<b>ILT2</b>	--	IgG <sub>1</sub> ratón	--	López-Botet

<sup>a</sup>**FITC:** Fluorescein isothiocyanate; **PE:** Phycoerythrin

<sup>b</sup>**BD Biosciences:** Denderstraat, Erembodegem, Belgium; **CALTAG,** San Francisco, CA, USA; **ABCAM:** Cambridge, UK ; **R&D SYSTEMS,** MN, USA; **M&B:** Miltenyi Bistec S.L, Pozuelo de Alarcón, España.





## *RESULTADOS*

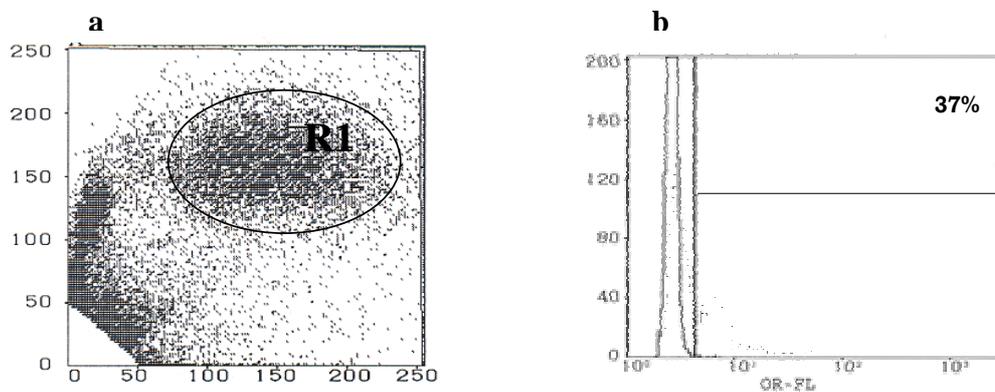


## **FENOTIPO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS EN DECIDUA HUMANA**

El fenotipo de las dDC no se encuentra completamente definido, sin embargo varios estudios han demostrado que uno de los antígenos que se expresa de forma más significativa en esta población es el DC-SIGN [Kooyk et al, 2003]. Esta molécula es un ligando del receptor de ICAM-3, perteneciente a la superfamilia de las lectinas tipo C, sirve de receptor también para unir HIV y es expresado por las DC inmaduras (iDC) mieloides [Geijtenbeek et al, 2000]. En contraste con el fenotipo de las células iDC, el CD83, antígeno perteneciente a la superfamilia de las Ig, se caracteriza por ser expresado en las DC maduras (mDC) e interviene en la presentación del antígeno a las células T induciendo una respuesta inmunitaria [Bachereau et al, 1998]. Algunos autores consideran DC-SIGN como marcador de macrófagos [Gardner et al, 2003; Shortman et al, 2002], sin embargo, varios autores sostienen que este antígeno solo es expresado por células dendríticas mieloides (miDC) [Engering et al, 2002] en proceso de maduración, que a su vez pueden ser confundidas con macrófagos por expresar antígenos comunes a estos, como por ejemplo el CD14.

La citometría de flujo es una técnica de análisis que permite seleccionar una población de células en suspensión en función de sus

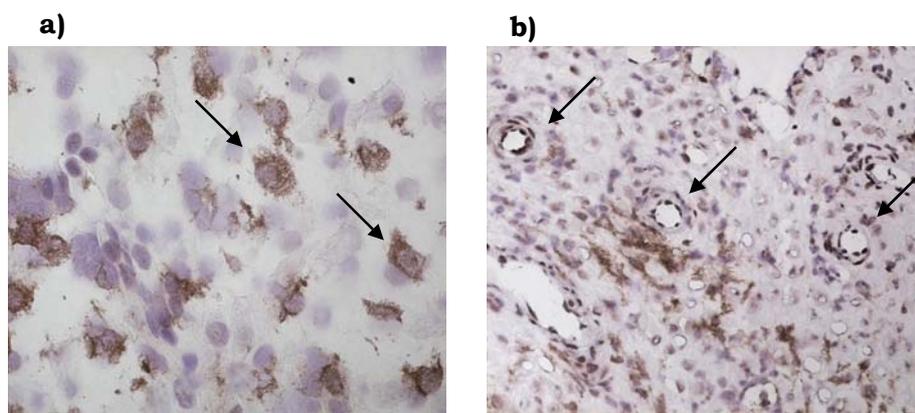
características morfológicas como tamaño y granularidad, o de la expresión de antígenos detectados mediante anticuerpos específicos. En nuestro estudio la población seleccionada se situó en la ventana R1 (Fig. 4), región en la que se localizan las células dendríticas (DCs) de sangre periférica. Es en ésta región donde además encontramos una mayor expresión del marcador DC-SIGN (CD209), en las muestras de decidua objeto de estudio (Fig. 4). La población situada en la ventana R1 se analizó con objeto de determinar la expresión de diversos antígenos de superficie (tabla 1, ver la sección de Material y métodos) en las DC deciduales (dDC) de primer trimestre, procedentes de muestras de decidua de aborto inducido (ABI), de aborto espontáneo (ABE) o de placenta a término.



**Figura 4:** Selección de la población de células dendríticas en la ventana R1. a) Citograma de dispersión en el que se muestra la región R1, donde se encuentran las células deciduales seleccionadas. b) Expresión de DC-SIGN<sup>+</sup> en la población seleccionada mediante la ventana R1. Gráficas seleccionadas de uno de los experimentos realizados.

## 1. Fenotipo antigénico de DC deciduales de aborto inducido

La caracterización fenotípica de las dDC se realizó por tanto en base a la expresión del antígeno de superficie DC-SIGN y mediante otros marcadores de superficie utilizándose la citometría de flujo (tabla 2). Por otra parte, la inmunohistoquímica fue utilizada para determinar la localización tisular de las células DC-SIGN<sup>+</sup> (positivas) (Fig. 5). En este caso pudimos observar no solo su localización tisular (Fig. 5a), sino también su distribución, que está centrada principalmente en torno a los vasos sanguíneos de la decidua (Fig. 5b).



**Figura 5:** Distribución de las células DC-SIGN<sup>+</sup> en decidua de primer trimestre. Las células fueron marcadas en cortes histológicos de decidua con el anticuerpo DC-SIGN marcado con DAB; a) Inmunohistoquímica mostrando la distribución tisular de las células DC-SIGN<sup>+</sup> (aumentos 20X); b) Inmunohistoquímica mostrando la localización de las células DC-SIGN<sup>+</sup> en torno a los vasos sanguíneos (aumentos 10X). Las fotografías mostradas proceden de una muestra ABI representativa de un total de 10 muestras analizadas.

### 1.1 Marcaje simple mediante citometría de flujo

Mediante marcaje simple en citometría de flujo identificamos en R1 la presencia de distintas subpoblaciones celulares en decidua normal (tabla 2).

El DC-SIGN, como hemos mencionado anteriormente, es el marcador característico de las iDC. Mediante la expresión de este marcador podíamos determinar la población en la que existía un mayor porcentaje de iDC, para posteriormente realizar un estudio más extenso en esta población. Observamos así que es en la región R1 donde encontramos un mayor porcentaje de células DC-SIGN+ en decidua normal ( $28.3 \pm 18.4 \%$ ; tabla 2; Fig. 4).

Como comentamos previamente en la introducción, las DC son bien de origen mielóide o de origen plasmocitoide [Takeuchi et al, 2007; Kadowaki et al, 2007]. Para poder determinar que tipo de dDC predomina en decidua, analizamos en la población de células seleccionadas la expresión de los marcadores CD1c y CD11c, propios de DC de origen mielóide, y CD123 para identificar el origen linfóide o plasmocitoide de las mismas [Schmitt et al, 2007]. El CD1c y CD11c son expresados en las DC mieloides en sangre periférica [Engerign et al, 2002, Grabbe et al, 2000; Dzionek et al, 2000; Ito et al; 1999 O'Doherty et al,

1994; Thomas et al, 1993]. El CD123, también conocido como la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL3 [Macardle et al; 1996], se expresa con alta intensidad en las DC plasmocitoides de sangre periférica y granulocitos, pero su expresión es mínima en las células de origen mieloide [Schmitt et al, 2007]. La elevada expresión de CD11c ( $31.9 \pm 22.9$  %) junto con la baja expresión de CD123 ( $7.1 \pm 5.9$  %) indicaría inicialmente que las dDC de ABI son principalmente de origen mieloide. Sin embargo, se observó una baja expresión del antígeno CD1c ( $3.7 \pm 3.1$  %; tabla 2).

El CD83 es el marcador característico de las mDC [Troy et al, 1998; McLellan et al, 1998; Ivanova et al, 2005]. Se estudió la expresión de este antígeno para ver si en la decidua de primer trimestre encontrábamos también una población de mDC. Nosotros hemos observado una baja expresión del marcador CD83 ( $3.2 \pm 4.3$  %; tabla 2), lo que indica que las mDC en decidua normal de primer trimestre no es una población predominante en la ventana R1.

Las DC se caracterizan por ser células presentadoras de antígeno (APC) muy potentes [Banchereau & Steinman, 1998]. Para llevar a cabo esta función se induce en las iDC la expresión de moléculas MHC II junto con la expresión de otros marcadores necesarios durante el proceso de maduración a APC. Para determinar si existe un fenotipo de APC en las dDC se estudiaron los antígenos CD80 y CD86, característicos de APC

[Olivares et al, 1997]. Este análisis reveló que las dDC de ABI estudiadas en la ventana R1 expresaban estos marcadores de manera elevada ( $43.2 \pm 24.2$  % de CD80 y  $70.1 \pm 11.1$  % de CD86; tabla 2). También se estudio la expresión de HLA-DR, molécula de clase II, propia de APC [Rieger et al, 2004], encontrado que solo una pequeña proporción de células era HLA-DR+ ( $5 \pm 1.1$  %; tabla 2). Siendo éste un signo más de inmadurez para las células estudiadas en la ventana R1.

El CD40 es una proteína de membrana que se expresa en todas las APC y es un marcador de activación para las DC [Schlossman et al, 1995]. Dicho marcador fue expresado en un porcentaje de células relativamente elevado dentro de la ventana R1 ( $40.3 \pm 19.5$  %; tabla 2).

El CD14 es un marcador de macrófagos, aunque también es expresado por las iDC mieloides [Engering et al, 2002]. Su expresión se pudo observar en torno a un 20 % (tabla 2) en la ventana R1.

El CD25 es el péptido  $\alpha$  del receptor de la IL2. Se trata de un marcador de activación de células T y DC [Uchiyama et al, 1981]. Mediante este marcaje determinaremos si las células deciduales de la ventana R1 se encuentran activadas o no. Como se indica en la tabla 2, en las células de ABI situadas en la ventana R1 encontramos un total de  $35.3 \pm 26.5$  % de CD25.

El CD68, junto con el CD14, es un antígeno expresado por macrófagos, monocitos, neutrofilos, basofilos y DC. Participa en la inducción de fagocitosis [Schlossman et al, 1994]. Teniendo en cuenta que una de las características de las iDC es su capacidad fagocítica, se realizó el marcaje con dicho antígeno, para ver si en la ventana R1 existían células con este fenotipo. A pesar de haber encontrado una expresión considerable de células iDC, observamos que el CD68 se expresaba débilmente ( $4.9 \pm 4.6$  %; tabla 2) en la ventana R1.

El CD10 es un marcador característico de las células deciduales estromales (DSC) [Imai et al, 1992; Montes et al, 1996]. Se ha estudiado para determinar la existencia en la ventana R1 de contaminación por parte de dichas DSC. A pesar de que las muestras son procesadas mediante la utilización de cedazo de 53  $\mu\text{m}$  (véase Materiales y Métodos), que permite la eliminación de la mayor parte de las DSC, puede ocurrir que una proporción de ellas, de bajo tamaño, permanezcan. El CD10 nos permitió por tanto establecer si existe contaminación por parte de las DSC deciduales en la población seleccionada (ventana R1). La baja expresión de CD10 ( $6.6 \pm 6.3$  %; tabla 2) nos indicó que no existe apenas contaminación por parte de estas células en la ventana de estudio.

Los neutrófilos se caracterizan por la expresión de CD15 [Nakayama et al, 2001]. Dichas células se localizan en sangre periférica en una ventana equivalente a la región en la que encontramos las DC (ventana R1). A pesar de que los neutrófilos, que son células de elevada densidad, deberían de haberse separado del resto de células deciduales mediante el gradiente de ficoll empleado, pueden llegar a quedar algunas. El análisis por citometría para este marcador, como se indica en la tabla 2, demostró que existe una elevada proporción de células que expresan CD15, y por tanto la existencia de neutrófilos en la ventana R1, donde también se sitúan las DC.

Un marcador característico de las células NK deciduales es el CD56 [King et al, 1998]. Al ser estas células una de las poblaciones mayoritarias de la decidua, en torno al 70% de la población de linfocitos, se decidió estudiar la expresión de dicho marcador en la ventana de las DC (ventana R1). Este marcaje mostró que en las células seleccionadas existía una población CD56+ de un  $27.3 \pm 16.6$  % (tabla 2).

El Fas (CD95), receptor de superficie celular perteneciente a la familia del receptor de necrosis celular (TNFR), es un mediador de la apoptosis inducida en la célula diana tras la unión con su ligando FasL (CD95L), [Nagata et al, 1994; Lynch et al, 1995; Griffith et al, 1997]. La expresión de dichos marcadores en la ventana de las DC (ventana R1)

demonstró la existencia de una población Fas+ ( $61.1 \pm 13.87$  %; tabla 2) y de una población FasL+ ( $48.48 \pm 15.81$  %; tabla 2).

El ILT2 (immunoglobuline-like transcript-2) es un receptor inhibidor perteneciente a la familia de LIR/ILT, de los receptores de células NK, cuyo ligando es HLA-G [Cosman et al, 1997; Colonna et al, 1997]. La expresión de dicho marcador en la ventana de las DC (ventana R1) demostró la existencia de una población ILT2+ ( $26.8 \pm 20.68$  %; tabla 2).

**Tabla 2:** Análisis estadístico sobre la expresión de distintos antígenos en población de las células deciduales de primer trimestre procedentes de ABI en la ventana R1.

Marcador	Porcentaje <sup>a</sup>	Marcador	Porcentaje
<b>CD1c</b>	$3.0 \pm 3.1$	<b>CD80</b>	$43.2 \pm 24.2$
<b>CD10</b>	$6.6 \pm 6.3$	<b>CD83</b>	$3.2 \pm 4.3$
<b>CD11c</b>	$31.9 \pm 22.9$	<b>CD86</b>	$70.1 \pm 11.1$
<b>CD14</b>	$22.7 \pm 17.9$	<b>CD123</b>	$7.1 \pm 5.9$
<b>CD15</b>	$68.6 \pm 7.9$	<b>DC-SIGN</b>	$28.3 \pm 18.4$
<b>CD16</b>	$18.5 \pm 19.9$	<b>HLA-DR</b>	$5.0 \pm 1.1$
<b>CD25</b>	$35.3 \pm 26.5$	<b>FAS</b>	$61.1 \pm 13.87$
<b>CD40</b>	$40.3 \pm 19.5$	<b>FASL</b>	$48.48 \pm 15.81$
<b>CD56</b>	$27.3 \pm 16.6$	<b>ILT2</b>	$26.8 \pm 20.68$
<b>CD68</b>	$4.9 \pm 4.6$		

<sup>a</sup>Porcentaje respecto al 100% de células seleccionadas en la ventana R1

### 1.2 Marcaje doble mediante citometría de flujo

Una vez estudiado el marcaje simple de las células deciduales que se encontraban en la ventana de las DC (ventana R1), se decidió, teniendo en cuenta que era la ventana donde se encontró el mayor porcentaje de células DC-SING+, realizar dobles marcajes respecto a esta población para poder conocer sus características fenotípicas.

Mediante doble marcaje (Fig. 6) hemos podido observar que las células DC-SING+ de decidua normal co-expresaban altos niveles de CD11c, CD25, CD40, CD80 y CD86, mientras que los marcadores CD1c, CD14, CD15, CD68, CD123 y HLA-DR eran co-expresados en menor proporción (Fig. 6). La alta expresión de CD11c y baja de CD123 por parte de las DC-SING+ demuestra que estas iDC deciduales pertenecen al linaje mielóide (tabla 3). A pesar de todo, CD1c, que es considerado también un marcador de DC mieloides, fue expresado muy débilmente por las células DC-SIGN+.

Las células DC-SIGN+ expresan débilmente otros marcadores asociados a la inmadurez (CD14, CD68), y expresaban intensamente moléculas asociadas a la maduración/activación de las DC (CD25, CD40, CD80, CD86), aunque, sin embargo, el HLA-DR, que pertenece a este último grupo de moléculas es expresado pobremente. Por otra parte, el

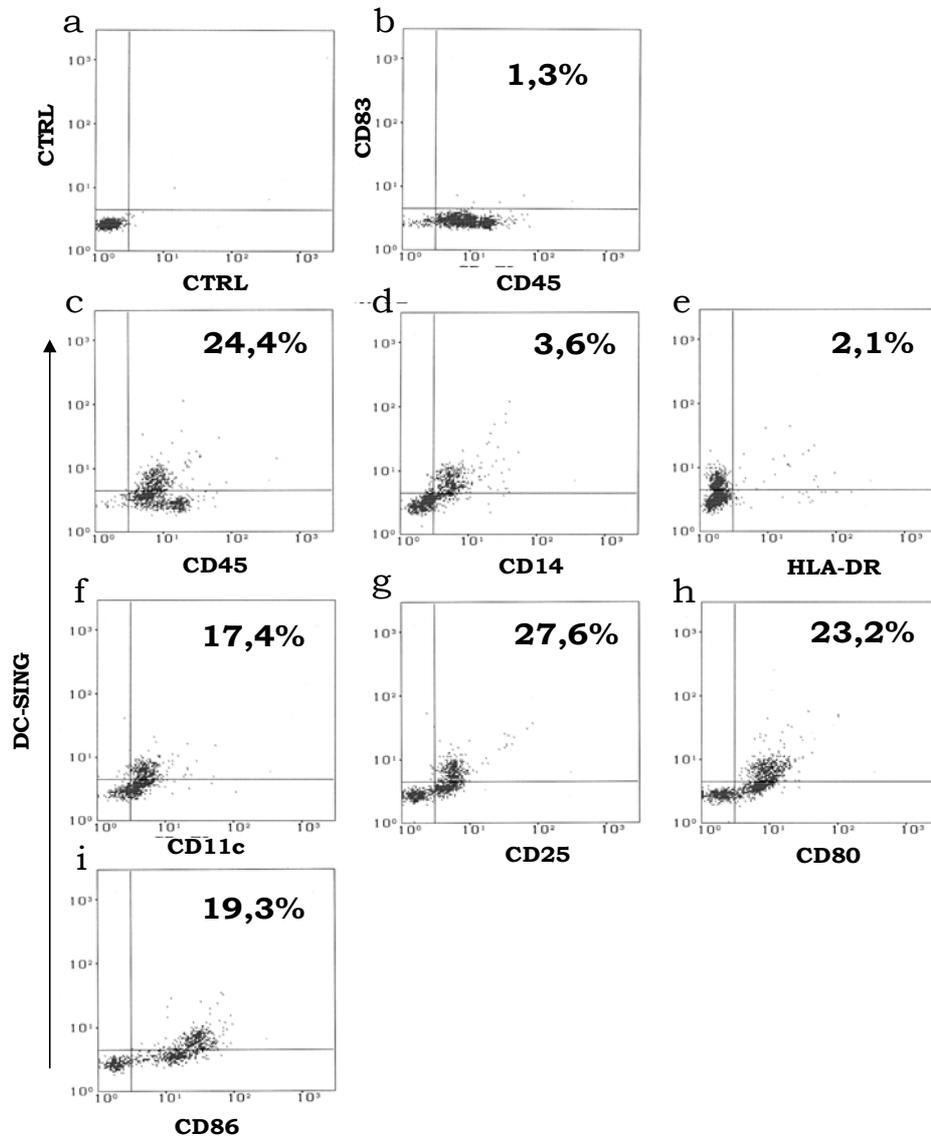
CD83, marcador de células mDC, es expresado también débilmente. Mediante este doble marcaje CD83/DC-SIGN pudimos determinar la existencia de una población de DC CD83+/DC-SIGN+, ya que la mayor parte de las células CD83+ co-expresaban DC-SIGN (Fig. 7).

Todo estos resultados nos indican que las dDC son principalmente DC mieloides inmaduras en distintas etapas de diferenciación hacia la madurez.

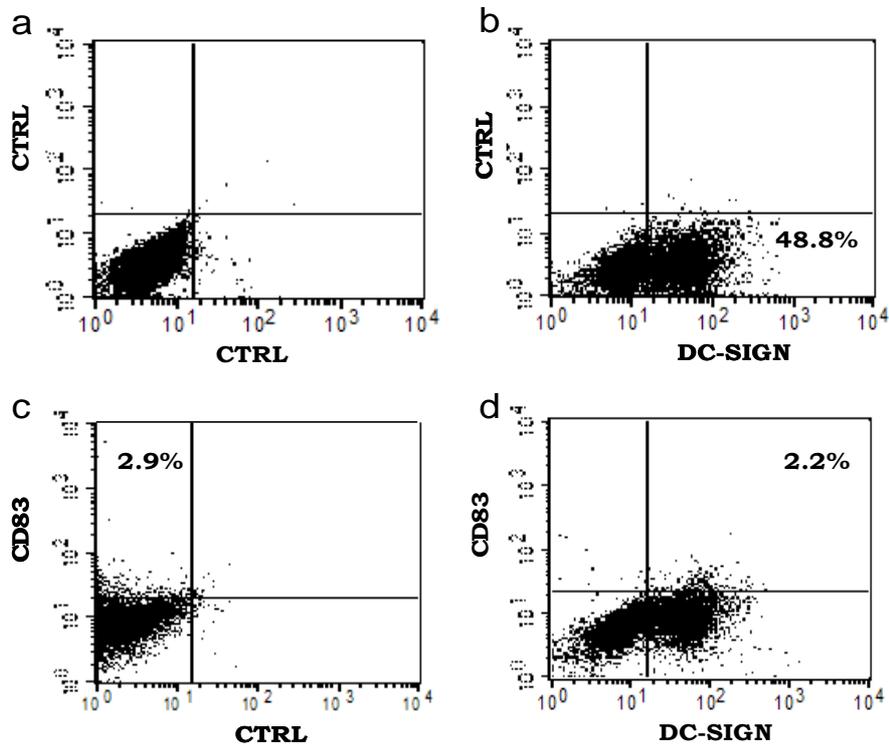
**Tabla 3:** Análisis estadístico sobre la expresión de distintos antígenos en las células DC-SIGN+ de primer trimestre procedentes de ABI situadas en la ventana R1.

<b>Marcador</b>	<b>Porcentaje<sup>a</sup></b>	<b>Marcador</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>CD1c/DC-SIGN</b>	1.2 ± 1.3	<b>CD45/CD56</b>	35.9 ± 14.1
<b>CD11c/DC-SIGN</b>	17.4 ± 10.3	<b>CD45/CD83</b>	1.3 ± 1.2
<b>CD14/CD56</b>	7.6 ± 7.1	<b>CD45/DC-SIGN</b>	24.4 ± 14.7
<b>CD14+/DC-SIGN+</b>	4.1 ± 2.1	<b>CD56/CD16</b>	3.7 ± 3.3
<b>CD14-/DC-SIGN+</b>	25.2 ± 20.6	<b>CD56/DC-SIGN</b>	11.4 ± 13.4
<b>CD14+/DC-SIGN-</b>	3.6 ± 3.9	<b>CD68/DC-SIGN</b>	2.4 ± 2.2
<b>CD15+/DC-SIGN+</b>	6.1 ± 4.7	<b>CD80/DC-SIGN</b>	23.2 ± 17.4
<b>CD15+/DC-SIGN-</b>	68.9 ± 15.5	<b>CD86/DC-SIGN</b>	19.3 ± 13.4
<b>CD15-/DC-SIGN+</b>	4 ± 3.1	<b>DC-SIGN/CD123</b>	5.3 ± 4.7
<b>CD16/CD10</b>	2.0 ± 1.4	<b>HLA-DR/DC-SIGN</b>	2.1 ± 1.1
<b>CD16/CD14</b>	7.7 ± 8.7	<b>HLA-G/DC-SIGN<sup>b</sup></b>	28.5 ± 27.8
<b>CD16/DC-SIGN</b>	3.6 ± 1.9	<b>DC-SIGN/FASL</b>	28.23 ± 10.25
<b>CD25/DC-SIGN</b>	23.6 ± 13.9	<b>FAS/DC-SIGN</b>	32.01 ± 14.45
<b>CD40/DC-SIGN</b>	22.9 ± 11.4	<b>ILT2/DC-SIGN</b>	31.7 ± 17.3
<b>CD45/CD10</b>	0.5 ± 0.6		
<b>CD45/CD14</b>	28.7 ± 15.9		

<sup>a</sup>Porcentaje respecto al 100% de células seleccionadas en la ventana R1. <sup>b</sup>Porcentaje respecto al 100% de DC-SIGN+ en la ventana R1



**Figura 6:** Expresión conjunta de antígenos de superficie en la población de células dendríticas, seleccionada en la ventana R1, en muestras ABI. a) Citograma de fluorescencia mostrando los controles de Ig isotipo para los anticuerpos utilizados; b) Expresión conjunta de CD45 y CD83 en la población de células seleccionadas en la ventana R1; c-i) Citogramas de fluorescencia donde se muestra la expresión de DC-SIGN y un segundo antígeno indicado en decidua de primer trimestre procedente de ABI, dentro de la población seleccionada en R1. Datos representativos seleccionados de un total de 73 muestras ABI analizadas.

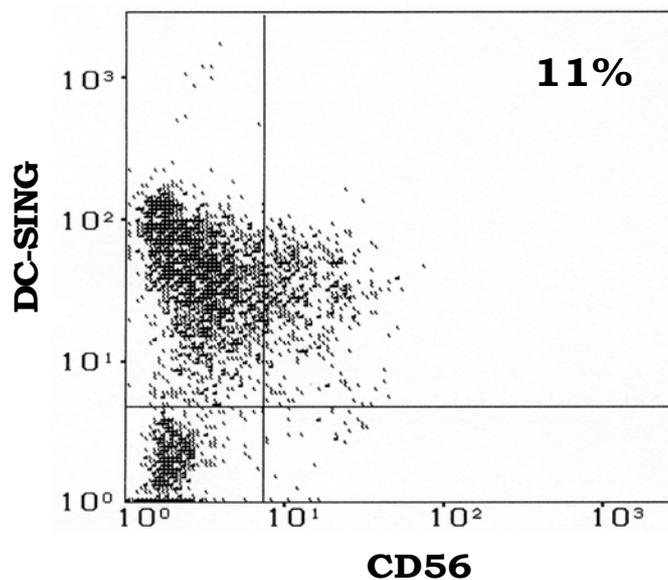


**Figura 7:** Expresión conjunta de CD83 y DC-SIGN en la población de células dendríticas, seleccionada en la ventana R1, en muestras ABI: a) Citograma de fluorescencia mostrando los controles de Ig isotipo para los anticuerpos utilizados; b) Expresión de DC-SIGN-FITC en la población de células seleccionadas en la ventana R1; c) Expresión de CD83-PE en la población de células seleccionadas en la ventana R1; d) Expresión de CD83-PE y DC-SIGN-FITC en la población de células seleccionadas en la ventana R1. Datos representativos seleccionados de un total de 3 muestras ABI analizadas.

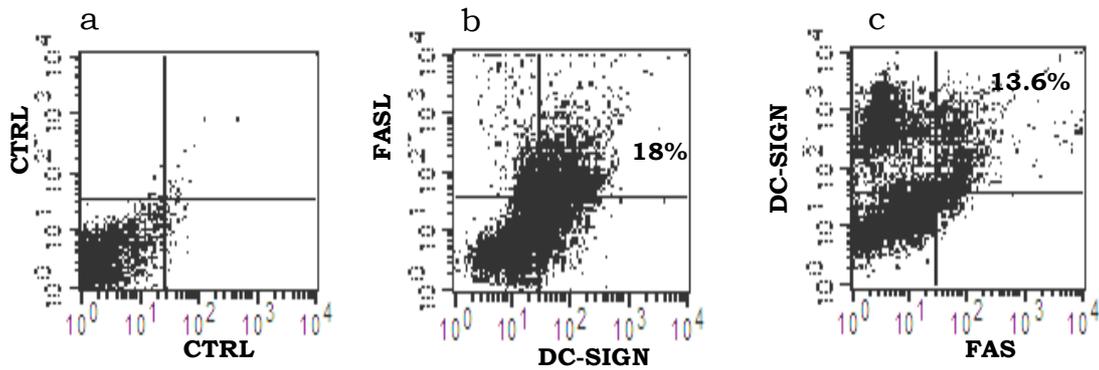
También se ha podido observar la presencia de co-expresión de CD56 en la población seleccionada. El CD56 es un marcador característico de las células NK deciduales. Teniendo en cuenta que la ventana R1 no es la ventana en la que se encuentran las células NK, debido a su tamaño y complejidad, y sabiendo que CD56 no es un

marcador característico de DC, cabría suponer que dicha co-expresión es debida a la existencia de complejos entre las células NK y las dDC (Fig. 8 y tabla 3).

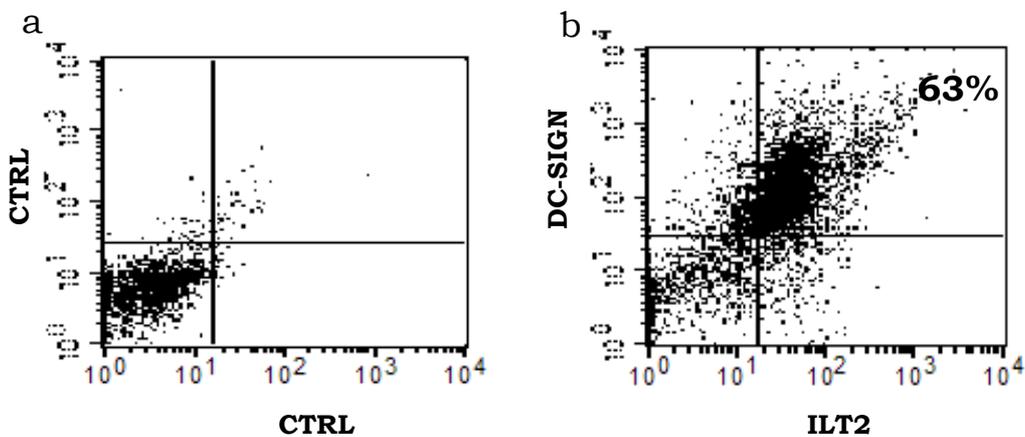
En cuanto a Fas y FasL en la población de células DC-SING+ en muestras procedentes de ABI, hemos observado una elevada expresión ( $30.01 \pm 14.45$  %; tabla 3) lo cual podría indicar que estas células no sólo podrían ser eliminadas por apoptosis, debido a la expresión de Fas, sino que también podrían inducir apoptosis de células cercanas debido a la expresión de FasL (Fig. 9).



**Figura 8:** Expresión conjunta de CD56 y DC-SIGN en la población de células dendríticas, seleccionada en la ventana R1, en muestras ABI. Citograma de fluorescencia mostrando la expresión de CD56-FITC y DC-SING-PE en la población seleccionada en la ventana R1.



**Figura 9:** Expresión conjunta de FAS y FASL en la población DC-SIGN<sup>+</sup>, seleccionada en la ventana R1, en muestras ABI. a) Citograma de fluorescencia mostrando los controles de Ig isotipo para los anticuerpos utilizados; b) Citograma de fluorescencia mostrando la expresión de FASL-PE y DC-SING-FITC en la población seleccionada; c) Citograma de fluorescencia mostrando la expresión de FAS-PE y DC-SING-FITC en la población seleccionada.

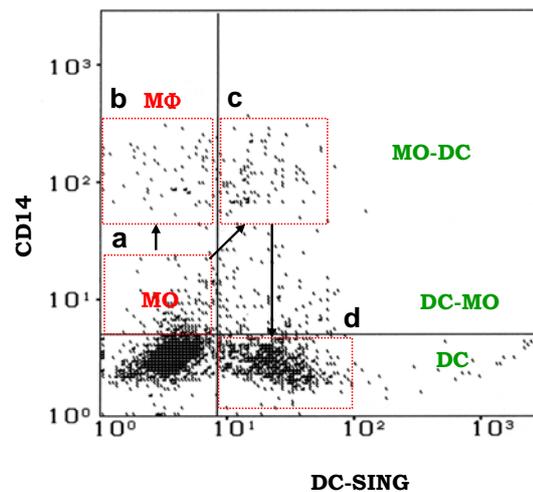


**Figura 10:** Expresión conjunta de ILT2 en la población DC-SIGN<sup>+</sup>, seleccionada en la ventana R1, en muestras ABI. a) Citograma de fluorescencia mostrando los controles de Ig isotipo para los anticuerpos utilizados; b) Citograma de fluorescencia mostrando la expresión de ILT2-FITC y DC-SING-PE en la población seleccionada.

Como mostramos en el apartado anterior, en la ventana R1 observamos una población positiva para ILT2, receptor NK inhibidor. El estudio de doble marcaje demostró la existencia de células DC-SING+ en muestras procedentes de ABI, con una elevada expresión para ILT2 (31.7 ±17.3 %; tabla 3) (Fig. 10). Parte de la expresión ILT2 puede deberse a complejos de DC y NK, sin embargo la población DC-SIGN+CD56+, presente en la ventana R1, se encuentra en una proporción inferior a la observada para DC-SIGN+ILT2+, lo que demuestra realmente la existencia de células DC ILT-2+ en decidua. La expresión de ILT2 ha sido descrita previamente en iDC [Ji et al, 2004]. La presencia de esta población en decidua normal podría ser debida a la existencia de un mecanismo de tolerancia materno-fetal que impediría la migración de las dDC hacia los nódulos linfáticos, inhibiendo su activación, o la protección frente a la citotoxicidad celular.

### 1.2.1. Población CD14/DC-SING

Al realizar el estudio del doble marcaje CD14/DC-SING observamos la existencia de cuatro poblaciones claramente diferenciadas en la ventana R1: CD14- (negativas) /DC-SING-; CD14+/DC-SING-; CD14+/DC-SING+ y CD14-/DC-SING+ (Fig. 11), siendo esta última la población mayoritaria en decidua de ABI (tabla 3).



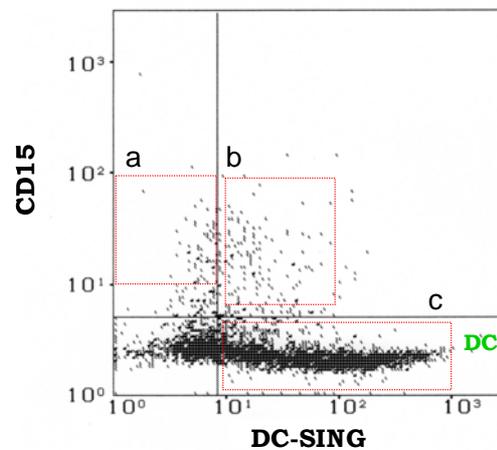
**Figura 11:** Análisis de las subpoblaciones en función de la expresión DC-SIGN/CD14 en las células dendríticas, seleccionadas en la ventana R1, en muestras ABI. Estudio mediante citometría de flujo de la expresión de CD14 por las células DC-SIGN+ de muestras de ABI. a) población DC-SIGN-/CD14+, Monocitos (Mo); b) población DC-SIGN-/CD14<sup>Bright</sup>, macrófagos (MO) c) población DC-SIGN+/CD14<sup>Bright</sup> (MO-DC), y DC-SIGN+/CD14<sup>Dim</sup> (DC-MO), iDC en vías de maduración; d) población DC-SIGN+/CD14-, dendríticas (DC).

Varios autores consideran que los macrófagos son células que expresan DC-SIGN [Shortman et al, 2002; Gardner et al, 2003], y otros proponen que las células DC-SIGN+ son precursores de las DC más que macrófagos [Engering et al, 2002]. Teniendo en cuenta esta posibilidad y en función de nuestros datos (Fig.11), vemos que existe una población CD14<sup>Dim</sup> (con una expresión de baja intensidad para este marcador) DC-SIGN-, que podría corresponder a monocitos, con la posibilidad de seguir dos caminos distintos de diferenciación. La primera vía daría lugar a una

población CD14<sup>Bright</sup> (con una expresión de alta intensidad para este marcador) DC-SIGN<sup>-</sup> característica de los macrófagos, y la segunda daría lugar poblaciones sucesivas de dDC inmaduras en progresivas etapas de madurez: CD14<sup>Bright</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>, que muchos autores confunden con macrófagos, CD14<sup>Dim</sup>/DC-SIGN<sup>+</sup> y CD14<sup>-</sup>/DC-SIGN<sup>+</sup> [Shortman et al, 2002; Dietl et al, 2006]. Se trata pues de las diferentes poblaciones que aparecen cuando se produce la diferenciación de monocitos hacia macrófagos o hacia DC.

### 1.2.2. Población CD15/DC-SING

Al realizar el estudio del doble marcaje CD15/DC-SING en decidua de ABI, pudimos observar la existencia de tres poblaciones claramente diferenciadas: CD15<sup>+</sup>/DC-SING<sup>+</sup>; CD15<sup>+</sup>/DC-SING<sup>-</sup>; y CD15<sup>-</sup>/DC-SING<sup>+</sup> (Fig. 12). La población mayoritaria es la CD15<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>-</sup>, población correspondiente a neutrófilos, mientras que las células DC-SIGN<sup>+</sup>, que son DC, podrían expresar parte de ellas CD15, según se ha observado en DC asociadas a tumores (tabla 3) [Remmel et al, 2001].

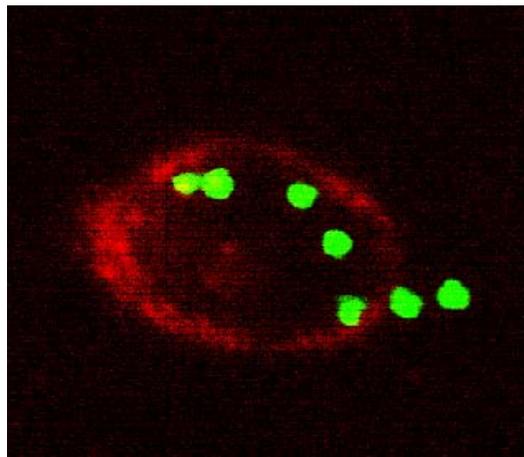


**Figura 12:** Análisis de las poblaciones DC-SIGN/CD15 en la población de células dendríticas, seleccionada en la ventana R1, en muestras ABI. Estudio mediante citometría de flujo de la expresión de CD15 por las células DC-SIGN+ de muestras de ABI. a) población DC-SIGN-/CD15+; b) población DC-SIGN+/CD15+; c) población DC-SIGN+/CD15-, DC, células dendríticas.

### 1.3. Actividad fagocítica de las DC de decidua normal

Una de las características funcionales de las iDC es la de tener una alta capacidad fagocítica. La capacidad fagocítica se estudió en la población DC-SIGN+ de las células seleccionadas. Mediante análisis de microscopía confocal (Fig. 13) hemos podido estudiar la capacidad fagocítica de las células dendríticas. Observamos que las células DC-SIGN+ de decidua son capaces de fagocitar partículas de carboxilato marcadas con fluoresceína (ver material y métodos). En la Figura 13 podemos observar con claridad la expresión de ambos marcadores, DC-

SIGN-rojo y bolitas verdes, demostrando dicha capacidad fagocítica. El hecho de que presenten capacidad fagocítica junto con la positividad para el DC-SIGN es un claro signo de inmadurez, ya que las células DC maduras tienen muy disminuida esta función.



**Figura 13:** *Capacidad Fagocítica en la población de DC de decidua.*: microfotografía de Microscopía confocal mostrando una célula dendrítica DC-SIGN+ (PE-rojo) y las bolitas de látex fluorescente (verde) fagocitadas. Las fotografías mostradas proceden de una muestra ABI representativa de un total de 10 muestras analizadas.

## **2. Fenotipo antigénico de DC deciduales de aborto espontáneo**

La caracterización fenotípica de las dDC se realizó, al igual que para ABI, en base a la expresión del antígeno de superficie DC-SIGN y mediante otros marcadores de superficie utilizándose la citometría de flujo (tabla 4).

### 2.1. Marcaje simple mediante citometría de flujo

En las dDC de aborto espontáneo (ABE) se observó una población de células DC-SIGN+ de un 14% aproximadamente, indicando la existencia de una población importante de iDC en la decidua de ABE, aunque inferior al que encontramos en decidua de ABI ( $28.2 \pm 18.4$  %). Para el resto de marcadores analizados pudimos observar que en las población estudiada en la ventana R1 había, una alta expresión de CD11c+ y presentaban una baja expresión para CD123, marcador de pDC (tabla 4), lo que indicaba que las células dDC de ABE son principalmente de origen mieloide.

El CD83 es el marcador característico de las mDC, como ya hemos mencionado. En el caso de las dDC de decidua de ABE se observó que la expresión de CD83, en la ventana R1, era prácticamente inexistente, lo que nos indicaba predominante la presencia de una población de iDC, debido a la alta expresión de DC-SIGN en comparación con la expresión del marcador CD83 (tabla 4). Para determinar si existía un fenotipo de APC en las dDC se estudiaron los antígenos CD80 y CD86, observándose que en las células de decidua de ABE, en la ventana R1, existía expresión de estos marcadores de forma elevada ( $33.9 \pm 10.9$  % para CD80,  $27.8 \pm 10.5$  % para CD86; tabla 4).

Al igual que en la decidua normal, se observó la existencia de una baja expresión de HLA-DR ( $6.6 \pm 3.3$  %; tabla 4), indicándonos un bajo grado de maduración y activación de las células deciduales de ABE.

El CD40 se expresa en un total de  $17.9 \pm 15.5$  % en las dDC de ABE (tabla 4) situadas en la R1, lo que determinaría la presencia de una población considerable de células presentadoras de antígenos y el estado de activación de dichas células.

**Tabla 4:** Análisis estadístico sobre la expresión de distintos antígenos en la población de las células deciduales de primer trimestre procedentes de ABE, seleccionadas en la ventana R1.

<b>Marcador</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Marcador</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>CD1c</b>	$3.8 \pm 2.0$	<b>CD80</b>	$33.9 \pm 10.9$
<b>CD10</b>	$3.6 \pm 6.2$	<b>CD83</b>	$1.3 \pm 0.9$
<b>CD11c</b>	$27.2 \pm 15.4$	<b>CD86</b>	$27.8 \pm 10.5$
<b>CD14</b>	$23.2 \pm 15.6$	<b>CD123</b>	$9.3 \pm 9.3$
<b>CD15</b>	$76.1 \pm 9.2$	<b>DC-SIGN</b>	$13.9 \pm 9.6$
<b>CD16</b>	$79.5 \pm 10.2$	<b>HLA-DR</b>	$6.6 \pm 3.3$
<b>CD25</b>	$12.8 \pm 8.4$	<b>FAS</b>	$38.6 \pm 0.9$
<b>CD40</b>	$17.9 \pm 15.5$	<b>FASL</b>	$33.9 \pm 9.9$
<b>CD56</b>	$11.5 \pm 11.5$	<b>ILT2</b>	$13.9 \pm 13.8$
<b>CD68</b>	$5.2 \pm 4.9$		

Porcentaje respecto al 100% de células seleccionadas en la ventana R1.

El CD14 es un marcador que también lo encontramos expresado en las dDC de ABE ( $23.2 \pm 15.6$  %; tabla 4), su expresión es un índice de

inmadurez por parte de las DC, aunque también podría indicar la presencia de monocitos y macrófagos.

El CD25, marcador de activación, nos permitió determinar la existencia de células activadas procedentes de ABE en la ventana R1, expresándose en un  $12.8 \pm 8.4$  % de las células seleccionadas (tabla 4), al igual que ocurría con las células de ABI (tabla 2), aunque en una menor proporción.

El CD68, como ya hemos mencionado anteriormente, participa en la inducción de fagocitosis, por tanto se realizó el marcaje con dicho antígeno para ver si en la ventana R1 existían células con este fenotipo que nos indicase la presencia de células con dicha capacidad fagocítica. Pudimos observar, aunque el CD68 se expresase débilmente ( $5.2 \pm 4.9$  %; tabla 4), que en la ventana R1 existían células procedentes ABE, en función de la expresión de este marcador, con capacidad fagocítica.

Las células deciduales procedentes de decidua de ABE presentaban una baja expresión de CD10 ( $3.6 \pm 6.2$  %; tabla 4), indicándonos la baja contaminación por parte de las DSC en la ventana R1, al igual que ocurría con las células procedentes de ABI.

En la población seleccionada también observamos la expresión de manera elevada el CD15 ( $76.1 \pm 9.2$  %; tabla 4), lo que nos indicaba la existencia en la ventana R1 de una importante población de neutrófilos, que permanecía a pesar de que las muestras eran tratadas con gradiente de ficoll.

El CD56, marcador característico de las células NK deciduales, se expresaba, al igual que en las muestra procedentes de ABI, en las células de la ventana R1 ( $11.5 \pm 11.5$  %; tabla 4), lo que nos revela que al igual que para el ABI, existen células NK en la ventana de las DC.

La expresión de Fas y FasL, se observó también en la ventana R1 ( $38.6 \pm 0.9$  y  $33.9 \pm 9.9$  respectivamente; tabla 4) en las muestras de ABE, por tanto también existen células que pueden sufrir apoptosis e incluso inducir apoptosis sobre otras células.

La expresión de ILT2 observada en la ventana R1 ( $13.9 \pm 13.8$  %; tabla 4), indica que en las muestras de ABE también existen células que podrían actuar protegiendo frente a la citotoxicidad celular o dando lugar a mecanismos de tolerancia materno-fetal.

Atendiendo a los resultados obtenidos en el estudio de marcaje simple, podemos decir que las poblaciones de células deciduales situadas en la ventana R1 de ABE, son equivalentes a las de ABI.

### 2.2. Doble marcaje mediante citometría de flujo

En cuanto al doble marcaje para las dDC de ABE (Fig. 14), encontramos resultados equivalentes a los obtenidos en las muestras de ABI: las células DC-SIGN+ expresaron CD11c ( $9 \pm 7.2$  %), y solo en menor proporción CD123 ( $3.7 \pm 2.3$  %, marcador de células linfoides), confirmándose así una población mayoritaria de origen mieloide en las dDC DC-SIGN+. A pesar de todo, y también de forma equivalente al ABI, el antígeno CD1c, fue expresado pobremente.

La baja co-expresión por parte de las células DC-SIGN+ de HLA-DR ( $4.6 \pm 2.8$  %), marcador de activación y maduración de las DC, confirma el estado de inmadurez de estas células. Esta posibilidad es apoyada por la actividad fagocítica demostrada en las DC-SIGN+. Sin embargo, la baja expresión de CD14 y CD68 (marcadores de inmadurez), junto con la elevada co-expresión de CD25, CD40, CD80 y CD86, que son marcadores de activación y maduración, sugiere que las dDC de ABE, al

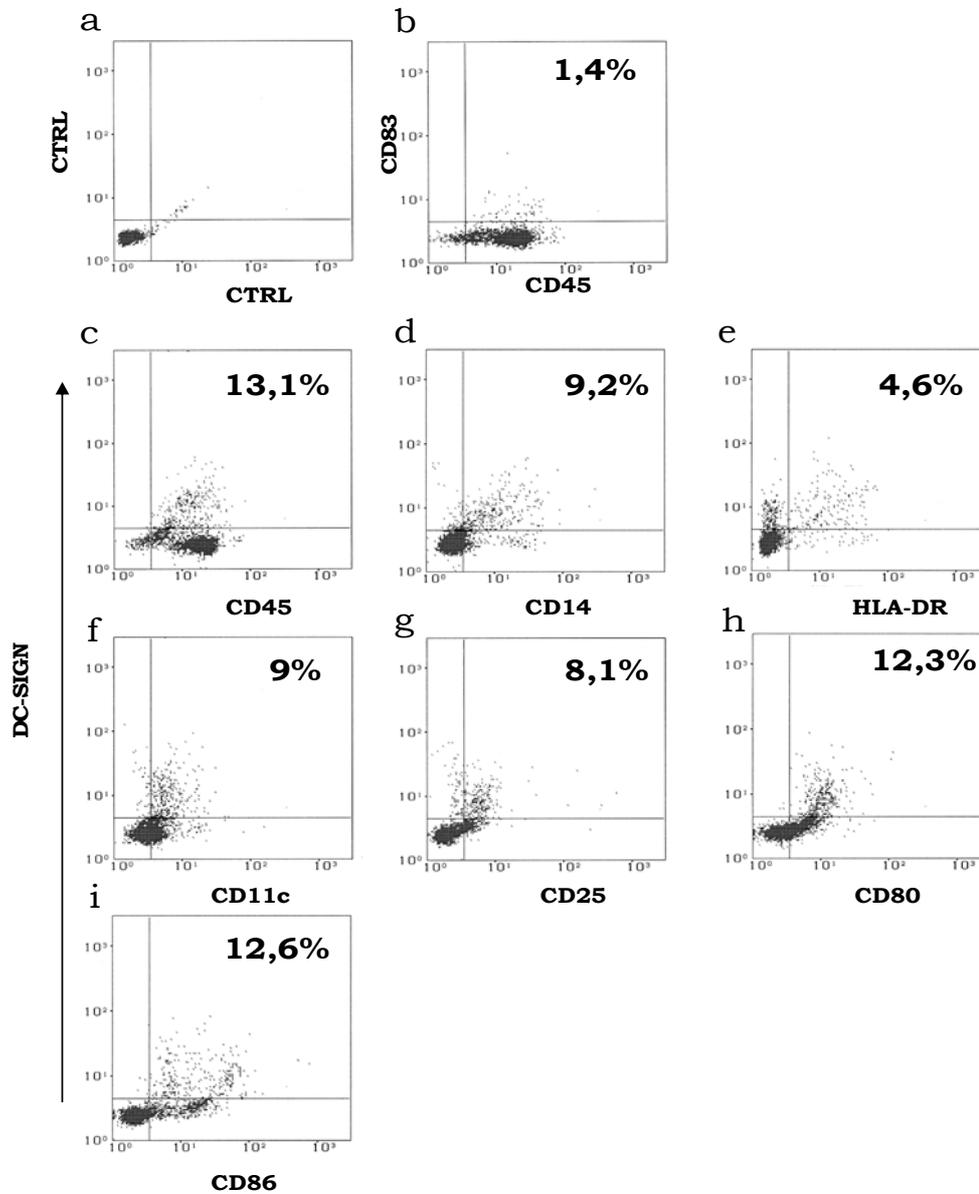
igual que las de ABI, aunque inmaduras, se encuentran en distintas etapas de diferenciación hacia la madurez (tabla 5).

En este caso hemos observado la co-expresión de CD56+/DC-SIGN+ en una menor proporción, aunque suponemos al igual que en la decidua normal, la existencia de complejos de células NK y dDC (tabla 5).

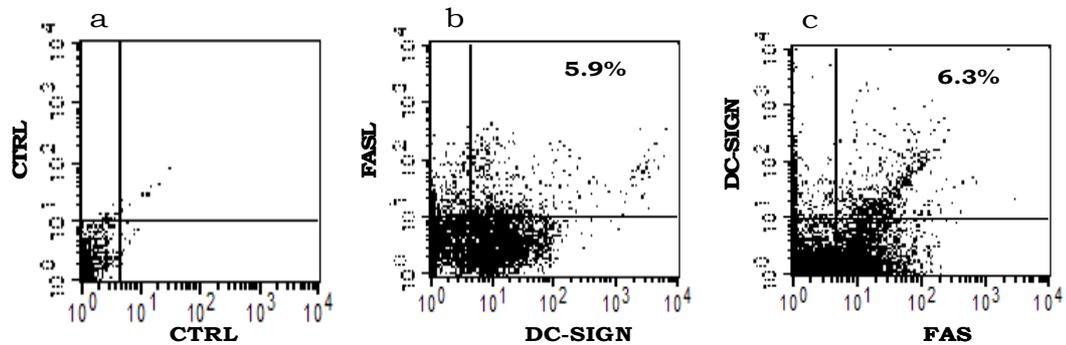
En cuanto a la expresión de Fas y FasL en las células DC-SIGN+ de muestras ABE, hemos observado una menor expresión ( $4.52 \pm 2.44$  % para Fas y  $2.44 \pm 1.46$  % de FasL), lo cual muestra que las células DC-SIGN+ en ABE sufren menor apoptosis, debido a la baja expresión de Fas, y tiene menor capacidad para inducir apoptosis sobre otras células, debido a la baja expresión de FasL (Fig. 15).

En cuanto a la expresión de ILT2 en la población de células DC-SIGN+ en muestras procedentes de ABE, hemos observado una baja expresión (tabla 4) de dicho receptor, lo cual podría indicar una baja protección frente a la citotoxicidad celular (Fig.16).

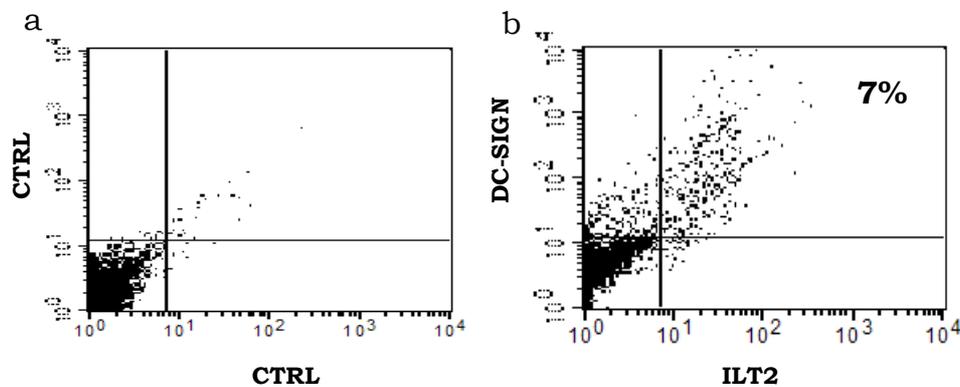
Teniendo en cuenta los resultados mostrados, podemos afirmar que las poblaciones de iDC procedentes de ABI y ABE, estudiadas en la ventana R1, presentan un fenotipo semejante.



**Figura 14:** Expresión conjunta de antígenos de superficie en la población de células dendríticas, seleccionada en la ventana R1, en muestras ABE. a) Citograma de fluorescencia mostrando los controles de Ig isotipo para los anticuerpos utilizados; b) Expresión conjunta de CD45 y CD83 en la población de células seleccionadas en la ventana R1; c-i) Citogramas de fluorescencia donde se muestra la expresión de DC-SIGN y un segundo antígeno indicado, en decidua de primer trimestre procedente de ABE en la población seleccionada. Datos representativos seleccionados de un total de 45 muestras ABE analizadas.



**Figura 15:** Expresión de FAS y FASL en la población DC-SIGN<sup>+</sup>, seleccionada en la ventana R1, en muestras ABE. a) Citograma de fluorescencia mostrando los controles de Ig isotipo para los anticuerpos utilizados; b) Citograma de fluorescencia mostrando la expresión de FASL-PE y DC-SIGN-FITC en la población seleccionada; c) Citograma de fluorescencia mostrando la expresión de FAS-FITC y DC-SIGN-PE en la población seleccionada.



**Figura 16:** Expresión de ILT2 en la población DC-SIGN<sup>+</sup>, seleccionada en la ventana R1, en muestras ABE. a) Citograma de fluorescencia mostrando los controles de Ig isotipo para los anticuerpos utilizados; b) Citograma de fluorescencia mostrando la expresión de ILT2-FITC y DC-SIGN-PE en la población seleccionada.

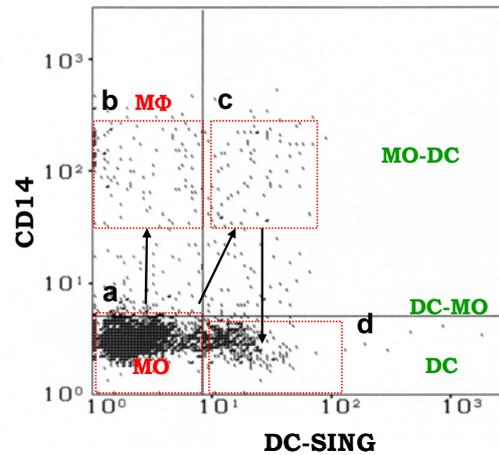
**Tabla 5:** Análisis estadístico sobre la expresión de distintos antígenos en las células DC-SIGN+ de primer trimestre procedentes de ABE situadas en la ventana R1.

<b>Marcador</b>	<b>Porcentaje<sup>a</sup></b>	<b>Marcador</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>CD1c/DC-SIGN</b>	1.9 ± 1.3	<b>CD45/CD56</b>	19.8 ± 8.3
<b>CD11c/DC-SIGN</b>	9.0 ± 7.2	<b>CD45/CD83</b>	1.4 ± 0.9
<b>CD14/CD56</b>	2.9 ± 1.7	<b>CD45/DC-SIGN</b>	13.1 ± 8.8
<b>CD14+/DC-SIGN+</b>	9.2 ± 5.7	<b>CD56/CD16</b>	2.9 ± 2.4
<b>CD14-/DC-SIGN+</b>	2.7 ± 3	<b>CD56/DC-SIGN</b>	1 ± 0.4
<b>CD14+/DC-SIGN-</b>	7.7 ± 4.4	<b>CD68/DC-SIGN</b>	4 ± 4.5
<b>CD15+/DC-SIGN+</b>	9.2 ± 4.4	<b>CD80/DC-SIGN</b>	12.3 ± 9.4
<b>CD15+/DC-SIGN-</b>	72.1 ± 6.2	<b>CD86/DC-SIGN</b>	12.6 ± 10
<b>CD15-/DC-SIGN+</b>	4.1 ± 3.5	<b>DC-SIGN/CD123</b>	3.7 ± 2.3
<b>CD16/CD10</b>	2.1 ± 1.6	<b>HLA-DR/DC-SIGN</b>	4.6 ± 2.8
<b>CD16/CD14</b>	24.1 ± 17.1	<b>HLA-G/DC-SIGN<sup>(b)</sup></b>	34.4 ± 28.5
<b>CD16/DC-SIGN</b>	4.4 ± 2.3	<b>DC-SIGN/FASL</b>	2.44 ± 1.46
<b>CD25/DC-SIGN</b>	10.2 ± 8.9	<b>FAS/DC-SIGN</b>	4.52 ± 2.44
<b>CD40/DC-SIGN</b>	9.8 ± 7.8	<b>ILT2/DC-SIGN</b>	6.22 ± 5.68
<b>CD45/CD10</b>	1.7 ± 2.3		
<b>CD45/CD14</b>	26.1 ± 23.5		

<sup>a</sup>Pocentaje respecto al 100% de células seleccionadas en la ventana R1. <sup>b</sup>Pocentaje respecto al 100% de DC-SIGN+ en la ventana R1

### 2.2.1. Población CD14/DC-SING en decidua de ABE.

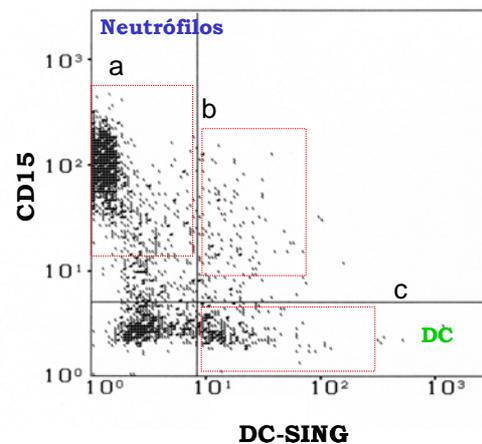
Al realizar el estudio del doble marcaje CD14/DC-SING para dDC de ABE, pudimos observar la existencia, al igual que en las dDC de ABI situadas en la ventana R1, de cuatro poblaciones, CD14-/DC-SING-; CD14+/DC-SING-; CD14+/DC-SING+ y CD14-/DC-SING+ (Fig. 17), observándose en este caso una población mayoritaria de células CD14-/DC-SIGN+ (tabla 5).



**Figura 17:** Análisis de las poblaciones DC-SIGN/CD14, seleccionada en la ventana R1, en muestras ABE. Estudio mediante citometría de flujo de la expresión de CD14 por las células DC-SIGN+ de muestras de ABE. a) población DC-SIGN-/CD14+, Monocitos (Mo); b) población DC-SIGN-/CD14<sup>Bright</sup>, macrófagos (MO) c) población DC-SIGN+/CD14<sup>Bright</sup> (MO-DC), y DC-SIGN+/CD14<sup>Dim</sup> (DC-MO), iDC en vías de maduración; d) población DC-SIGN+/CD14<sup>-</sup>, dendríticas (DC).

### 2.2.2. Población CD15/DC-SIGN en decidua de ABE.

Al realizar el estudio del doble marcaje CD15/DC-SIGN en decidua de ABE, observamos igualmente la existencia de tres poblaciones claramente diferenciadas, siendo estas poblaciones CD15+/DC-SIGN+; CD15+/DC-SIGN-; y CD15-/DC-SIGN+ (Fig. 18 y tabla 5). La población mayoritaria en la ventana R1 corresponde a neutrófilos CD15+DC-SIGN-.



**Figura 18:** Análisis de las poblaciones DC-SIGN/CD15, seleccionada en la ventana R1, en muestras ABE. Estudio mediante citometría de flujo de la expresión de CD15 por las células DC-SIGN+ de muestras de ABE. a) población DC-SIGN-/CD14+; b) población DC-SIGN+/CD15+; c) población DC-SIGN+/CD15-.

### 3. Comparación de las DC de aborto inducido y aborto espontáneo

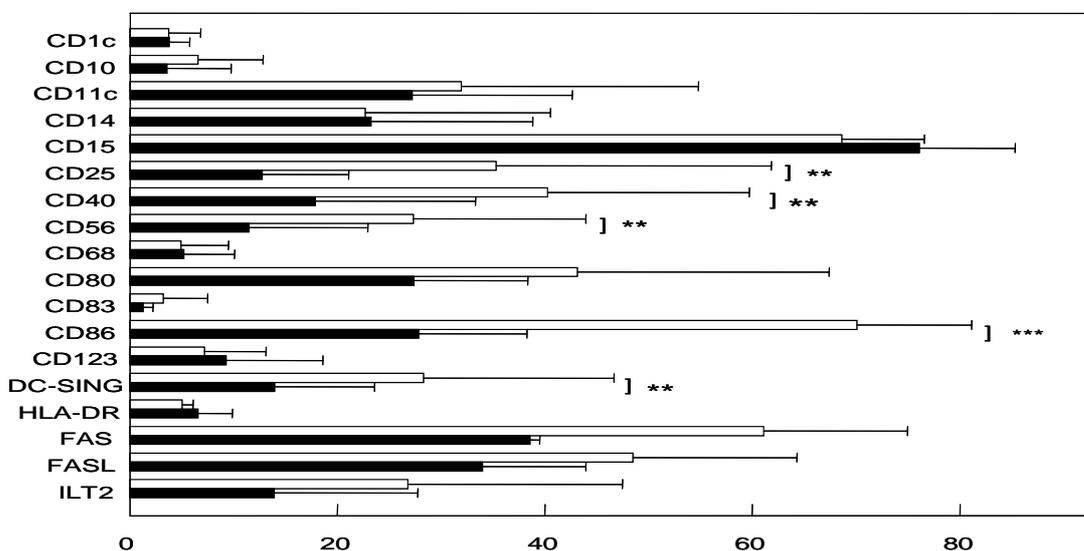
Al comparar los marcajes simples para las poblaciones procedentes de ABI y ABE se pudo observar que existían diferencias estadísticamente significativas para los siguientes antígenos de membrana, **CD25**, **CD40**, **CD56**, **CD86**, **FAS** y **DC-SIGN** (Fig. 19, tabla 6), siendo mayores dichas poblaciones en las dDC obtenidas de ABI en comparación con las dDC de ABE.

**Tabla 6:** Análisis estadístico sobre la expresión de distintos antígenos en células de decidua de primer trimestre procedentes de muestras de ABI y ABE situadas en la ventana R1.

<b>Marcador</b>	<b>ABORTO INDUCIDO (ABI)<sup>a</sup></b>	<b>ABORTO ESPONTÁNEO (ABE)<sup>a</sup></b>	<b>P</b>
<b>CD1c</b>	3.7 ± 3.1	3.8 ± 2.0	0.974
<b>CD10</b>	6.6 ± 6.3	3.6 ± 6.2	0.357
<b>CD11c</b>	31.9 ± 22.9	27.2 ± 15.4	0.606
<b>CD14</b>	22.7 ± 17.9	23.2 ± 15.6	0.534
<b>CD15</b>	68.6 ± 7.9	76.1 ± 9.2	0.163
<b>CD25</b>	35.3 ± 26.5	12.8 ± 8.4	<b>0.0003</b>
<b>CD40</b>	40.3 ± 19.5	17.9 ± 15.5	<b>0.0102</b>
<b>CD56</b>	27.3 ± 16.6	11.5 ± 11.5	<b>0.008</b>
<b>CD68</b>	4.9 ± 4.6	5.2 ± 4.9	0.443
<b>CD80</b>	43.2 ± 24.2	33.9 ± 10.9	0.485
<b>CD83</b>	3.2 ± 4.3	1.3 ± 0.9	0.223
<b>CD86</b>	70.1 ± 11.1	27.8 ± 10.5	<b>0.0001</b>
<b>CD123</b>	7.1 ± 5.9	9.3 ± 9.3	0.719
<b>DC-SIGN</b>	28.3 ± 18.4	13.9 ± 9.6	<b>0.01</b>
<b>HLA-DR</b>	5.0 ± 1.1	6.6 ± 3.3	0.264
<b>FAS</b>	61.1 ± 13.87	38.6 ± 0.9	0.170
<b>FASL</b>	48.48 ± 15.81	33.98 ± 9.99	0.630
<b>ILT2</b>	26.8 ± 20.68	13.9 ± 13.8	0.186

<sup>a</sup>Pocentaje respecto al 100% de células seleccionadas en la ventana R1.

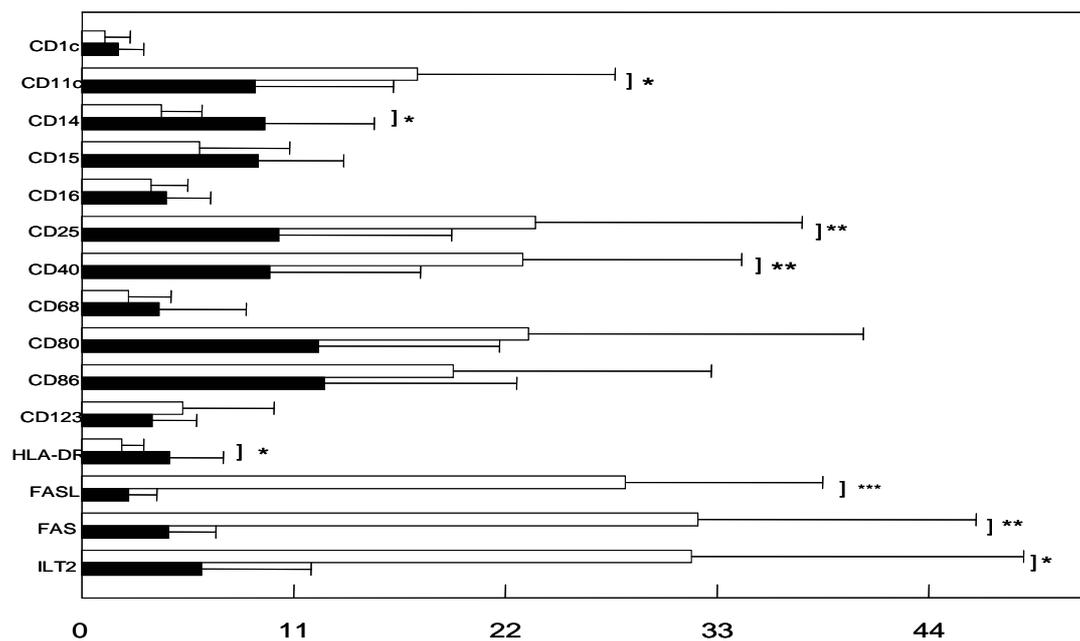
En cuanto a los dobles marcajes con DC-SIGN, pudimos ver que existían diferencias estadísticamente significativas entre las dDC procedentes de ABI y dDC de ABE en la expresión de CD11c, CD14, CD25, CD40, Fas, FasL, ILT2 y HLA-DR presentando una  $p < 0,05$  (Fig. 20 y tabla 7). Siendo en todos los casos porcentajes superiores en las muestras de ABI, lo cual es lógico si tenemos en cuenta que en decidua normal encontramos una población mayor de dDC DC-SIGN<sup>+</sup> que en ABE (Fig. 19 y tabla 6).



**Figura 19:** Análisis de las poblaciones presentes, seleccionadas en la ventana R1, en muestras ABE y ABI. Estudio estadístico sobre la expresión de distintos antígenos en células de decidua de primer trimestre procedentes de muestras de ABI (barras blancas) y ABE (barras negras) situadas en la ventana R1. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

En cuanto a las distintas subpoblaciones CD14/DC-SIGN procedentes de muestras de decidua de ABI y de ABE, pudimos observar que existían diferencias estadísticamente significativa para cada una de las poblaciones observadas en decidua, CD14+/DC-SIGN+, CD14+/DC-SIGN- y CD14-/DC-SIGN+ (Fig. 21), siendo superior la población CD14-/DC-SIGN+, en la decidua de ABI en comparación con ABE. Este fenotipo corresponde a una población inmadura, lo cual concuerda con los resultados obtenidos mediante marcaje simple, en los que

observábamos que el porcentaje de células DC-SIGN+ es superior en ABI que en ABE. En cuanto a los porcentajes de las células CD14+/DC-SIGN+ y CD14+/DC-SIGN-, se ha visto que son superiores en decidua de ABE en comparación con la de ABI (Fig. 21 y tabla 7).

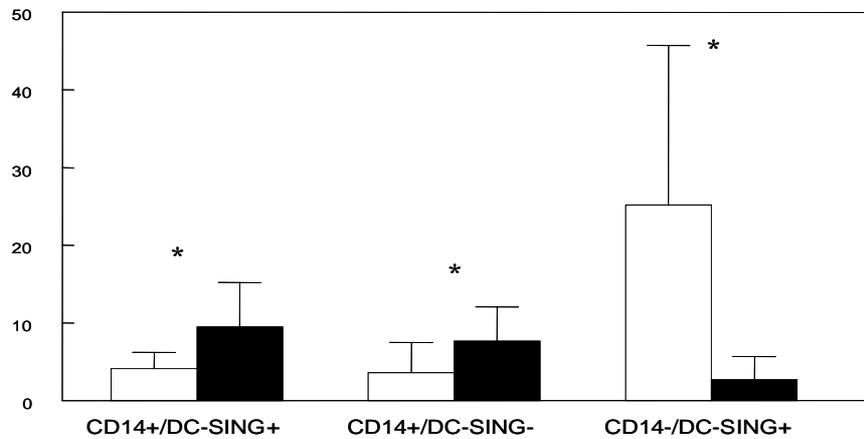


**Figura 20:** Análisis de la expresión de varios antígenos en la población DC-SIGN+, seleccionada en la ventana R1, en muestras ABI y ABE. Estudio estadístico sobre la expresión de distintos antígenos en células DC-SIGN+ de decidua de primer trimestre procedentes de muestras de ABI (barras blancas) y ABE (barras negras) situadas en la ventana R1. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

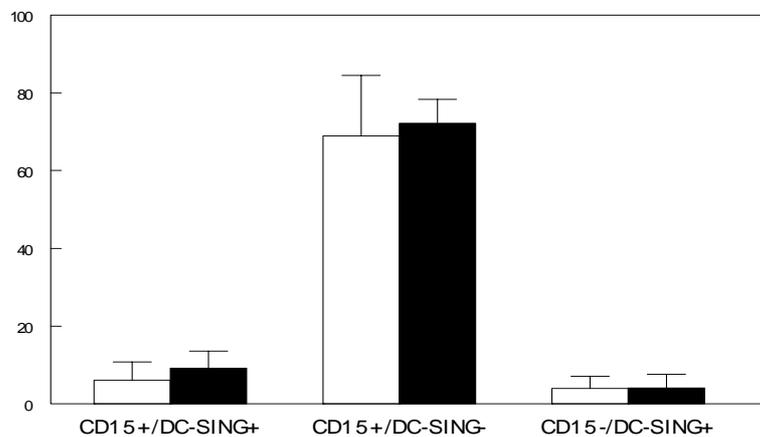
**Tabla 7:** Análisis estadístico sobre la expresión de distintos antígenos en las células DC-SIGN+ de primer trimestre procedentes de muestras de ABI y ABE situadas en la ventana R1.

<b>Marcador</b>	<b>ABI</b>	<b>ABE</b>	<b>P</b>
<b>CD1c/DC-SIGN</b>	1.2±1.3	1.9±1.3	0.498
<b>CD11c/DC-SIGN</b>	17.4± 10.3	9.0±7.2	<b>0.049</b>
<b>CD14/CD56</b>	7.6±7.1	2.9±1.7	0.326
<b>CD14+/DC-SIGN+</b>	4.1±2.1	9.2±5.7	<b>0.021</b>
<b>CD14-/DC-SIGN+</b>	25.2±20.6	2.7±3	<b>0.003</b>
<b>CD14+/DC-SIGN-</b>	3.6±3.9	7.7±4.4	<b>0.05</b>
<b>CD15+/DC-SIGN+</b>	6.1±4.7	9.2±4.4	0.521
<b>CD15+/DC-SIGN-</b>	68.9±15.5	72.1±6.2	0.757
<b>CD15-/DC-SIGN+</b>	4±3.1	4.1±3.5	0.972
<b>CD16/CD10</b>	2.0±1.4	2.1±1.6	0.991
<b>CD16/CD14</b>	7.7±8.7	24.1±17.1	0.213
<b>CD16/DC-SIGN</b>	3.6±1.9	4.4±2.3	0.900
<b>CD25/DC-SIGN</b>	23.6±13.9	10.2±8.9	<b>0.0004</b>
<b>CD40/DC-SIGN</b>	22.9±11.4	9.8±7.8	<b>0.006</b>
<b>CD45/CD10</b>	0.5±0.6	1.7±2.3	0.509
<b>CD45/CD14</b>	28.7±15.9	26.1±23.5	0.156
<b>CD45/CD56</b>	35.9±14.1	19.8±8.3	<b>0.025</b>
<b>CD45/CD83</b>	1.3±1.2	1.4±0.9	0.859
<b>CD45/DC-SIGN</b>	24.4±14.7	13.1±8.8	0.139
<b>CD56/CD16</b>	3.7±3.3	2.9±2.4	0.337
<b>CD56/DC-SIGN</b>	11.4±13.4	1±0.4	0.617
<b>CD68/DC-SIGN</b>	2.4±2.2	4±4.5	0.954
<b>CD80/DC-SIGN</b>	23.2±17.4	12.3±9.4	0.244
<b>CD86/DC-SIGN</b>	19.3±13.4	12.6±10	0.418
<b>DC-SIGN/CD123</b>	5.3±4.7	3.7±2.3	0.673
<b>HLA-DR/DC-SIGN</b>	2.1±1.1	4.6±2.8	<b>0.031</b>
<b>HLA-G/DC-SIGN(*)</b>	28.5±27.8	34.4±28.5	0.721
<b>FAS/DC-SIGN</b>	32.01±14.45	4.52±2.44	<b>0.0024</b>
<b>FASL/DC-SIGN</b>	28.23±10.25	2.44±1.46	<b>0.0004</b>
<b>ILT2/DC-SIGN</b>	31.67±17.25	6.22±5.68	<b>0.0019</b>

(\*): Población referida al 100% de células DC-SIGN+



**Figura 21:** Análisis de las subpoblaciones CD14/DC-SIGN en muestras de ABI y ABE. Estudio comparativo sobre las subpoblaciones CD14+DC-SIGN+, CD14+DC-SIGN-, CD14-DC-SIGN+ de muestras procedentes ABI (barras blancas) y ABE (barras negras) situadas en la ventana R1. \*  $p < 0.05$ .



**Figura 22:** Análisis de las subpoblaciones CD15/DC-SIGN en muestras de ABI y ABE. Estudio comparativo sobre las subpoblaciones CD15+DC-SIGN+, CD15+DC-SIGN-, CD15-DC-SIGN+ de muestras procedentes de ABI (barras blancas) y de ABE (barras negras) situadas en la ventana R1.

En el caso de la expresión de CD15/DC-SIGN, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las poblaciones procedentes de ABI y ABE en la ventana R1 (Fig. 22).

#### **4. Fenotipo antigénico de las DC de placenta a término.**

##### 4.1 Marcaje simple mediante citometría de flujo

En las muestras de decidua procedentes de placenta se observó también la existencia de una población de células DC-SIGN+, de un 14% aproximadamente (tabla 8), que nos indicaba la presencia de una población de iDC, lo que quedó confirmado por la baja expresión del marcador CD83 ( $2.2 \pm 2.6$  %), marcador de mDC (tabla 8). Al igual que para las dDC de ABI y ABE los marcadores estudiados fueron CD11c, CD14, CD15, CD25, CD40 y CD56 (tabla 8).

Las células deciduales de placenta que se encontraban en la ventana R1, expresaban CD11c ( $16.2 \pm 10.9$  %), lo que mostraba la presencia de células de origen mieloide para las DC estudiadas. Ahora bien, en la muestras de placenta se ha observado una mayor expresión de CD123 ( $17.4 \pm 9.5$  %), marcador característico de las pDC, aunque

este antígeno también es expresado por macrófagos y monocitos en vías de diferenciación [Shortman et al, 2002]. En cuanto a la expresión de CD25 y CD40, marcadores de activación y maduración, nos indica la existencia de células de placenta que se encuentran activadas y posiblemente en vías de maduración.

En las muestras de placenta para la región R1 mostró la expresión de CD56, lo que nos demostraba la existencia igualmente de células NK en las células seleccionadas. La elevada expresión de CD15, sugiere la existencia de neutrófilos en la ventana R1, de la misma manera que ocurría para el ABI y el ABE. Por otro lado, observamos la expresión de marcadores como HLA-DR, que nos indica, no sólo la existencia de un estado de madurez y activación de las células de la ventana R1, sino también la posible existencia de macrófagos.

**Tabla 8:** Análisis estadístico sobre la expresión de distintos antígenos en la población de las células deciduales de decidua a término en la ventana R1.

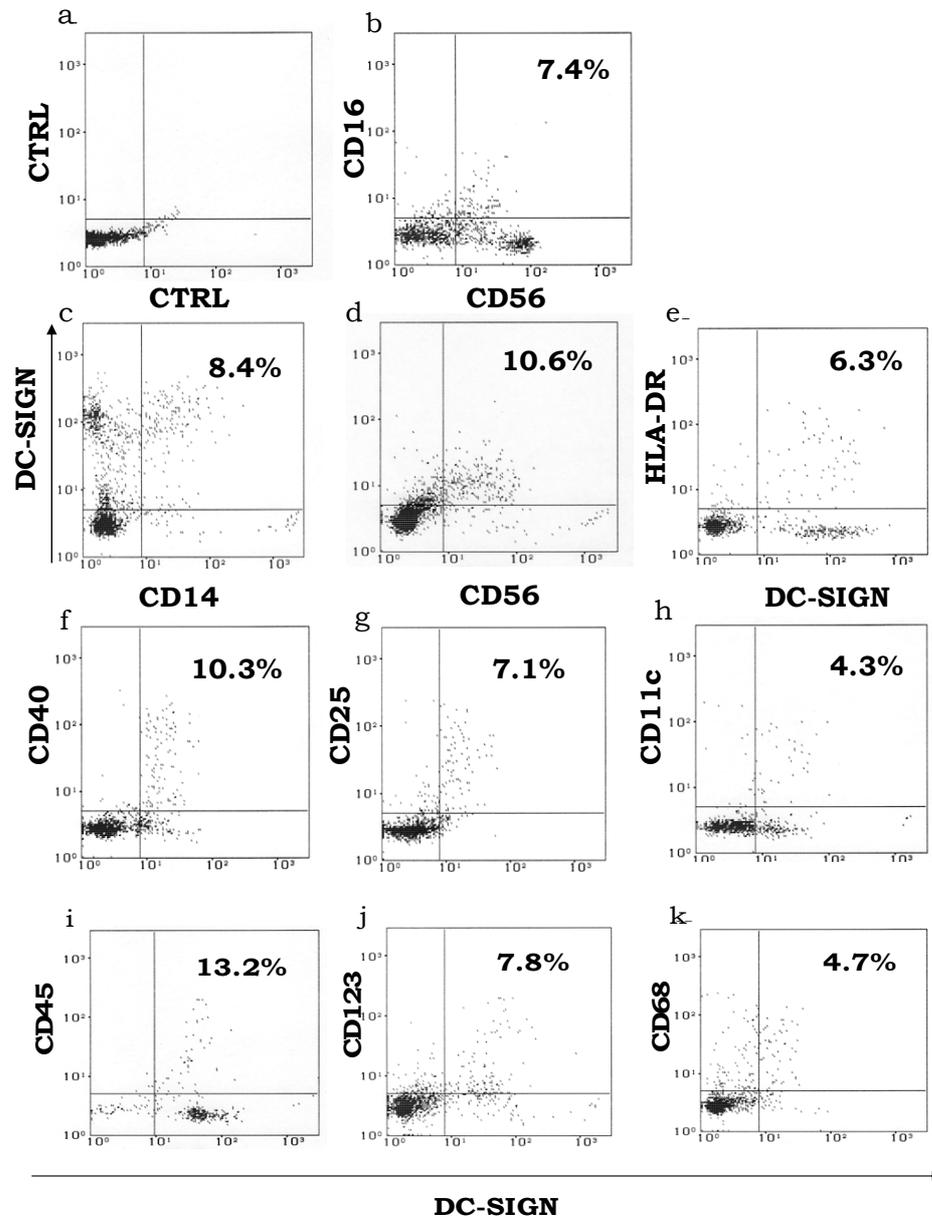
<b>Marcador</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Marcador</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>CD1c</b>	14.9 ± 12.9	<b>CD45</b>	82.5 ± 6.4
<b>CD10</b>	16.1 ± 3.3	<b>CD56</b>	18.3 ± 7.3
<b>CD11c</b>	16.2 ± 10.9	<b>CD68</b>	7.2 ± 3.9
<b>CD14</b>	24.7 ± 4.6	<b>CD83</b>	2.3 ± 2.6
<b>CD15</b>	71.9 ± 14	<b>CD123</b>	17.4 ± 9.5
<b>CD16</b>	42.1 ± 4.9	<b>HLA-DR</b>	15.8 ± 7
<b>CD25</b>	11.1 ± 3.9	<b>DC-SIGN-FITC</b>	11.4 ± 4.4
<b>CD40</b>	20.2 ± 3.2	<b>DC-SIGN-PE</b>	13.9 ± 8.1

Pocentaje respecto al 100% de células seleccionadas en la ventana R1.

#### 4.2 Doble marcaje mediante citometría de flujo

La co-expresión (Fig. 23) de las células DC-SIGN<sup>+</sup> con el CD11c, nos indicó el origen mieloide de las DC DC-SIGN<sup>+</sup> de placenta. Sin embargo, al contrario que en la decidua de primer trimestre, encontramos una población significativa de células DC-SIGN<sup>+</sup> que co-expresaban CD123. Este resultado hace pensar en la existencia de DC plasmocitoides que coexistirían en decidua de placenta junto a DC mieloides. Otra posibilidad es que se trate de macrófagos o incluso de monocitos en vías de diferenciación hacia DC mieloides. La co-expresión por parte de las células DC-SIGN<sup>+</sup> de CD68, marcador de fagocitosis, es un signo más de inmadurez. Por otra parte expresión de HLA-DR, marcador de maduración y activación, nos lleva a concluir que aunque las DC mayoritarias en placenta, como ocurre en las iDC de ABI y ABE, se encuentran en estadios intermedios de maduración. Hecho que se confirma en la expresión de CD25 y CD40 en las células DC-SIGN<sup>+</sup> de placenta, ya que este no se corresponde con el 100% de la población DC-SIGN<sup>+</sup>.

También se ha podido observar la co-expresión de CD56, indicando que en la decidua de placenta a término existen complejos entre las DC y las NK, al igual que en ABI y ABE (Fig. 23 y tabla 9).



**Figura 23:** Expresión conjunta de antígenos de superficie población de células dendríticas, seleccionada en la ventana R1, en muestras de placenta. a) Citograma de fluorescencia mostrando los controles de Ig isotipo para los anticuerpos utilizados; b) Expresión conjunta de CD16 y CD56 en la población de células seleccionadas en la ventana R1; c-k) Citogramas de fluorescencia donde se muestra la expresión de DC-SIGN y un segundo antígeno indicado, en decidua de placenta a término en la población seleccionada. Datos representativos seleccionados de un total de 9 muestras de placenta analizadas.

**Tabla 9:** Análisis estadístico sobre la expresión de distintos antígenos en las células DC-SIGN+ procedentes de decidua a término situadas en la ventana R1.

<b>Marcador</b>	<b>Porcentaje<sup>a</sup></b>
<b>CD1c/DC-SIGN</b>	2.2 ± 1.6
<b>CD11c/DC-SIGN</b>	5.4 ± 4.5
<b>CD14/DC-SIGN</b>	7.5 ± 0.1
<b>CD25/DC-SIGN</b>	7.3 ± 2.6
<b>CD40/DC-SIGN</b>	10.4 ± 2.4
<b>CD45/DC-SIGN</b>	10.8 ± 4.4
<b>CD68/DC-SIGN</b>	6 ± 3
<b>HLA-DR/DC-SIGN</b>	4.6 ± 1.6
<b>CD56/ DC-SIGN</b>	11.4 ± 4.9
<b>CD123/ DC-SIGN</b>	7.4 ± 2.9
<b>CD45/CD83</b>	0.8 ± 1.1
<b>CD56/CD16</b>	11.5 ± 3.6

<sup>a</sup>Porcentaje respecto al 100% de células seleccionadas en la ventana R1.

## **5. Comparación de las DC de placenta respecto a aborto inducido y aborto espontáneo.**

El estudio de las poblaciones de DC en decidua de placenta a término mostró diferencias con respecto a esta población en decidua de primer trimestre. Al comparar la población de dDC procedente de las distintas muestras objeto de estudios pudimos observar, para el marcaje simple, que existían diferencias estadísticamente significativa para CD25,

DC-SIGN entre las células de placenta respecto a ABI, existiendo una población de células iDC superior en ABI ( $28.4 \pm 18.4$  %) en comparación con la placenta ( $13.9 \pm 8.1$  %; tabla 10).

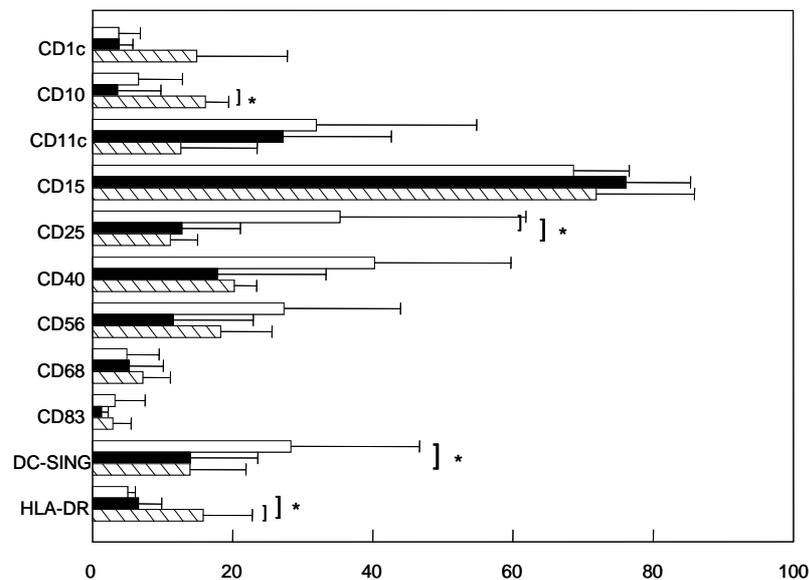
Teniendo en cuenta que la decidua de tercer trimestre es una decidua a término, sería lógico pensar que la población celular de iDC se va a ver disminuida debido a que esas células ya no estarían ejerciendo un papel fundamental a la hora de la tolerancia o inmovinactivación materno-fetal. El descenso en la expresión de CD25 podría estar relacionado con el hecho de que una vez terminado en embarazo no es necesaria la presencia de células activadas para llevar a cabo funciones inmunológicas.

También se ha podido ver diferencias para CD10 de placenta respecto al ABE (Fig.24 y tabla 10,), lo que podría indicar que existe una mayor contaminación en cuanto a la población DSC en la preparación.

**Tabla 10:** Análisis estadístico sobre la expresión de distintos antígenos en las células de decidua a término con muestras de ABI y ABE en la ventana R1.

Marcador	ABI <sup>a</sup>	ABE <sup>a</sup>	PLACENTA <sup>a</sup>	<i>P</i> <sub>ABI/PLA</sub> <sup>b</sup>	<i>P</i> <sub>ABE/PLA</sub> <sup>c</sup>
<b>CD1c</b>	3.7 ± 3.1	3.8 ± 2.0	14.9 ± 12.9	0.09	0.126
<b>CD10</b>	6.6 ± 6.3	3.6 ± 6.2	16.1 ± 3.3	0.095	0.02
<b>CD11c</b>	31.9 ± 22.9	23.2 ± 15.4	12.6 ± 10.9	0.290	0.276
<b>CD14</b>	22.7 ± 17.9	27.4 ± 15.6	24.7 ± 4.6	0.812	0.949
<b>CD15</b>	68.6 ± 7.9	76.1 ± 9.2	71.9 ± 14	0.605	0.582
<b>CD25</b>	35.3 ± 26.5	12.8 ± 8.4	11.1 ± 3.9	<b>0.017</b>	0.295
<b>CD40</b>	40.3 ± 19.5	17.9 ± 15.5	20.2 ± 3.2	0.119	0.802
<b>CD56</b>	27.3 ± 16.6	11.5 ± 11.5	18.3 ± 7.3	0.156	0.159
<b>CD68</b>	4.9 ± 4.6	5.2 ± 4.9	7.2 ± 3.9	0.382	0.754
<b>CD83</b>	3.2 ± 4.3	1.3 ± 0.9	2.9 ± 2.6	0.431	0.119
<b>DC-SIGN</b>	28.3 ± 18.4	13.9 ± 9.6	13.9 ± 8.1	<b>0.05</b>	0.994
<b>HLA-DR</b>	5.0 ± 1.1	6.6 ± 3.3	15.8 ± 7	<b>0.002</b>	<b>0.011</b>

<sup>a</sup>Porcentaje respecto al 100% de células seleccionadas en la ventana R1. <sup>b</sup>*p* entre placenta y ABI; <sup>c</sup>*p* entre placenta y ABE.



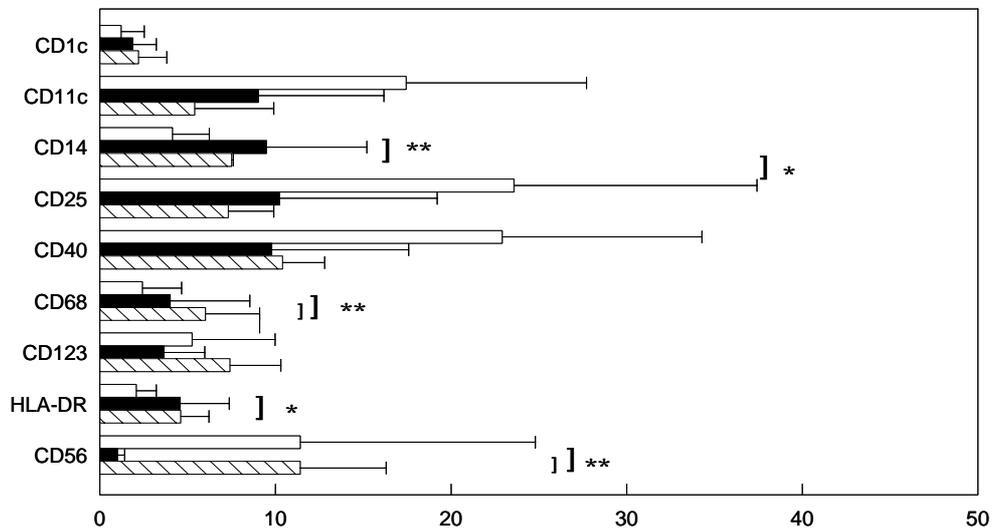
**Figura 24:** Análisis de las poblaciones presentes en las células dendríticas, seleccionada en la ventana R1, en muestras de decidua a término, ABE y ABI. Estudio estadístico sobre la expresión de distintos antígenos en células de decidua de muestras decidua a término (barras rayadas, ABI (barras blancas) y ABE (barras negras) situadas en la ventana R1. \**p* < 0.05.

En cuanto a las iDC DC-SIGN+ se observó, mediante doble marcaje, que existían diferencias respecto a las distintas subpoblaciones analizadas en placenta respecto a ABI, como eran la expresión de CD14, CD25, CD56, CD68 y HLA-DR, y diferencias en la expresión de CD56 y CD68 respecto a ABE (Fig. 25 y tabla 11).

**Tabla 11:** Análisis estadístico sobre la expresión de distintos antígenos en las células DC-SIGN+ de decidua de tercer trimestre en comparación con muestras ABI y ABE situadas en la ventana R1.

Marcador	ABI <sup>a</sup>	ABE <sup>a</sup>	PLACENTA <sup>a</sup>	<i>P</i> <sub>ABI/PLA</sub> <sup>b</sup>	<i>P</i> <sub>ABE/PLA</sub> <sup>c</sup>
<b>CD1c/DC-SIGN</b>	1.2 ± 1.3	1.9 ± 1.3	2.2 ± 1.6	0.832	0.478
<b>CD11c/DC-SIGN</b>	17.4 ± 10.3	9.0 ± 7.2	5.4 ± 4.5	0.425	0.09
<b>CD14/DC-SIGN</b>	3.6 ± 2.1	9.2 ± 5.7	7.5 ± 0.1	0.690	<b>0.006</b>
<b>CD25/DC-SIGN</b>	23.6 ± 13.9	8.1 ± 8.9	7.3 ± 2.6	0.753	<b>0.018</b>
<b>CD40/DC-SIGN</b>	22.9 ± 11.4	9.8 ± 7.8	10.4 ± 2.4	0.89	0.101
<b>CD45/CD83</b>	1.3 ± 1.2	1.4 ± 0.9	0.8 ± 1.1	0.48	0.737
<b>CD45/DC-SIGN</b>	24.4 ± 14.7	13.1 ± 8.8	10.8 ± 4.4	0.691	0.198
<b>CD56/CD16</b>	3.7 ± 3.3	2.9 ± 2.4	11.5 ± 3.6	<b>0.0003</b>	<b>0.04</b>
<b>CD56/DC-SIGN</b>	11.4 ± 13.4	1 ± 0.4	11.4 ± 4.9	<b>0.006</b>	<b>0.003</b>
<b>CD68/DC-SIGN</b>	2.4 ± 2.2	2.3 ± 4.5	6 ± 3.1	<b>0.03</b>	<b>0.05</b>
<b>CD123/DC-SIGN</b>	5.3 ± 4.7	3.7 ± 2.3	7.4 ± 2.9	0.159	0.432
<b>HLA-DR/DC-SIGN</b>	2.1 ± 1.1	4.6 ± 2.8	4.6 ± 1.6	0.987	<b>0.005</b>

<sup>a</sup>Porcentaje respecto al 100% de células seleccionadas en la ventana R1. <sup>b</sup>*p* entre placenta y ABI; <sup>c</sup>*p* entre placenta y ABE.



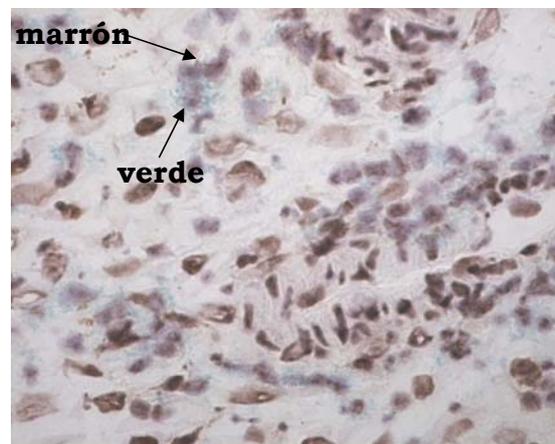
**Figura 25:** Análisis de la expresión de varios antígenos en la población DC-SIGN+ en muestras de decidua a término, ABE y ABI. Estudio estadístico sobre la expresión de distintos antígenos en células DC-SIGN+ de decidua a término (barras rayadas) en comparación con muestras ABI (barras blancas) y ABE (barras negras) situadas en la ventana R1. \*  $p < 0.05$ .

## **ESTUDIO DE COMPLEJOS**

### **1. Estudio de la población CD56/DC-SIGN**

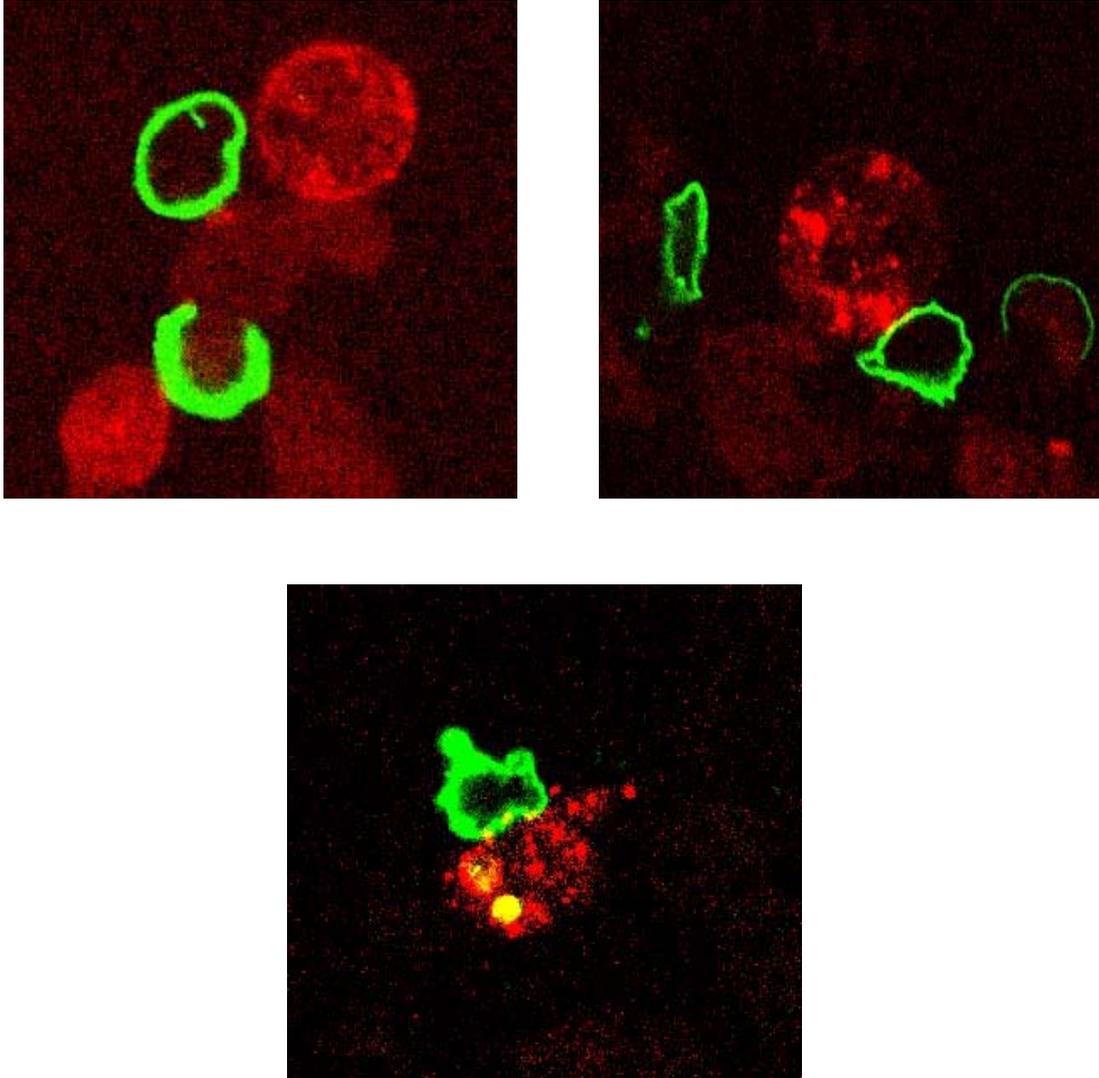
Al realizar el análisis del marcador CD56 en la ventana de células seleccionadas mediante citometría de flujo pudimos observar la existencia de una población de células DC-SIGN<sup>+</sup> que eran positivas para el antígeno CD56 (Fig. 8 y tabla 3). El hecho sugería la formación de inmunocomplejos de células CD56<sup>+</sup>/DC-SIGN<sup>+</sup>, ya que no se esperaba expresión de CD56 en células iDC. Quisimos por tanto confirmar esta hipótesis mediante el análisis de las muestras por inmunohistoquímica y microscopía confocal. Estos experimentos demostraron que el doble marcaje era realmente debido a la formación de agregados entre las células dendríticas DC-SIGN<sup>+</sup> y las células NK deciduales CD56<sup>+</sup> (Fig. 26 y Fig. 27).

El análisis estadístico de las poblaciones de DC reveló que la proporción de complejos celulares DC-SIGN<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> es superior en ABI que en ABE, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos ( $11.4 \pm 13.4 \%$  y  $1 \pm 0.4 \%$  respectivamente;  $p=0.617$ ) (Fig. 28).

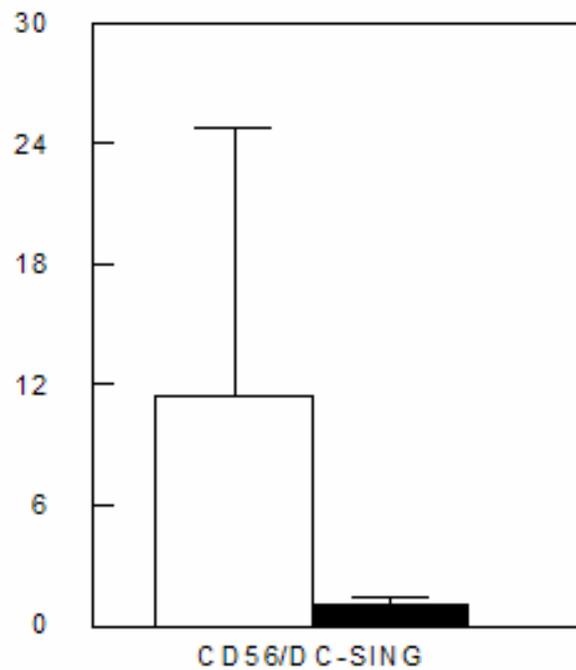


**Figura 26:** Estudio mediante inmunohistoquímica de complejos CD56+/DC-SIGN+. Las células fueron marcadas en cortes histológicos de decidua con el anticuerpo DC-SIGN marcado con DAB (marrón) y células CD56 marcadas con Histogreen (azul), observándose co-localización de las células CD56+ y DC-SIGN+ que confirman la existencia de complejos entre células NK y iDC en decidua de primer trimestre (aumentos 20X). Datos representativos seleccionados de un total de 10 muestras de ABI analizadas.

Este análisis además demostró, en algunos de estos complejos que fueron visualizados por microscopía óptica, que las DC presentaban un “aspecto en ebullición”, semejante al que presentan de células en apoptosis (resultados no mostrados). Teniendo en cuenta que las DC de decidua expresaban las moléculas FAS y FASL, llevamos a cabo un estudio sobre apoptosis en los complejos CD56/DC-SING, que se expone en el siguiente apartado.



**Figura 27:** Estudio mediante microscopía confocal de complejos CD56+/DC-SIGN+ en células de decidua de primer trimestre. Las células de decidua fueron marcadas con el anticuerpo DC-SIGN (PE-rojo) y células CD56 (FITC-verde), observándose que las células que expresan CD56-verde aparecen asociadas a células DC-SIGN-rojo, que confirman la existencia de complejos entre células NK y iDC en decidua de primer trimestre (aumentos 60X). Datos representativos seleccionados de un total de 3 muestras de ABI analizadas.



**Figura 28:** Análisis mediante citometría de flujo de las subpoblaciones CD56/DC-SIGN seleccionadas en la ventana R1, en muestras en muestras ABI y ABE. Estudio comparativo sobre las subpoblaciones CD56+DC-SIGN+ de muestras procedentes de ABI (barras blancas) y de ABE (barras negras) situadas en la ventana R1.

## 2. Estudio de Apoptosis en los complejos CD56+/DC-SIGN+

Los datos morfológicos de microscopia sugerían que las NK podían estar induciendo la muerte de las DC mediante apoptosis, por lo que estudiamos la presencia de células en apoptosis en los complejos DC-NK mediante distintas técnicas.

**Tabla 12:** Estudio sobre la proporción de células DC-SIGN+ en apoptosis detectadas mediante marcaje con Anexina-V situadas en la ventana R1 en muestras de ABI.

<b>ABI<sup>a</sup></b>	<b>% DC-SIGN+</b>	<b>% DC-SIGN+/ANEXINA+</b>
<b>1A</b>	43	22.8
<b>3A</b>	32.5	22.8
<b>4A</b>	49.2	4.3
<b>5A</b>	61.7	3.7

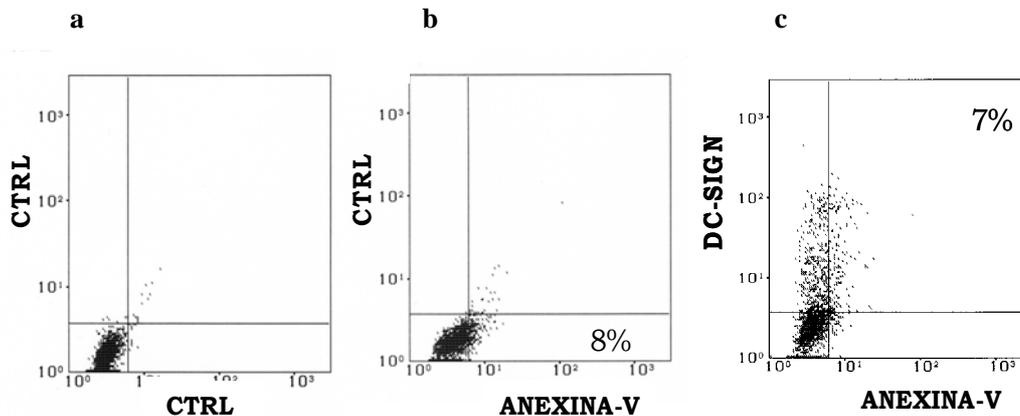
<sup>a</sup> muestra de aborto analizadas; b Porcentaje respecto al 100% de células seleccionadas en la ventana R1

### 2.1 Estudio mediante Anexina-V

Para determinar si existía la inducción de apoptosis en las células DC-SIGN en la decidua, marcamos la población DC-SIGN+, con Anexina-V-FITC, utilizada para detectar la apoptosis temprana. La Anexina-V se une a la fosfatidilserina expresada por las células en apoptosis. Se observó la existencia de una población Anexina-V+/DC-SIGN+ en ABI (tabla 12 y Fig. 29). Este hecho nos sugería que parte de las iDC de decidua se encontrarían en apoptosis.

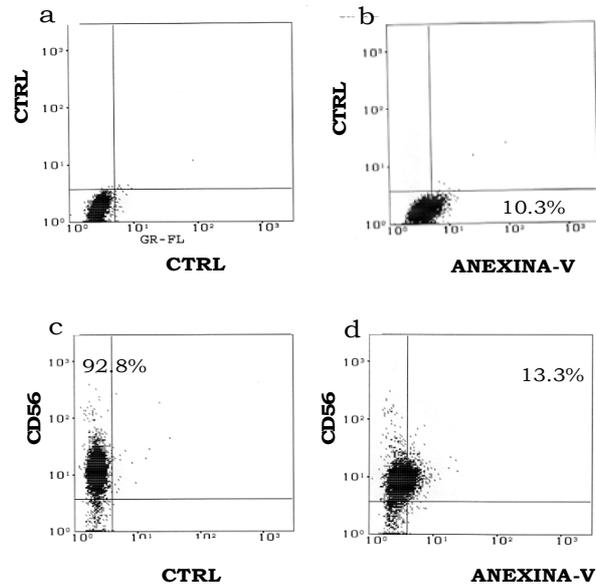
Dado que las células dendríticas forman complejos con las células NK deciduales, cabía la posibilidad de que la Anexina-V+ detectada mediante citometría de flujo procedieran de células NK. Así pues, estudiamos también el marcaje con Anexina-V en las población de células CD56+ en la ventana de las DC (R1) y observamos que también

existía doble positividad Anexina-V/CD56 (Fig. 30), lo que nos indicaría la existencia de células NK en apoptosis.

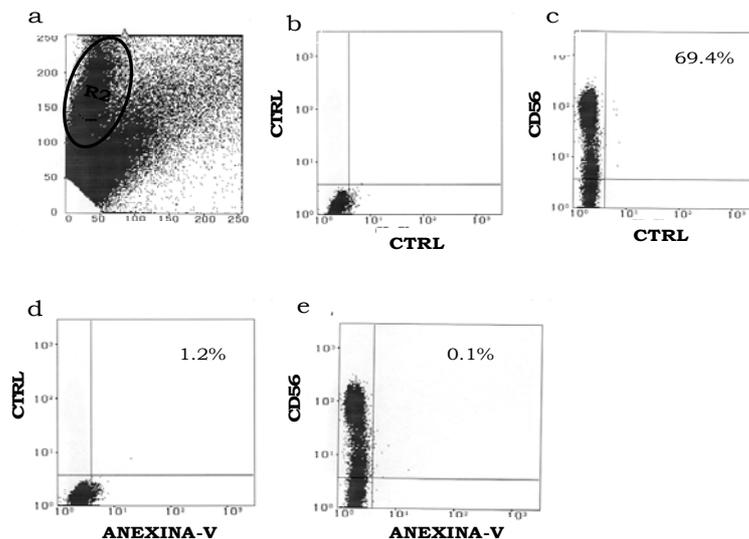


**Figura 29:** Detección de células DC-SIGN<sup>+</sup> en apoptosis de muestras ABI en la población de células seleccionadas en R1 por citometría de flujo. a) Citograma de fluorescencia mostrando el control de Ig isotipo rojo y sin marcar con AnexinaV-FTIC; b) Citograma de fluorescencia mostrando la expresión de DC-SIGN-PE y Anexina-V-FITC en la población seleccionada.

Ahora bien, al estudiar dichas células NK en la ventana de los linfocitos se vio que no existía doble positividad Anexina-V/CD56 (Fig. 31). Este hecho sugiere que si bien las NK de la ventana de las DC pueden encontrarse en apoptosis, la apoptosis observada en los complejos correspondía principalmente a las iDC con las que las NK forman complejos.



**Figura 30:** Detección de células CD56+ en apoptosis de muestras ABI en la población de células seleccionadas en R1 por citometría de flujo. a) Citograma de fluorescencia mostrando el control de Ig isotipo rojo y sin marcar con AnexinaV-FITC b) Citograma de fluorescencia mostrando el marcaje simple de Anexina-V-FITC; c) Citograma de fluorescencia mostrando la expresión de CD56+; d) Citograma de fluorescencia mostrando la expresión de a de CD56+ y el marcaje con Anexina-V-FITC.



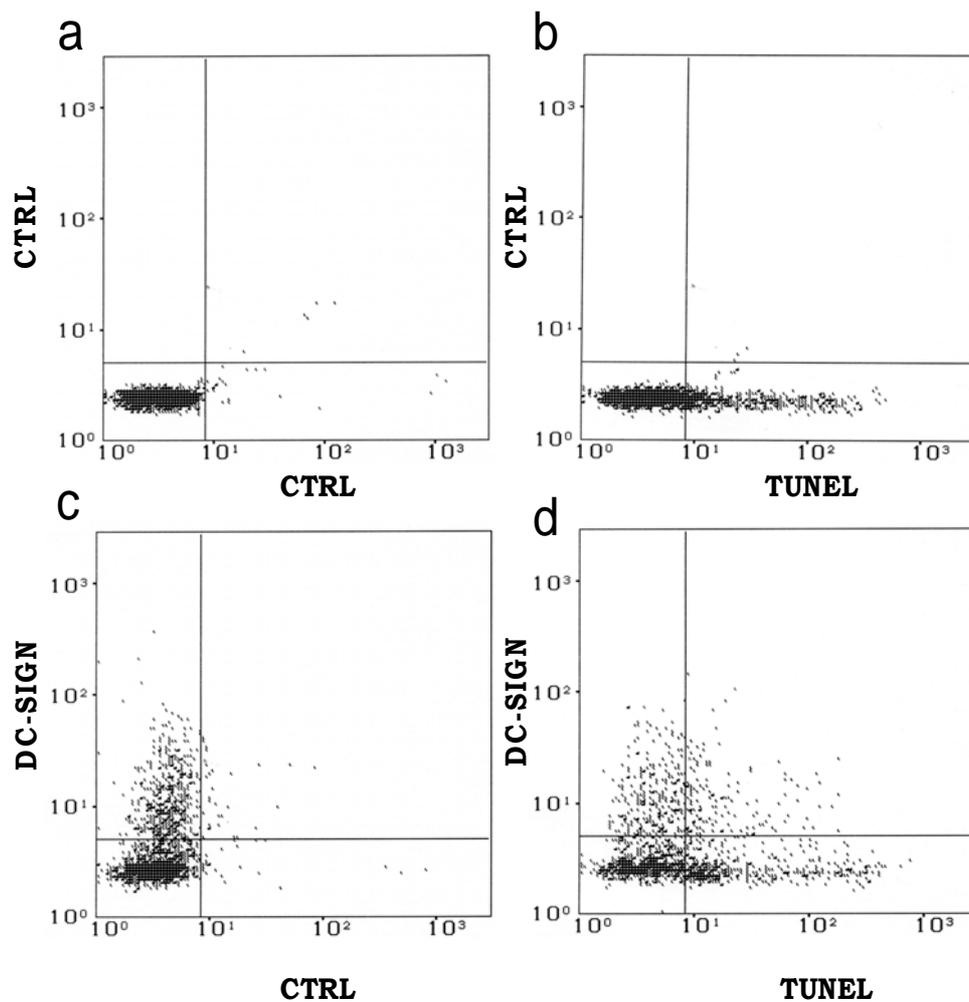
**Figura 31:** Detección de células CD56+ en apoptosis de muestras ABI, seleccionadas en la ventana de linfocitos R2, por citometría de flujo. a) Citograma de dispersión en el que

se muestra la región R2, donde se encuentran los linfocitos deciduales seleccionados; b) Citograma de fluorescencia mostrando el control de Ig isotipo rojo y sin marcar con AnexinaV-FITC; c) Citograma de fluorescencia control mostrando el marcaje simple CD56+; d) Citograma de fluorescencia control mostrando la expresión de Anexina-V-FITC; e) Citograma de fluorescencia mostrando la expresión de CD56+ y el marcaje con Anexina-V-FITC.

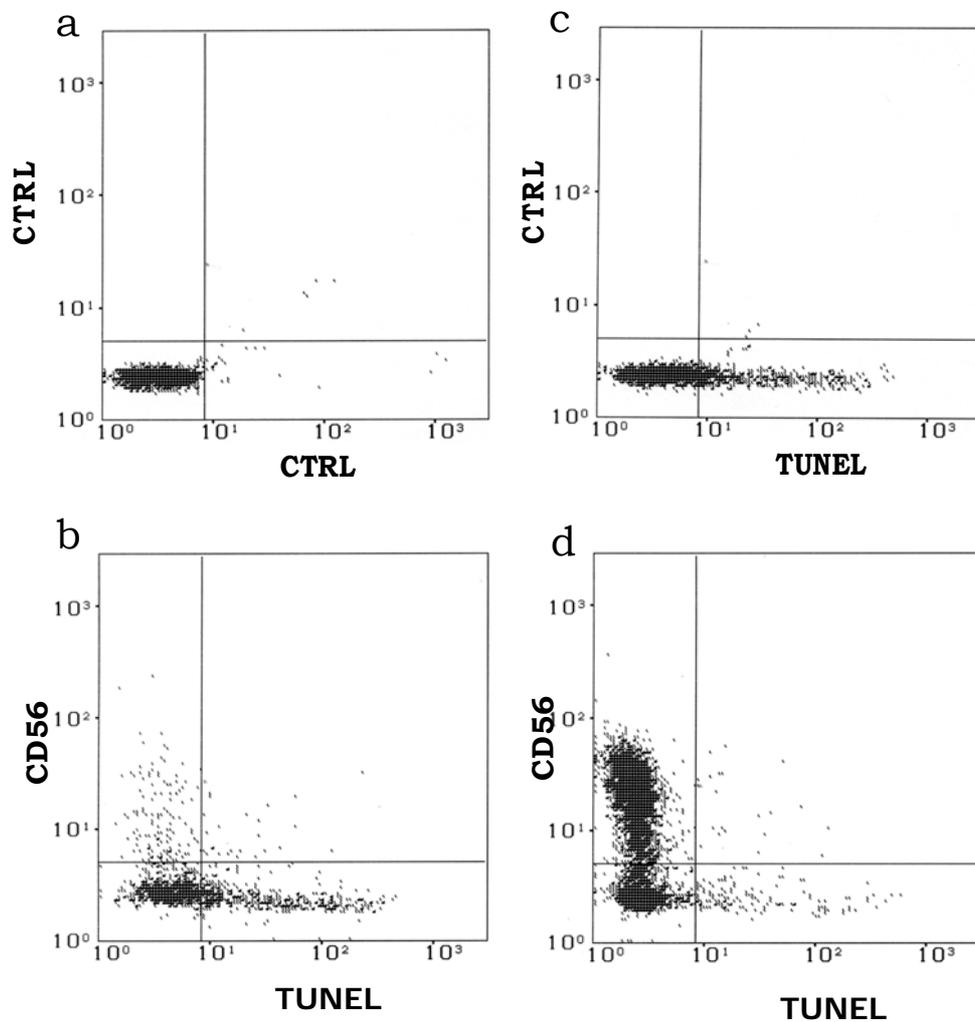
### 2.2 Estudio de la apoptosis con la técnica TUNEL mediante citometría de flujo.

La técnica del túnel se utiliza para detectar apoptosis tardía mediante la incorporación de nucleótidos marcados al DNA fraccionado. Pudimos así observar la existencia de una población apoptótica TUNEL+/DC-SIGN+ (Fig. 32) y TUNEL+/CD56+ (Fig. 33) en la ventana R1 en la decidua normal. Al igual que en el estudio con Anexina-V, esto podría indicar, que las células en apoptosis podían ser tanto las DC, como las NK o ambas. El estudio del TUNEL de las células CD56+ en la ventana de los linfocitos, ventana R2, demostró nuevamente que la NK apoptóticas (TUNEL+/CD56+) eran casi inexistentes (Fig. 33d), lo que nos sugería que la apoptosis observada en la ventana R1 de DC es debida principalmente a las DC-SIGN+.

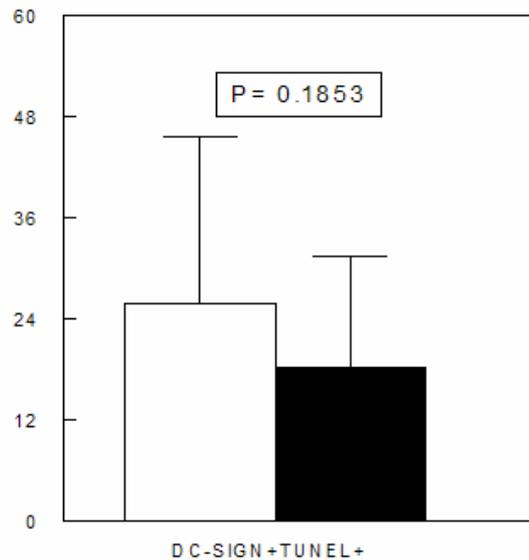
Al comparar las poblaciones DC-SIGN+/TUNEL+ de ABI y ABE se observó que una mayor proporción de estas células en ABI, aunque sin diferencia significativa (Fig. 34).



**Figura 32:** Determinación mediante citometría de flujo del porcentaje de células DC-SIGN+ que son TUNEL+ en decidua de ABI de la población seleccionada en R1. a) Citograma de fluorescencia mostrando el control de Ig isotipo para la fluorescencia roja y sin marcar DNA con TUNEL; b) citograma control donde se muestra la población de células en apoptosis (TUNEL+) y el control isotipo para la fluorescencia roja; c) citograma control para DC-SIGN+ y sin marcar el DNA con TUNEL; d) doble marcaje de la población de células en R1 para DC-SIGN y TUNEL.



**Figura 33:** Determinación mediante citometría de flujo de la población de células CD56+ que son TUNEL+ en muestras decidua de ABI. a) Citograma de fluorescencia mostrando el control de Ig isotipo para la fluorescencia roja y sin marcar DNA con TUNEL; b) citograma control donde se muestra la población de células en apoptosis (TUNEL+) en la ventana R1 y el control isotipo para la fluorescencia roja; c) citograma control para CD56+ y sin marcar el DNA con TUNEL, d) Doble marcaje de la población de células en R2 para CD56 y TUNEL.

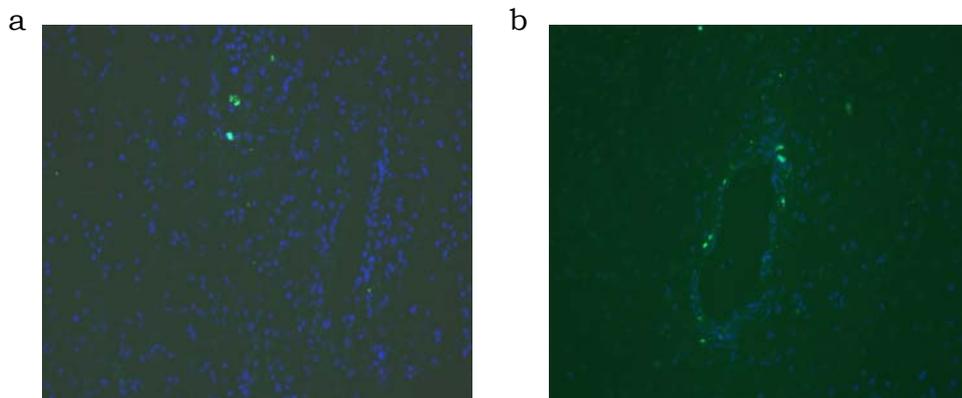


**Figura 34:** Comparación de las poblaciones de células DC-SIGN+/TUNEL+ procedente de ABI y ABE seleccionadas en R1 por citometría de flujo. Análisis comparativo de las células DC-SIGN (rojo) y las células en opoptosis (TUNEL-verde) en muestras procedentes de decidua de ABI (blanco) y ABE (negro) mediante citometría de flujo en la población seleccionada con la ventana R1.

### 2.3 Estudio de la apoptosis con la técnica TUNEL mediante fluorescencia

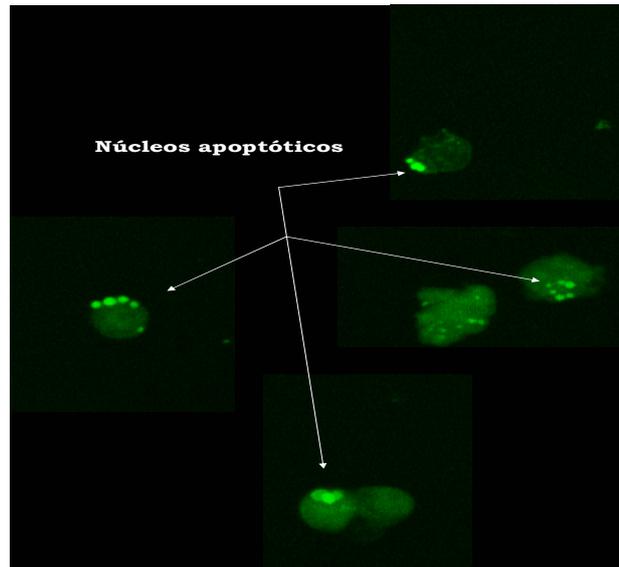
Con objeto de dilucidar que células de los inmunocomplejos NK/DC sufrían apoptosis, analizamos mediante microcopia de fluorescencia y confocal las muestras de decidua utilizando la técnica TUNEL. En la figura 35 podemos ver la existencia de apoptosis en decidua de ABI (a) y ABE (b). Figura localizada en la región perivascular para el marcaje de TUNEL. Como describíamos en el apartado anterior

esta localización perivascular es característica de las iDC en decidua (Fig. 5b).

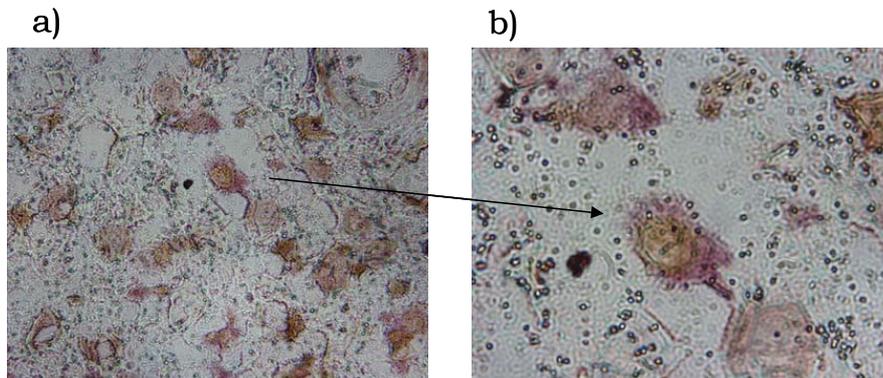


**Figura 35:** Detección de las células en apoptosis en cortes histológicos de decidua mediante la técnica TUNEL. Detección de DNA con DAPI (azul) y DNA fragmentado (verde) con la técnica TUNEL en cortes de decidua. a) cortes de decidua de ABI; b) cortes de decidua de ABE. Datos representativos de un total de 10 muestras de ABI y 10 muestras de ABE analizadas. (Aumentos 10X)

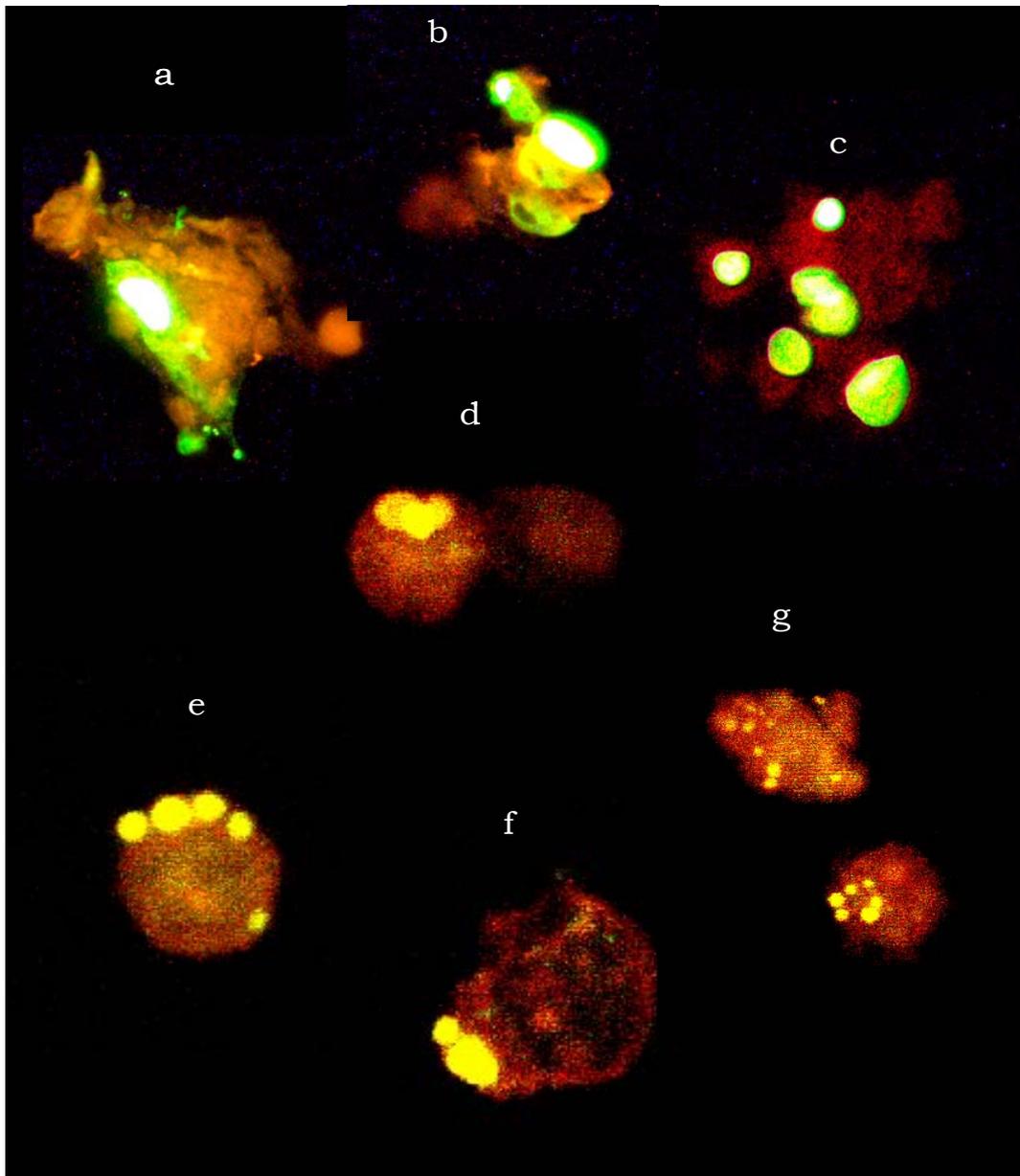
Para confirmar el tipo de célula (DC o NK) que se encontraba en apoptosis, las DC se purificaron mediante citometría de flujo, *sorter*, en función de la expresión de DC-SIGN-PE, obteniendo un grado de pureza entre el 80-95%. Las DC-SIGN+ purificadas fueron posteriormente marcadas con la técnica del TUNEL y analizadas mediante microscopía confocal (Fig. 36). En la Figura 37 se observa con claridad la existencia de los núcleos apoptóticos en las DC-SIGN+, confirmado la apoptosis de las células dendríticas de decidua. Dicha apoptosis también ha podido ser observada mediante inmunohistoquímica (Fig. 38).



**Figura 36:** Detección de apoptosis en células DC-SIGN+ purificadas con “sorter” y marcadas con TUNEL. Microfotografías de microscopia confocal mostrando el marcaje de núcleos apoptóticos (verde) con la técnica TUNEL de células DC-SIGN+ purificadas de muestras decidua ABI. Datos seleccionados de un total de 3 muestras analizadas (aumentos 60X).



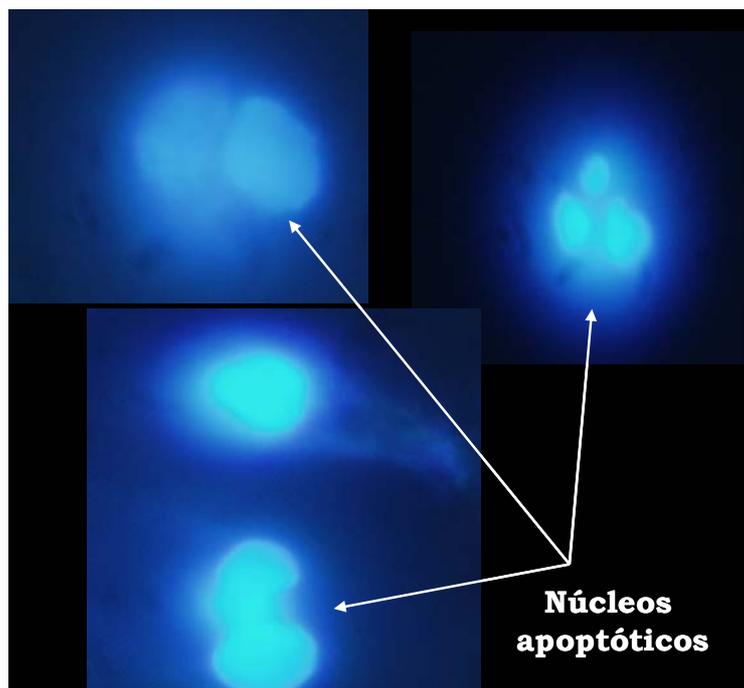
**Figura 37:** Estudio mediante inmunohistoquímica de DC-SIGN+ en apoptosis. Las células fueron marcadas en cortes histológicos de decidua con el anticuerpo DC-SIGN marcado con VIP (rosa), observándose doble marcaje TUNEL+ (marrón) confirmando la existencia de células iDC en apoptosis en decidua de primer trimestre, a) aumentos 20X; y b) aumentos 100X. Datos representativos seleccionados de un total de 3 muestras de ABI analizadas.



**Figura 38:** Detección de apoptosis en células DC-SIGN+ purificadas con “sorter” y marcadas con TUNEL. Microfotografías de microscopia confocal mostrando, marcaje de fragmentos de DNA (verde) con la técnica TUNEL de células DC-SIGN+ (rojo) purificadas de muestras decidua ABI. a-c) microfotografía confocal (mostrando solo un plano de corte) de la células DC-SIGN+. d-g) Microscopia confoca (suma de todos los planos de corte) de células DC-SIGN+ TUNEL+, la colocalización verde/rojo se observa en amarillo. Datos seleccionados de un total de 3 muestras analizadas (aumentos 60X).

#### 2.4 Tinción con DAPI de las células de la decidua

La tinción de células con DAPI, que tiñe exclusivamente los núcleos (ver material y métodos), permite observar en microscopia confocal y de fluorescencia, el aspecto de los núcleos celulares, bien normales o formando cuerpos apoptóticos propios de células en apoptosis. Mediante fluorescencia sobre células purificadas con columnas electromagnéticas (ver Material y Métodos) y en base a la expresión de DC-SIGN-PE, pudimos ver la existencia de núcleos apoptóticos en las células DC-SIGN+ (Fig. 39).



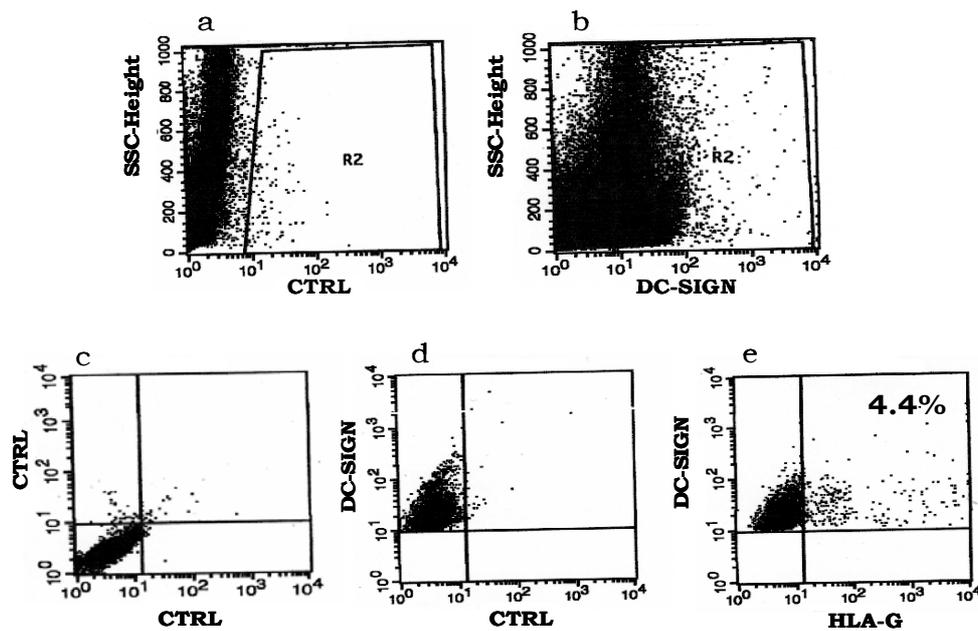
**Figura 39:** Detección de núcleos apoptóticos en células DC-SIGN+ purificadas y marcadas con DAPI. Fotografías de microscopia fluorescencia mostrando la tinción con DAPI en células DC-SIGN+ (rojo) purificadas, procedentes de muestras decidua ABI. Datos seleccionados de un total de 4 muestras analizadas (aumentos 60x).

### **3. Estudio de la expresión de HLA-G por las DC**

#### *3.1 Expresión HLA-G en células DC-SING+ de ABI*

El HLA-G es una molécula no clásica perteneciente al MHC de clase I, su expresión es característica en el trofoblasto. Esta molécula es el ligando de varios receptores, tanto inhibidores como activadores, de la actividad citotóxica de las células NK [Valés-Gómez et al., 1999]. Al observar mediante doble marcaje CD56/DC-SIGN la posible existencia de complejos, pensamos realizar el estudio de la expresión de HLA-G por las dDC en la ventana R1, para explorar la posibilidad de que esta molécula este implicada en la interacción NK-dDC. Este estudio se ha analizado respecto al 100% de dDC DC-SIGN+ y no a la población total de la ventana R1, como se ha hecho para el resto del fenotipo con motivo de eliminar la positividad de HLA-G correspondiente al posible trofoblasto contaminante en la ventana R1.

Al realizar el estudio de la expresión de HLA-G para las dDC 100% DC-SING+ de ABI, pudimos observar la existencia de una población HLA-G+/DC-SING+ (Fig. 40; Tabla 3).



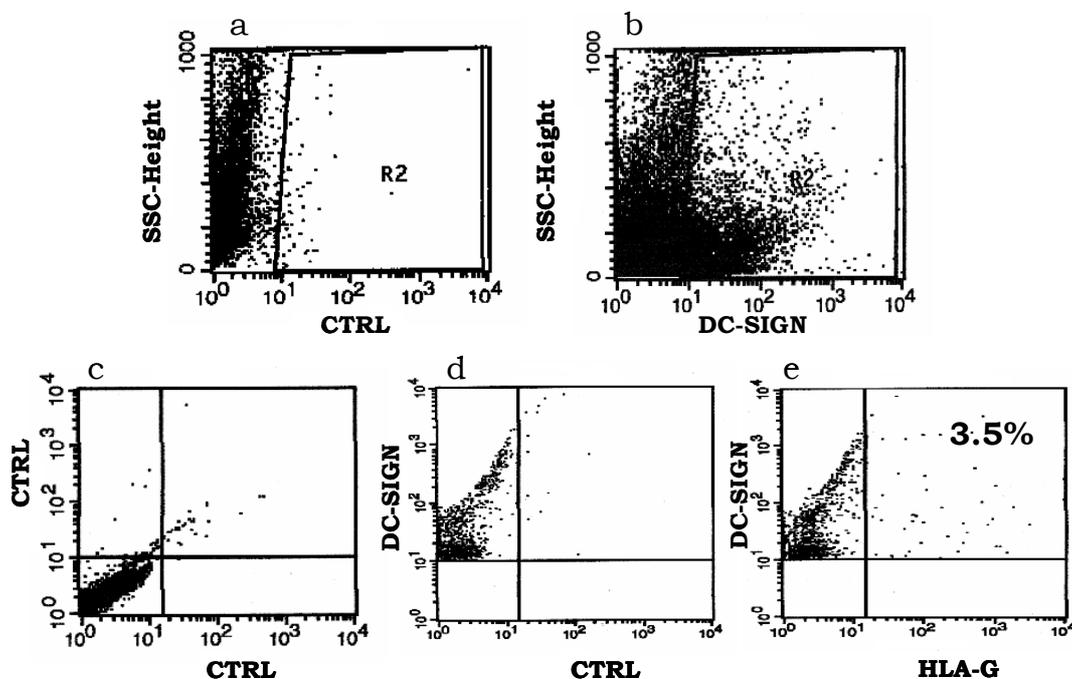
**Figura 40:** Expresión conjunta de HLA-G y DC-SIGN en una población de células dendríticas 100% DC-SIGN+, seleccionadas en la ventana R1, de muestras de ABI. a) Citograma control mostrando la tinción con la Ig isotipo para la fluorescencia roja (PE), eje de abcisas, respecto a la complejidad citoplasmática, eje de ordenadas; b) Expresión de DC-SING-PE en la población de células seleccionadas en la ventanas R1 y la ventana R2, mostrada en a; c) Expresión de HLA-G-FITC y DC-SING-PE en la población de células seleccionadas en la ventana R1+ R2. Datos representativos seleccionados de un total de 3 muestras ABI analizadas.

### 3.2 Expresión HLA-G en células DC-SING+ de ABE

Al igual que para las dDC de ABI, se estudió la expresión de HLA-G en las dDC DC-SIGN+ de ABI en la ventana R1, debido a la existencia de complejos entre las células NK y dDC. Este estudio se ha analizado

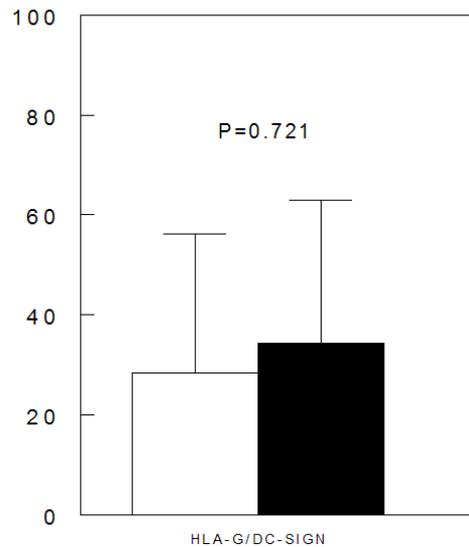
respecto al 100% de dDC DC-SIGN+ y no a la población total de la ventana R1, como se ha hecho para el resto del fenotipo.

En este caso el estudio de la expresión de HLA-G para las dDC 100% DC-SIGN+ de ABE, pudimos observar la existencia de una población HLA-G+/DC-SIGN+ (Fig. 41; tabla 5) para las dDC de ABE.



**Figura 41:** Expresión conjunta de HLA-G y DC-SIGN en una población de células dendríticas 100% DC-SIGN+ de ABE. a) Citograma control mostrando la tinción con la Ig isotipo para la fluorescencia roja (PE), eje de abcisas, respecto a la complejidad citoplasmática, eje de ordenadas; b) Expresión de DC-SIGN-PE en la población de células seleccionadas en la ventanas R1 y la ventana R2, mostrada en a; c) Expresión de HLA-G-FITC y DC-SIGN-PE en la población de células seleccionadas en la ventana R1+ R2. Datos representativos seleccionados de un total de 3 muestras ABI analizadas.

Al comparar las poblaciones de HLA-G+/DC-SIGN+ para ABI y ABE, pudimos observar que no existía diferencia estadísticamente significativa,  $p=0.721$  (Fig. 42).



**Figura 42:** Comparación de las poblaciones de células HLA-G+/DC-SIGN+ procedente de ABI y ABE en la región R1. Análisis comparativo de las células DC-SIGN (rojo) y células HLA-G (verde) en muestras procedentes de decidua de ABI (blanco) y ABE (negro) mediante citometría de flujo en la población seleccionada con la ventana R1\*R2 (100% DC-SIGN+).



## *DISCUSIÓN*

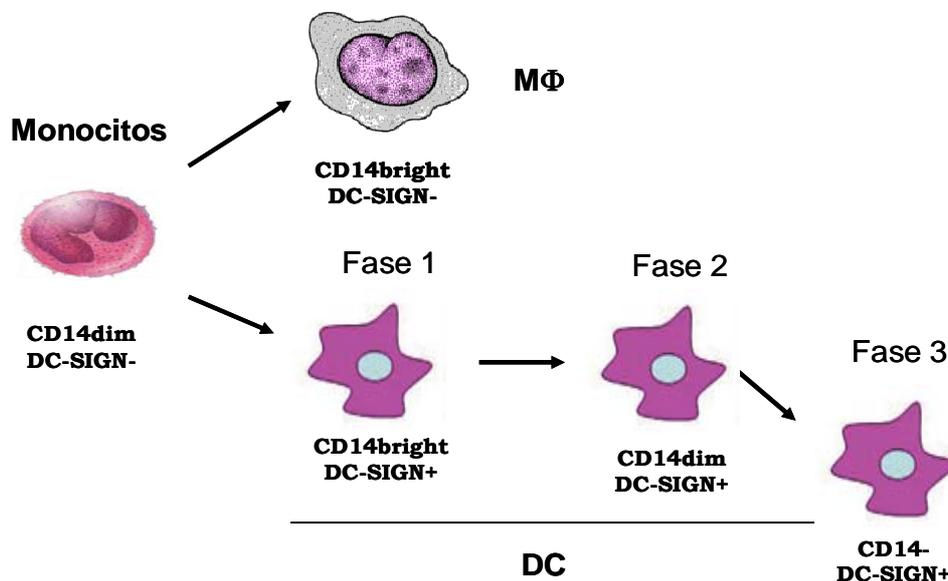


## DISCUSION

### **1. Las células dendríticas de primer trimestre de embarazo son células mieloides en distinto grado de madurez.**

El DC-SIGN es un marcador característico de las iDC que se encuentra altamente expresado por las DC derivadas de monocitos [Figdor et al, 2002; Geijtenbeek et al, 2000]. Según algunos autores, el DC-SIGN es un marcador que también es expresado por los macrófagos [Soilleux et al., 2002], ahora bien, el fundamento para esta afirmación, se basa en la detección de este marcador en células redondeadas, sin morfología dendrítica, que expresan marcadores macrofágicos como el CD14 y el CD68. Sin embargo, estos marcadores y la morfología redondeada también son expresados por las DC, por lo que otros autores proponen que las células DC-SIGN<sup>+</sup>, mas que macrófagos, serían realmente precursores de las DC [Engering et al, 2002; Dietl et al, 2007]. Teniendo en cuenta esta posibilidad, y en función de nuestros datos en los que se han analizado las poblaciones de la decidua en base a la expresión de DC-SIGN y CD14 (Fig.11), vemos que existe una población CD14<sup>Dim</sup>DC-SIGN<sup>-</sup> (denominada fase 0), que podría corresponder a monocitos con la posibilidad de seguir dos caminos distintos de diferenciación. La primera vía daría lugar a una población CD14<sup>Brigh</sup>DC-SIGN<sup>-</sup> característica de los macrófagos y la segunda daría lugar a

poblaciones sucesivas de dDC inmaduras en progresivas etapas de madurez: CD14<sup>Bright</sup>DC-SIGN<sup>+</sup> (denominada fase 1), que muchos autores confunden con macrófagos, pero que probablemente se trata de DC en mayor grado de inmadurez; células CD14<sup>Dim</sup>DC-SIGN<sup>+</sup> (denominada fase 2), de madurez intermedia, y células CD14<sup>-</sup>DC-SIGN<sup>+</sup> (denominada fase 3), con un mayor grado de madurez, aunque no de madurez completa ya que todas estas fases de diferenciación estarían dentro de la etapa inicial de iDC, sin haber concluido la diferenciación completa a DC totalmente madura. Se trata, pues, de las diferentes poblaciones que aparecen cuando se produce la diferenciación de monocitos hacia macrófagos o hacia DC (Fig.43), aunque las células DC-SIGN<sup>+</sup> estarían relacionadas con el linaje de las DC [Dietl et al, 2007].



**Figura 43:** Diferentes poblaciones que aparecen cuando se produce la diferenciación de los monocitos hacia macrófagos o células dendríticas.

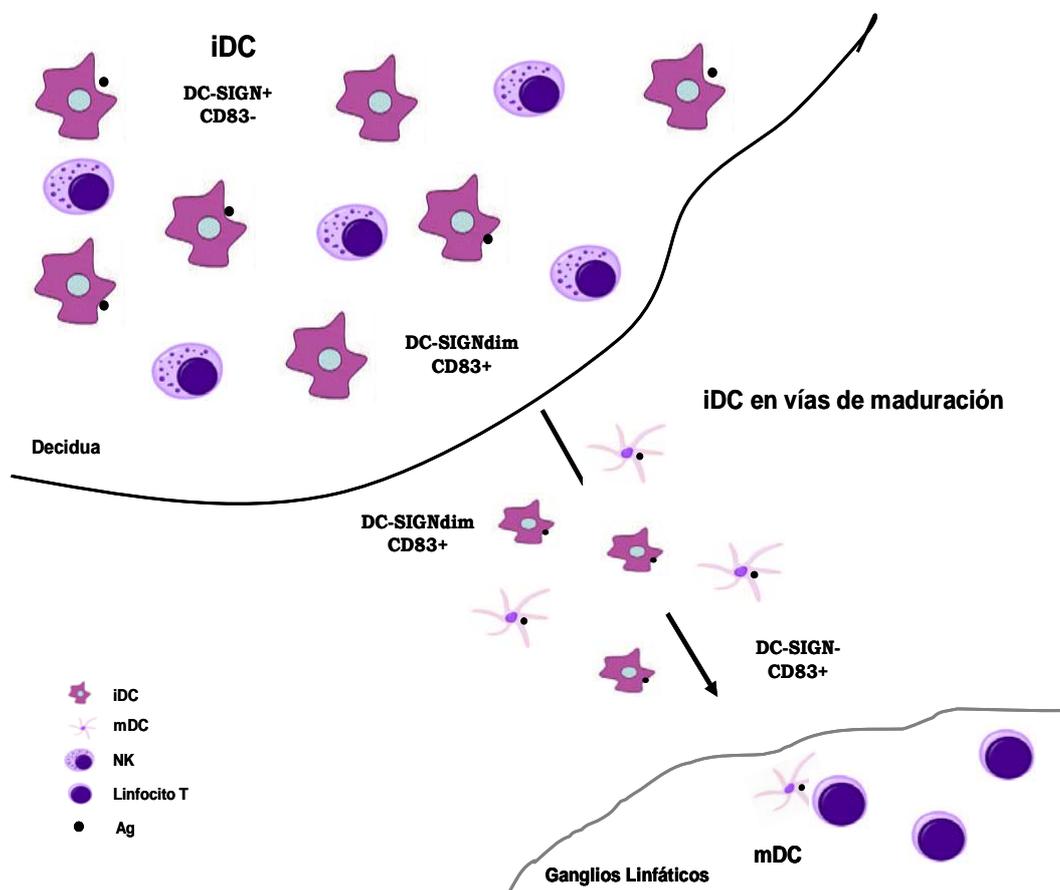
El origen mieloide también se ha podido observar mediante el estudio de los antígenos CD11c y CD1c por las células DC\_SIGN+. En base a la expresión de CD11c, nuestros datos confirman, a pesar de la baja expresión del CD1c (tabla 3), que las iDC estudiadas son de origen mieloide. Ahora bien, a pesar del origen mieloide que se ha establecido, hemos podido evidenciar la existencia de una población DC-SIGN+ que también expresa el antígeno CD123 (tabla 3). Este antígeno ha sido normalmente considerado como un marcador de DC de origen linfoide [Schmitt et al, 2007]. Sin embargo, esta co-expresión también podría ser indicativo de un origen mieloide ya que se ha podido ver que los monocitos expresan CD123 [Shortman et al, 2002]. Teniendo en cuenta que las dDC son células derivadas de monocitos, no es ilógico pensar que estas iDC, con un alto grado de inmadurez, podrían inicialmente expresar CD123 (tabla 3).

Las dDC, aunque en distintas etapas de madurez, se encuentran predominantemente en un estado inmaduro como se ha podido comprobar mediante el estudio fenotípico, fundamentalmente por la baja expresión del marcador de madurez CD83 [Troy et al, 1998; McLellan et al, 1998; Ivanova et al, 2005] (Fig. 6) y la elevada capacidad fagocítica (Fig. 13). Ahora bien, a pesar de su fenotipo inmaduro, se ha podido observar que dichas células expresan marcadores que son característicos de las APC y asociados a un fenotipo más maduro de las DC, como son CD25, CD40, CD80 y CD86 (Fig.6), mientras que otros marcadores de

madurez como HLA-DR y el citado CD83 se encuentran solo débilmente expresados (Fig. 6). Estos datos aparentemente paradójicos, expresión de marcadores de madurez e inmadurez, confirman lo propuesto anteriormente, la presencia de DC en la decidua en distintas fases de maduración (Fig. 43).

Los resultados de Kämmerer y col., [2000], coinciden con los nuestros. Estos autores encuentran en decidua humana de primer trimestre DC mieloides inmaduras y solo una pequeña proporción de DC maduras CD83+, no obstante consiguen diferenciar in vitro las formas de DC inmadura a las DC maduras CD83+. Este proceso de diferenciación parece desarrollarse, al menos en parte, en la decidua, pues además de las subpoblaciones que comentamos más arriba y que podían suponer distintas etapas de diferenciación desde el monocito a las DC inmadura (Fig.11), la presencia de una pequeña proporción de células DC-SIGN+ con una débil expresión de CD83 (Fig. 7), confirma in vivo los resultados de Kämmerer y col., [2000]. Aunque probablemente la maduración total de las DC se consigue en los ganglios locales, es probable que esas células DC-SIGN+CD83+ representen la última etapa de maduración de las dDC en la decidua antes de ir hacia el ganglio. También coinciden nuestros resultados con los de Kämmerer y col., [2003] en la distribución perivascular de las células DC-SING+ identificadas mediante inmunohistoquímica (Fig. 5b).

En función de todos estos resultados, podríamos suponer que las dDC inmaduras llegadas a la decidua por vía sanguínea, una vez captan en Ag, comenzarían a migrar hacia los nódulos linfáticos, donde como mDC darían lugar a la presentación del Ag a los linfocitos T. Por tanto, podríamos decir que las iDC deciduales se encuentran en distintas etapas de diferenciación hacia mDC (Fig. 44).



**Figura 44:** Proceso de captación, migración/maduración y presentación de antígenos por las células dendríticas

## **2. Presencia de otros tipos celulares en la ventana electrónica en la que se han analizado las células dendríticas.**

Mediante estudio fenotípico de las dDC en su ventana electrónica característica, hemos podido ver la existencia de una elevada expresión de CD15 (tabla 3). Parte de dicha expresión corresponde a las células DC-SIGN+, población CD15+DC-SIGN+, ahora bien, como podemos ver en la figura 12, existe una elevada proporción de células CD15+DC-SIGN-. Esta población no corresponde a una población de iDC, sino que son neutrófilos, ya que la ventana característica de los neutrófilos coincide con la de las dDC.

Aparte de neutrófilos, también se han detectado células CD56+ en la ventana electrónica de las DC. El CD56 es el marcador característico de las NK, y no es expresado por las DC, lo que sugiere la existencia de estas células NK, que son los leucocitos más abundantes de la decidua de primer trimestre, en una ventana que no es la ventana característica de los linfocitos. Este resultado nos hizo pensar en la existencia de complejos de células NK con las dDC, tal y como se ha descrito por Kämmerer y col., [2002].

### **3. Las células dendríticas deciduales forman complejos con las NK**

Los resultados publicados por Kämmerer y col., con anterioridad [2002], demostraban mediante inmunohistoquímica la existencia de complejos formados por las DC y las NK. Nosotros hemos podido confirmar estos resultados, no solo por inmunohistoquímica (Fig. 26), sino también por citometría de flujo (Fig. 8). No obstante, mediante esta última técnica, más sensible que la inmunohistoquímica, observamos claramente la presencia de células “doblemente marcadas DC-SIGN/CD56”, pero la citometría no nos permitió discriminar si se trataban de complejos formados por ambos tipos celulares o si eran las propias células dendríticas las que expresan CD56. La microscopía confocal permitió observar claramente la formación complejos, ya sugeridos por la inmunohistoquímica, entre células dendríticas DC-SIGN+ y células NK CD56+ (Fig. 27).

### **4. Las células NK inducen apoptosis a las células dendríticas deciduales**

En los complejos DC-NK observados mediante microscopía, algunas de las DC mostraban una clara morfología apoptótica de “células en ebullición”, lo que podía sugerir, en principio, que las células NK

estaban induciendo apoptosis en las DC, de forma equivalente a la inducción de apoptosis por estas células NK en trofoblasto [Olivares et al, 2002]. Para confirmar esta hipótesis se aplicaron distintas tecnologías de determinación de apoptosis.

La apoptosis fue estudiada mediante citometría de flujo, como se ha mencionado en el apartado de resultados, con Anexina-V (apoptosis temprana) y con la técnica del TUNEL (apoptosis tardía). Los complejos formados por las iDC y las dNK no son discriminados mediante citometría de flujo, por lo que la apoptosis observada tanto en las iDC (Fig. 29, Anexina, y 32, TUNEL) como en las dNK (Fig. 30, Anexina-V, y 33, TUNEL), estudiadas en la ventana electrónica característica de las células dendríticas, nos planteaba la duda de cual de los dos tipos celulares se encontraba realmente en apoptosis. Al estudiar la apoptosis de las células CD56+ en su ventana electrónica correspondiente (linfocitos), observamos que estas células no presentaban apoptosis (Fig. 31, Anexina-V; Fig. 33d, TUNEL). Según este dato, podemos decir que las dNK en apoptosis serían las que se encuentran formando complejos con, con las dDC.

El estudio del TUNEL mediante inmunofluorescencia en cortes de decidua muestra una distribución perivascular de las células positivas (Fig. 35), lo que sugiere que se trata de células iDC y no las NK la que

se encuentran en apoptosis, ya que esta distribución es característica de las DC (Fig. 5b). Estudios de doble marcaje DC-SIGN/TUNEL mediante inmunohistoquímica han confirmado que son estas células las que se encuentran en apoptosis (Fig. 37). La posterior purificación de las células DC-SIGN+ mediante *sorter*, purificación mediante la cual los complejos fueron eliminados, y columnas, nos permitió ver tanto por TUNEL (Fig. 36, Fig. 38) como por DAPI (Fig. 39), respectivamente, que eran las iDC las que se encontraban en apoptosis. Este dato es apoyado por King y col., [2000] que han podido observar que las células NK expresan Bcl-2, un factor antiapoptótico que protegería a las NK de la apoptosis [King et al, 2002]. Es muy probable, por tanto, que las NK se unan a las iDC para inducirle apoptosis, de forma equivalente a esta actividad de las dNK sobre el trofoblasto [Olivares et al, 2002, Minas et al, 2007]. Por otra parte, se ha demostrado en otros sistemas que las NK inducen citotoxicidad sobre iDC, en un proceso de edición de estas células. En la decidua, las NK “editarían” o regularían el proceso de maduración de las DC inmaduras impidiendo su desarrollo a células DC maduras y su emigración a los ganglios linfáticos locales para actuar como APC.

Se ha podido observar mediante estudio de Fas y FasL (tabla 2), la expresión de dichos marcadores en la ventana electrónica característica de las DC. La expresión de Fas en la ventana de las DC estaría indicando la existencia de células susceptibles a la apoptosis en dicha ventana, las

cuales podrían ser las DC. Esta idea se confirma en el fenotipo doble de Fas y FasL para las iDC DC-SIGN<sup>+</sup> en su ventana electrónica característica (Fig. 9), donde observamos la existencia de DC que expresan Fas y FasL (podría ser que las que expresan FasL fueran las NK que forman complejos).

También se ha podido ver la expresión del receptor ILT2 por parte de las DC (Fig. 10). La existencia de una población DC-SIGN<sup>+</sup>ILT2<sup>+</sup> ha sido previamente descrita por Ju y col., [2004], aunque aún no había sido observada en decidua. Esta expresión podría deberse también a la presencia de los inmunocomplejos, puesto que este es un receptor característicos de células NK. No obstante en el estudio de marcaje doble se observó que es mayor el porcentaje de células DC-SIGN<sup>+</sup>ILT2<sup>+</sup> que de complejos DC-SIGN<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, lo que demuestra la presencia real de esta población en la decidua. Esto podría ser indicativo de que el ILT2 de las iDC, se uniese al HLA-G del trofoblásto o de otros tipos celulares como las DSC [Blanco et al., 2007], dando lugar a una inhibición de la maduración o de la fagocitosis de las DC.

Existen por tanto distintos mecanismos de control de las dDC: edición por las NK, control a través de receptores inhibidores que controlan las funciones y maduración de las dDC. Estos mecanismos podrían ser relevantes en la tolerancia materno-fetal.

## **5. En el aborto espontáneo desciende la proporción de células dendríticas**

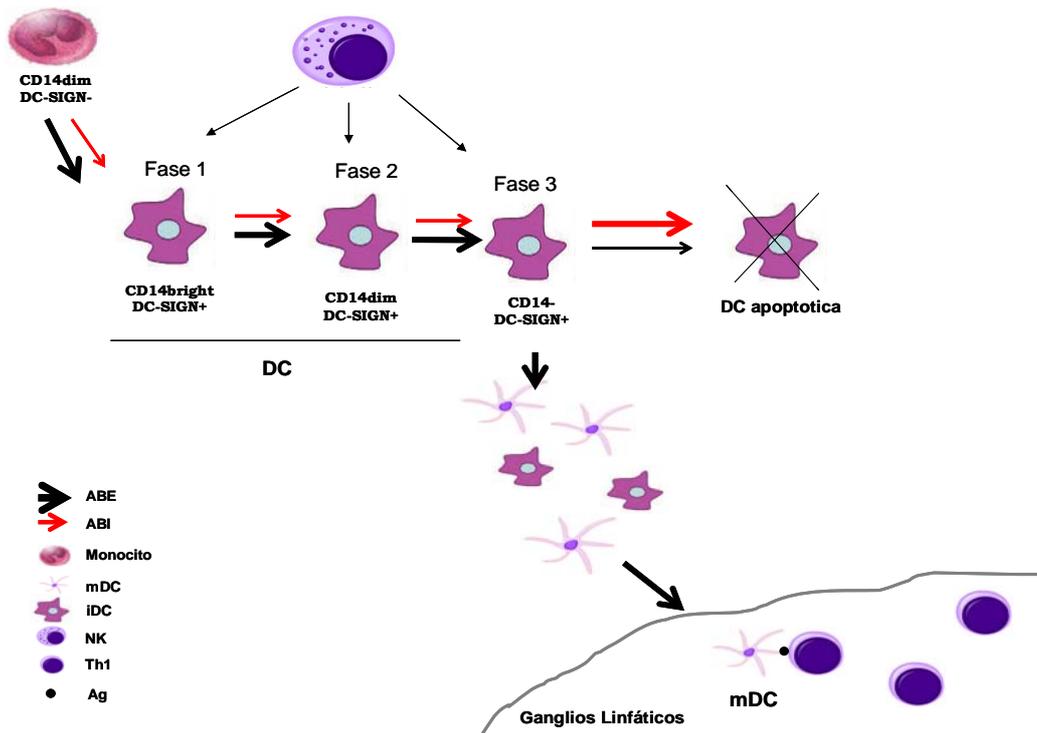
Al detectar DC inmaduras en la decidua normal, pensamos que en el ABE se detectarían DC maduras CD83+ que inducirían una respuesta inmunitaria frente al trofoblasto. Mediante estudio fenotípico hemos podido observar que frente a lo esperado inicialmente, las DC de ABE presentaron un fenotipo equivalente a las DC de ABI: DC inmaduras en distintas etapas de diferenciación. La única diferencia detectada fue la proporción de estas células, siendo superior en ABI respecto al ABE (tabla 6; Fig. 19). Ahora bien, el estudio realizado se ha basado en porcentajes de poblaciones, por lo que teniendo en cuenta que en la ventana electrónica característica de las DC, hemos observado la existencia de neutrófilos y células NK, tenemos que preguntarnos si ha habido un descenso real de la población de células DC-SIGN+ o, si lo que ha ocurrido es que se ha producido un aumento de las poblaciones de neutrófilos o NK situadas en la ventana de las DC. El hecho de no observar una diferencia significativa en las proporciones de neutrófilos CD15+DC-SIGN- (Fig. 22) en ABI con respecto ABE, podría ser un indicativo de un descenso real de las células DC-SIGN+ en ABE en comparación con las existentes en las ABI; descenso que como se observa en la figura 19, es paralelo al descenso de las células CD56+, células que como hemos comentado anteriormente forman complejos con

las células dendríticas. También se ha observado descensos en las proporciones de células que expresan antígenos asociados a DC: CD86, CD83, CD80, CD40, CD25, CD11c (Fig. 20). Todos estos resultados confirman que en el ABE se ha producido un descenso real de DC, sobre todo de las formas más maduras, que son las que expresan algunos de estos antígenos (CD25, CD40, CD80, CD83 y CD86).

No obstante, se observó que existía una población de DC, CD14+DC-SIGN+, cuyas proporciones eran superiores en el ABE con respecto al ABI (Fig. 21). Esta población, incluiría las poblaciones CD14<sup>Brigh</sup>DC-SIGN+ (fase 1) con menor grado de madurez, y la población CD14<sup>Dim</sup>DC-SIGN+ (fase 2) que se encontraría en un estado intermedio de maduración. En conclusión, en el aborto espontáneo descienden las iDC más maduras y se incrementan las más inmaduras. Teniendo en cuenta la hipótesis desarrollada por nosotros sobre la base inmunológica del aborto espontáneo [Olivares et al, 2002], en esta circunstancia se produce un estado de inmunoactivación donde existe un predominio de Th1. Puesto que las DC mieloides parecen estar implicadas en la estimulación de las Th1 [Rissoan et al, 1999], existe la posibilidad de que las DC de la decidua, tras las primeras etapas de madurez en la decidua, emigren a los ganglios locales para activar las células Th1. Este fenómeno estaría bloqueado en el embarazo normal porque las NK bloquean la diferenciación de las DC induciéndole apoptosis. Estas DC

apoptóticas quedarían en la decidua y de ahí su mayor proporción en ABI. En el aborto espontáneo, las iDC más maduras (fase 3) escaparían de las NK hacia los ganglios linfáticos locales para estimular a las Th1, produciéndose un descenso de las iDC más maduras en la decidua, pero quedando las más inmaduras (CD14+DC-SIGN+), que incluso pueden incrementarse por la diferenciación desde los monocitos (CD14+DC-SIGN-) para compensar el descenso de las DC más maduras (CD14-DC-SIGN+). En el ABE habría una menor actividad citotóxica de las NK sobre las DC, lo que les permitiría escapar (Fig. 46). Aunque nuestros datos no son estadísticamente significativos, si hemos podido observar una menor proporción de DC en apoptosis en ABE que en ABI. Probablemente la actividad citotóxica de las NK, que en el ABE está incrementada, se dirija hacia el trofoblasto [Olivares et al., 2002, Ju et al, 2007].

La mayor expresión de Fas en ABI (Fig. 19), podría coincidir con la hipótesis de que las DC de ABI son más susceptibles a la apoptosis. Esta idea se confirma en el fenotipo doble de Fas y FasL para las iDC DC-SIGN+ en su ventana electrónica característica (Fig. 20), donde observamos una clara diferencia entre las DC que expresan Fas y FasL en ABI que ABE (podría ser que las que expresan FasL fueran las NK que forman complejos).



**Figura 46:** Representación de la posible repoblación de las subpoblaciones CD14/DC-SIGN en decidua normal y de aborto espontáneo.

También se ha podido ver la expresión del receptor ILT2 por parte de las DC (Fig. 20). La mayor proporción de DC que expresan ILT2 en ABI respecto al ABE, podría ser indicativo de un fenómeno adicional de inhibición de las DC en la decidua normal. Este receptor en contacto con HLA-G del trofoblasto o de las DSC [Blanco et al., 2007] inhibiría las funciones de las DC o su proceso de diferenciación, mientras que las DC del ABE, al expresar menos ILT2, estarían menos inhibidas y progresaría

su diferenciación y su emigración a los ganglios linfáticos locales para activar a las células Th1.

## **6. Placenta**

Al estudiar la decidua de la placenta a término, hemos podido observar una mayor proporción de CD10+ en comparación con la decidua normal de primer trimestre y de aborto espontáneo (Fig. 24), lo que sería indicativo de una mayor contaminación por parte de las células DSC, células que se caracterizan por la expresión de este antígeno. La población correspondiente a los neutrófilos, CD15+, no varía significativamente.

En la placenta a término, en comparación con decidua normal de primer trimestre, hay una baja proporción de DC-SIGN+, lo que se puede observar también con los antígenos CD25 y CD40, marcadores de maduración. También hay una menor población de CD56 aunque esta diferencia no es significativa (Fig. 24). Esto puede ser indicativo de una disminución de complejos DC/NK en decidua a término. De hecho, nuestro grupo ha observado una menor proporción de células NK CD56+ en decidua a término (~30%), que en decidua de primer trimestre (~70%) [[Abadía-Molina et al, 1996](#), [Olivares et al, 2002](#)].

No obstante, se ha podido ver que en decidua a término existe un aumento de la población CD14+DC-SIGN+ (Fig. 25), que incluyen a las fases más inmaduras de las dDC: CD14<sup>bright</sup>DC-SIGN+ (fase 1) y CD14<sup>dim</sup>DC-SIGN+ (fase 2), respecto a las poblaciones encontradas en ABI. Paradójicamente la población DC más madura CD14-DC-SIGN+ (fase 3) es menor en placenta que en ABI (Fig. 25). El descenso de las formas más maduras de dDC en la decidua a término viene apoyado por la menor expresión de CD25 y CD40, marcadores de activación y maduración. Por tanto, en decidua a término ocurre igual que en el aborto espontáneo: hay un descenso de las DC más maduras y un incremento de la DC más inmaduras. Otro indicativo de inmadurez para las células DC-SIGN+ en la decidua a término, sería la expresión de CD123. Como podemos ver en la Figura 25, el CD123 presenta una mayor expresión en placenta. Teniendo en cuenta que el CD123 es un antígeno que se expresa en monocitos (CD14<sup>dim</sup>DC-SIGN-) [Shortman et al, 2002], es probable que también lo haga en las DC en las primeras fases de madurez. Podríamos pensar que el aumento de las poblaciones en fase 1 y fase 2 (procedentes de la diferenciación de monocitos) se produciría para dar lugar a una “re población” de las dDC en fase 3, que se encontrarían en menor porcentaje.

Al igual que lo comentado anteriormente en el aborto espontáneo, el descenso de células DC más maduras en la decidua a término podría

suponer una emigración de estas células a los ganglios locales para iniciar la activación de células T relacionadas con el desencadenamiento del parto [[Abadía-Molina et al., 1997](#)].



*CONCLUSIONES*



**CONCLUSIONES**

- 1) Las células dendríticas de primer trimestre de embarazo humano son células mieloides inmaduras en distinto grado de madurez.
- 2) En la decidua de aborto espontáneo existe el mismo tipo de células dendríticas que en la decidua normal, pero estas células se encuentran en menor proporción en el aborto espontáneo.
- 3) Las células dendríticas de decidua humana forman complejos con las células NK deciduales.
- 4) Una proporción de células dendríticas deciduales se encuentra en apoptosis. Este dato sugiere que las NK, con las que forman complejos, inducen la muerte de las DC. Este podría ser un mecanismo más de tolerancia materno-fetal, por el que las DC serían eliminadas para evitar que activaran a las Th1 implicadas en la inducción del aborto.



## *ABREVIATURAS*



**ABREVIATURAS COMUNMENTE UTILIZADAS**

**ABE:** Aborto espontáneo

**ABI:** Aborto inducido

**APC:** Antigen Presenting Cell

**CR:** Receptor del Complemento

**CTLA-4:** Antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico

**DAPI:** diclorhidrato 4',6-Diamidino-2-fenil indol

**DC:** Dendritic cell

**DC-SIGN:** Dendritic Cells Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin

**dNK:** Decidual Natural Killer

**dNK:** Decidual Natural Killer

**DSC:** Decidual Stromal Cell

**EVT:** Trofoblasto Extravellositario

**Fas:** Factor Apoptosis Signaling

**FasL:** Factor Apoptosis Signaling Ligand

**FLT3L:** Ligando de la Tirosin Kinasa 3 para FMS

**GM-CSF:** Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor

**HIV:** Human Immunodeficiency Virus

**HLA:** Human Leucocyte Antigen

**HSC:** Hematopoyetic Stem Cell

**IC:** Immuno Complejos

**ICAM:** Molécula de Adhesión Intercelular.

**iDC:** Células Dendríticas Inmaduras (Immature Dendritic Cells)

**IDO:** Indolamina 2,3-dioxigenasa

**IFN:** Interferon

**IL:** Interleuquina

**ILT:** Ig Like Transcript 2

**KIR:** Killer cell Ig-like Receptors

**LIF:** Leukaemia Inhibitory Factor

**LIR:** Leucocyte Ig-like Receptor

**M-CSF:** Macrophage Colony-Stimulating Factor

**mDC:** Células Dendríticas Maduras (Mature Dendritic Cells)

**MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad

**miDC:** Myeloid Dendritic Cells

**MR:** Receptores de Manosa (Manose Receptors)

**NK:** Natural Killer

**NKG:** Natural Killer

**pDC:** Plasmocytoid Dendritic Cells

**PMN:** Polimorfonucleares

**TARC:** Thymus and activation-regulated chemokine

**TCR:** Receptor células T

**TGF:** Transforming Growth Factor

**Th:** Linfocito T helper

**TLR:** Toll Like Receptor

**TNF:** Tumor Necrosis Factor

**TNFR:** Tumor Necrosis Factor Receptor

**TRAIL:** Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand

**TRAIL-R:** Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand  
Receptor

**Treg:** Célula T reguladora

**TUNEL:** Tdt-mediated dUTP nick end labelling

**uNK:** Uterine Natural Killer

**VCAM:** Vascular Cell Adhesion Molecule



*BIBLIOGRAFIA*



**BIBLIOGRAFIA**

- [1] Abadia-Molina AC, Ruiz C, King A, Loke Y.W. and Olivares EG. Lymphocytes of human term decidua decrease cell adhesion to a plastic substrate. Human Reproduction vol.12 no.11 pp.2393–2398, 1997
- [2] Abadía-Molina AC, Ruiz C, Montes MJ, King A, Loke YW, Olivares EG. Immune phenotype and cytotoxic activity of lymphocytes from human term decidua against trophoblast. J Reprod Immunol. 1996 Aug;31(1-2):109-23.
- [3] Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. Peripheral blood fibrocytes: Differentiation pathway and migration to wound sites. 2001, J Immunol 166:7556–7562.
- [4] Adams S, O'Neill DW, Bhardwaj N. Recent advances in dendritic cell biology. J Clin Immunol. 2005 Mar; 25(2):87-98.
- [5] Aggarwal BB. Human Cytokines. London: Blackwell Science; 1998.
- [6] Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. Immunol Lett. 2003 Jan 22;85(2):85-95
- [7] Aldebert D, Diallo M, Niang M, Sarr D, Cisse C, Moreau JC, Jambou R. Differences in circulating dendritic cell subtypes in peripheral, placental and cord blood in African pregnant women. J Reprod Immunol. 2007 Feb;73(1):11-9.
- [8] Anneke Engering, Sandra J. van Vliet, Teunis B. H. Geijtenbeek, and Yvette van Kooyk. Subset of DC-SIGN\_ dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. blood, 1 september 2002 \_ volume 100, number 5.
- [9] Ardavin C, Wu L, Li CL, Shortman K. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. Nature. 1993 Apr 22;362(6422):761-3

- [10] Ardavin C, Wu L, Li CL, Shortman K: Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus morphology. *Nature Immunol* 2:1144, 2001.
- [11] Ashkar A.A, Di Santo J.P & Croy B.A. Interferon  $\gamma$  contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J. Exp. Med*, 2000. 192, 259–270.
- [12] Ashkar A.A. & Croy B.A. Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy. *Semin. Immunol*, 2001. 13, 235–241.
- [13] Bajtay Z, Speth C, Erdei A, Dierich MP. Cutting edge: productive HIV-1 infection of dendritic cells via complement receptor type 3 (CR3, CD11b/CD18). *J Immunol* 2004;173:4775–8.
- [14] Baker JM, Bamford AI, Antezak DF. Modulation of allospecific CTL responses during pregnancy in equids: an immunological barrier to interspecies matings? *J Immunol* 1999; 162:4496–4501.
- [15] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245–52.
- [16] Bates EE, Fournier N, Garcia E, Valladeau J, Durand I, et al. APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J. Immunol.*1999, 163:1973–83.
- [17] Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 1995; 377:630–2.
- [18] Bendriss-Vermare, N., Barthelemy, C., Durand, I., Bruand, C., Dezutter-Dambuyant, C., Mouliau, N., Berrih-Aknin, S., Caux, C., Trinchieri, G., Briere, F. Human thymus contains IFN- $\alpha$ -producing CD11c(-), myeloid CD11c(±), and mature interdigitating dendritic cells. *J. Clin. Invest.*2001, 107, 835–844.

- [19] Blanco O, Tirado I, Munoz-Fernandez R, Abadia-Molina AC, Garcia-Pacheco JM, Pena J, Olivares EG. "Human decidual stromal cells express HLA-G Effects of cytokines and decidualization". *Hum Reprod.* 2007; Oct 18.
- [20] Bleijs DA, Geijtenbeek TBH, Figdor CG, van Kooyk Y. DC-SIGN and LFA-1: a battle for ligand. *Trends Immunol.* 2001, 22:457-63
- [21] Blois SM, Kammerer U, Soto CA, Tometten MC, Shaikly V, Barrientos G, Jurd R, Rukavina D, Thomson AW, Klapp BF, Fernández N, Arck PC. Dendritic cells: key to fetal tolerance?. *Biol Reprod.* 2007 Oct;77(4):590-8.
- [22] Blom B, Ho S, Antonenko S, Liu YJ: Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192:1785, 2000. *Blood.* 2003 Sep 1; 102(5):1569-77.
- [23] Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med.* 2002 Dec 16;196(12):1627-38
- [24] Bouma GJ, van Caubergh P, van Bree SP, Castelli-Visser RM, Witvliet MD, van der Meer-Prins EM, van Rood JJ, Claas FH. Pregnancy can induce priming of cytotoxic T lymphocytes specific for paternal HLA antigens that is associated with antibody formation. *Transplantation.* 1996 Sep 15;62(5):672-8
- [25] Briere, F., Bendriss-Vermare, N., Delale, T., Burg, S., Corbet, C., Rissoan, M. C., Chaperot, L., Plumas, J., Jacob, M. C., Trinchieri, G., et al. Origin and filiation of human plasmacytoid dendritic cells. *Hum. Immunol.* 2002, 63, 1081-1093.
- [26] Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. 1994, *Mol Med* 1:71-81.

- [27] Bulmer D, Peel S. An autoradiographic study of cellular proliferation in the uterus and placenta of the pregnant rat. *J Anat.* 1974 Apr; 117(Pt 2):433-41.
- [28] Bulmer JN, Longfellow M, Ritson A. Leukocytes and resident blood cells in endometrium. *Ann N Y Acad Sci.* 1991; 622:57-68. Review.
- [29] Bulmer JN, Lunny DP, Hagin SV. Immunohistochemical characterization of stromal leucocytes in nonpregnant human endometrium. *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 1988 Jul;17(3):83-90
- [30] Calatayud S, Vivier E, Bernaud J, Mérieux Y, Rigal D. Expression of a NK cell-restricted epitope on decidual large granular lymphocytes. *Int Immunol.* 1996 Oct;8(10):1637-42
- [31] Carosella ED, Rouas-Freiss N, Paul P, Dausset J. HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. *Immunol Today.* 1999; 20:60-62
- [32] Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M: Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* 1:305, 2000.
- [33] Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999;5:919-23.
- [34] Chang MD, Pollard JW, Khalili H, Goyert SM, Diamond B.. Mouse placental macrophages have a decreased ability to present antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993 Jan15; 90(2):462-6.
- [35] Chao KH, Wu MY, Chen CD, Yang JH, Yang YS, Ho HN. The expression of killer cell inhibitory receptors on natural killer cells and activation status of CD41 and CD81 T cells in the decidua of normal and abnormal early pregnancies. *Hum Immunol* 1999; 60:791-797.

- [36] Chaouat G, Cayol V, Mairovitz V, Dubanchet S. Localisation of the Th2 cytokines IL-3, IL-4, IL-10 at the foeto-maternal interface during human and murine pregnancy and lack of requirement for Fas-Fas ligand interaction for a successful allogeneic pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1999;42:1-13.
- [37] Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, Martal J. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol*. 2002 Jan;53(1-2):241-56. Review.
- [38] Chesney J, Bacher M, Bender A, Bucala R. The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. 1997, *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6307-6312
- [39] Chesney J, Metz C, Stavitsky AB, Bacher M, Bucala R. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. 1998, *J Immunol* 160:419-425.
- [40] Chumbly G, King A, Robertson K, Holmes N, Loke YW. Resistance of HLA-G and HLA-A2 transfectants to lysis by decidual NK cells. *Cell Immunol* 1994; 155: 312-322.
- [41] Clark DA, Arck PC, Chaouat G. Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. *Am J Reprod Immunol* 1999, 41:5-22.
- [42] Clarke RAF. Wound repair: overview and general considerations. In: Clarke RAF, editor. *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 1996. p. 3e50.
- [43] Colbern GT, Chiang MH, Main EK. Expression of the nonclassic histocompatibility antigen HLA-G by preeclamptic placenta. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 1244-1250.
- [44] Colonna M, Navarro F, Bellón T, Llano M, García P, Samaridis J, Angman L, Cella M, López-Botet M. A

- common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med.* 1997 Dec 1;186(11):1809-18.
- [45]** Colonna M, Samaridis J, Angman L. Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 2000, 30:697-704
- [46]** Constant SL and Bottomly K. Induction of TH1 and TH2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Ann Rev Immunol* 1997.15:297-322.
- [47]** Cooper, M.A., Fehniger, T.A. & Caligiuri, M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, 2001. 22, 633-640.
- [48]** Corinti, S., D. Medaglini, A. Cavani, M. Rescigno, G. Pozzi, P. Ricciardi Castagnoli, and G. Girolomoni. Human dendritic cells very efficiently present a heterologous antigen expressed on the surface of recombinant gram-positive bacteria to CD4+ T lymphocytes. *J. Immunol.* 1999, 163:3029-3036.
- [49]** Cosman D, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, Peterson L, Hsu ML. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity.* 1997 Aug;7(2):273-82.
- [50]** Coumans B, Thellin O Zorzi W Melot F Bougoussa M Melen L Zorzi D Hennen G Igout A Heinen E. Lymphoid cell apoptosis induced by trophoblastic cells: a model of active foeto-placental tolerance. *J Immunol Methods.* 1999; 224: 185-96.
- [51]** Dietl J, Hönig A, Kämmerer U and Rieger L. Natural Killer Cells and Dendritic Cells at the Human Feto-maternal Interface: an Effective Cooperation? *Placenta.* 2006, 27, 341-347
- [52]** Dosiou C, Lathi RB, Tulac S, Huang ST, Giudice LC. Interferon-related and other immune genes are downregulated in peripheral blood leukocytes in the luteal phase of the

- menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 May;89(5):2501-4.
- [53] Dosiou C, Ruth B. Lathi, Suzana Tulac, S.-T. Joseph Huang and Linda C. Giudice. Interferon-Related and Other Immune Genes Are Downregulated in Peripheral Blood Leukocytes in the Luteal Phase of the Menstrual Cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol. 89, No. 5 2501-2504
- [54] Drake, P.M. et al. Human placental cytotrophoblasts attract monocytes and CD56(bright) natural killer cells via the actions of monocyte inflammatory protein 1 $\alpha$ . *J. Exp. Med.* 2001. 193, 1199-1212.
- [55] Drickamer K C-type lectin-like domains. *Curr Opin Struct Biol.* 1999 Oct;9(5):585-90
- [56] Duffield JS. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci (Lond)* 2003;104(1):27e38.
- [57] Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *Immunol.* 2000; 165:6037-6046.
- [58] Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, et al. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J. Exp. Med.* 2001, 194:1823-34.
- [59] Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demaurex N, Lanzavecchia A, Fransen J, Figdor CG, Piguet V, van Kooyk Y. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol.* 2002 Mar 1;168(5):2118-26
- [60] Erdei A, Füst G, Gergely J. The role of C3 in the immune response. *Immunol Today* 1991;12:332-7.
- [61] Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW. et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003; 4:1206-12.

- [62] Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*. 2003 Apr 15;101(8):3052-7.
- [63] Ferenczy A, Guralnick M. Endometrial microstructure: structure-function relationships throughout the menstrual cycle. *Semin Reprod Endocrinol*. 1983, 1:205-212.
- [64] Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med*. 2002;195:343e51.
- [65] Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat. Rev. Immunol*. 2002, 2:77-84
- [66] Foo IT, Naylor IL, Timmons MJ, Trejdosiewicz LK. Intracellular actin as a marker for myofibroblasts in vitro. *Lab Invest*. 1992, 67:727-733.
- [67] Freeman GJ, Boussiotis VA, Anumanthan A, Bernstein GM, Ke XY, Rennert PD, Gray GS, Gribben JG, Nadler LM. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity*. 1995 May;2(5):523-32.
- [68] Fujii T, Ishitani A, Geraghty DE. A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol*. 1994; 153(12):5516e24.
- [69] Galy A, Travis M, Cen D, Chen B: Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity*. 1995 3:459.
- [70] García-Pacheco JM, Oliver C, Kimatrai M, Blanco FJ, Olivares EG. Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related to bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod*. 2001 Dec;7(12):1151-7.

- [71] Gardner L, Moffett A: Dendritic cells in the human decidua. *Biol Reprod.* 2003; 69:1438–1446.
- [72] Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Figdor CG, van Kooyk Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1 receptor present in placenta that infects T cells in trans—a review. *Placenta.* 2001 Apr;22 Suppl A:S19-23
- [73] Geijtenbeek TBH, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GCF, Adema GJ, et al. Identification of DCSIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell.* 2000, 100:575–85
- [74] Goldman-Wohl DS, Ariel I, Greenfield C et al. Lack of human leucocyte antigen-G expression in extravillous trophoblast is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6: 88–95.
- [75] Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(1):23e35.
- [76] Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 2002;111:927–30.
- [77] Grabbe S, Kampgen E, Schuler G. Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional. *Immunol Today.* 2000; 21:431-433.
- [78] Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med.* 2002; 195:1641–6.
- [79] Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science.*1995; 270: 1189-92.
- [80] Griffith TS, Ferguson TA. The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege. *Immunol Today.* 1997; 18:240–4.
- [81] Grohmann U, Orabona C, Fallarino F. et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol.* 2002; 3:1097–101.
- [82] Grouard, G., Rissoan, M.C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y.J. 1997. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3

- and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* 185:1101-1111
- [83]** Guimond, M.J. Luross JA, Wang B, Terhorst C, Danial S, Croy BA. Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. *Biol. Reprod.* 1997. 56, 169–179.
- [84]** Guller S, Lachapelle L. The role of placental Fas ligand in maintaining immune privilege at maternal–foetal interfaces. *Semin Reprod Endocrinol.* 1999; 17:39–44.
- [85]** Hancock WW, Sayegh MH, Zheng XG, Peach R, Linsley PS, Turka LA. Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 26;93 (24):13967-72.
- [86]** Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, Gazit R, Yutkin V, Benharroch D, Porgador A, Keshet E, Yagel S & Mandelboim O. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature medicine.* 2006, volumen 12, 9 september.
- [87]** Hanna J, Wald O, Goldman-Wohl D, Prus D, Markel G, Gazit R, Katz G, Haimov-Kochman R, Fujii N, Yagel S, Peled A, Mandelboim O. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells.
- [88]** Hao QL, Zhu J, Price MA, Payne KJ, Barsky LW, Crooks GM: Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. *Blood.* 2001; 97:3683.
- [89]** Hara N, Fujii T, Yamashita T, Kozuma S, Okai T, Taketani Y. Altered expression of human leukocyte antigen (HLA-G) on extravillous trophoblasts in preeclampsia: immunohistological demonstration with anti-HLA-G specific antibody ‘87G’ and anti-cytokeratin antibody ‘CAM5.2’. *Am J Reprod Immunol.* 1996; 36: 349–538.

- [90] Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*. 1997; 90(9):3245-3287.
- [91] Heikkinen J, Mottonen M, Alanen A, Lassila O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol*. 2004 May; 136(2):373-8.
- [92] Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000 Dec 7;408(6813):740-5
- [93] Hiby SE, King A, Sharkey A, and Loke YW. Molecular studies of trophoblast HLA-G: polymorphism, isoforms, imprinting and expression in pre-implantation embryo. *Tissue Antigens*. 1999; 53:1
- [94] Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy KM et al. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med*. 2004; 200: 957-965.
- [95] Hildreth JE, Orentas RJ. Involvement of a leukocyte adhesion receptor (LFA-1) in HIV-induced syncytium formation. *Science* 1989; 244:1075-8.
- [96] Hunt JS, Vassmer D, Ferguson TA, Miller L. Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. *J Immunol*. 1997; 158:4122-8.
- [97] Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. The apoptosis cascade — morphological and immunohistochemical methods for its visualisation. *Anat Embryol (Berl)*. 1999; 200:1-18.
- [98] Huppertz B, Frank HG, Kingdom JC, Reister F, Kaufmann P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol*. 1998; 110:495-508.
- [99] Huppertz B, Frank HG, Reister F, Kingdom J, Korr H, Kaufmann P. Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast:

- analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Lab Invest.* 1999; 79:1687-702.
- [100]** Imai K, Maeda M, Fujiwara H, Okamoto N, Kariya M, Emi N, Takakura K, Kanzaki H, Mori T. Human endometrial stromal cells and decidual cells express cluster of differentiation (CD) 13 antigen/aminopeptidase N and CD10 antigen/neutral endopeptidase. *Biol Reprod.* 1992; 46:328-334.
- [101]** Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J Exp Med.* 1990 Aug ;172(2):631-40
- [102]** Ishitani A, Geraghty DE. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89 (9):3947e51.
- [103]** Ito T, Inaba M, Inaba K, et al. A CD1a\_/CD11c\_subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol.* 1999; 163:1409-1419.
- [104]** Ivanova E, Kyurkchiev D, Altankova I, Dimitrov J, Binakova E, Kyurkchiev S. CD83 monocyte-derived dendritic cells are present in human decidua and progesterone induces their differentiation in vitro. *Am J Reprod Immunol.* 2005 Apr;53 (4):199-205.
- [105]** Iwasaki A, Kelsall BL. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J. Exp. Med.* 1999; 190:229-40.
- [106]** Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:197-216. Epub 2001 Oct 4
- [107]** Jiang SP, Vacchio MS. Multiple mechanisms of peripheral T cell tolerance to the fetal "allograft." *J Immunol* 1998; 160:3086-3090.
- [108]** Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC. The receptor DEC-

- 205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature*. 1995, 375:151–55.
- [109] JM, Leonard S, McBey BA & Croy BA. Induction of murine spiral artery modification by recombinant human interferon-gamma. *Placenta*. 2005, 26, 835–838.
- [110] Joachim R, Zenclussen AC, Polgar B, Douglas AJ, Fest S, Knackstedt M, Klapp BF, Arck PC. The progesterone derivative dydrogesterone abrogates murine stress-triggered abortion by inducing a Th2 biased local immune response. *Steroids*. 2003 Nov;68(10-13):931-40.
- [111] Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk A H. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol*. 2001, 22, 394–400.
- [112] Josien R, Heslan M, Soulillou J P, and Cuturi M C. Rat spleen dendritic cells express natural killer cell receptor protein 1 (NKR-P1) and have cytotoxic activity to select targets via a Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 1997; 186:467.
- [113] Ju XS, Hacker C, Scherer B, Redecke V, Berger T, Schuler G, Wagner H, Lipford GB, Zenke M. Immunoglobulin-like transcripts ILT2, ILT3 and ILT7 are expressed by human dendritic cells and down-regulated following activation. *Gene*. 2004 Apr 28;331:159-64
- [114] Kadowaki N. Dendritic cells: a conductor of T cell differentiation. *Allergol Int*. 2007 Sep;56(3):193-9.
- [115] Kadowaki, N., Antonenko, S., Yiu-Nam Lau, J., and Liu, Y.-J. 2000. Natural interferon  $\alpha$  / $\beta$ -producing cells link innate and adaptive immunity. *J. Exp. Med.* 192:219-226
- [116] Kamat B. R. and Isaacson P. G. The immunocytochemical distribution of leukocytic subpopulations in human endometrium. *Am J Pathol*. 1987 April; 127(1): 66–73.
- [117] Kämmerer U, Choppet M, McLellan AD, Kapp M, Huppertz HI, Kampgen E, Dietl J. Human deciduas

- contains potent immunostimulatory CD83+ dendritic cells. *Am J Pathol.* 2000;157:159-69.
- [118]** Kämmerer U, Eggert AO, Kapp M, McLellan AD, Geijtenbeek TB, Dietl J et al.: Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *Am J Pathol* 2003; 162:887–896.
- [119]** Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol.* 2003 Dec;3(12):984-93. Review.
- [120]** Keskin DB, Allan DS, Rybalov B, Andzelm MM, Stern JN, Kopcow HD, Koopman LA, Strominger JL. TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 7;104(9):3378-83. Epub 2007 Feb 20
- [121]** Keskin DB, Allan DS, Rybalov B, Andzelm MM, Stern JN, Kopcow HD, Koopman LA, Strominger JL. TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 27;104(9):3378-83.
- [122]** Kimatrai M, Oliver C, Abadia-Molina AC, Garcia-Pacheco JM, and Olivares EG. Contractile activity of human decidual stromal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2003; 88(2):844–849
- [123]** King A, Burrows T, Verma S, Hiby S, Loke YW. Human uterine lymphocytes. *Hum Reprod Update.* 1998 Sep-Oct;4(5):480-5
- [124]** King A, Gardner L, Loke YW. Co-stimulation of human decidual natural killer cells by interleukin-2 and stromal cells. *Hum Reprod.* 1999 Mar; 14(3):656-63.
- [125]** King A, Loke YW. On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. *Immunol. Today.* 1991 ec; 12(12):432-5. Review.
- [126]** Kishimoto T, Goyert S, Kikutani H, Mason D, Miyasaka M, Moretta L, Ohno T, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamura K, Sugawara H, von dem Borne AE, Zola H. CD

- antigens 1996. *Blood*. 1997 May 15;89(10):3502
- [127] Knofler M, Mosl B, Bauer S, Griesinger G, Husslein P. TNF-alpha/ TNFRI in primary and immortalized first trimester cytotrophoblast. *Placenta* 2000; 21:525-535.
- [128] Kolb-Mäurer A, Gentschev I, Fries H W, Fiedler F, Bröcker E B, Kämpgen E, and Goebel W. Listeria monocytogenes-infected human dendritic cells: uptake and host cell response. *Infect. Immun.* 2000, 68:3680-3688.
- [129] Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med*. 2003 Oct 20;198(8):1201-12
- [130] Krebhiel RH. Cytochemical studies of the deciduas reaction in the rat during early pregnancy and in the production of deciduomata. *Physiol.Zool.*1937 10,212-223.
- [131] Krishnan L, Guilbert LJ, Wegmann TG, Belosevic M, Mosmann TR. T helper 1 response against *Leishmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF and reduced IL-10 production by placental cells. *J Immunol*. 1996 Jan 15;156(2):653-62.
- [132] Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol*. 2001 Oct;31(10):3026-37.
- [133] Lagadari M, Blois S, Margni R, Miranda S..Analysis of macrophage presence in murine placenta: influence of age and parity status.

- Am J Reprod Immunol. 2004 Jan;51(1):49-55.
- [134]** Laskarin G, Kämmerer U, Rukavina D, Thomson AW, Fernandez N, Blois SM. Antigen-Presenting Cells and Materno-Fetal Tolerance: An Emerging Role for Dendritic Cells. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2007; 58; 255-267
- [135]** Lee R, Silver R. Recurrent pregnancy loss: Summary and clinical recommendations. *Semin Reprod Med*. 2000; 18:433-40.
- [136]** Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol*. 1975 Jan;78(1):71-100.
- [137]** Leonard, S. Murrant C, Tayade C, van den Heuvel M, Watering R, Croy BA. Mechanisms regulating immune cell contributions to spiral artery modification – facts and hypotheses – a review. *Placenta* 27 (Suppl. 1), 2006, 40–46.
- [138]** Letarte M, Vera S, Tran R, Addis JB, Onizuka RJ, Quackenbush EJ, Jongeneel CV, McInnes RR. Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med*. 1988 Oct 1; 168(4):1247-53.
- [139]** Leverrier Y, Lorenzi R, Blundell MP, Brickell P, Kinnon C, Ridley AJ, Thrasher AJ. Cutting edge: the Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for efficient phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol*. 2001 Apr 15; 166(8):4831-4.
- [140]** Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol*. 1993 Nov 1;151(9):4562-73
- [141]** Loke Y, King A. Human implantation: cell biology and immunology. Cambridge: Cambridge University Press. 1995.p.18-41.
- [142]** Loke YW, King A. Immunological aspects of human implantation. *J Reprod Fertil Suppl*. 2000; 55:83-90. Review.
- [143]** Ludewig B, Graf D, Gelderblom HR, Becker Y, Kroczeck RA, Pauli G.

- Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur J Immunol.* 1995 Jul; 25(7):1943-50.
- [144]** Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol Today* 1995; 16:569-74. *Lab Invest.* 1999; 79:1687-702.
- [145]** Lysiak JJ, Lala PK. In situ localization and characterization of bone marrow derived cells in the decidua of normal murine pregnancy. *Biol Reprod.* 1992; 47:603-613
- [146]** Macardle PJ, Chen Z, Shih CY, et al. Characterization of human leucocytes bearing the IL-3 receptor. *Cell Immunol.* 1996; 168(1):59-68.(Biology).
- [147]** Madden DR. The three-dimensional structure of peptide MHC complexes. *Annu Rev Immunol.* 1995; 13:587-622
- [148]** Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, et al. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J. Cell Biol.* 2000, 151:673-84.
- [149]** Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk A H, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.* 2002, 80, 477-483.
- [150]** Malanga D, Barba P, Harris PE, Maffei A, Del Pozzo G. The active translation of MHCII mRNA during dendritic cells maturation supplies new molecules to the cell surface pool. *Cell Immunol.* 2007 Apr;246(2):75-80. Epub 2007 Jul 27
- [151]** Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K: Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood.* 2001; 97:3333.
- [152]** Margni RA, Zenclussen AC. During pregnancy, in the context of a Th2-type cytokine profile, serum IL-6

- levels might condition the quality of the synthesized antibodies. *Am J Reprod Immunol.* 2001 Sep;46(3):181-7. Review.
- [153] Marquez C, Trigueros C, Franco JM, Ramiro AR, Carrasco YR, Lopez-Botet M, Toribio ML: Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells. *Blood.* 1998; 91:2760.
- [154] Martin P, Del Hoyo G M, Anjuere F, Arias C F, Vargas H H, Fernandez L, Parrillas V, Ardavin C. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha<sub>B220</sub> dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood.* 2002, 100, 383–390.
- [155] Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 1995 Nov 1;182(5):1545-56.
- [156] Marzi M, Viganò A, Trabattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, Clerici M. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1996; 106:127–133.
- [157] McLellan AD, Heiser A, Sorg RV, Fearnley DB, Hart DNJ: Dermal dendritic cells associated with T lymphocytes in normal human skin display an activated phenotype. *J Invest Dermatol.* 1998, 111:841-849
- [158] Mellor AL, Baban B, Chandler P, Marshall B, Jhaver K, Hansen A, Koni PA, Iwashima M, Munn DH. Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J Immunol.* 2003 Aug 15;171(4):1652-5.
- [159] Melnick D A, Meshulam T, Manto A, and Malech H L. Activation of human neutrophils by monoclonal antibody PMN7C3: cell movement and adhesion can be triggered

- independently from the respiratory burst. *Blood*. 1986; 67, 1388-1394
- [160] Melnick D A, Nauseef W M, Markowitz S D, Gardner J P, and Malech H L. Biochemical analysis and subcellular localization of a neutrophil-specific antigen, PMN-7, involved in the respiratory burst. *J. Immunol*. 1985; 134, 3346-3355
- [161] Minas V, Jeschke U, Kalantaridou SN, Richter DU, Reimer T, Mylonas I, Friese K, Makrigiannakis A. Abortion is associated with increased expression of FasL in decidual leukocytes and apoptosis of extravillous trophoblasts: a role for CRH and urocortin. *Mol Hum Reprod*. 2007 Sep;13(9):663-73.
- [162] Miyazaki S, Tsuda H, Sakai M, Hori S, Sasaki Y, Futatani T, Miyawaki T and Saito S. Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. *J Leukoc Biol*. 2003; 74: 514-22.
- [163] Mofett A, Loke YW. The immunological paradox of pregnancy: a reappraisal. *Placenta* 2004; 25: 1-8.
- [164] Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*. 2002 Sep;2(9):656-63. Review. Erratum in: *Nat Rev Immunol* 2002 Dec;2(12):975.
- [165] Montes MJ, Aleman P, Tortosa CG, Borja C, Ruiz C, Olivares EG. Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with hematopoietic cells. *J Reprod Immunol* 1996; 30:53-66.
- [166] Montes MJ, Tortosa CG, Borja C, Abadía AC, González-Gómez F, Ruiz C, Olivares EG. Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am J Reprod Immunol*. 1995 Sep; 34(3):188-94.
- [167] Mor G, Abrahams VM. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003 Dec 2;1:119. Review.
- [168] Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2

- development. *Nat Immunol* 2000;1:199-205 .
- [169] Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73.
- [170] Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998; 281:1191-1193.
- [171] Murakoshi H, Matsuo H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T and Maruo T. Expression of Fas/Fas-ligand, Bcl-2 protein and apoptosis in extravillous trophoblast along invasion to the decidua in human term placenta. *Endocr J.*2003; 50: 199-207.
- [172] Nagata S. Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. *Adv Immunol.* 1994; 57:129-44.
- [173] Nagl M, Kacani L, Mu"llauer B, Lemberger E M, Stoiber H, Sprinzl G M, Schennach H, and Dierich M P. Phagocytosis and Killing of Bacteria by Professional Phagocytes and Dendritic Cells *Clinical and diagnostic laboratory immunology.* *Adv Immunol.* 2002; 9 (6): 1071-1082.
- [174] Nagler-Anderson C, Terhoust C, Bhan AK, Podolsky DK. Mucosal antigen presentation and the control of tolerance and immunity. *Trends Immunol.* 2001 Mar;22(3):120-2.
- [175] Nakayama F, Nishihara S, Iwasaki H, Kudo T, Okubo R, Kaneko M, Nakamura M, Karube M, Sasaki K and Narimatsu H. CD15 expression in mature granulocytes is determined by a1,3-fucosyltransferase IX, but in promyelocytes and monocytes by a1,3-fucosyltransferase IV. *J. Biol. Chem.*2001, 276, 16100-16106.
- [176] Nayamoto NS, El Sukkari D, Villadangos JA. Dendritic cells constitutively present self-antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. *Blood,* 2004, 103, 2187-2195.
- [177] O'Brien M, Dausset J, Carosella ED, Moreau P. Analysis of the role of

- HLA-G in preeclampsia. *Hum Immunol.* 2000; 61: 1126–1131.
- [178] O'Doherty U, Peng M, Gezelter S *et al.* Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994;82:487-493.
- [179] Olivares EG, Montes MJ, Oliver C, Galindo JA, Ruiz C. Cultured human decidual stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. *Biol Reprod.* 1997; 57(3):609-15.
- [180] Olivares EG, Muñoz R, Tejerizo G, Montes MJ, Gómez-Molina F, Abadía-Molina AC. Decidual lymphocytes of human spontaneous abortions induce apoptosis but not necrosis in JEG-3 extravillous trophoblast cells. *Biol Reprod.* 2002 Oct;67(4):1211-7
- [181] Oliver C, Cowdrey C, Abadía-Molina AC, Olivares EG. Antigen phenotype of cultured decidual stromal cells of human term decidua. *J Reprod Immunol.* 1999; 45:19–30
- [182] Oliver C, Montes MJ, Galindo JA, Ruiz C, Olivares EG. Human decidual stromal cells express-smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum Reprod.* 1999; 14:1599–1605
- [183] Olweus, J., BitMansour, A., Warnke, R., Thompson, P.A., Carballido, J., Picker, L.J., and Lund-Johansen, F. 1997. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:12551-12556
- [184] Payne SG, Smith SC, Davidge ST, Baker PN, Guilbert LJ. Death receptor Fas/Apo-1/CD95 expressed by human placental cytotrophoblasts does not mediate apoptosis. *Biol Reprod.* 1999 May;60(5):1144-50.
- [185] Pedagogos E, Hewitson TD, Walker RG, Nicholis KM, Becker GJ. Myofibroblast involvement in chronic transplant rejection. *Transplantation.* 1997; 64:1192–1197.
- [186] Penna G, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid

- dendritic cells. *Hum Immunol.* 2002 Dec;63(12):1164-71
- [187] Piccinni MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani G. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med* 1998; 4:1020–1024.
- [188] Piccinni MP, Scaletti C, Vultaggio A, Maggi E, Romagnani S. Defective production of LIF, M-CSF and Th2-type cytokines by T cells at fetomaternal interface is associated with pregnancy loss. *J Reprod Immunol.* 2001 Oct-Nov;52(1-2):35-43.
- [189] Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta* 1983; 4:397–413.
- [190] Pijnenborg R. Implantation and immunology: maternal inflammatory and immune cellular responses to implantation and trophoblast invasion. *Reprod Biomed Online.* 2002; 4 Suppl 3:14-7. Review.
- [191] Pilichowska M E, Fleming M D, Pinkus J L, and Pinkus G S. Neoplastic Cells Express the Immature Dendritic Cell Marker BDCA-2 and Produce Interferon. *American Journal of Clinical Pathology.* 2007; 128; 3: 445 – 453
- [192] Plum J, De Smedt M, Verhasselt B, Offner F, Kerre T, Vanhecke D, Leclercq G, Vandekerckhove B. In vitro intrathymic differentiation kinetics of human fetal liver CD34\_CD38- progenitors reveals a phenotypically defined dendritic/T-NK precursor split. *J Immunol.* 1999; 162:60.
- [193] Ponte M, Cantoni C, Biassoni R, Tradori-Cappai A, Bentivoglio G, Vitale C, Bertone S, Moretta A, Moretta L, Mingari MC. Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A. 1999 May 11;96(10):5674-9
- [194]** Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Hassan N, Al-Azemi M, Al-Shamali E. Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. *Cell Immunol.* 1999 Sep 15;196(2):122-30.
- [195]** Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today.* 1997 Oct;18(10):478-82.
- [196]** Rajagopalan S, Bryceson YT, Kuppusamy SP, Geraghty DE, van der Meer A, Joosten I, Long EO. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol.* 2006, 4, e9.
- [197]** Rammensee H, Falk K, Rotzschke O. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol.* 1993; 11:213.
- [198]** Read S, Powrie F. CD4 (+) regulatory T cells. *Curr Opin Immunol.* 2001; 13:644-9.
- [199]** Reading JP, Huffman JL, Wu JC, Palmer FT, Harton GL, Sisson ME, Keyvanfar K, Gresinger TH, Cochrane WJ, Fallon LA, et al. Nucleated erythrocytes in maternal blood: quantity and quality of fetal cells in enriched populations. *Hum Reprod.* 1995 Sep;10(9):2510-5.
- [200]** Reed JC. Caspases and cytokines: roles in inflammation and autoimmunity. *Adv Immunol.* 1999;73:265-99.
- [201]** Reis e Sousa C, Stahl P D, and Austyn J M. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* 1993, 178:509-519.
- [202]** Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol.* 2006 Jun;6(6):476-83.
- [203]** Relloso M, Puig-Kröger A, Pello OM, Rodríguez-Fernández JL, de la Rosa G, Longo N, Navarro J, Muñoz-Fernández MA, Sánchez-Mateos P, Corbí AL. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. *J*

- Immunol. 2002 Mar 15;168(6):2634-43
- [204]** Rimmel E, Terracciano L, Noppen C, Zajac P, Heberer M, Spagnoli GC, and Padovan E. Modulation of dendritic Cell Phenotype and Mobility by Tumor Cells In Vitro. *Human Immunology* 62, 39–49 (2001).
- [205]** Res P, Martinez-Caceres E, Jaleco AC, Staal F, Noteboom E, Weijer K, Spits H: CD34<sup>+</sup> CD38<sup>dim</sup> cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood*. 1996; 87:5196.
- [206]** Rescigno M, Granucci F, Citterio S, Foti M, and Ricciardi Castagnoli P. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol.Today*. 1999, 20:200–203.
- [207]** Richards RG, Brar AK, Frank GR, Hartman SM, Jikihara H. Fibroblast cells from term human decidua closely resemble endometrial stromal cells: induction of prolactin and insulin-like growth factor binding protein-1 expression. *Biol Reprod*. 1995 Mar;52(3):609-15.
- [208]** Riddick DH, Kusmik WF. Decidua: a possible source of amniotic fluid prolactin. *Am J Obstet Gynecol*. 1977 Jan 15;127(2):187-90
- [209]** Rieger L, Hofmeister V, Probe C, Dietl J, Weiss EH, Steck T, Kämmerer U. Th1- and Th2-like cytokine production by first trimester decidual large granular lymphocytes is influenced by HLA-G and HLA-E. *Mol Hum Reprod*. 2002 Mar;8(3):255-61
- [210]** Rieger L, Honig A, Sütterlin M, Kapp M, Dietl J, Ruck P, Kämmerer U. Antigen-presenting cells in human endometrium during the menstrual cycle compared to early pregnancy. *J Soc Gynecol Investig*. 2004 Oct;11(7):488-93
- [211]** Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*. 1999, 283: 1183.

- [212] Rogers AM, Boime I, Connolly J, Cook JR, Russell JH. Maternal-foetal tolerance is maintained despite transgene-driven trophoblast expression of MHC class I, and defects in Fas and its ligand. *Eur J Immunol.* 1998;28:3479-87.
- [213] Ruiz C, Montes MJ, Abadía-Molina AC, Olivares EG. Phagocytosis by fresh and cultured human decidual stromal cells: opposite effects of interleukin-1 alpha and progesterone. *J Reprod Immunol.* 1997 Apr; 33(1):15-26
- [214] Runic R, Lockwood CJ, Ma Y, DiPasquale B, Guller S. Expression of Fas ligand by human cytotrophoblast: implications in placentation and foetal survival. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1996; 81:3119-22.
- [215] Ryan EJ, Marshall AJ, Magaletti D, Floyd H, Draves KE, Olson NE, Clark EA. Dendritic cell-associated lectin-1: a novel dendritic cell-associated, C-type lectin-like molecule enhances T cell secretion of IL-4. *J Immunol.* 2002 169:5638-48.
- [216] Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol.* 2000 Jul;47(2):87-103.
- [217] Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000; 101:455-8.
- [218] Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 1995, 182:389-400.
- [219] Sallusto F, Lanzavecchia A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J Exp Med.* 1999 Feb 15;189(4):611-4
- [220] Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol*

- Hum Reprod. 2004 May;10(5):347-53. Epub 2004 Mar 2
- [221] Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein RL, Springer TA, et al. CD antigens 1993. Blood. 1994 Feb 15;83(4):879-80
- [222] Schmitt N, Cumont MC, Nugeyre MT, Hurtrel B, Barré-Sinoussi F, Scott-Algara D and Israël N. Ex vivo characterization of human thymic dendritic cell subsets. Immunobiology, Volume 212, Issue 3, 15 May 2007, Pages 167-177.
- [223] Schrocksnadel K, Widner B, Bergant A, Neurauter G, Schennach H, Schrocksnadel H, Fuchs D. Longitudinal study of tryptophan degradation during and after pregnancy. Life Sci. 2003; 72:785-93.
- [224] Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. Nat Rev Immunol. 2002; 2:389-400.
- [225] Shortman K and Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol. 2002 Mar;2(3):151-61
- [226] Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. Nat Rev Immunol. 2007 Jan;7(1):19-30.
- [227] Skubitz K M, and Snook R W. J Immunol. 1987 139, 1631-1639.
- [228] Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Placental apoptosis in normal human pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 1997 Jul;177(1):57-65.
- [229] Soilleux EJ, Morris LS, Leslie G, Chehimi J, Luo Q, Levroney E, Trowsdale J, Montaner LJ, Doms RW, Weissman D, Coleman N, and Lee B. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro Journal of Leukocyte Biology. 2002. Volume 71, March 445-457.
- [230] Somerset DA ,Zheng Y, Mark D. Kilby, David M. Sansom\_ & Mark T. Drayson. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD251 CD41

- regulatory T-cell subset. *Immunology*, 2004. 112 38–43
- [231]** Starkey PM, Clover LM, Rees MC. Variation during the menstrual cycle of immune cell populations in human endometrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1991 May 10; 39(3):203-7.
- [232]** Starkey PM, Sargent IL, Redman CW. Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. *Immunology*. 1988 Sep;65(1):129-34
- [233]** Steinbrink K, Wöfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol*. 1997 Nov 15; 159(10):4772-80.
- [234]** Steinman R M, Hawiger D, Nussenzweig M C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol*. 2003, 21, 685–711.
- [235]** Steinman RM, Cohn ZA. Pillars Article: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med*. 1973. 137: 1142-1162. *J Immunol*. 2007 Jan 1;178(1):5-25
- [236]** Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:271-96
- [237]** Streilein JW. Unravelling immune privilege. *Science*. 1995; 270:1158–9.
- [238]** Sumathi VP, McCluggage WG. CD10 is useful in demonstrating endometrial stroma at ectopic sites and in confirming a diagnosis of endometriosis. *J Clin Pathol*. 2002 May;55(5):391-2.
- [239]** Sun Q, Woodcock JM, Rapoport A, et al. Monoclonal antibody 7G3 recognizes the N-terminal domain of the human interleukin-3 (IL-3) receptor alpha-chain and functions as a specific IL-3 receptor antagonist. *Blood*. 1996; 87(1):83-92.(Biology)
- [240]** Suzuki N, Yamamoto K, Toyoshima S, Osawa T, Irimura T. Molecular cloning and expression of cDNA encoding human macrophage C-type lectin. Its unique carbohydrate binding specificity for

- Tn antigen. *J. Immunol.* 1996, 156:128–35
- [241]** Svensson L, Arvola M, Sallstrom MA, Holmdahl R, Mattsson R. The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice. *J Reprod Immunol.* 2001; Jul;51(1):3-7.
- [242]** Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 2000 Jul 17;192(2):303-10.
- [243]** Takeuchi S, Furue M. Dendritic cells: ontogeny. *Allergol Int.* 2007 Sep;56(3):215-23.
- [244]** Tangri S, Wegmann TG, Lin H, Raghupathy R. Maternal anti-placental reactivity in natural, immunologically-mediated fetal resorptions. *J Immunol* 1994; 152:4903–4912.
- [245]** Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Curr Opin Immunol.* 2000; 12: 731-7.
- [246]** Thieblemont N, Haeffner-Cavaillon N, Ledur A, L'Age-Stehr J, Ziegler-Heitbrock HW, Kazatchkine MD. CR1 (CD35) and CR3 (CD11b/CD18) mediate infection of human monocytes and monocytic cell lines with complement-opsonized HIV independently of CD4. *Clin Exp Immunol* 1993;92:106–13.
- [247]** Thomas R, Davis LS, Lipsky PE. Isolation and characterization of human peripheral blood dendritic cells. *J Immunol.* 1993;150:821-834. 17.
- [248]** Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA, Barnes PF, Rollinghoff M, Bolcskei PL, Wagner M, Akira S, Norgard MV, Belisle JT, Godowski PJ, Bloom BR, Modlin RL. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors.

- Science. 2001 Feb 23;291(5508):1544-7
- [249] Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL: Development of CD8alphapositive dendritic cells from a common myeloid progenitor. Science. 2000; 290:2152.
- [250] Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nat Rev Immunol. 2003 Feb; 3(2):133-46.
- [251] Troy A, Davidson P, Atkinson C, Hart D: Phenotypic characterisation of the dendritic cell infiltrate in prostate cancer. J Urol. 1998, 160:214-219
- [252] Trundley A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. Tissue Antigens. 2004 Jan;63(1):1-12
- [253] Tsuda H, Michimata T, Hayakawa S, Tanebe K, Sakai M, Fujimura M, Matsushima K and Saito S (2002) A Th2 chemokine, TARC, produced by trophoblasts and endometrial gland cells, regulates the infiltration of CR4+ T lymphocytes into human decidua at early pregnancy. Am J Reprod Immunol 48,1±8.
- [254] Uchiyama T, Nelson DL, Fleisher TA, Waldmann TA. A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. II. Expression of Tac antigen on activated cytotoxic killer T cells, suppressor cells, and on one of two types of helper T cells. J Immunol. 1981 Apr;126(4):1398-403
- [255] Uckan D, Steele A, Cherry, et al. Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. Mol Hum Reprod. 1997; 3:655-62.
- [256] Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. Curr Opin immunol. 2002 Feb;14(1):103-10
- [257] Valés-Gómez M, Reyburn HT, Erskine RA, López-Botet M & Strominger JL. Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor

- CD94/NKG2-C to HLA-E. *EMBO J*, 1999, 18, 4250–4260.
- [258]** Valladeau J, Duvert-Frances V, Pin JJ, Kleijmeer MJ, Ait-Yahia S, Ravel O, Vincent C, Vega F Jr, Helms A, Gorman D, Zurawski SM, Zurawski G, Ford J, Saeland S. Immature human dendritic cells express asialoglycoprotein receptor isoforms for efficient receptor-mediated endocytosis. *J. Immunol.* 2001, 167:5767–74
- [259]** Van den Heuvel M, Peralta C, Bashar S, Taylor S, Horrocks J, Croy BA. Trafficking of peripheral blood CD56(bright) cells to the decidualizing uterus--new tricks for old dogmas? *J Reprod Immunol.* 2005 Oct; 67(1-2):21-34. Review.
- [260]** Van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; Sep 3, 697–709.
- [261]** Vassiliadou N, Bulmer JN. Quantitative analysis of T lymphocyte subsets in pregnant and nonpregnant human endometrium. *Biol Reprod.* 1996; 55(5):1017-22.
- [262]** Venu G, Pillarisetty, Steven C, Katz, Joshua I, Bleier, Alaap B, Shah, and Ronald P. DeMatteo2. Natural Killer Dendritic Cells Have Both Antigen Presenting and Lytic Function and in Response to CpG Produce IFN-via Autocrine IL-121. *The Journal of Immunology.* 2005, 174: 2612–2618.
- [263]** Villadangos JA, Schnorrer P, Wilson NS. Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive forces. *Immunol Rev.* 2005 ct;207:191-205.
- [264]** Vince GS, Starkey PM, Jackson MC, Sargent IL, Redman CW. Flow cytometric characterisation of cell populations in human pregnancy decidua and isolation of decidual macrophages. *J Immunol Methods.* 1990 Sep 14;132(2):181-9.
- [265]** Walker LS, Chodos A, Eggena M, Doms H, Abbas AK. Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo. *J Exp Med.* 2003; 198:249–58.

- [266] Warren, H. S., Altin, J. G., Waldron, J. C., Kinnear, B. F., and Parish, C. R. J. *Immunol.* 1996, 156, 2866-2873
- [267] Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev.* 1998 Jun;163:19-34
- [268] Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatherer JP, Canfield RE, Armstrong EG, Nisula BC. Incidence of early loss of pregnancy. *New Engl J Med* 1988; 319:189-194.
- [269] Willment JA, Gordon S, Brown GD. Characterization of the human beta-glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J. Biol. Chem.* 2001, 276:43818-23.
- [270] Wilson NS, El-Sukkari D, Belz GT, Smith CM, Steptoe RJ, Heath WR, Shortman K, Villadangos JA. Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood.* 2003 Sep 15;102(6):2187-94. Epub 2003 Jun 5
- [271] Wilson NS, El-Sukkari D, Villadangos JA. Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. *Blood.* 2004 Mar 15;103(6):2187-95. Epub 2003 Nov 6
- [272] Wilson SE, Li Q, Weng J, Barry-Lane PA, Jester JV, Liang Q, Wordinger RJ. The Fas- Fas ligand system and other modulators of apoptosis in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*1996; 37: 1582-92.
- [273] Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3:199-210.
- [274] Wu L, Antica M, Johnson GR, Scollay R, Shortman K: Development potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus. *J Exp Med.* 1991; 174:1617.
- [275] Wu X, Li DJ, Yuan MM, Zhu Y, Wang MY. The expression of chemokine receptors in CD56(bright) CD16- natural killer cells and the

- mechanism of their recruitment in deciduas. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2004 Jun 17; 84(12):1018-23.
- [276]** Xerri L, Devilard E, Hassoun J, Mawas C, Birg F. Fas ligand is not only expressed in immune privileged human organs but is also coexpressed with Fas in various epithelial tissues. *Mol Pathol*. 1997; 50: 87-91.
- [277]** Zenclussen AC, Blois S, Stumpo R, Olmos S, Arias K, Malan Borel I, Roux ME, Margni RA. Murine abortion is associated with enhanced interleukin-6 levels at the feto-maternal interface. *Cytokine*. 2003 Nov 21; 24(4):150-60.
- [278]** Zenclussen AC, Fest S, Busse P, Joachim R, Klapp BF, Arck PC. Questioning the Th1/Th2 paradigm in reproduction: peripheral levels of IL-12 are down-regulated in miscarriage patients. *Am J Reprod Immunol*. 2002 Oct; 48(4):245-51.
- [279]** Zenclussen AC, Fest S, Sehmsdorf US, Hagen E, Klapp BF, Arck PC. Upregulation of decidual P-selectin expression is associated with an increased number of Th1 cell populations in patients suffering from spontaneous abortions. *Cell Immunol*. 2001 Nov 1; 213(2):94-103.
- [280]** Zenclussen AC, Kortebani G, Mazzolli A, Margni R, Malan Borel I. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor serum levels in recurrent spontaneous abortion women immunized with maternal white cells. *Am J Reprod Immunol*. 2000 Jul; 44(1):22-9.
- [281]** Zenclussen, A. C., Fest, S., Busse, P., Joachim, R., Klapp, B. F. and Arck, P. C., Questioning the Th1/Th2 paradigm in reproduction: Peripheral levels of IL-12 are down-regulated in miscarriage patients. *Am. J. Reprod. Immunol*. 2002. 48: 245–251.