

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

Y BIOLOGIA MOLECULAR

ESTUDIO INMUNOLOGICO DE LA
DECIDUA HUMANA

TESIS DOCTORAL

M^a LUISA VARGAS PEREZ

Granada, 1990

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

Curso de 19 89 a 19 90

Folio 87

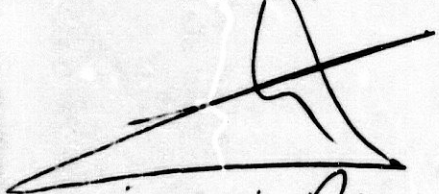
Número 174

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. M^e Juez
Váquez Pérez, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente
tema, que libremente había elegido: "Estudio inmunológico de la
Diénesis Humana".

Terminada la lectura y contestadas la objeciones formuladas por los Jueces del Tribunal, este
le calificó de APTO "EN LAUDE" por Unanimitad
Granada 11 de Junio de 19 90

EL PRESIDENTE,

El Secretario del Tribunal,

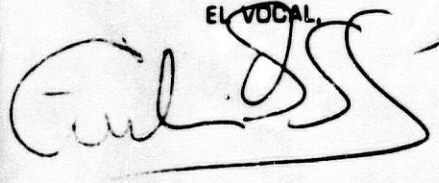

Fdo.: José Ramón Fuentes

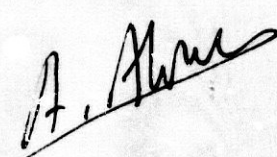

Fdo.: R. Palatel


EL VOCAL,

EL VOCAL,

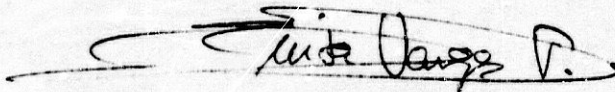
EL VOCAL,


Fdo.: Emilio Doblaré


Fdo.: Antonio Muñoz


Fdo.: José Pérez

FIRMA DEL GRADUANDO.

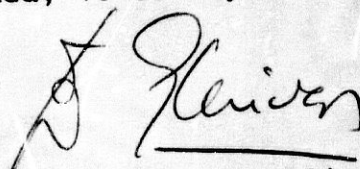


D. ENRIQUE GARCIA OLIVARES, PROFESOR TITULAR DEL
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE LA
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que D^a M^a LUISA VARGAS PEREZ ha realizado bajo mi
dirección su trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema
"ESTUDIO INMUNOLOGICO DE LA DECIDUA HUMANA", que ha
finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido
revisada ya presente y estando conforme con su
presentación para obtener el grado de Doctor.

Granada, 16 de Mayo de 1990



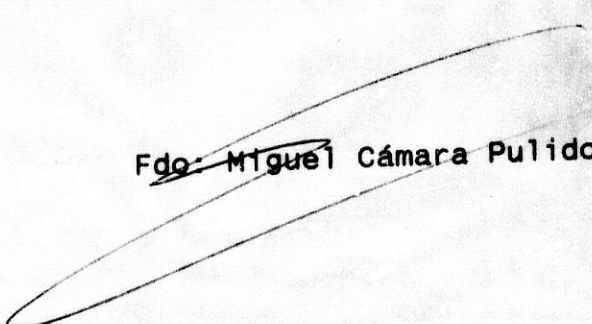
Fdo: Enrique García Olivares

D. MIGUEL CAMARA PULIDO, PROFESOR ASOCIADO DEL
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA DE LA FACULTAD DE
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que DA MA LUISA VARGAS PEREZ ha realizado bajo mi
dirección su trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema
"ESTUDIO INMUNOLOGICO DE LA DECIDUA HUMANA", que ha
finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido
revisada la presente y estando conforme con su
presentación para obtener el grado de Doctor.

Granada, 16 de Mayo de 1990

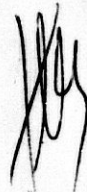

Fdo: Miguel Cámara Pulido

D. FRANCISCO GONZALEZ GOMEZ, CATEDRATICO DEL DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que D^a M^a LUISA VARGAS PEREZ ha realizado bajo mi dirección su trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema "ESTUDIO INMUNOLOGICO DE LA DECIDUA HUMANA", que ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido revisada la presente y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor.

Granada, 16 de Mayo de 1990



Fdo: Francisco Gonzalez Gomez

Parte de los resultados que se recogen en esta Memoria han sido presentados en el XIV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología, Granada 1988; World Congress of Obstetrics and Gynecology, Rio de Janeiro 1988; XX Congreso Español de Obstetricia y Ginecología, Palma de Mallorca 1989; 4th International Congress of Reproductive Immunology, Kiel 1989; XI Reunión de Medicina Perinatal, Granada 1989.

A Juanjo

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a D. Enrique García Olivares, que me ha ayudado en todo momento y que me ha enseñado, con su ejemplo, el tesón, la meticulosidad y la exigencia que requiere todo trabajo científico.

A D. Miguel Cámara Pulido, su ayuda y orientación a lo largo de todo el trabajo.

A D. Francisco Gonzalez Gomez, su orientación y consejos y el interés puesto en el presente trabajo.

A Pilar Alemán Casado, cuya colaboración ha sido fundamental para la conclusión de esta Tesis Doctoral.

A Purificación Alfaro, técnico de Anatomía Patológica, que desinteresadamente ha realizado los cortes histológicos y me ha resuelto todos aquellos problemas técnicos que han surgido en la realización de las técnicas inmunohistológicas.

A Carmen García Tortosa y a M^a José Gomez, que además de su ayuda siempre me han animado a seguir adelante.

A mis compañeros M^a José, Juan Luis y Fernando, que han compartido distintos momentos de este trabajo.

A Juan García y a sus compañeros residentes de Obstetricia y Ginecología, al personal del Servicio de Obstetricia y a Miguel Angel Motos, por su ayuda en la recogida de las muestras.

A José Javier Lopez Caballero, que me inició en el campo de las técnicas inmunohistológicas.

A la Sección de Inmunología del Hospital Universitario de Granada por toda la colaboración prestada.

Y a todos aquellos que con su apoyo han hecho posible este trabajo.

ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo
APC	Célula Presentadora de Antígeno
BSA	Albúmina Bovina
CD	Grupo de Diferenciación
Con A	Concanavalina A
CTL	Linfocito T Citotóxico
dGL	Linfocitos Granulados Deciduales
EASF	Factores Supresores Asociados al Embrión
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
FcγIIIR	Receptor para la región Fc de la IgG, tipo III
FITC	Isocianato de Fluoresceína
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Monocitos
GMG	Granulocitos Matriales Glandulares
HLA	Histocompatibility Leukocyte Antigens
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
LAK	Capacidad Destructora activada por linfoquinas
LGL	Linfocitos Grandes Granulados
MLC	Cultivo Mixto Linfocitario
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NK	Natural Killer
PBS	Tampón Salino de Fosfatos
PG	Prostaglandina
PHA	Fitoheماغlutinina

PLAP	Isoenzima Placentaria de la Fosfatasa Alcalina
PWM	Pokeweed Mitogen
SLSC	Células Supresoras de Vida Corta
TGF	Factor de Crecimiento Transformante
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TTL	Test de Transformación Linfoblástica

INDICE

	Pag.
<u>INTRODUCCION</u>	1
ANTECEDENTES.....	2
INMUNIDAD SISTEMICA DURANTE EL EMBARAZO.....	5
<u>INMUNIDAD HUMORAL</u>	5
<u>ELEMENTOS CELULARES DE LA RESPUESTA INMUNE</u>	5
Subpoblaciones linfocitarias.....	5
Función linfocitaria.....	7
Actividad NK.....	9
Actividad Supresora.....	10
<u>FACTORES SERICOS INMUNOSUPRESORES</u>	11
Esteriodes.....	11
Alfa-2-glicoproteína asociada al embarazo.....	14
Alfa-fetoproteína.....	15
Beta-1-glicoproteína específica del embarazo.....	16
Factor precoz del embarazo.....	17
Lactógeno placentario humano.....	18
Gonadotrofina coriónica humana.....	19
Proteína A plasmática asociada al embarazo.....	20
Proteína placentaria 15.....	21
Inhibidor de la síntesis de prostaglandinas asociado al embarazo.....	21
<u>UNIDAD FETOPLACENTARIA</u>	22
<u>TEORIA DEL FIBRINOIDE</u>	22
<u>ANTIGENICIDAD Y/O INMUNOGENICIDAD DEL EMBRION</u>	23
<u>ANTIGENICIDAD Y/O INMUNOGENICIDAD DE LAS MEMBRANAS FETALES</u>	25
<u>ASPECTOS INMUNES DEL TROFOBlasto</u>	26
Poblaciones celulares del trofoblasto.....	26
Expresión de antígenos HLA.....	28
Antígenos TLX.....	30
Antígenos relacionados con los grupos sanguíneos.....	32

Fosfatasa alcalina y receptores de factores de crecimiento.....	32
Inmunosupresión y resistencia a la citólisis.....	35
RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE MATERNO A LOS	
ANTIGENOS FETALES.....	37
Anticuerpos anti sincitiotrofoblasto.....	37
Anticuerpos anti HLA.....	40
Anticuerpos anti TLX.....	42
INMUNOBIOLOGIA DEL TEJIDO DECIDUAL.....	44
Células deciduales.....	45
<i>Morfología.....</i>	<i>45</i>
<i>Ontogenia.....</i>	<i>46</i>
<i>Marcadores de superficie.....</i>	<i>46</i>
<i>Funciones.....</i>	<i>48</i>
Macrófagos deciduales.....	50
Linfocitos deciduales.....	51
Células supresoras.....	52
Células NK. Actividad NK.....	53
<u>OBJETIVOS.....</u>	57
<u>MATERIAL Y METODOS.....</u>	59
TEJIDOS.....	60
TECNICAS INMUNOHISTOLOGICAS/INMUNOCITOLOGICAS.....	62
Criterios morfológicos.....	66
Estimación del porcentaje de células positivas.....	66
PREPARACION DE LAS SUSPENSIONES CELULARES.....	68
FRACCIONAMIENTO DE LAS SUSPENSIONES MEDIANTE	
GRADIENTES DE DENSIDAD.....	68
PREPARACION DE EXTENSIONES CELULARES PARA	
INMUNOCITOQUIMICA.....	70
ANALISIS DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE POR CITOMETRIA	
DE FLUJO.....	71
Anticuerpos monoclonales.....	71
Preparación de las muestras.....	72
Contaje de células positivas.....	73
METODOS ESTADISTICOS.....	75
Cálculo de valores medios y de su desviación estandar...	75

Análisis de la varianza de dos vías.....	75
Test de Wilcoxon.....	76
<u>RESULTADOS</u>	78
<u>DISCUSION</u>	149
<u>CONCLUSIONES</u>	179
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	181

INTRODUCCION

ANTECEDENTES

El embarazo es la única situación fisiológica donde un aloinjerto no se asocia a un fenómeno de rechazo.

Clásicamente se describieron cinco mecanismos que intentaban explicar la tolerancia inmune materna frente al feto:

a. *El concepto como un estímulo antigénico ineficaz.*

Esta teoría fue lanzada por Littel en la década de los 20, y supone que la expresión de los aloantígenos derivados del padre está descendida en la unidad fetoplacentaria, no provocando por tanto, una respuesta inmune en la madre. No obstante, el hecho de que en la madre se encuentren anticuerpos anti MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) paternos, y que injertos heterotópicos de tejidos fetales sean normalmente rechazados, nos hace suponer que existen antígenos fetales expuestos al sistema inmune materno.

b. *El útero como un lugar inmunológicamente privilegiado.* El útero ha sido comparado con otros sitios inmunológicamente privilegiados, como la cámara anterior del ojo, donde pequeños aloinjertos pueden ser transplantados sin ser rechazados. De hecho, los aloinjertos muestran una mayor supervivencia en el útero decidualizado. Este efecto no aparece en ausencia de

decidualización natural o artificial (Beer 1979). Sin embargo, a diferencia de otros sitios inmunológicamente privilegiados, el útero decidualizado tiene un sustancial drenaje linfático a través del cual podrían llegar elementos inmunes.

c. *La placenta como una barrera inmunológica.* El feto en el útero está relativamente aislado de la madre. Ambos sistemas circulatorios están separados por las células del trofoblasto. No obstante moléculas y células pueden atravesar la barrera placentaria en ambas direcciones.

d. *El embarazo induce un estado de inmunosupresión en la madre.* Éste estado de inmunosupresión puede ser consecuencia de los cambios endocrinológicos que ocurren durante el embarazo y de la acción de sustancias derivadas de la placenta. Sin embargo, hasta el momento, no hay una evidencia clara de la disminución de la respuesta inmune durante la gestación.

e. *Durante el embarazo se desarrolla una tolerancia específica frente al feto.* Sin embargo, si consideramos la tolerancia en su sentido estricto, como falta de respuesta inmune, no existe durante el embarazo, ya que la madre es capaz de crear anticuerpos anti antígenos paternos y de rechazar otros injertos tisulares heterotópicos.

Por lo tanto, ninguno de los postulados anteriores explica el éxito del embarazo vivíparo.

La placenta en la especie humana y en ratones es hemocorial. En ella, las células maternas y las células trofoblásticas están en íntimo contacto. Esto nos sugiere que en el mantenimiento del embarazo intervienen tres elementos: la madre (el huesped), la unidad fetoplacentaria (el injerto) y la interfase materno-fetal (unión injerto-huesped). Los mecanismos que explican la falta de rechazo del feto deben estar relacionados con estos tres elementos. Por lo tanto, a continuación, vamos a analizar el estado de la inmunidad sistémica durante el embarazo, los aspectos inmunes de la unidad fetoplacentaria (embrión, membranas y trofoblasto), la respuesta del sistema inmune materno frente a los antígenos fetales y, por último, la inmunobiología del tejido decidual.

INMUNIDAD SISTEMICA DURANTE EL EMBARAZO

INMUNIDAD HUMORAL

Numerosos estudios indican que existen variaciones en las concentraciones plasmáticas de IgG, IgM e IgA en embarazadas normales, aunque no se conoce su causa.

Maroulis y col. (1971) encuentra un descenso en los niveles de IgG al final de la gestación que atribuyen a un aumento de la transferencia placentaria. Otros autores aclaran que la disminución de IgG es más pronunciada en primigestas que en segundigestas, y se acompaña de un descenso de IgA (Ostensen y col., 1983).

Así mismo, se han detectado inmunocomplejos circulantes durante la gestación con la técnica de inhibición de aglutinación por latex (Masson y col., 1977) y con la técnica de fijación de C1q marcado con enzimas (Stimson y col., 1981).

ELEMENTOS CELULARES DE LA RESPUESTA INMUNE

Subpoblaciones linfocitarias

Diversos autores señalan que la inmunidad celular está deprimida durante el embarazo (Finn y col., 1972; Brunham y col., 1983). Por este motivo son numerosos los estudios

encaminados a dilucidar como se encuentran las subpoblaciones de linfocitos T en embarazos humanos normales (Sridama y col., 1982; Schafer y col., 1982; Vanderbeeken y col., 1982; Barnett y col., 1983; Coulam y col., 1983; Lucivero y col., 1983; Moore y col., 1983a; Tallon y col., 1984; Canepa y col., 1984, Bailey y col., 1985; Glassman y col., 1985; Smart y col., 1986; Fiddes y col., 1986; Degenne y col., 1988; Castilla y col., 1989) y patológicos (Moore y col., 1983b; Sridama y col., 1983; Gudson y col., 1984; Barnett y col., 1984). En estos estudios, la alteración más frecuentemente encontrada es la del número y proporción de células CD4⁺. Recientemente se ha demostrado que la proporción de células CD4⁺ disminuye en el primer trimestre de gestación, se mantiene en el segundo trimestre, y vuelve a los niveles normales en el tercer trimestre (Castilla y col., 1989). Estos resultados son comparables con los de otros autores (Barnett y col., 1983; Canepa y col., 1984; Degenne y col., 1988). Ya que los linfocitos T Helper son CD4⁺, se ha propuesto que este descenso podría alterar la actividad Helper de la madre, contribuyendo a la supervivencia fetal (Sridama y col., 1982; Vanderbeeken y col., 1982; Barnett y col., 1983). Sin embargo, esto no puede ser del todo aceptado, ya que las células CD4⁺ incluyen varias poblaciones celulares con distintas funciones y aún no se conoce cual de estas subpoblaciones es la que se encuentra descendida a lo largo

del embarazo.

Función linfocitaria

La función linfocitaria durante el embarazo se ha estudiado tanto *in vivo* (mediante transplante de injertos y test cutáneos) como *in vitro* (mediante test de transformación linfoblástica con diversas sustancias).

El transplante de injertos se usó con bastante frecuencia hace unos años en animales de experimentación. De la gran cantidad de ensayos que se hicieron podemos sacar las siguientes conclusiones:

1. Los injertos cutáneos son siempre rechazados por las mujeres gestantes (Andersen y Monroe, 1962) y por las ratonas y conejas preñadas.
2. Los embarazos sucesivos facilitan el injerto (Breyere y Barret, 1960b; Baines y col., 1980)
3. Los injertos cutáneos paternos sobreviven durante más tiempo en las hembras después del parto (Volkoka y Maysky, 1969; Anderson 1970) siempre que sean transplantados a los pocos días del mismo (David y col., 1967; Beer y Billingham, 1971). Los aloinjertos cardíacos de rata son rechazados durante las fases iniciales y media del embarazo, pero muestran una supervivencia más prolongada si son tranferidos al final de la gestación o poco después del parto (Heron 1971, 1972)

De los tests cutáneos, el más usado ha sido el de la

tuberculina, que muestra resultados dispares (Montgomery y col., 1968; Present y Comstosk, 1975; Jones y col., 1983). Holland y col. (1984) provocaron una reacción de hipersensibilidad tardía frente a hematies de burro, mediante la introducción de linfocitos sensibilizados y antígeno en ratonas preñadas, no encontrando diferencias significativas con el grupo control en la reacción inflamatoria, pero sí un defecto en la fase sensibilizadora o inductora de la respuesta primaria de hipersensibilidad tardía.

En mujeres embarazadas, el ensayo de inmunidad celular que se ha estudiado más ampliamente y con resultados más contradictorios, es el test de transformación linfoblástica (TTL) a partir de linfocitos de sangre periférica, principalmente con fitohemaglutinina (PHA). Este se ha encontrado disminuido (Finn y col., 1972; Nelson y col., 1973; Thong y col., 1973; Petrucco y col., 1976; Garewal y col., 1978, Mehrotra, 1982; Brunham y col., 1983; Valdimarsson y col., 1983; Goodfellow, 1983; Castilla y col., 1990), sin cambios (Hsu, 1974; Majumbar y col., 1984) o aumentado (Metcalf, 1972; Jones y col., 1983). Utilizando concanavalina-A como mitógeno desciende la transformación linfoblástica (Mehrotra, 1982; Valdimarsson y col., 1983, Castilla y col., 1990), al igual que con PWM (Hsu, 1974).

En presencia de suero de mujer no gestante (suero heterólogo), los linfocitos de mujeres embarazadas

prolifera igual que los linfocitos de no embarazadas cuando los enfrentamos con linfocitos paternos (Knobloch y Jouja, 1976; Robert y col., 1973). Pero cuando son los linfocitos fetales los que estimulan a las células maternas, se observa una débil respuesta (Knobloch y Jouja, 1976; Lawler y col., 1975). Sin embargo, diversos autores han descrito una disminución en la respuesta de linfocitos maternos en cultivo mixto con linfocitos de un tercer individuo (Thong y col., 1973).

Se ha demostrado la existencia en sangre periférica durante el embarazo de linfocitos citotóxicos feto-específicos (Redman y col., 1987); sin embargo, la actividad citotóxica de los mismos es controvertida. Mientras que Vanderbeeken y col. (1984) no encuentran actividad citotóxica frente a antígenos fetales o paternos, otros autores describen linfocitos maternos con débil actividad citotóxica frente a células blanco fetales (Wattanasak y Matangkasombut, 1983; Chardonnnes y Jeannet, 1980).

Actividad NK

Las células Natural Killer (NK) comenzaron a tener importancia en Inmunología de la Reproducción, cuando se observó que células del trofoblasto portaban moléculas blanco para células NK, tanto en ratones como en humanos (Lala y col., 1983).

Se ha demostrado que la actividad NK en sangre periférica disminuye en la mujer embarazada (Baley y Schacter, 1985), lo cual parece ser debido a una reducción en la proporción de células NK maduras y con actividad lítica (Lee y col., 1987). Castilla y cols. (1989) observan un descenso durante la gestación de las células CD16⁺, que se corresponden con células NK maduras.

Por otra parte, Lala y col. (1983) observaron que la actividad NK estaba aumentada en la primera mitad del embarazo sólo en primigestas y que dicha actividad disminuía en todas las embarazadas en la segunda mitad.

Actividad supresora

Stankova y Pleszczynski (1984) observan que el cultivo linfocitario mixto entre células maternas y células del recién nacido es significativamente más débil que entre mujeres control y recién nacido. Al eliminar de las células maternas las células T con receptores Fc γ , desaparecen las diferencias en las respuestas. Vanderbeeken y col. (1984) obtienen resultados equivalentes al quitar las células Fc γ R⁺ y al eliminar las células CD8⁺. Esto nos sugiere que en la circulación periférica materna existen células supresoras antígeno-específicas.

Fiddes y col. (1986) ha estudiado, en sangre periférica, la actividad supresora inducida por histamina, que es máxima en el segundo trimestre de gestación y

desaparece en el tercer trimestre.

Recientemente, Castilla y col.(1990) han observado un aumento de la actividad de las células supresoras de vida corta (SLSC) a lo largo del embarazo. Estas células constituyen una subpoblación de células T que presentan actividad supresora no-específica y que desaparecen después de 24 horas de cultivo *in vitro*. Las células supresoras de vida corta están inducidas por la PGE₂ (Fischer y col., 1981), sustancia producida en la interfase materno-fetal (Contractor, 1983; Parhar y col., 1988) y que también, parece inducir actividad supresora mediada por linfocitos T en la mujer embarazada normal y en el recién nacido (Durandy y col., 1985). Así mismo, Rinaldo y col. (1983) encuentran relación entre la actividad SLSC y las células T CD8⁺.

FACTORES SERICOS INMUNOSUPRESORES

Esteroides

A partir de precursores maternos y fetales la placenta sintetiza estrógenos que liberará a la circulación materna y fetal, incrementándose sus niveles conforme avanza el embarazo.

Simmons y col. (1968) observan como el estradiol prolonga la supervivencia tanto del primer como del segundo

injerto de piel en ratones. Estudios posteriores (Stimson y Hunter, 1976) determinan que al tratar ratas con 17- β -estradiol aparecían en suero factores solubles. Estos factores, entre otras cosas, inhibían la formación de rosetas con hematies de carnero en linfocitos humanos, suprimían la inhibición de la migración de leucocitos inducida por antígenos y bloqueaban parcialmente la transformación linfoblástica inducida por PHA.

La progesterona es sintetizada por células trofoblásticas, por lo que su concentración es mucho mayor en sangre intervellosa que en sangre periférica materna. Al igual que los estrógenos, la progesterona y sus análogos sintéticos prolongan la viabilidad de transplantes de corazón en ratas (Pettirossi y col., 1976; Beer y Billingham, 1979).

La inyección intraperitoneal en ratones de un anticuerpo monoclonal anti-progesterona, 32 horas postcoito, impide la implantación y detiene el desarrollo embrionario en una etapa previa a la cavitación (Wang y col., 1984).

Durante la interacción linfocito-monocito la progesterona parece actuar principalmente sobre el linfocito T, a diferencia de los glucocorticoides que parecen actuar sobre células T y monocitos (Stites y Siiteri, 1983). Linfocitos de mujeres embarazadas normales

tratados con progesterona liberan un factor no dializable que inhibe la actividad citotóxica y la síntesis de prostaglandinas F_2 (Szekeres-Barto y col., 1985). En el monocito, la generación de radicales de oxígeno durante la ingestión de zimosan se ve disminuida por la progesterona y otros esteroides (Stimson, 1983).

La actuación de la progesterona sobre las células supresoras es controvertida. O'Hearn y Stites (1983) determinan que las concentraciones de progesterona que inhiben la síntesis de DNA y la generación de linfocitos T citotóxicos, también inhiben la generación o actividad de células supresoras aloantígeno específicas. Los mismos autores encontraron este efecto con estradiol (5-10 $\mu\text{gr/ml}$) y cortisol (1 $\mu\text{gr/ml}$). Sin embargo, Randazzo y col. (1980) observaron, además de una relativa resistencia de las células supresoras a la metilprednisolona, un incremento de actividad cuando eran expuestas a bajas dosis de hormonas esteroideas. De igual forma, Holdstock y col. (1982) demostraron que la progesterona aumenta la generación de células supresoras inducidas por Con A, no encontrando este efecto con testosterona ni estradiol.

Los niveles plasmáticos de transcortina, cortisol libre y cortisol unido a albúmina y transcortina aumentan progresivamente durante el embarazo (Jaffe, 1986). Se ha demostrado que el cortisol retrasa el rechazo de aloinjertos en animales (Munroe, 1971).

Bajas dosis de cortisol pueden aumentar la proliferación de células linfoides, pero concentraciones suficientemente altas inhiben la síntesis de DNA tanto basal como estimulada (Makman y col., 1968; Petrucco y col., 1976). Los corticoides tienen bastantes efectos sobre los macrófagos. Suprimen la respuesta al factor inhibitorio de la migración de macrófagos (Balow y Rosenthal, 1973) y disminuyen la actividad fagocítica (Schreider, 1977). También impiden la diferenciación de monocitos a macrófagos (Rinehart y col., 1982). Probablemente, los efectos de los corticoides en aloinjertos y reacciones de hipersensibilidad tardía dependan más de los efectos antiinflamatorios (disminución de la permeabilidad capilar, aumento del tono vascular) que de la supresión directa de la función linfoide.

Alfa-2-Glicoproteína asociada al embarazo (alfa2-PAG, PAG, SP3, PAM, PZP)

La PAG es una glicoproteína que se encuentra en todos los individuos normales con unos valores que oscilan entre 0'1 y 130 $\mu\text{gr/ml}$. Estos valores se incrementan unas 60 veces durante el embarazo y el tratamiento con estrógenos (Stimson, 1978).

Entre las propiedades inmunosupresoras de la PAG se encuentran una disminución significativa de la proliferación linfocitaria inducida por PHA, Con A,

reacción linfocitaria mixta con células alogénicas y PPD (Stimson, 1976). También bloquea la inhibición de la migración de leucocitos inducida por BCG, reduce la unión espontánea de las células T con los hematies de carnero (Stimson 1976) y afecta la movilidad de los macrófagos (Straube y col., 1975).

La PAG se ha identificado en la superficie de monocitos sanguíneos durante la gestación, ya que estas células son capaces de sintetizarlo (Stimson y col., 1979)

Alfa-fetoproteína (AFP)

Es una glicoproteína sintetizada principalmente por el hígado y que constituye un elemento esencial en el suero y líquido amniótico durante la gestación (Murgita y col., 1983).

Numerosos estudios han atribuido propiedades inmunosupresoras a la AFP que actuaría, por tanto, como un agente inmunorregulador durante el desarrollo fetal. La AFP puede activar *in vitro* una subpoblación de células derivadas de la médula ósea que expresan marcadores característicos de células supresoras no T, estas son las células NS (natural supresor) (Hoskin y col., 1985). Las células NS inhiben la proliferación alorreactiva de la célula T en el adulto y la proliferación autorreactiva de las células T en el recién nacido, y son consideradas como las responsables del control de la respuesta inmune al

principio de la ontogenia (Hooper y col., 1985). La AFP también puede suprimir la actividad NK (Cohen y col., 1986), disminuir la capacidad fagocítica de los macrófagos (Olinescu y col., 1978), inducir células T supresoras (Murgita y col., 1977; Peck y col., 1982) e inhibir los efectos mitogénicos de la PHA, Con A y lipopolisacáridos sobre las células esplénicas de ratón (Murgita y Tomasi, 1975).

El efecto inmunorregulador de la AFP también incluye una inhibición selectiva de la respuesta proliferativa de las células T frente a los antígenos MHC de clase II, mientras que la respuesta frente a los antígenos MHC de clase I no se afecta (Peck y col., 1978). Lu y col (1984) atribuyen esta inhibición selectiva a que la AFP produce una disminución de la expresión de antígenos MHC de clase II en los macrófagos. Esta inhibición es reversible, ya que cuando los macrófagos son estimulados con linfoquinas vuelven a adquirir antígenos MHC de clase II (Crainie y col., 1989).

Beta-1-glicoproteína específica del embarazo (PSB₁G, SP1, PAPP-C, TBG)

Es una glicoproteína sintetizada por el sincitiotrofoblasto que alcanza su máxima concentración en suero (200 µgr/ml) al final del embarazo. El único papel inmunológico que se atribuye a SP1 es su influencia en la

transformación linfoblástica. Los estudios dirigidos a determinar la concentración necesaria para inhibir dicha transformación son contradictorios. Cerni y col.(1977) observan que la disminución de la respuesta a PHA no depende de la dosis. Horne y col.(1976) demuestran que a una concentración de 250 µgr/ml inhibe un 75% de la proliferación inducida por PHA sin afectar la inducida por Con A. Otros autores determinan que la SP1 a concentraciones de 120 µgr/ml inhibe del 35-99% la reacción linfocitaria mixta (Gulyansky y col., 1985b).

Petrov y col.(1985) describieron un receptor en la superficie de los linfocitos para SP1. El número de células T que presentan este receptor aumenta progresivamente durante el embarazo.

Factor precoz del embarazo (EPF)

El factor precoz del embarazo fue detectado por primera vez en suero de embarazadas por Morton y col.(1976) cuando comprobaron que este impedía que linfocitos de no embarazadas se unieran a hematies de carnero. Este factor se ha detectado en suero de ratón, humanos y corderos, de 6 a 24 horas después de la fertilización y solo se encuentra en el primer y segundo trimestre, estando disminuido en caso de aborto (Morton y col., 1977). La existencia de este factor ha sido negada por Cooper y Aitken (1980) que no encontraron diferencias entre suero de

embarazadas y otros sueros en la capacidad de inhibir la formación de rosetas.

Rolfe y col.(1985) comprueban que la supresión ejercida por EPF no es directa, sino que se produce a través de la activación de células supresoras. Estas liberan dos tipos de factores: uno que actúa restringido a la región I del sistema H-2 del ratón, y otro que actúa restringido a un locus fuera de la región H-2. Al administrar EPF a ratonas, éste desaparece de la circulación a los 2-4 días, mientras que los factores supresores se detectan al menos durante 14 días.

Lactógeno placentario humano (HPL, HCS)

Las propiedades inhibitorias del lactógeno placentario fueron descritas por Contractor y Davies (1973), y Petrucco y col. (1976) quienes comprobaron que HPL suprimía la proliferación linfocitaria a concentraciones de 25-50 $\mu\text{gr/ml}$. No obstante, Morse (1976) encuentra después de cuidadosas purificaciones que el HPL suprime la proliferación linfocitaria inducida por PHA y el cultivo mixto linfocitario a concentraciones superiores a 1000 $\mu\text{gr/ml}$. Es posible que un contaminante sea el responsable de los efectos inhibitorios observados con HPL ya que los valores máximos encontrados en suero de embarazada (7-10 $\mu\text{gr/ml}$) y placenta (200 $\mu\text{gr/ml}$) son insuficientes para suprimir la respuesta inmune.

Gonadotrofina coriónica humana (hCG)

La gonadotrofina coriónica humana es una glicoproteína, cuyos niveles se elevan rápidamente en el primer trimestre del embarazo hasta 100 U.I./ml cayendo posteriormente por debajo de 60 U.I./ml. Los trabajos realizados con HCG sin purificar demuestran que valores por debajo de 4000 U.I./ml prolongan la supervivencia de aloinjertos de piel (Pearse y Kaiman, 1967), disminuyen la reacción injerto contra huesped en ratones (Gulyansky y Fyodorav, 1985a; Shalnev y col., 1985) e inhiben la respuesta proliferativa de linfocitos humanos a células alogénicas y PHA (Contractor y Davies, 1973; Gulyansky y col., 1985b; Shalnev y col., 1985). Sin embargo, la hCG purificada no presenta casi actividad a concentraciones todavía mayores (Maes y Claverie, 1977; Morse y col., 1976). Estos autores demostraron que las actividades inmunosupresoras y hormonales podían separarse por cromatografía, indicando que el factor activo es otra sustancia distinta de la hCG.

Bartocci y col.(1983) investigaron las propiedades inmunosupresoras *in vivo* de hCG purificada y hCG recombinada a partir de subunidades purificadas. Se comprobó que estas hCG inhiben la respuesta de hipersensibilidad tardía de ratones a hematies de carnero. Pero para esto se necesita la presencia de las gónadas, ya que en ratones castrados no se demuestra el efecto inmunosupresor de la

hCG. El mecanismo de acción de la hCG es desconocido pero quizás esté relacionado con las prostaglandinas, ya que la indometacina y la aspirina son capaces de inhibir su actividad inmunosupresora (Bartocci y col.1982).

Shalnev y col.(1985) han demostrado que la hCG disminuye la actividad NK, no modifica la actividad de células T supresoras y aumenta la capacidad inmunosupresora de los glucocorticoides.

Castilla y col. (1989) han detectado una disminución de células CD4⁺ en primer y segundo trimestre de embarazo. Así, la proporción células CD4⁺ presenta una curva de variación inversa a la hCG. Esto ya había sido observado por Canepa y col. (1984) quienes demostraron una correlación inversa entre estos dos parámetros.

Proteína A plasmática asociada al embarazo (PAPP-A)

Es una α -2-macroglobulina no caracterizada completamente y sintetizada por el trofoblasto. Sus niveles séricos se elevan progresivamente durante el embarazo pero, principalmente, durante el tercer trimestre. La concentración decrece rápidamente después del parto con una vida media de 3 a 4 días, siendo indetectable después de 4-6 semanas. Se ha demostrado que la PAPP-A posee la capacidad de disminuir significativamente la transformación linfoblástica inducida por mitógenos (Stimson, 1983).

Proteína placentaria 15 (PP15)

Forma parte del grupo de proteínas solubles extraídas del tejido placentario. Se encuentra a muy baja concentración en suero materno, y es capaz de inhibir el cultivo linfocitario mixto (Bohn, 1985).

Inhibidor de la síntesis de prostaglandinas asociado al embarazo (PAPSI)

El suero de embarazada presenta diversas propiedades antiinflamatorias, como por ejemplo, la capacidad de estabilizar los lisosomas de leucocitos aislados, de modificar la función de los neutrófilos y de suprimir la liberación de enzimas lisosomiales por los macrófagos.

Se ha identificado una proteína del suero asociada al embarazo, PAPSI, la cual es responsable de gran parte de esta actividad antiinflamatoria (Stimson, 1983). Esta proteína inhibe *in vitro* el paso de ácido araquidónico a prostaglandinas (Kuehl y col., 1977), pero la dosis necesaria para obtener el 50% de inhibición (ID_{50}) fue mucho mayor que para la indometacina. Sin embargo, *in vivo*, se ha comprobado que ID_{50} para PAPSI es mucho menor que para indometacina, mostrándose el PAPSI como un efectivo inhibidor de la síntesis de prostaglandinas *in vivo*. PAPSI se ha detectado en el citoplasma de células trofoblásticas durante la gestación, excepto al término (Stimson, 1983).

UNIDAD FETOPLACENTARIA

TEORIA DEL FIBRINOIDE

El fibrinoide es una mucoproteína sulfatada y rica en ácido sialico, y que fue propuesta como protectora del trofoblasto (Kirby y col., 1964). Dicha protección la ejercería por camuflaje de los determinantes antigénicos trofoblásticos o por repulsión electrostática de los linfocitos. Estudios que apoyaban esta teoría, tales como el incremento de la inmunogenicidad del trofoblasto tras el tratamiento con neuraminidasa (Currie y col., 1968), no han podido ser confirmados por otros autores (Searle y col. 1975). Además la capa de fibrinoide no es una capa continua en la placenta hemocorial, por lo tanto no podría proteger al trofoblasto en su totalidad (Lala y col. 1984).

Stein-Werblowsky (1981) supuso la existencia de una barrera de α -2-macroglobulina a nivel del endotelio vascular placentario. La α -2-macroglobulina depositada formaría una barrera física entre leucocitos maternos y fetales, sin embargo esta teoría, tampoco ha sido confirmada.

ANTIGENICIDAD Y/O INMUNOGENICIDAD DEL EMBRION

Las células del sistema inmune materno tienen la capacidad de atravesar la barrera mucosa uterina hasta la luz del tracto reproductor. La zona pelúcida protege al blastocisto de las células maternas inmunológicamente competentes. Sin embargo, al iniciarse la implantación la zona pelúcida se pierde, quedando el blastocisto vulnerable al ataque materno, lo que se podría ver favorecido, además, por la ruptura de la barrera mucosa durante la implantación. Por lo tanto la antigenicidad del embrión preimplantado es de gran importancia para el desarrollo posterior. Estudios en ratones llevados a cabo por Lala y Kim (1984) demuestran la presencia de antígenos H-2 en el estadio de mórula y al comienzo del estadio de blastocisto. Sin embargo, no se detectan antígenos H-2 en blastocistos tardíos, próximos a la implantación, lo cual explicaría su falta de inmunogenicidad y, por tanto, de rechazo. No se sabe a que es debido la falta de expresión de antígenos MHC de clase I en el embrión preimplantado, estos autores consideran que puede haber una represión temporal de los genes MHC en las células del blastocisto en este estadio, justo antes de que la implantación tenga lugar. El embrión postimplantado presenta en su superficie celular antígenos del sistema mayor y menor de Histocompatibilidad (Edidin 1972; Jenkinson y Billington; 1977, Kirwood y Billington,

1981). A pesar de esto, el embrión postimplantado no provoca una reacción de rechazo, ya que la placenta lo protege del sistema inmune materno.

Se ha demostrado que el embrión humano preimplantado produce factores inmunosupresores (EASF) que podrían jugar un importante papel en el mantenimiento del embarazo en los estadios más precoces (Bose, 1989, Daya y Clark, 1986). Bose (1989) purifica estas sustancias mediante cromatografía con DEAE-celulosa y demuestra la existencia de, al menos, tres clases de factores inmunosupresores: a) Los producidos antes de la implantación pero que desaparecen después de que esta se produzca. Estos actuarían suprimiendo la respuesta celular materna en los primeros estadios de la interacción materno-fetal. Estos factores no aparecen en el suero de la embarazada. b) Los producidos por el embrión preimplantado pero que continúan después de la implantación para mantener un micrambiente de inmunosupresión. c) Los producidos después de la implantación y que aumentan el estado de inmunosupresión. Los dos últimos tipos de EASF aparecen también en el suero de la embarazada.

Bose (1989) no determina la naturaleza exacta de los EASF. Sin embargo, sugiere que pueden estar constituidos por una molécula básica asociada a una proteína transportadora de diferente peso molecular, y diferentes propiedades bioquímicas.

ANTIGENICIDAD Y/O INMUNOGENICIDAD DE LAS MEMBRANAS FETALES

El saco ovular humano está compuesto por dos membranas: el corion por fuera, y el amnios por dentro. Ambas son derivados fetales.

Recientes estudios (Hunt y col., 1988; Hsi y col., 1988) demuestran que las células amnióticas sintetizan y expresan moléculas, que son reconocidas por anticuerpos monoclonales dirigidos contra determinantes monomórficos de antígenos HLA de clase I. Además, contienen mRNA que hibrida con la sonda pHLA1.1, complementaria de los genes que codifican los antígenos HLA de clase I. No se han descrito uniones entre estos antígenos de clase I expresados por las células amnióticas y antisueros dirigidos frente a los ags HLA derivados de la madre o del padre. Sin embargo, se han observado que las células amnióticas reaccionan con anticuerpos monoclonales dirigidos frente a antígenos del locus HLA-B (Yang y col. 1984). Por lo tanto, es posible que las células amnióticas sintetizen antígenos HLA de clase I completos e incompletos (o "no clásicos", de los que hablaremos más adelante).

Diversos factores regulan la expresión de estos antígenos *in vitro*. El IFN-gamma incrementa los niveles de mRNA de clase I en las células amnióticas (Hunt y col., 1988) y la expresión de ags. de Clase I (Hunt y Wood, 1986). Por otra parte, el EGF (factor de crecimiento

epidérmico), para el cual las células amnióticas tienen receptores (Chegini y Rao, 1985), posee efectos antagónicos al IFN-gamma. El EGF disminuye el mRNA de clase I en preparaciones de células amnióticas y la expresión de antígenos HLA de clase I (Schreiber y col., 1984).

En el mesénquima amniótico se han identificado células HLA-DR⁺ de aspecto macrofágico. Su número se incrementa a partir del segundo trimestre de gestación (Bulmer y Johnson 1984; Sutton y col., 1986). A estas células se les ha atribuido una función defensiva frente a las infecciones transplacentarias (Sutton y col., 1986)

Las células citotrofoblásticas de la membrana coriónica son clase II negativas pero expresan antígenos HLA de clase I "no clásicos" (Ellis y col., 1986).

ASPECTOS INMUNES DEL TROFOBLASTO

Poblaciones celulares del trofoblasto humano (Loke y Butterworth, 1987)

Una heterogénea población de células trofoblásticas se pone en contacto con los tejidos maternos a lo largo del embarazo. Históricamente el sincitiotrofoblasto veloso ha recibido la mayor parte de la atención en los estudios de la interfase materno fetal. Pero, actualmente, está reconocido que otros tipos celulares también pueden jugar

un importante papel en la inmunorregulación.

Las vellosidades coriónicas están envueltas por dos capas de trofoblasto. La más interna se denomina capa de Langhan y está formada por citotrofoblasto, y la más externa esta integrada por células del sincitiotrofoblasto. En el fondo de algunas vellosidades las células citotrofoblásticas proliferan, atraviesan el sincitiotrofoblasto y forman columnas de citotrofoblasto que anclan las vellosidades al útero. De estas columnas se desprenden algunas células que adoptan una morfología irregular y se disponen entre las vellosidades coriónicas y la decidua subyacente. Conforme progresa el embarazo estas células se infiltran de material fibrinoide. Las células citotrofoblásticas, aisladas o en grupos, continúan migrando a través de la decidua para llegar incluso al miometrio. Estas constituyen el llamado citotrofoblasto intersticial. Algunas de estas células intersticiales se transforman en células gigantes multinucleadas. Por último, en las arterias espirales también se pueden encontrar células citotrofoblásticas que eventualmente reemplazan al endotelio, es el trofoblasto endovascular.

De forma general al citotrofoblasto que forma parte de las vellosidades se le denomina citotrofoblasto vellositario y al que se detecta fuera de las vellosidades, en las distintas localizaciones arriba citadas, se le llama citotrofoblasto extravellositario.

Expresión de antígenos HLA

Los antígenos HLA son esenciales para las funciones de reconocimiento inmune. Los diferentes antígenos HLA son reconocidos por diferentes tipos de células T. Los antígenos de clase I son las estructuras blanco de las células T citotóxicas, mientras que los antígenos de clase II son reconocidos por las células T CD4⁺ en el proceso de presentación del antígeno. Por tanto, es fundamental conocer el grado de expresión de estos antígenos por parte del trofoblasto para entender la inmunobiología de las complejas interacciones materno-fetales.

Estudios inmunohistológicos revelan una falta de expresión de antígenos HLA de clase I y II en el citotrofoblasto vellositario y en el sincitiotrofoblasto (Suderland y col., 1981; Johnson y col., 1981; Faulk y McIntyre, 1983; Johnson, 1984; Bulmer y Johnson, 1985a). Esta falta de expresión antigénica ha sido confirmada a nivel genético. La transcripción genética de la β 2-microglobulina es escasa, e inexistente para los genes que codifican las cadenas pesadas de los ags. HLA de clase I (Kawata y col., 1984).

Por otra parte, las células del citotrofoblasto extravellositario expresan antígenos de clase I, pero no de clase II. Ellis y col. (1986) determinan que este antígeno de clase I es una glicoproteína no-polimorfa con una cadena pesada de solo 40 kD asociada a la β 2 microglobulina. Se ha

especulado si esta molécula es una variedad de antígeno HLA-C, o bien, si es un antígeno HLA "no clásico" o antígeno HT (equivalente a los antígenos Qa/T1a del ratón) (Redman y col., 1984; Hsi y col., 1984; Wells y col., 1984; Bulmer y Johnson, 1985a).

De otro lado, es conocido que el IFN-gamma induce un incremento de la expresión de antígenos HLA en todas las células nucleadas. Sin embargo, Hunt y col. (1987) mediante estudios inmunohistológicos, determinan que el trofoblasto humano permanece refractario al efecto del IFN-gamma. Estudios posteriores (Feinman y col., 1987) usando trofoblasto a término, encuentran que el IFN-gamma incrementa 1,8 veces la cantidad del mRNA que codifica los antígenos HLA de clase I. Una posible explicación a la discordancia que muestran estos dos hallazgos podría ser que el IFN-gamma induce en el trofoblasto humano un incremento de la transcripción y, quizás, de la traslación de los antígenos HLA de clase I, pero no aumentaría su expresión en la superficie de la célula (Loke, 1989).

¿Que papel pueden jugar los antígenos HLA de clase I "no clásicos" en la reproducción? Una posibilidad sería la "Hipótesis del inmunotropismo placentario de Wegmann" (Wegmann, 1987) que dice: "El reconocimiento por parte de los linfocitos T maternos de los aloantígenos extraños expresados por las células trofoblásticas da lugar a la liberación de linfoquinas por esos linfocitos T, tales

linfoquinas podrían mejorar el crecimiento y la función placentaria. Dos experimentos en ratón apoyan esta hipótesis. En primer lugar, la deplección de linfocitos T maternos durante el embarazo reduce el crecimiento placentario a la mitad (se mide por incorporación de ^3H *in vivo*). En segundo lugar, las linfoquinas IL-3 y GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos) estimulan el crecimiento del trofoblasto murino cuando se mantiene en cultivo más de un año. El GM-CSF es producido, además, por una gran variedad de células, tales como fibroblastos, macrófagos y células endoteliales (Munker y col., 1986; Zucañi y col., 1986; Thorens y col., 1987) y está presente en los sobrenadantes de células deciduales (Wegmann, 1988). Sin embargo, la IL-3 no se ha detectado en decidua (Clark, 1989). No obstante, queda por confirmar si la hipótesis de Wegmann es aplicable o no al embarazo humano.

Antígenos TLX

Faulk y cols. (1978) definieron dos tipos de antígenos en el trofoblasto:

- antígeno TA1, expresado únicamente en el trofoblasto y en algunas células tumorales. Son antígenos especie específicos. Preparaciones de antígeno TA1, así como antisueros frente a TA1, inhiben el cultivo mixto linfocitario (MLC).

- Antígeno TA2, que se conoce como antígeno de reacción cruzada trofoblasto-linfocito (TLX).

El antígeno TLX se detecta en todas las células del trofoblasto (Johnson, 1984), en células tumorales embrionarias (como el teratocarcinoma) y trofoblásticas (como el coriocarcinoma) (McLaughlin y col., 1982), en linfocitos de sangre periférica (Faulk y McIntyre, 1983), en plaquetas (Faulk y McIntyre, 1983; Kajino y col., 1987) y en plasma seminal (Kajino y col., 1988).

Es reconocido por el anticuerpo monoclonal H316 (McLaughlin y col., 1982; Bulmer y col., 1984; Bulmer y Johnson, 1985a). Este detecta dos glicoproteínas de superficie de 55 y 65 kD de peso molecular (Stern y col., 1986), que pueden representar productos de un mismo gen o de dos genes distintos.

Se han realizado muchos estudios acerca del hipotético papel que los antígenos TLX tienen en el desarrollo embrionario y fetal. McIntyre (1988), basándose en la evidencia serológica de que existen variedades alotípicas de antígenos TLX, sugiere que el hecho de que una pareja presente distintos alotipos de TLX da lugar a la señal responsable del reconocimiento materno y mantenimiento del embarazo. La compatibilidad TLX entre una pareja puede dar lugar a una falta de señal, lo que conduciría a abortos recurrentes espontáneos.

Antígenos relacionados con los grupos sanguíneos

Los antígenos del sistema ABO no se expresan en el trofoblasto humano. Sin embargo, un reciente estudio (King y Loke, 1988) que utiliza anticuerpos monoclonales dirigidos frente a carbohidratos fucosilados y sialicados, localiza el antígeno sialyl-Le^x en el trofoblasto extravellocitario de embarazos normales, en molas y en células del coriocarcinoma.

Fosfatasa alcalina placentaria y Receptores de factores de crecimiento

La isoenzima placentaria de la fosfatasa alcalina (PLAP) es fuertemente expresada por el sincitiotrofoblasto después del primer trimestre del embarazo, pero no se expresa en otras poblaciones trofoblásticas (Bulmer y Johnson, 1985a; Johnson, 1984). Como los antígenos TLX, PLAP se detecta, además, en una gran variedad de tumores (Risk y Johnson, 1985). Aunque las funciones biológicas de la PLAP se desconocen, se ha observado que esta enzima tiene la capacidad de desfosforilar residuos fosfotirosina en proteínas a pH neutro (Swarup y col., 1981). Las células del sincitiotrofoblasto, así como muchos tumores PLAP positivos, expresan receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y para la insulina (Avruch y col., 1982; Carson y col., 1983; Richards y col. 1983). Estos receptores están asociados con actividad tirosil

quinasa, la cual es esencial para la proliferación celular. La PLAP puede, por lo tanto, regular el crecimiento celular y de tumores relacionados, mediante desfosforilación de fosfotirosilproteínas (Risk y Johnson, 1985).

La transferrina es otro importante factor de crecimiento celular. El receptor para la transferrina se expresa en el sincitiotrofoblasto y no en otras poblaciones trofoblásticas (Johnson, 1983; Johnson y Molloy, 1983).

También se han detectado en la placenta humana receptores de alta afinidad para TNF- α (Eades y col., 1988). Esta citoquina, que es producida fundamentalmente por los macrófagos, tiene la capacidad de necrosar tumores poco antigénicos. El TNF- α , además, presenta actividad antitrofoblástica, pudiendo inducir abortos (Clark, 1989). Sin embargo, el trofoblasto tiene la capacidad de activar y reclutar células supresoras (no T) en la decidua que liberan una molécula, similar al TGF- β , capaz de inhibir tanto la producción como la actividad del TNF- α (Clark y col., 1988).

En la Tabla I hacemos un breve resumen de la expresión de antígenos MHC y TLX, de PLAP, y de receptores para transferrina y EGF en las poblaciones del trofoblasto humano.

Tabla I: Marcadores de superficie en las distintas poblaciones del trofoblasto humano (Johnson y col., 1987)

Población celular	HLA Clase I	HLA Clase II	TLX	Receptor para transferrina y EGF	PLAP
Sincitiotrofoblasto vellosos	-	-	+	+	+
Citotrofoblasto vellosos	-	-	+	-	(+)
Citotrofoblasto extraveloso en el lecho placentario	<u>±</u> *	-	+	-	(<u>±</u>)
Citotrofoblasto coriónico	<u>±</u> *	-	+	-	(<u>±</u>)

+, positivo; ±, las células son variablemente positivas o negativas; (+), debilmente positivo; -, negativo.

*las células reaccionaron con el anticuerpo monoclonal W6/32, pero no expresan determinantes polimórficos HLA-A o B.

Inmunosupresión y resistencia a la citólisis

Numerosos estudios concluyen que las células trofoblásticas pueden ser una fuente de actividad inmunosupresora (Barg y col., 1978; Golander y col., 1981; Hamoaka y col., 1983). Se ha observado, tanto en placenta murina (Duc y col., 1987) como en humana (Saji y col., 1987), la síntesis de factores solubles de carácter proteico que inhiben la actividad NK frente a células K562 y otras actividades linfocitarias, como el cultivo mixto linfocitario y la inducción de linfocitos T citotóxicos (Hamoaka y col., 1987). También el trofoblasto tiene la capacidad de reclutar y activar células supresoras no T en la decidua (Slapsys y col., 1988). Estas células, como ya se ha dicho anteriormente, liberan TGF- β , capaz de inhibir la actividad y la producción de TNF- α (Clark y col., 1988).

Las células trofoblásticas murinas en cultivo son resistentes a la citotoxicidad mediada por células T, por células NK y por mecanismos ADCC (Zuckermann y Head, 1987; Zuckermann y Head, 1988). Recientes estudios (King y col., 1989) en humanos, revelan que, las células trofoblásticas también son resistentes a la lisis mediada por las células NK de sangre periférica y deciduales. Esta resistencia frente a la actividad de células citotóxicas, podría ser un mecanismo clave en la protección fetal. Sin embargo, recientemente se ha observado en ratón que el trofoblasto puede ser lisado por células NK activadas con IL-2 (células

LAK) (Drake y Head, 1988). No se ha determinado si en la interfase materno-fetal se produce IL-2 que pudiera inducir la generación de células LAK, por lo que no sabemos si estas podrían ser potencialmente peligrosas para el trofoblasto, de tal forma, que se necesitara un mecanismo para bloquear la generación de estas células. No obstante, Soubiran y col. (1987) demostraron en la placenta humana a término la presencia de una sustancia que mostraba epítopos comunes con la IL-2. A esta sustancia, más que un papel activador de células inmunes, se le ha atribuido una función trófica y también inmunosupresora, ya que podría competir localmente con la IL-2 secretada por los linfocitos activados.

RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE MATERNO A LOS ANTIGENOS FETALES

Durante la gestación se produce una amplia variedad de anticuerpos frente a antígenos fetales (Tabla II). A continuación analizaremos los más importantes.

Ac Anti-Sincitiotrofoblasto

Numerosos estudios describen, en el embarazo humano normal, respuesta de anticuerpos frente al trofoblasto (Hulka y col., 1963; Burstein y Blumenthal, 1969; Nakakita, 1972). Billington y Davies (1987) desarrollan una técnica de ELISA para la detección de tales anticuerpos usando vesículas sincitiotrofoblásticas como antígeno. Las vesículas de trofoblasto reaccionaron con el suero de diferentes mujeres en varios estadios de gestación. Esto implica la presencia, en el suero de las embarazadas, de anticuerpos que están dirigidos frente a determinantes tejido-específicos. También estudiaron el tipo y la evolución de los niveles de estos anticuerpos en primigestas y segundigestas, y obtuvieron los siguientes resultados:

- En primigestas, se detectaron anticuerpos tipo IgG en el 77% de las mujeres estudiadas y anticuerpos tipo IgM en el 48%. La actividad anticuerpo fue máxima durante el primer trimestre de gestación. Mientras que los de tipo IgG

Tabla II: Antígenos fetales y placentarios frente a los que la madre desencadena una respuesta inmune (Wegmann y Gill, 1983).

Antígenos	Especie	Tipo de Respuesta	
		humoral	celular
HLA-ABC	Humana	+	+
HLA-DR	Humana	+	
H-2	Ratón	+	+
RT1	Rata	+	+
Sincitiotrofoblasto	Humana	+	+
TLX	Humana	+	
ABO	Humana	+	
Factor Rh	humana	+	+
H-Y	humana ratón	+	+

se detectan a lo largo de todo el embarazo, los anticuerpos IgM descienden hacia niveles muy bajos en la décima semana de gestación.

- En segundigestas, descienden los niveles de anticuerpos. Los de tipo IgG se detectan en el 61% de mujeres y los de IgM en el 42%. La cinética de la respuesta es comparable a la de las primigestas, aunque los niveles medios de anticuerpos son sustancialmente más bajos a lo largo del embarazo. También la cantidad de anticuerpos antitrofoblasto descienden en los siguientes embarazos.

En primigestas, la mayor parte de estos anticuerpos están formando complejos inmunes y persisten a lo largo de la gestación. En segundigestas, el nivel de anticuerpos asociados a complejos es sólo ligeramente superior al nivel de anticuerpos libres al comienzo del embarazo, pero descienden rápidamente en el tercer trimestre y son indetectables después de las 32 semanas.

En resumen, los anticuerpos dirigidos contra determinantes del sincitiotrofoblasto aparecen en la mayor parte de los embarazos humanos y contribuyen a la formación de complejos inmunes. Tales anticuerpos se desarrollan principalmente en el primer embarazo y al principio del segundo.

Estos anticuerpos antitrofoblasto no tienen relación con los anticuerpos anti TLX. Su función sería la de actuar como anticuerpos bloqueantes que protegerían la placenta

del reconocimiento y de la respuesta inmune materna. De todas formas, el papel real de los mismos queda todavía por determinar.

Anticuerpos anti HLA

En la mujer, la mayor parte de anticuerpos citotóxicos inducidos durante el embarazo están dirigidos contra ags HLA paternos (Snell y col., 1976). Se producen anticuerpos frente a antígenos polimórficos, tanto de clase I como de clase II (Borelli y col. 1982).

Se tienen evidencias de la expresión de antígenos HLA de clase I "no clásicos" (moléculas no-polimórficas) en el trofoblasto extravelositario y en células de coriocarcinoma (Ellis y col., 1986). El embrión preimplantado no parece expresar ninguna molécula de clase I (Desoye y col., 1988), y tampoco parece que el trofoblasto velositario exprese en ningún estadio de la gestación antígenos polimórficos de clase I, (Loke, 1989).

De otro lado, no se han detectado antígenos MHC de clase II en ninguna población trofoblástica de ninguna especie. Sin embargo, durante el embarazo, la mujer se sensibiliza frente a antígenos de clase I y de clase II; esto se debe al paso de linfocitos fetales a la circulación materna (Herzenberg y col., 1979). Tales células pueden ser detectadas a partir de la 15ª semana de gestación y son la fuente más probable de ags HLA de clase I y II paternos.

El paso de estos anticuerpos citotóxicos al feto podría ser perjudicial. Sin embargo, se conoce que la placenta es un eficiente inmunoabsorbente, y previene la entrada de anticuerpos anti-HLA a la circulación fetal (Wegmann y col., 1979a, b).

El sincitiotrofoblasto posee receptores Fc para IgG e IgM (Davies y col., 1981) y se pensó que la capacidad de inmunoabsorción se podría deber a estos receptores, pero Wegmann y Gill (1983) comprobaron que estos no eran necesarios para la función inmunoabsorbente de anticuerpos antipaternos.

Estudios realizados en ratones (Raghupathy y col., 1984) demuestran que los anticuerpos anti MHC paternos se fijarían a los antígenos MHC presentes en la placenta para ser internalizados y degradados. Una parte de los productos de la descomposición podría ser liberada a la circulación materna. Algunos autores sugieren, que otra parte de las proteínas degradadas podría utilizarse como fuente de aminoácidos esenciales para el feto (Wild, 1979). Además, los macrófagos que se han identificado en el estroma placentario podrían eliminar los anticuerpos que han sido desnaturalizados por la placenta (Raghupathy y col., 1984).

Junto con los anticuerpos citotóxicos, ya descritos, la mujer embarazada puede sintetizar también anticuerpos anti-HLA bloqueantes. Numerosos estudios (Greenberg y col., 1973; Robert y col., 1973, Brochier y col., 1974) describen

en el suero de gestantes actividad inhibidora del MLR debida a la presencia de estos anticuerpos bloqueantes que enmascararían los antígenos HLA-DR de las células estimuladoras (Albrechtsen y col., 1977). Estos anticuerpos están presentes en suero durante el primer trimestre de gestación. Anticuerpos similares son inducidos por transfusiones sanguíneas, y su presencia se correlaciona con un aumento de la supervivencia del aloinjerto renal (McLeod y col., 1983). Los anticuerpos bloqueantes capaces de inhibir la reacción mixta linfocitaria entre linfocitos maternos y linfocitos paternos o fetales se detectan en el suero de aproximadamente el 50% de mujeres embarazadas (Jonker y col., 1977). Por lo tanto, no son esenciales para el desarrollo normal del embarazo, aunque pueden estar implicados en mecanismos de inmunorregulación materna en aquellos casos donde ocurra aloinmunización.

Anticuerpos anti-TLX

Anticuerpos anti-TLX han sido detectados en sueros de primigrávidas (McIntyre, 1988). Aunque el suero de una primigrávida normal no es citotóxico, cuando en el laboratorio se consigue una disociación de complejos idiotipo-antiidiotipo, el suero de la embarazada muestra una elevada citotoxicidad frente a los linfocitos de su pareja y frente a un panel linfocitario (Faulk y McIntyre, 1986). Estos datos sugieren que las mujeres embarazadas

normales producen anticuerpos frente a los antígenos TLX paternos, pero que no se detectan rutinariamente porque son bloqueados por anticuerpos antiidiotipo también producidos por la madre (Faulk y col., 1987).

El éxito del embarazo necesita la formación de una adecuada red entre anti-TLX y su anti-idiotipo mientras que la ausencia de tal red o su formación no equilibrada, daría lugar a abortos recurrentes primarios o secundarios respectivamente (McIntyre, 1988).

La necesidad de producir, en una mujer embarazada, una adecuada respuesta inmune frente a estos posibles antígenos TLX constituye la base teórica del tratamiento de las abortadoras habituales con transfusiones de linfocitos de sus parejas (Taylor y Faulk, 1981).

Además de las transfusiones de linfocitos se han ensayado, en las abortadoras crónicas, otras formas de tratamiento que también han dado buenos resultados y ocasionan menos problemas. Se han usado óvulos vaginales de plasma seminal con antígenos TLX (McIntyre, 1988), e infusiones salinas que contienen un pool de sincitiotrofoblasto y que se administran por vía intravenosa (Johnson y col., 1988)

INMUNOBIOLOGIA DEL TEJIDO DECIDUAL

El tejido decidual es el único componente materno de la interfase materno-fetal. Aparece en el útero gestante de ciertos órdenes de mamíferos y ejerce, entre otros, un papel inmunorregulador local en el mantenimiento del embarazo.

Puede ser una mera coincidencia que la reacción decidual ocurra en ciertos mamíferos (roedores, insectívoros, carnívoros y antropoides; Finn y Porter, 1975), en los que las células trofoblásticas oradan el endometrio y permanecen expuestas al sistema inmune materno, y no ocurra en otros, como los ungulados, en los que el endometrio permanece intacto y protegido del trofoblasto. Por lo tanto, parece existir una correlación positiva entre la extensión de la decidualización y el grado de invasión trofoblástica (Finn, 1980).

El tejido decidual se desarrolla en el endometrio gestante inmediatamente después de la implantación del embrión. Es un tejido transitorio, ya que desaparece después del parto. Aunque la reacción decidual ocurre en todo el endometrio, es más intensa en el sitio de implantación (decidua basal) resultado de un apropiado microambiente.

La decidua en la especie murina y humana está formada, principalmente, por células deciduales típicas tipo

estromales (que de ahora en adelante vamos a llamar células deciduales), también contiene fibroblastos, linfocitos, monocitos-macrófagos, granulocitos polimorfonucleares, células endometriales granulares, y vasos sanguíneos (Lala y Kearns, 1984).

Células deciduales

Morfología

Las células deciduales son células grandes aunque de tamaño variable (generalmente tienen 30µm de diámetro en humanos). Son ligeramente vacuoladas, ocasionalmente binucleadas. El núcleo es generalmente excéntrico, redondo u ovoide, con la cromatina uniformemente dispersa y con uno o más nucleolos. El citoplasma es basófilo cuando se tiñe con Giemsa. Estas células son distinguibles de los macrófagos, que muestran el núcleo arriñonado o lobulado con cromatina condensada, el citoplasma es muy vacuolado o espumoso, y presentan propiedades fagocíticas. A nivel ultraestructural, las células deciduales muestran microfilamentos fibrilares (de 5 a 7nm de diámetro) en el citoplasma, retículo endoplásmico dilatado, y varios tipos de uniones intercelulares en la membrana celular (Lala y Kearns, 1984).

Ontogenia

Se han identificado (Kearns y Lala, 1983) a los precursores inmediatos de las células deciduales como células estromales de tipo fibroblástico del endometrio, que aumentan de tamaño, y a través de varios ciclos proliferativos se diferencian a células deciduales. Además, Kearns y Lala (1982) muestran que las células deciduales que aparecen en decíduomas de ratonas son descendientes de precursores de la médula ósea. En estos experimentos, la reacción decidual fue inducida en una raza murina que había sido irradiada y reconstituida con células de médula ósea de un híbrido (F₁) resultante de aparear la raza receptora con otra raza distinta. La identificación autorradiográfica del fenotipo H-2 de las células deciduales mostró la identidad de este con el fenotipo H-2 de los linfocitos esplénicos, y con el de los macrófagos del decíduoma.

Marcadores de superficie

Kearns y Lala (1985b) mediante un estudio autorradiográfico en decidua murina, muestran que las células deciduales son Thy-1[±] (30% en el día 8 y 46% en el día 12), Lyt⁻, Mac-1[±] (8% en el día 8 y 25% en el día 12), I-A⁻, I-J⁻, y H-2⁺, además se detectaron receptores Fc en una gran cantidad de estas células. La presencia de Thy-1 (en ausencia de Lyt e I-J) en una subpoblación de células deciduales indica su relación con células estromales

fibroblásticas más que con células T. Aún no está aclarado si la presencia de Mac-1 en una pequeña población de células deciduales supone que estas tengan alguna relación con los monocitos-macrófagos.

Mediante inmunización singénica de un ratón CBA virgen con células deciduales de ratona CBA del día 11 a 14 de gestación, se han obtenido dos anticuerpos monoclonales que reconocen marcadores específicos de las células deciduales (Kearns y Lala, 1985c; Kearns y col., 1985). Los dos anticuerpos (IgG_{2b} unido a proteína A) son secretados por los clones 16F12 y 2G4F8. Estos anticuerpos reaccionan de forma específica con una variable pero sustancial proporción de células deciduales humanas y de ratas, y no presentan ningún tipo de reacción con el trofoblasto ni con ninguna célula leucocitaria. El antígeno reconocido por el anticuerpo 16F12 ha sido denominado Dec-1.

Además del antígeno Dec-1, Parhar y col. (1988) definen otras características de las células deciduales humanas. Estas células poseen vimentina citoplasmática pero no citokeratina (a diferencia de las células trofoblásticas). No poseen actividad esterasa específica, actividad fagocítica, ni la molécula 63D3 en superficie, lo cual nos permite diferenciarlas de los monocitos. Pulmer y col. (1988b) observan que algunas células deciduales reaccionan débilmente con el anticuerpo monoclonal Dako-Macrófago.

Funciones

Además de jugar un destacado papel nutritivo al comienzo de la implantación, las células deciduales también presentan funciones endocrinas ya que secretan prolactina, estrógenos y progesterona, y además tienen una función inmunorreguladora durante el embarazo semialogénico (Lala y Kearns, 1984).

Las células deciduales representan una importante clase de células supresoras en la decidua humana temprana, capaces de suprimir la alorreactividad linfocitaria (Parhar y col., 1988). Según estos autores el efecto supresor se ejerce tanto en el inicio como en la progresión del MLR. La PGE_2 se identificó como el mediador molecular más importante en esta inmunosupresión en base a los siguientes resultados: (1) la presencia de indometacina ($10^{-5}M$) o anticuerpos anti PGE_2 inhiben esta supresión; (2) la adición de PGE_2 pura, pero no de $PGF_{2\alpha}$, produce efecto supresor de manera dosis-dependiente; (3) los niveles de PGE_2 medidos en el día 4 del MLR en los pocillos que contienen células deciduales se correlacionan positivamente con la cantidad de células deciduales o el grado de supresión. La presencia de células deciduales o PGE_2 al principio del MLR también inhibe la generación de citotoxicidad mediada por células T.

La supresión del MLR parece ser el resultado de la acción de la PGE_2 sobre dos eventos de la activación

linfocitaria: (1) disminución de la expresión del receptor para la IL-2, e (2) inhibición de la producción de IL-2.

Se sabe que las prostaglandinas son sintetizadas en el amnios, corion y decidua humanos (Contractor, 1983) así como en la decidua murina (Vladimirsky y col., 1977).

A la PGE₂ se le reconoce su capacidad para suprimir *in vitro* las respuestas de virtualmente todas las células del sistema inmune (Goodwin y Ceuppens, 1983). La PGE₂ liberada por la decidua podría, por tanto, suprimir la activación de todas las líneas celulares con capacidad lítica *in situ*, las cuales podrían ser potencialmente dañinas para el trofoblasto (Lala y col, 1988).

El componente leucocitario de la decidua incluye varias subpoblaciones de células T, LGL y macrófagos (Kearns y Lala, 1985a). Ya que el trofoblasto presenta aloantígenos MHC (Ellis y col., 1986) y estructuras blanco para las células NK (Chatterjee-Hasrouni y col., 1984), la inactivación de las células T y de las células NK en la decidua, mediada por la PGE₂ puede ser importante para la supervivencia del concepto. Sin embargo, otros estudios muestran que la resistencia del trofoblasto a la lisis mediada por estas células no es debida a la inmunosupresión ejercida por la PGE₂ (Head y col., 1987). Además, Smith y Kelly (1988) han mostrado que aunque el tejido decidual posee una elevada capacidad para producir PGs *in vitro*, esta capacidad es suprimida *in vivo* por la progesterona, y

solo se producen PGs en grandes cantidades cuando el tejido se lava liberándose de esa supresión.

Matsui y col. (1989) identifican una sustancia secretada por las células deciduales que es capaz de inhibir la proliferación linfocitaria. Esta sustancia tiene un peso molecular comprendido entre 43000 y 67000 kD, por lo tanto, no es ningún tipo de PG.

Macrófagos deciduales

Macrófagos CD14⁺ constituyen una importante población leucocitaria en la decidua humana a través del embarazo. Poseen actividad fosfatasa ácida y esterasa no específica y son HLA-DR⁺ ((Sutton y col., 1983; Bulmer y Johnson, 1984).

Normalmente, los macrófagos están íntimamente asociados con el trofoblasto extravellocitario en la placa basal (Bulmer y Johnson, 1984; Kabawat y col., 1985, Bulmer y col., 1988c).

Los macrófagos deciduales pueden jugar, en principio, un papel fagocítico en el embarazo humano normal. Sin embargo, también pueden participar en las interacciones inmunes materno-fetales. Oksenberg y col.(1986) han demostrado que estas células poseen capacidad de presentación de antígeno y Lala y col. (1986) les han atribuido una función inmunosupresora mediada por la PGE₂.

Linfocitos deciduales

Otro grupo importante de leucocitos en la decidua humana son los linfocitos granulares deciduales (dGL), que son LGL. Inicialmente fueron descritos por Bulmer y Suderland (1984) como una inusual población linfoide CD2⁺ CD3⁻ que también expresa marcadores de células NK, el CD56 (Ritson y Bulmer, 1987). Estudios inmunohistoquímicos de tejidos incluidos en parafina y de suspensiones celulares han mostrado, que estos linfocitos granulados son análogos a los granulocitos endometriales estromales definidos previamente por Bulmer y col. (1987). Estos son abundantes en el estroma endometrial en el primer trimestre del embarazo y también en la fase lútea del ciclo menstrual (Ritson y Bulmer, 1987; Marshall y Jones, 1988; Bulmer y col., 1988a).

Recientemente se ha llevado a cabo un estudio de los linfocitos granulares deciduales (dGL) mediante citometría de flujo (Starkey y col., 1988). Estos autores han logrado distinguir tres subpoblaciones de dGL: células CD3⁻ CD56⁺ CD16⁻ CD2⁻, células CD3⁻ CD56⁺ CD16⁻ CD2⁺ (estas y las anteriores son las más abundantes) y una pequeña proporción de células CD3⁻ CD16⁺ que expresaban débilmente el antígeno CD56.

La mayor parte de los estudios inmunohistológicos de la decidua humana detectan una escasa proporción de

linfocitos T clásicos (CD3⁺) y linfocitos B (Bulmer y Suderland, 1984; Bulmer y Johnson, 1986; Khong, 1987; Starkey y col., 1988; Lessin y col., 1988)

Celulas supresoras

La actividad supresora en la decidua murina es atribuida a una población de linfocitos pequeños, granulados, con receptor Fc, y que no expresan marcadores de células T o B; esta actividad supresora está mediada por factores solubles que bloquean la respuesta linfocitaria a la IL-2 (Clark y col., 1986). Recientemente se ha relacionado este factor soluble con el TGF- β (Clark y col., 1988). Sin embargo, la procedencia de estas células supresoras, así como su relación con otros tipos celulares, queda aún por aclarar.

En la fase lutea existe un estado de inmunosupresión hormono-dependiente, que parece estar mediado por macrófagos y linfocitos T supresores. Las células CD8⁺ pueden expresar receptor para la progesterona (Szekeres-Bartho y col., 1985), por lo que es posible que la supresión hormono-dependiente esté mediada por linfocitos CD3⁺ CD8⁺, que se detectan en endometrio gestante y no gestante (Bulmer y col., 1988a; Marshall y Jones, 1988).

Daya y col. (1989) muestran que en la decidua humana de embarazos normales existen células supresoras inducidas por el trofoblasto. Son células pequeñas que aparecen en la

decidua de primer trimestre de embarazos normales y liberan factores solubles que bloquean a la IL-2. Estos factores solubles tienen un peso molecular de 22 y 44 kD, respectivamente (Daya y col. 1987). Estos datos son similares a los hallados en sistemas murinos, donde las pequeñas células supresoras se localizan en el sitio de la implantación, y parecen ser linfocitos granulados no T.

Resumiendo todo lo anteriormente expuesto, la línea y distribución de las células responsables de la inmunosupresión en la decidua humana y murina están todavía por aclarar. Hasta el momento no se ha podido establecer la correlación entre los estudios funcionales y las células identificadas por inmunohistoquímica. Macrófagos, linfocitos CD3⁺ CD8⁺ y linfocitos granulados parecen ser los responsables de la actividad supresora de la decidua humana, pero el papel de las poblaciones no leucocitarias, tales como las células epiteliales glandulares y las células deciduales estromales, también debe ser tomado en cuenta.

Células NK. Actividad NK

Se ha encontrado actividad NK en suspensiones deciduales murinas, alcanzando un pico máximo el día 6'5 de gestación (Croy y col., 1985). Las células NK asialo-GM1⁺ se localizaron en la decidua basal (Croy y Kassouf, 1989). Además de estas células, en la decidua murina se han

detectado unas células grandes y granulares que forman parte de las glándulas metriales y que se han denominado granulocitos metriales glandulares (GMG) (Stewart y Peel, 1980; Stewart, 1984). Recientes estudios de inmunofluorescencia muestran que las células GMG expresan asialo-GM1 y antígeno Thy1 (Mukhtar y Stewart, 1989). Estos resultados junto con el hallazgo de perforina en sus gránulos (Parr y col., 1987), sugiere que las células GMG pueden ser un tipo de células NK. Sin embargo, las células GMG en cultivo son incapaces de lisar células YAC (Croy y Kassouf, 1989). Los sobrenadantes de cultivos de células GMG pueden suprimir la respuesta linfocitaria a mitógenos y la lisis de células YAC mediadas por células NK esplénicas. Por lo tanto, las células GMG podrían mediar un estado de inmunosupresión (Croy y Kassouf, 1989).

La detección de linfocitos granulados CD56⁺ en la decidua humana ha llevado a distintos autores a determinar su actividad NK. King y col. (1989) aíslan leucocitos de decidua humana de primer trimestre y demuestran que poseen actividad NK frente a células K562, pero son incapaces de lisar a las células del trofoblasto.

Como ya hemos referido anteriormente las células del trofoblasto murino y humano son resistentes a la lisis mediada por actividad NK. Sin embargo, el trofoblasto murino es susceptible a la lisis mediada por células LAK (Drake y Head, 1988). En el embarazo normal parece existir

un mecanismo de inhibición de la IL-2, por lo tanto, la pérdida de este mecanismo puede dar lugar a la generación de células LAK y a la lisis del trofoblasto (Bulmer, 1989).

Un resumen de las distintas poblaciones leucocitarias de la decidua murina y humana se muestra en la Tabla III

Tabla III: Leucocitos en decidua humana y murina (Bulmer, 1989).

Tipo celular	Fenotipo	Posible función
<u>Ratón</u>		
Células supresoras (trofoblasto-dependiente)	Linfocitos pequeños granulados, no T, no B, FcR ⁺	Inmunosupresión: bloqueo de IL-2 vía TGF-beta
Células supresoras (hormono-dependientes)	Linfocitos Thy1 ⁺ , Lyt2 ⁺	Inmunosupresión
Macrófagos	F4/80 ⁺ , MHC clase II ⁺	Presentación de antígeno Inmunosupresión
Células GMG	Cel. grandes granuladas LCA ⁺ (rata), Thy1 ⁺ , asialo-GM1 ⁺ .	Lisis trofoblastica, inmunosupresión, producción de fac. de crecimiento
Células NK	LGL, asialo-GM1 ⁺	Actividad NK
<u>Humanos</u>		
dGL	NKH1 ⁺ , CD38 ⁺ , CD2 ⁺ , CD2 ^{+/-} , CD3 ⁻ , CD16 ⁻ .	Actividad NK, producción de fac. de crecimiento.
Linfocitos γ	CD3 ⁺ , CD8 ⁺ .	Inmunosupresión
Macrófagos	CD14 ⁺ , HLA clase II ⁺	Presentación de antígeno inmunosupresión.
Células supresoras (trofoblasto-dependiente)	Linfocitos pequeños granulados, no T, no B	Inmunosupresión: bloqueo de IL-2 vía factores solubles

OBJETIVOS

Durante el embarazo vivíparo, podemos considerar al feto como un injerto semialogénico para el sistema inmune de la madre; sin embargo, no es rechazado por ésta. Distintos trabajos sugieren que los mecanismos claves que protegen al concepto residen en la interfase materno fetal. Aunque estos mecanismos no son bien conocidos, la decidua parece desempeñar, en ellos, un papel importante.

Aunque se sospecha que las células deciduales son células inmunes, su fenotipo inmunológico no ha sido aún completamente establecido. Uno de los objetivos de esta tesis, por tanto, es analizar los marcadores inmunes que expresan estas células, y que permita relacionarlas con otras células inmunes ya establecidas.

Diversos autores han estudiado la presencia de distintas poblaciones leucocitarias en la decidua. Estos estudios, sin embargo son parciales y frecuentemente controvertidos. Otro objetivo de esta tesis doctoral es determinar, de la forma más precisa y completa posible, la caracterización, proporción y distribución de los leucocitos en la decidua.

Finalmente, pretendemos determinar si existen diferencias significativas entre la decidua de primer y tercer trimestre, que nos permita concluir sobre posibles variaciones de los parámetros a estudiar a lo largo del embarazo.

MATERIAL Y METODOS

TEJIDOS

- Amígdala procedente de amigdalectomías, usada como tejido control para la titulación de los distintos anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio inmunohistológico.

- Decidua basal de primer trimestre (22 casos) procedente de gestaciones de 9 a 11 semanas, obtenida mediante biopsia corial destinada a diagnóstico precoz de alteraciones cromosómicas fetales. De los 22 casos, 12 se procesaron para estudio inmunohistológico y en 10 se realizaron las suspensiones celulares.

- Decidua basal y miometrio a término (7 casos), obtenida mediante biopsia durante cesárea. Las cesáreas fueron debidas a malposiciones fetales, estrechamiento del canal del parto o cesáreas anteriores. Estas muestras solo se utilizaron en el estudio inmunohistológico

- Decidua y trofoblasto a término (23 casos) obtenidos de placentas procedentes de partos espontáneos y a término. En cada caso se comprobó que el embarazo fue normal. En 9 casos, la muestra placentaria se obtuvo del centro de la placenta y contenía tanto componente fetal (trofoblasto y estroma placentario), como componente materno (decidua); estos, se procesaron para el estudio inmunohistológico. Para la realización de las suspensiones celulares se utilizaron los 14 casos restantes, de cada uno se disecó la

cara materna de la placenta.

Los tejidos se procesaron inmediatamente después de su recogida salvo las muestras de decidua de primer trimestre que se mantuvieron en medio de cultivo durante un tiempo, (en ningún caso superior a una hora). Para la realización del estudio inmunohistológico los tejidos fueron seccionados en piezas de 30-70 mm³ aproximadamente, y hasta su utilización se conservaron a -180°C en nitrógeno líquido.

TECNICAS INMUNOHISTOLOGICAS/INMUNOCITOLOGICAS

Se han utilizado dos métodos inmunohistológicos, el uso de uno u otro dependió del tipo de la Ig constituyente del anticuerpo monoclonal. Cuando el anticuerpo era del tipo IgG se usó el método de inmunoperoxidasa indirecta, mientras que si el anticuerpo era del tipo IgM se prefirió utilizar el complejo preformado estreptavidina-peroxidasa biotinilada.

Como paso previo, las piezas fueron cortadas en congelación a 5 μ , montadas sobre portas albuminados (para impedir el desprendimiento del tejido durante el desarrollo de la técnica) y fijadas en acetona absoluta a 4 $^{\circ}$ C durante 10 minutos. Una vez fijados, se marcaron los portas con un doble círculo en torno al tejido, para impedir la difusión de los antisueros. Hasta su utilización, los portas se conservaron a -20 $^{\circ}$ C.

El desarrollo de estos métodos fue el siguiente:

- 1 $^{\circ}$. Las secciones tisulares, que estaban conservadas a -20 $^{\circ}$ C se mantienen 30 min. a temperatura ambiente, y se hidratan durante 15 min. con PBS
- 2 $^{\circ}$. Se bloquea la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% durante 10 min.
- 3 $^{\circ}$. Se lava con PBS durante 5 min.
- 4 $^{\circ}$. Se bloquean los receptores Fc con suero humano AB durante 15 min. Se retira el suero sin lavar.

50. Se incuba con el anticuerpo monoclonal (tabla IV) a las diluciones reseñadas durante 30 min.

60. Se lava tres veces con PBS (3 min. por lavado)

70. Se cubren las secciones con suero humano AB durante 5 min.. Se retira el suero sin lavar.

80. Se incuba con anti-IgG de ratón marcada con peroxidasa (Bio-Rad) (con el método de la inmunoperoxidasa indirecta) diluida a 1/100, o bien, con anti-IgM de ratón marcada con biotina (Sigma) (con el método de la estreptavidina peroxidasa-biotinilada) diluida a 1/100, durante 30 min.

90. Se repiten los pasos 60 y 70

100. Cuando se usa el sistema de la estreptavidina se incuban las secciones con el complejo preformado de estreptavidina peroxidasa biotinilada (Amershan) a una dilución de 1/300 durante 30 min.

110. Se repite el paso 60

120. Se revela la reacción con diaminobencidina al 0'05% bajo control microscópico.

Para preparar la diaminobenzidina se pesan 5 mgr de 3,3 Diaminobenzidina tetrahidroclorhidrica (Sigma) y se añaden a 10 ml de buffer PB* a pH 7,6. De esta solución se pueden hacer alícuotas de 1 ml que se pueden condervar a -200c. inmediatamente antes de usar la solución de diaminobenzidina (1ml) se le añaden 10 μ l de H₂O₂ al 3%.

* Preparación del buffer PB:

.KCl (Merck, R.F.A.).....0,20 gr
 .Na₂HPO (" ").....1,15 gr
 .KH₂PO (" ").....0,20 gr

Hasta 1000 ml de agua destilada.

13Q. Se para la reacción con PBS durante 5 min.

14Q. Se lavan los cortes con agua corriente y posteriormente con agua destilada

15Q. Se contratiñen con hematoxilina (Hematoxilina de Mayer. Sigma)

16Q. Se deshidratan con alcoholes a distinta concentración (50%, 70%, 96% y absoluto) y xilol. Se montan con la resina Eukitt.

Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Las diluciones de los anticuerpos monoclonales, del segundo anticuerpo y del complejo de estreptavidina peroxidasa biotinilada se realizaron con PBS-BSA al 1%.

En cada técnica se incluyó un control de especificidad en el que se sustituyó el anticuerpo monoclonal por PBS-BSA 1% y un control positivo constituido por secciones criostáticas de amígdala humana o extensiones de linfocitos de sangre periférica.

Tabla IV: Anticuerpos monoclonales usados en inmunohistoquímica

Anticuerpos	CD	Células reconocidas	Casa comercial	Dilución
BMA030	CD3	Linfocitos T	Behring, RFA	1/100
T4	CD4	Subpoblación de Ti y LT	Coulter, EE.UU.	1/100
OKT4		(<i>helper/inducer</i>)	Ortho, EE.UU.	1/100
BMA081	CD8	Subpoblación de Ti y LT	Behring, EEUU	1/100
OKT8		(<i>citotóxicos/supresores</i>)	Ortho, EE.UU.	1/100
OKM1	CD11b	M, G, NK	Ortho, EE.UU.	1/50
MO2	CD14	M, Mac, LHC	Coulter, EE.UU.	1/50
OKM14			Ortho, EE.UU.	1/100
Anti-leuM3			Becton Dickinson, EE.UU.	1/10
OKNK	CD16	NK, G, Mac	Ortho, EE.UU.	1/50
BMA070			Behring, RFA	1/50
B1	CD20	Linfocitos B	Coulter, EE.UU.	1/100
Anti-HLæ1	CD45	Leucocitos	Becton Dickinson, EE.UU.	1/50
Anti-Leu19	CD56	NK, LT activados	Becton Dickinson, EE.UU.	1/100
Anti-Leu7	CD57	NK, LT, subpoblación de LB	Becton Dickinson, EE.UU.	1/50
W6/32	HLA-A, B y C*	Todas las células nucleadas	Seralab, GB	1/50
OKIa1	HLA-DR	LB y LT y M/Mac activados	Ortho, EE.UU.	1/100
Vimentina		Células derivadas del mesénquima	Bio-Yeda EE.UU.	1/25

Ti: timocitos; LT: linfocitos T; LB: Linfocitos B; M: monocitos; G: granulocitos; Mac: macrófagos; NK: células NK; LHC: células de Langerhans.

* El anticuerpo W6/32 reconoce un determinante monomórfico de las cadenas pesadas de los Ags. HLA de Clase I

Criterios morfológicos

Morfológicamente las células deciduales fueron identificadas por su gran tamaño y contorno redondeado o poliédrico. Son ligeramente vacuoladas, ocasionalmente binucleadas, pero la mayor parte poseen un solo núcleo redondo u oval, con la cromatina uniformemente dispersa y con uno o más nucleolos (fig. 1). Los macrófagos son algo más pequeños que las células deciduales y de contorno frecuentemente irregular. Presentan núcleo en posición variable, arriñonado, sin nucleolo evidente y con cromatina gruesa. El citoplasma es altamente vacuolado. Las células linfoides son las más pequeñas, de contorno redondeado, núcleo redondeado y escaso citoplasma.

Estimación del porcentaje de células positivas

Hemos considerado como positiva, la tinción de coloración parduzca en los citoplasmas celulares. La intensidad de la tinción no ha sido valorada. No se ha considerado positivo la tinción de fibrina, de las zonas de necrosis y de los márgenes del tejido.

El recuento de las células positivas y negativas se realizó con microscopio óptico, utilizando el objetivo de 40x y eligiendo al azar un mínimo de 10 campos microscópicos en cada sección. Luego se calculó para cada sección y para cada marcador de superficie el porcentaje de células positivas.



Figura 1. Célula decidual típica (x500)

PREPARACION DE LAS SUSPENSIONES CELULARES

El tejido decidual es separado cuidadosamente del trofoblasto y se lava abundantemente en PBS para eliminar todos los elementos sanguíneos contaminantes.

A continuación se cortan en pequeñas piezas que se mantienen en PBS. Cada pieza se desmenuza concienzudamente con pinzas y bisturí, ayudado con el émbolo de una jeringa de 10 ml. El tejido desmenuzado se va pasando a un bote con 100 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal de ternera (Gibco) (que ha sido previamente descomplementado durante 30 min. a 56°C), 100.000 U/l de penicilina y 0,05 gr/l de gentamicina.

Una vez desmenuzado todo el tejido se filtra a través de una gasa y se centrifuga a 400g durante 10 min. El botón celular se resuspende en 8 ml de medio de cultivo.

FRACCIONAMIENTO DE LAS SUSPENSIONES CELULARES MEDIANTE GRADIENTES DE DENSIDAD

Para fraccionar las suspensiones celulares utilizamos gradientes discontinuos de Percoll (Pharmacia).

En primer lugar se preparó una solución de Percoll isosmótico con 9 partes de Percoll y 1 parte de ClNa 1,5 M. A partir de esta solución de Percoll isosmótico se obtuvieron los distintos gradientes de densidad diluyendo esta solución con ClNa 0,15 M de acuerdo con la siguiente

fórmula:

$$V_y = V_i \frac{(P_i - P)}{(P - P_y)}$$

Donde:

V_y = volumen del ClNa 0,15 M expresado en ml

V_i = volumen de Percoll isosmótico expresado en ml

P_i = densidad del Percoll isosmótico, que es 1,123 gr/ml

P_y = densidad del ClNa 0,15 M, que es 1,0058 gr/ml

P = densidad del gradiente que queremos preparar

En la tabla V mostramos como se prepararon los 6 gradientes de densidad

Tabla V: Preparación de las gradientes de densidad con Percoll isosmótico y ClNa 0'15M

Gradiente (gr/ml)	Percoll isosmótico	ClNa 0,15 M
1,013	10 ml	153,0 ml
1,027	10 ml	45,3 ml
1,036	10 ml	29,0 ml
1,047	10 ml	18,3 ml
1,059	10 ml	11,8 ml
1,080	10 ml	5,7 ml

Estos se fueron alineando uno sobre otro desde el más denso al menos denso en un tubo de cristal de 20 ml. En cada tubo se pusieron 2 ml de la solución de 1,080, 3 ml de la de 1,059, 4 ml de la de 1,047, 4 ml de la de 1,036, 3 ml de la 1,027, 1,5 ml de la de 1,013. A continuación se añadieron a cada tubo 2 ml de la suspensión de células que habíamos preparado y se centrifuga a 400g durante 10 minutos.

Después de las centrifugación se recogen las distintas fracciones celulares con pipetas Pasteur de plástico y se lavan con PBS-EDTA 0,2% durante 10 min. a 400g. Una vez lavados se decanta y se resuspende el botón celular en 1 ml de medio de cultivo. A continuación se cuentan las células de cada fracción en una cámara de Neubauer con microscopía de contraste de fase y se determina en cada fracción la morfología celular. Para su uso posterior el número de células se ajusta a una concentración de 3×10^5 - 8×10^5 .

PREPARACION DE EXTENSIONES CELULARES PARA INMUNOCITOQUIMICA

Se extienden 25 μ l de células a la concentración antes citada en portas albuminados y se dejan secar al aire o en una estufa a 37°C. Una vez secas las extensiones, se fijan en acetona absoluta durante 10 min. a 4°C. Ya fijadas se

conservan a -20°C hasta su utilización. Algunas de estas extensiones celulares se tiñeron con hematoxilina-eosina para determinar la composición celular de las distintas fracciones celulares.

ANALISIS DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE POR CITOMETRIA DE FLUJO

La citometría de flujo clasifica las células detectando simultáneamente la dispersión de la luz que producen cuando las atraviesa un rayo laser así como la fluorescencia verde y roja. La dispersión de la luz es producida por reflexión, refracción y difracción de la luz del laser cuando incide sobre la superficie celular y sus organelas. Por otro lado, la fluorescencia puede ser medida marcando las células, previamente, con un fluorocromo. En nuestro caso, como marcadores celulares utilizamos anticuerpos monoclonales conjugados con FITC (isocianato de fluoresceína).

En nuestro estudio el citómetro de flujo utilizado fue el ORTHO CYTORON (Ortho).

Anticuerpos monoclonales

En la tabla VI se describen las características de estos anticuerpos

Tabla VI: Relación de los anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio mediante citometría de flujo

AcMo	CD	Células que detecta	Isotipo
OKT3-FITC	CD3	LT	IgG _{2a}
OKT4-FITC	CD4	Subpoblación de LT y Ti (<i>helper/inducer</i>)	IgG _{2b}
OKT8-FITC	CD8	Subpoblación de LT y Ti (<i>citotox./supres.</i>)	IgG _{2a}
OKT11-FITC	CD2	LT	IgG _{2a}
OKpanB-FITC	CD19	LB	IgG ₁
OKB20-FITC	CD20	LB	IgG _{2b}
OKNK-FITC	CD16	NK, G, Mac	IgM
OKDR-FITC	HLA-DR	LB, LT activados, M y Mac activados	IgG _{2a}
OKM14-FITC	CD14	M, Mac, LHC	IgG _{2a}

Ti: timocitos; LT: linfocitos T; LB: Linfocitos B; M: monocitos; G: granulocitos; Mac: macrófagos; NK: células NK; LHC: células de Langerhans.

Preparación de las muestras

En tubos de plástico de 3 ml se ponen 100 u1 de células a la concentración antes indicada y 10 u1 de anticuerpo monoclonal. Se incuba durante 30 min. en un baño

de hielo. A continuación se le añade 1 ml solución de lisis* para lisis de los escasos hematies contaminantes y pasados 10 min se lee en el citómetro. En cada caso paralelamente se usaban controles con un apropiado isotipo de Ig de ratón para monitorizar la tinción no-específica.

*Preparación de la solución de lisis:

- 8,26 gr de cloruro de amonio
- 1 gr de bicarbonato potasico
- 0,037 gr de Tetrasodium EDTA

Se completa hasta un litro con agua destilada.

Contaje de las células positivas

El porcentaje de células positivas se calcula por integración del área bajo la curva cuyo umbral viene señalado por la tinción inespecífica (fig. 2). La positividad se estableció en la población total de células, salvo cuando se analizaron las células que componían la fracción de más densidad (1,080) . El citograma que resultaba al analizar esta fracción nos mostraba una sola población celular que se disponía de la misma manera que los linfocitos de sangre periférica, por lo que decidimos establecer una ventana que abarcara tal población y en la que obtuvimos el porcentaje de células positivas para cada marcador.

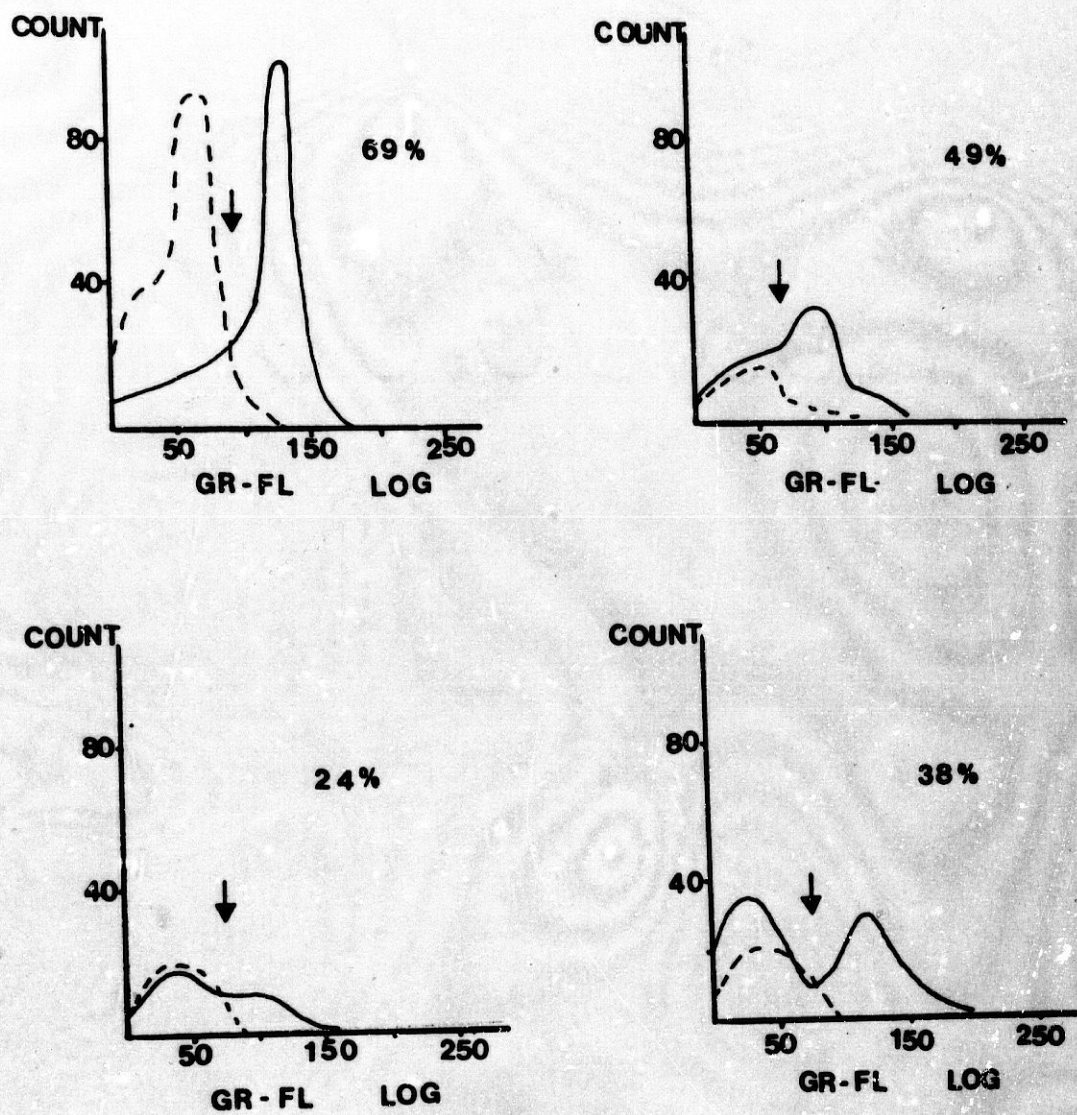


Figura 2. Patrones de positividad que han aparecido al analizar los marcadores de superficie de las células de las distintas fracciones celulares, mediante citometría de flujo. La curva de trazo discontinuo representa el control de tinción inespecífica y la curva de trazo continuo representa la tinción específica. La proporción de células positivas se calcula por integración del área que queda por debajo de la curva de trazo continuo y a la derecha de la flecha. En el eje de abscisas, se representa la cantidad de fluorescencia en forma de función logarítmica. En el eje de coordenadas está el número de células

METODOS ESTADISTICOS

Cálculo de los valores medios y de su desviación estandar

Para el cálculo de las medias utilizamos la expresión:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Siendo $\sum_{i=1}^n x_i$ la suma de todos los valores encontrados,

donde n = número de casos observados.

El cálculo de la desviación estandar se realiza mediante la fórmula:

$$D.S. = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left(\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n} \right)}$$

siendo $\sum_{i=1}^n x_i^2$ la suma de los de los cuadrados de los valores observados.

Análisis de la Varianza de dos vías (test de homogeneidad de varias muestras apareadas)

Este test se utilizó para comparar el porcentaje de células positivas para cada marcador en las 5 fracciones de densidad estudiadas.

Los datos debieron ser transformados para la realización de este test. El porcentaje de células positivas que viene expresado en tanto por ciento (F_i) se transformó en tanto por uno (f_i) y con esto se calculó el arco sen $\sqrt{f_i}$ que fue lo que se utilizó para realizar el

análisis de la varianza. A continuación se construyó una tabla para cada marcador inmune donde en las filas se representaban los datos por cada caso y en las columnas los datos para cada fracción (debido a la naturaleza del test se tuvieron que rechazar aquellos casos en los que un marcador no se pudo estudiar en las cinco fracciones). El test analiza la homogeneidad de datos tanto por filas como por columnas, aunque en nuestro trabajo solo nos interesa el resultado por columnas. El test se realizó mediante un programa estadístico OXSTAT en un ordenador EPSON compatible.

Cuando el resultado del test dió significativo se hacen comparaciones por parejas mediante el método secuencial de Newman y Keuls.

Test de Wilcoxon para comparar dos muestras de variables cualesquiera

Este test se utilizó para comparar los resultados entre la decidua de primer trimestre y la decidua a término para cada marcador. Se compararon así tanto los resultados inmunohistológicos como los de las suspensiones celulares.

Dadas dos muestras independientes de tamaños n_1 y n_2 ($n_1 \leq n_2$ por convenio) se unen las dos muestras en una sola, se ordenan de menor a mayor y se asignan rangos a sus elementos. A continuación se calculan las sumas de rangos R_1 y R_2 de los elementos de cada una de las muestras, y se

le llama R_{exp} a la suma de rango (R_1) de la muestra de menor tamaño. Como en nuestro caso todas las $n_1+n_2 \leq 30$, se compara la R_{exp} con la R_α en la tabla que corresponde

RESULTADOS

DISTRIBUCION TISULAR DE LOS DISTINTOS ANTIGENOS ESTUDIADOS
POR INMUNOHISTOLOGIA

EXPRESION DE CD45

EL antígeno común leucocitario o CD45 es ampliamente expresado por todos los tejidos que integran la interfase materno fetal en los dos trimestres estudiados.

En decidua de primer trimestre las células positivas corresponden a acúmulos linfoides, macrófagos, células fusiformes y células de aspecto decidual. Es de destacar, como en otros marcadores, que más tarde analizaremos, la disposición perivascular de las células positivas (fig.3).

También en decidua de tercer trimestre aparecen linfocitos, macrófagos y células de aspecto decidual CD45⁺ (fig.3). No existen diferencias significativas en la proporción de células positivas en el tejido decidual de los dos trimestres estudiados (tabla VII, fig.4). En el estroma placentario expresan este marcador tanto linfocitos como macrófagos .

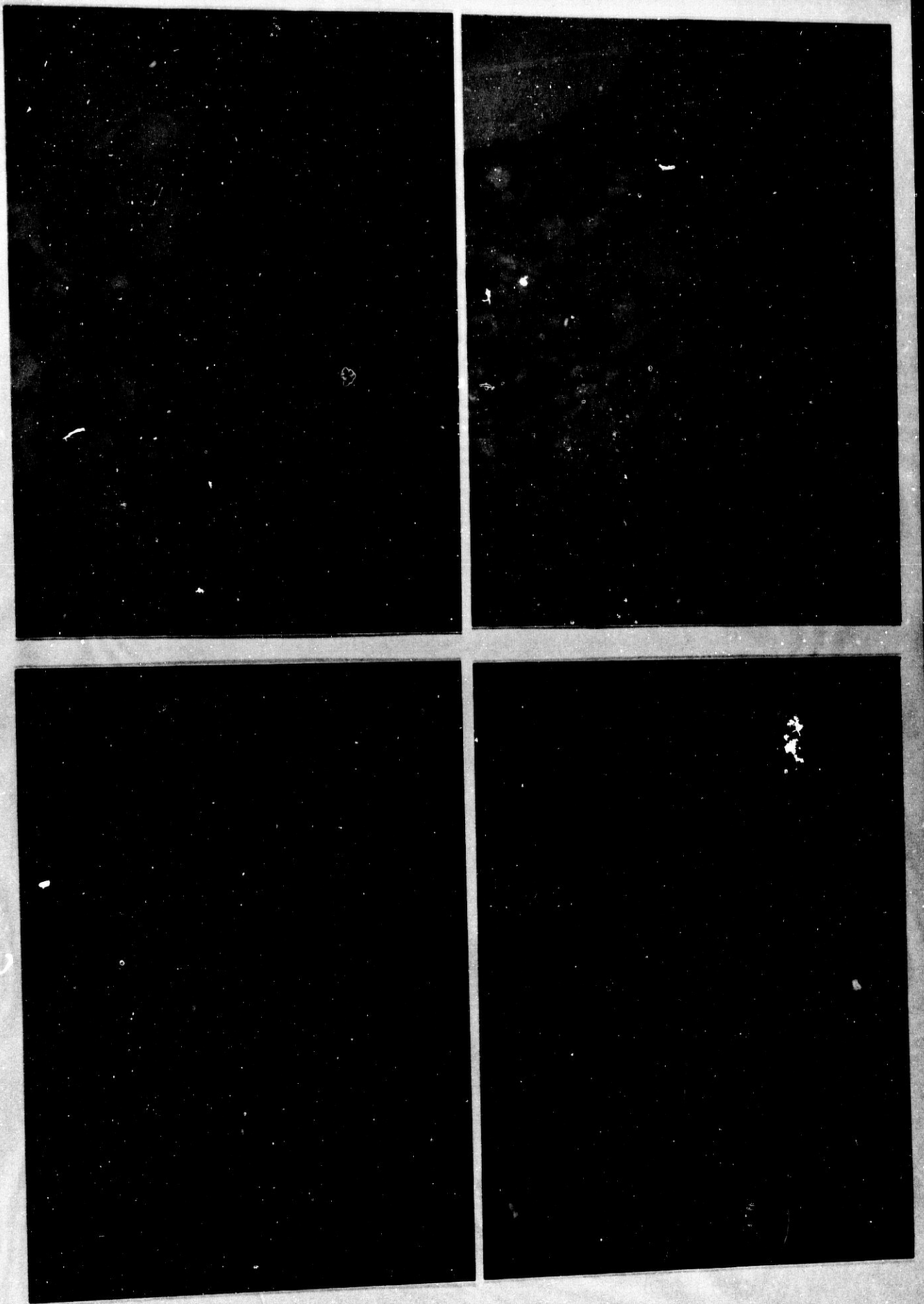


Figura 3. Expresión de CD45. A: acúmulo linfoide en decidua de primer trimestre (x400). B: células deciduales, fusiformes y linfoides en decidua de primer trimestre (x400). C: tinción perivascular que corresponde mayoritariamente a células fusiformes, en decidua de primer trimestre (x400). D: células deciduales y linfoides en decidua a término (x400).

Tabla VII: Porcentaje medio de células CD45⁺ en decidua de primer y tercer trimestre.

Células	Primer Trimestre		Tercer Trimestre		R _{exp} (n ₁ ,n ₂)	Significación
	Media	SD	Media	SD		
CD45 ⁺	41,09	9,19	43,17	17,98	55,5 (6, 11)	NS

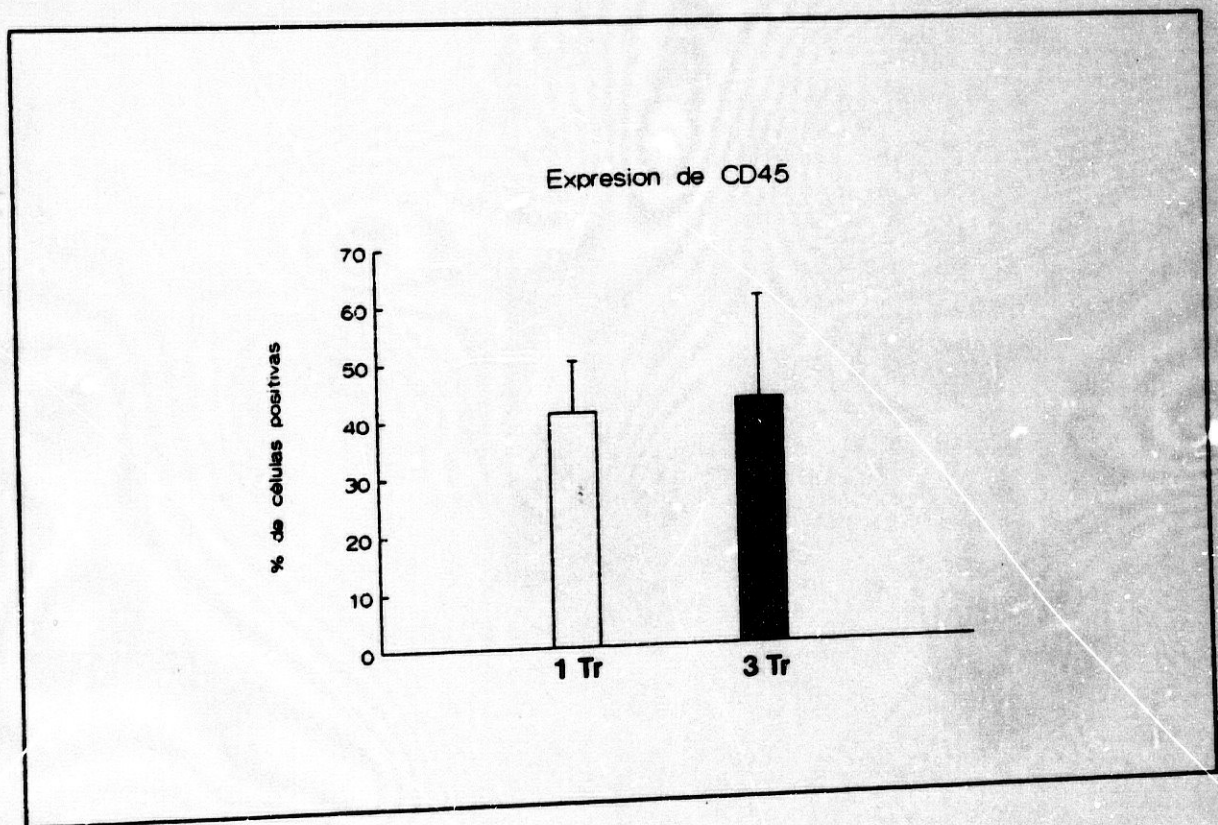


Figura 4. Porcentaje medio de células CD45⁺ en decidua de primer y tercer trimestre

EXPRESION DE CD3, CD4, CD8 y CD20

Los antígenos característicos de las células T como son CD3, CD4 y CD8 se expresan en baja proporción en decidua de primer trimestre (fig.5), y en decidua (fig.6) y estroma placentario de tercer trimestre (fig.7). Las células positivas, de morfología linfoide, se disponen tanto en forma de acúmulos como de forma aislada. Es de destacar la presencia de algunas células de aspecto macrofágico CD4⁺ en todos los tejidos estudiados (fig.8).

Al comparar los resultados obtenidos en decidua de primer y tercer trimestre (tabla VIII, fig.9) observamos que la proporción de células positivas para estos marcadores es significativamente superior en el caso de la decidua de tercer trimestre ($p < 0.01$).

No se han detectado células CD20 positivas (células B) en ningún caso (figura 10)

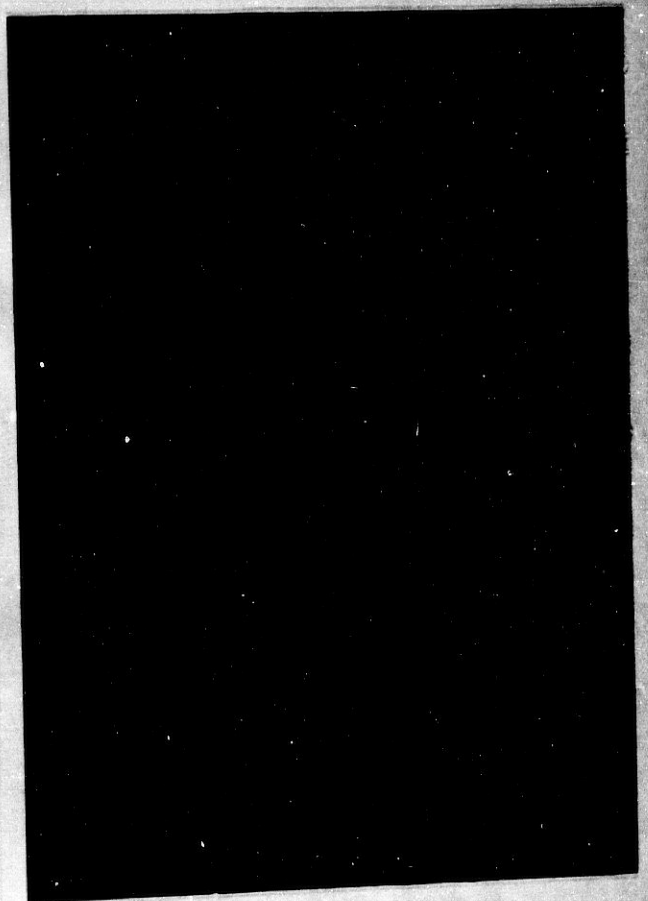
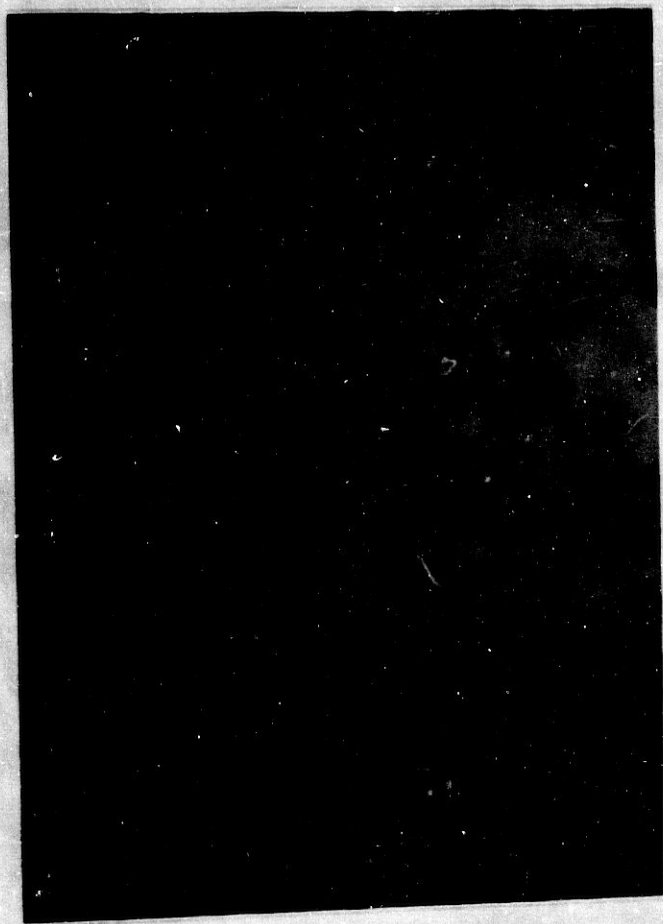
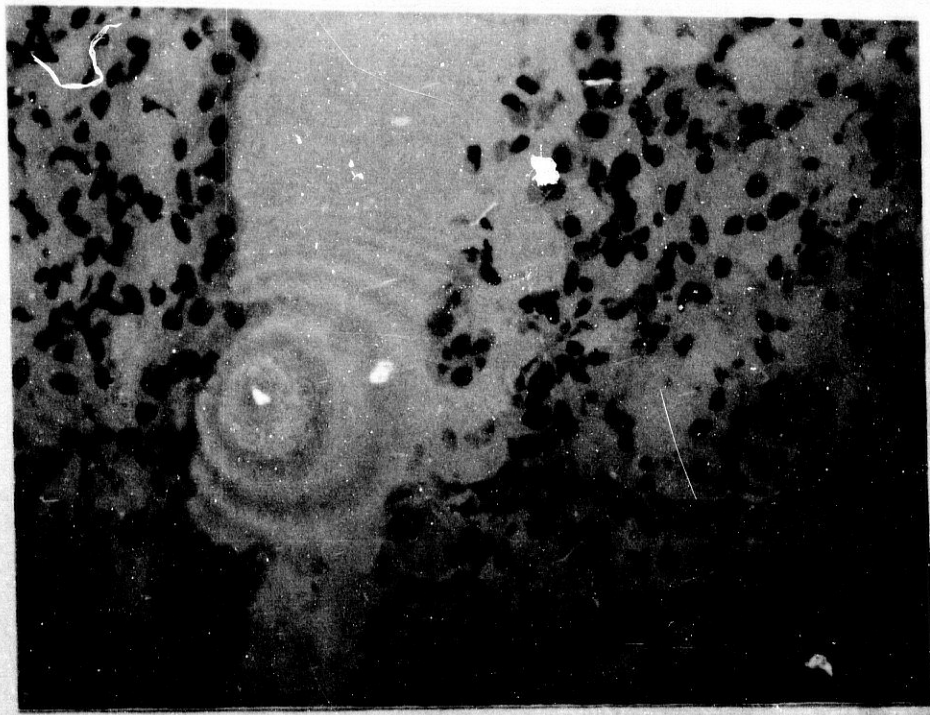


Figura 5. Decidua de primer trimestre. A: Células linfoides CD3⁺ (x400).
B: Células linfoides CD4⁺ (x400). C: Células linfoides CD8⁺ (x400).

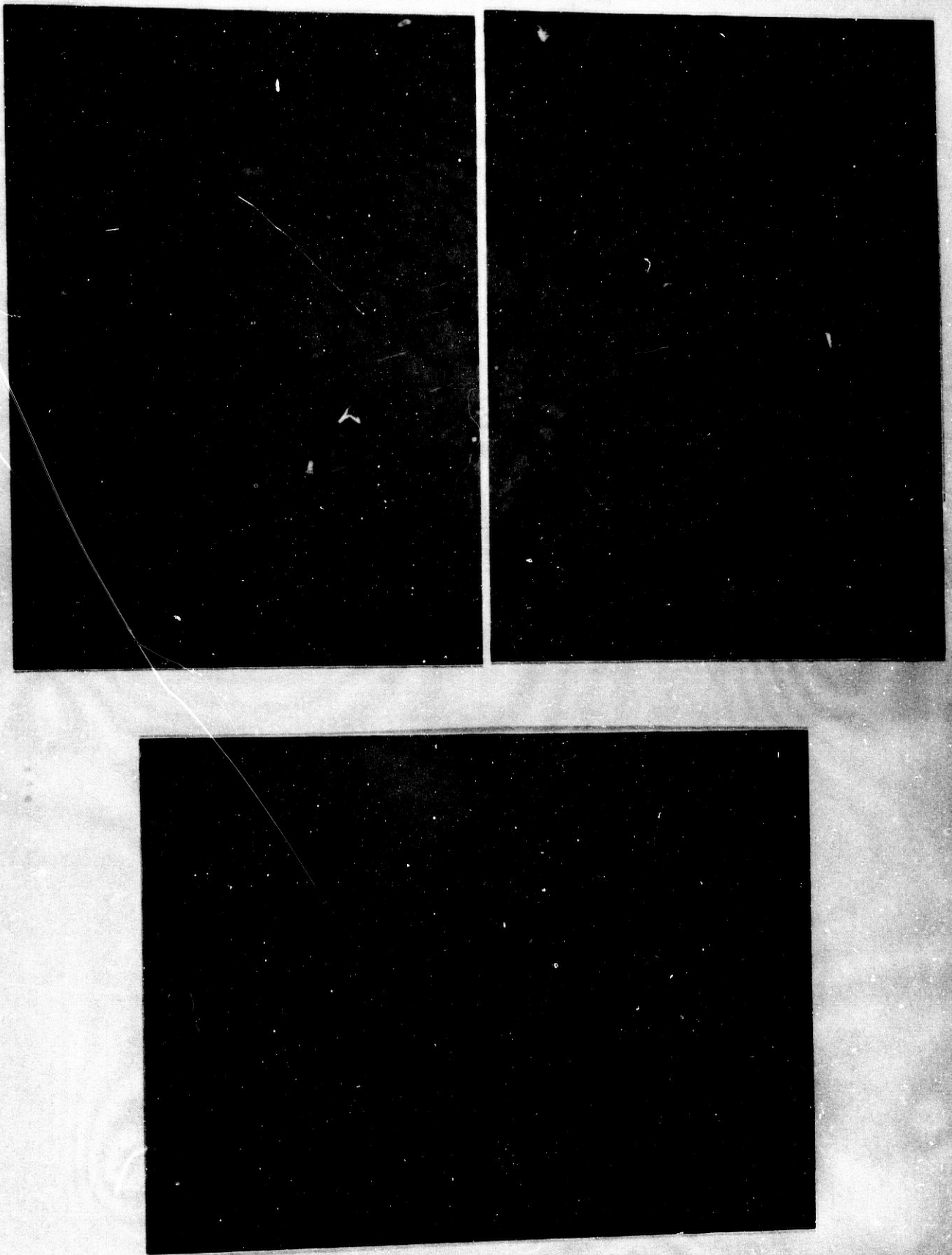


Figura 6. Decidua a término. A: Linfocitos CD3⁺ (x400). B: Linfocitos CD4⁺ (x400). C: Linfocitos CD8⁺ (x400).



Figura 7. Linfocitos CD3⁺ en el estroma placentario a término (x400)

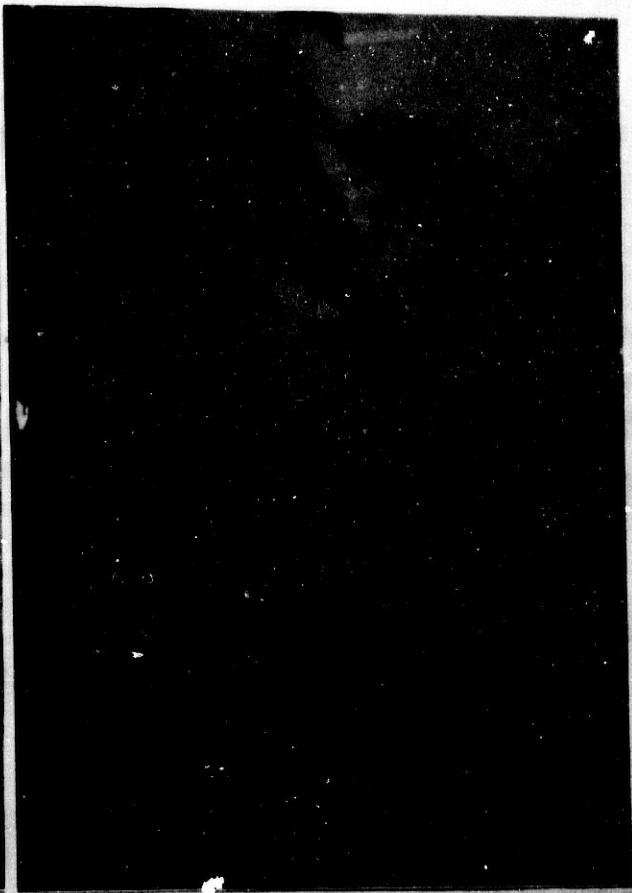


Figura 8. Macrófagos CD4⁺ en el estroma placentario a término (x400)

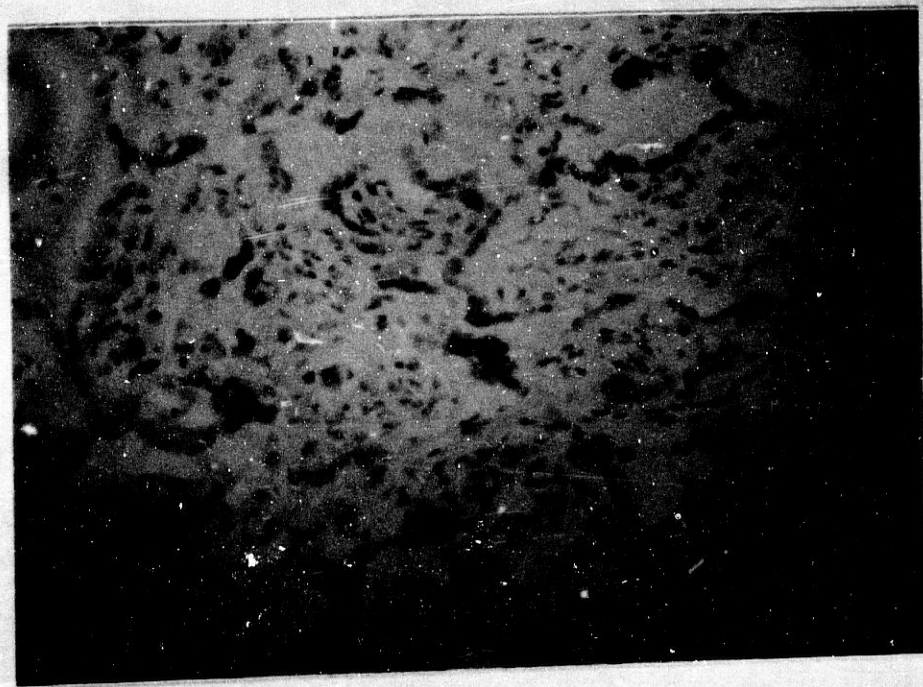


Figura 10. Estroma placentario de tercer trimestre. No se detectan células CD20⁺ (x200)

Tabla VIII: Porcentaje medio de células CD3⁺, células CD4⁺, células CD8⁺ y células CD20⁺ en decidua de primer y tercer trimestre.

Células	Primer Trimestre		Tercer Trimestre		R _{exp}	(n ₁ , n ₂)	Significación
	Media	SD	Media	SD			
CD3 ⁺	6	1,9	17,5	5,28	87	(6, 11)	p<0,01
CD4 ⁺	3,55	2,02	15,25	5,55	124	(8, 11)	p<0,01
CD8 ⁺	4,82	2,60	12,33	5,39	84,5	(6, 11)	p<0,01
CD20 ⁺	-	-	-	-		(6, 11)	-

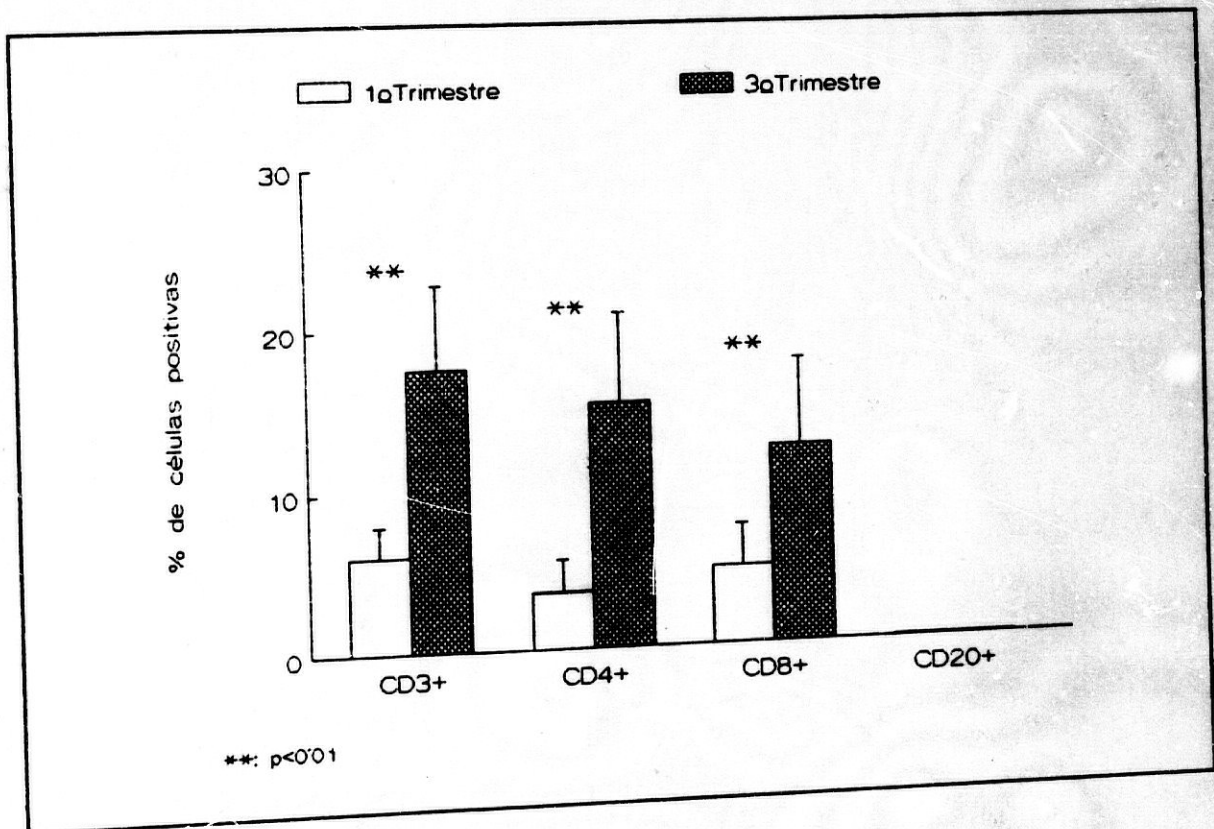


Figura 9. Porcentaje medio de células CD3⁺, células CD4⁺, células CD8⁺ y células CD20⁺ en decidua de primer y tercer trimestre.

EXPRESION DE CD11b Y CD14

El antígeno CD11b es el receptor de C3bi y está presente en monocitos, granulocitos y células NK; su expresión fue escasa en todos los tejidos estudiados. En decidua de primer trimestre aparecen células linfoides y células de aspecto macrófágico CD11b⁺. En decidua a término se detectan células de aspecto macrófágico positivas y en el estroma placentario aparecen linfocitos, macrófagos y granulocitos CD11b⁺ (fig.11).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la proporción de células positivas para este antígeno en primer y tercer trimestre (tabla IX, fig.12).

La expresión de CD14 (característico de monocitos-macrófagos, y células de Langerhans) se determinó mediante tres anticuerpos monoclonales: MO2, anti-leuM3 y OKM14, sin embargo, los dos primeros no dieron ningún tipo de reacción en ninguno de los casos estudiados.

En decidua de primer trimestre se detecta un 23% de células CD14⁺ que son fundamentalmente células de aspecto macrófágico (fig.13), también aparecen algunas células fusiformes, y en algún caso células de aspecto decidual. Las células positivas pueden aparecer en acúmulos, de forma aislada o con disposición perivascular.

También se observan células de aspecto macrofágico CD14⁺ en decidua de tercer trimestre y en el estroma placentario (fig.13), de forma aislada aparece alguna célula decidual positiva.

Aunque la proporción de células CD14⁺ es superior en la decidua de tercer trimestre respecto a la del primer trimestre la diferencia no es estadísticamente significativa (tabla IX, fig.12)



Figura 11. Expresión de CD11b. A: Células linfoides positivas en decidua de primer trimestre (x400). B: Macrófagos positivos en decidua a término (x400).

Tabla IX: Porcentaje medio de células CD11b⁺ y células CD14⁺ en decidua de primer y tercer trimestre.

Células	Primer Trimestre		Tercer Trimestre		R _{exp} (n ₁ , n ₂)	Significación
	Media	SD	Media	SD		
CD11b ⁺	7,64	8,29	11,40	7,64	49,5 (5, 11)	NS
CD14 ⁺	23,09	6,28	31	9,04	102,5 (8, 11)	NS

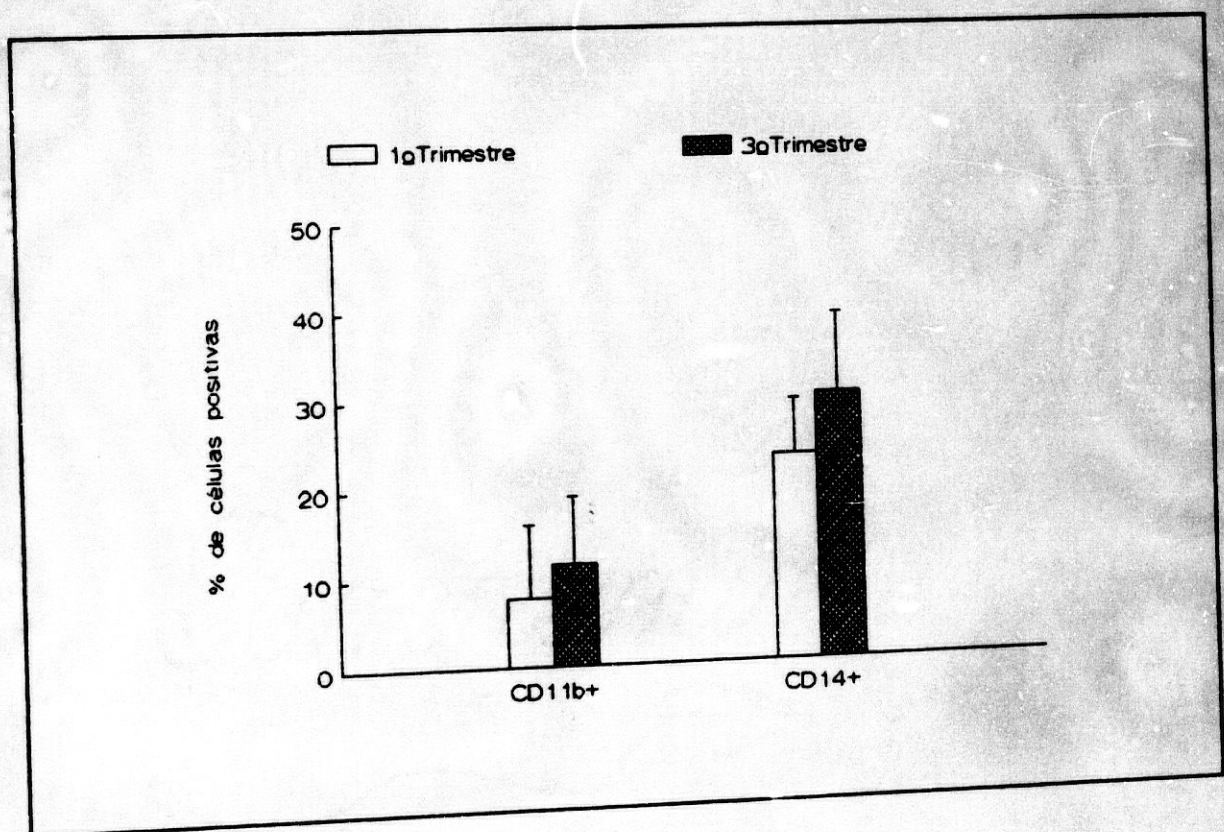


Figura 12. Porcentaje medio de células CD11b⁺ y células CD14⁺ en decidua de primer y tercer trimestre.

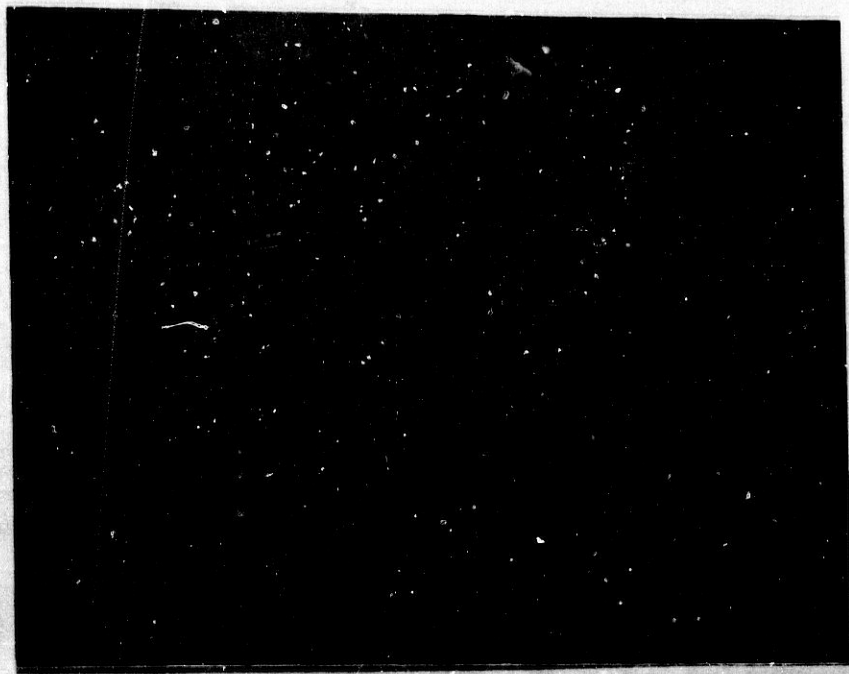


Figura 13. Macrófagos CD14⁺. A: en decidua de primer trimestre (x400). B: en decidua a término (x400). C: en estroma placentario a término (x400).

EXPRESION DE CD16, CD56 Y CD57

Para determinar la presencia de células NK en la interfase materno-fetal se han estudiado tres marcadores de superficie: CD16 (FcγIIIR, que además de en las células NK se puede encontrar en granulocitos y macrófagos), CD56 (característico de células NK, aunque también se detecta en linfocitos T activados) y CD57 (que se expresa en células NK, en algunas células T y en una subpoblación de células B).

El antígeno CD16 se estudió mediante los anticuerpos monoclonales BMA070 (que no dio ningún tipo de reacción) y OKNK, con el que si se obtuvieron resultados.

En decidua de primer y tercer trimestre aparecen células de aspecto linfoide y en algunos casos células de aspecto decidual CD16⁺ (fig.15). En estroma vellositario a término, se detecta este receptor en linfocitos y granulocitos. La proporción de células CD16⁺ es significativamente superior en decidua de tercer trimestre que en la decidua joven ($p < 0.01$) (tabla X, fig.16).

En decidua de primer trimestre se ha detectado una gran expresión del antígeno CD56, que aparece principalmente en células de aspecto linfoide y en células de morfología decidual, es de destacar, que en las zonas de decidua esponjosa con gran riqueza glandular las células CD56⁺ tienen una disposición periglandular y perivascular (fig.17).

La expresión de CD56 en decidua de tercer trimestre es inferior a la del primer trimestre aunque no de forma significativa (tabla X, fig.16) y corresponde a células de aspecto linfoide (en un caso aparece también en células de aspecto decidual). En el estroma placentario se detectan aislados linfocitos CD56⁺.

En ninguno de los tejidos estudiados se observan células CD57⁺ (fig. 19).

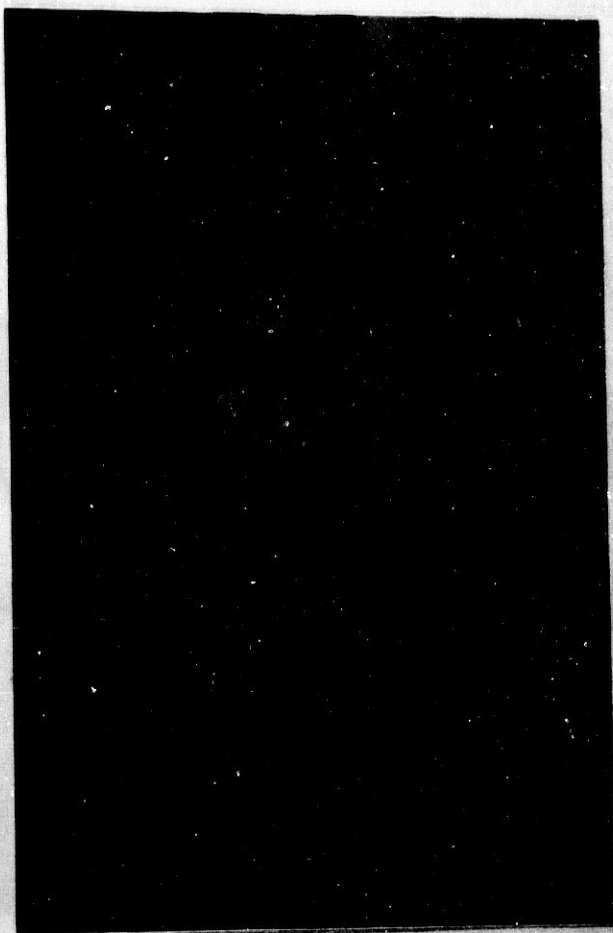
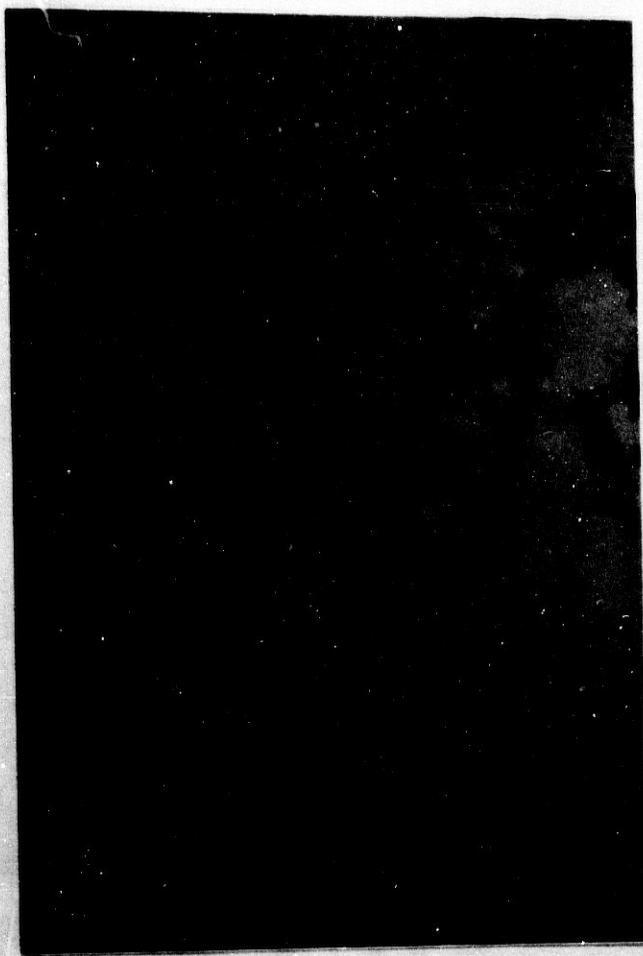


Figura 15. Expresión de CD16. A: Células linfoides positivas en decidua de primer trimestre (x400). B: Acúmulo linfoide en decidua a término, entre los linfocitos también se detectan algunas células de aspecto decidual CD16⁺ (D) (x400). C: Células deciduales positivas en decidua a término (x400).

Tabla X: Porcentaje medio de células CD16⁺, células CD56⁺ y células CD57⁺ en decidua de primer y tercer trimestre.

Células	Primer Trimestre		Tercer Trimestre		R _{exp}	(n ₁ , n ₂)	Significación
	Media	SD	Media	SD			
CD16 ⁺	12,22	6,83	25,43	4,69	87	(7, 9)	p<0,01
CD56 ⁺	32,67	8,90	16,29	14,92	40,5	(7, 9)	NS
CD57 ⁺	-	-	-	-		(7, 9)	-

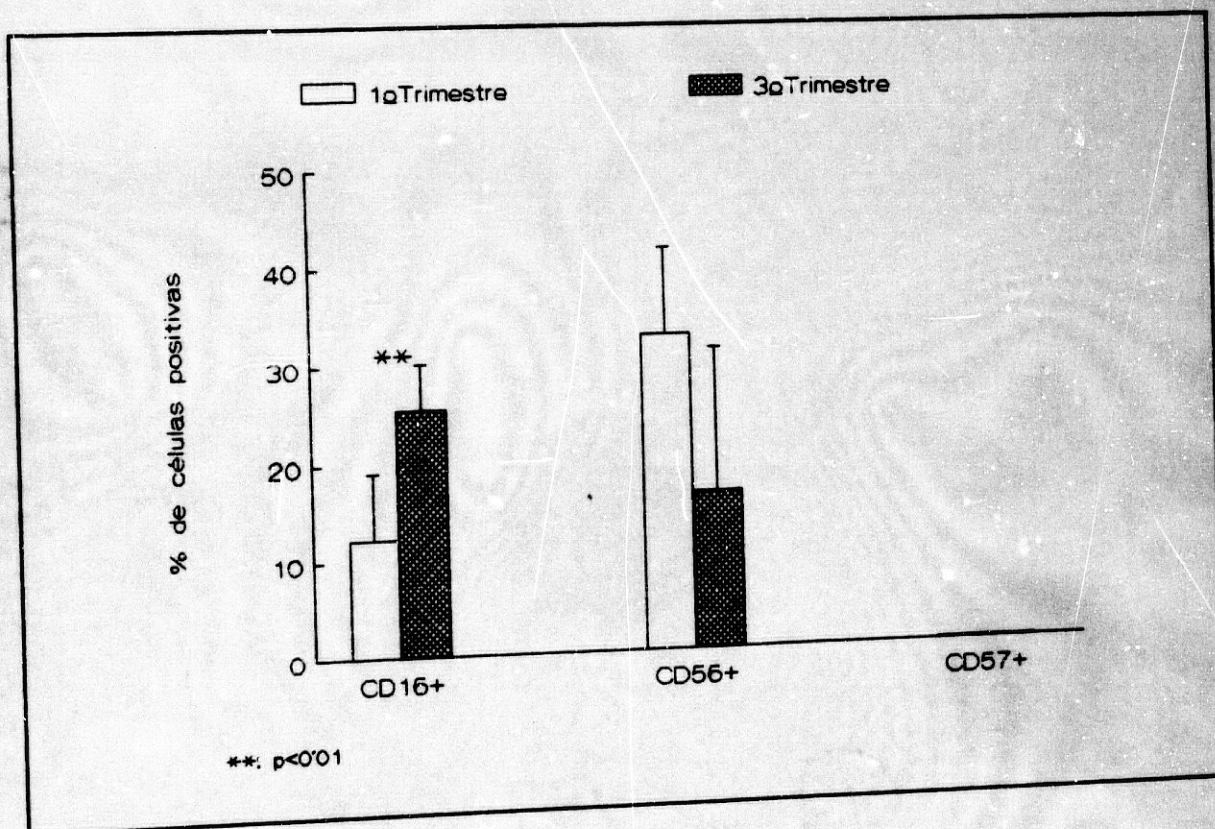


Figura 16. Porcentaje medio de células CD16⁺, CD56⁺ y CD57⁺ en decidua de primer y tercer trimestre.



Figura 17. Expresión de CD56 en decidua de primer trimestre. A: Células deciduales positivas (x400). B: tinción perivascular (x400). C: tinción periglandular (x400)

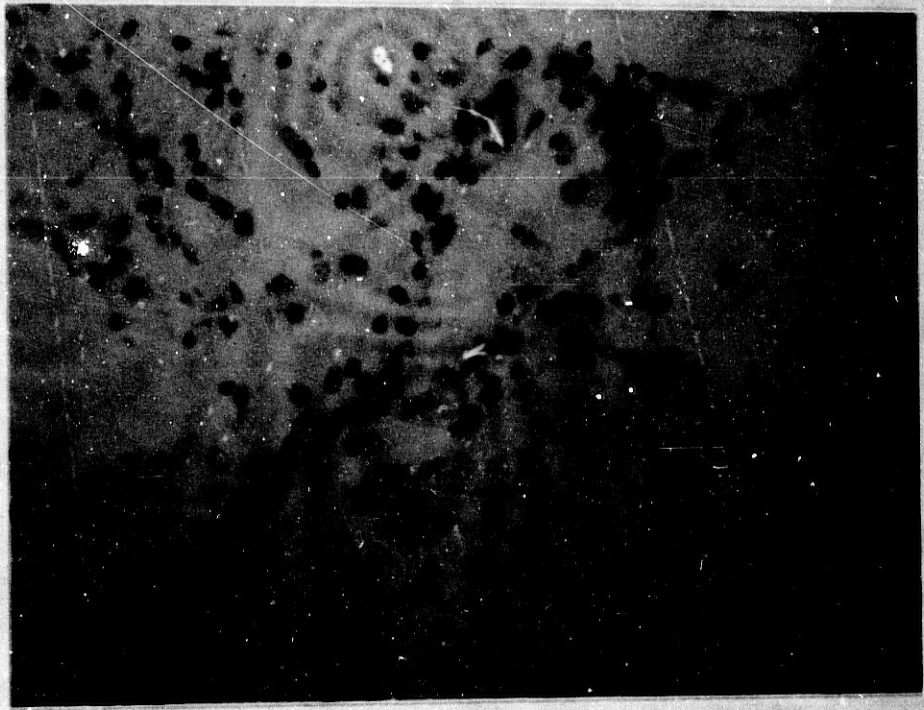


Figura 19. Decidua de primer trimestre de gestación. No se detectan células CD57⁺ (x400)

EXPRESION DE ANTIGENOS HLA DE CLASE I

Para detectar la expresión de los antígenos HLA de clase I se ha utilizado el anticuerpo monoclonal W6/32, que reconoce un determinante monomórfico de las cadenas pesadas de estos antígenos.

Todas las células del tejido decidual y del estroma placentario en ambos trimestres del embarazo son HLA clase I⁺. Así mismo también expresan estos antígenos, aunque en menor intensidad, las células del citotrofoblasto extravellocitario. El sincitiotrofoblasto es negativo en todos los casos (fig.20).

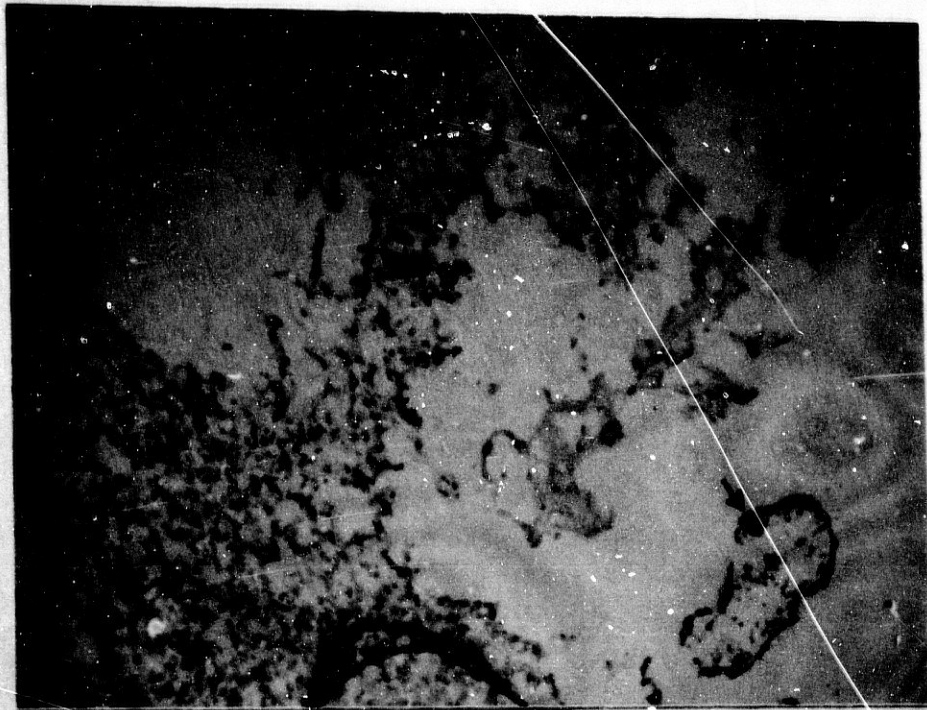


Figura 20. Expresión de Ags. HLA de clase I. A: en decidua de primer trimestre se observa como todas las células de la decidua son positivas mientras que el sincitiotrofoblasto señalado es negativo (x100). B: en la placenta a término el estroma placentario expresa antígenos HLA de clase I mientras que en el sincitiotrofoblasto no se detectan (x200). C: Citotrofoblasto extravellositario, que es positivo para este marcador (x400)

EXPRESION DE ANTIGENOS HLA-DR

Los antígenos DR han sido detectados en una importante proporción de células de la interfase materno fetal. Tanto en decidua de primer trimestre como en decidua de tercer trimestre. Estas células corresponden a linfocitos, células de aspecto macrófágico, células de aspecto decidual y células fusiformes en decidua de primer trimestre (fig.21), no existiendo diferencias estadísticamente significativas en la proporción de células DR⁺ en ambas deciduas (tabla XI, fig.22).

Es de destacar la expresión de antígenos HLA-DR por parte de los endotelios venulares en decidua de primer y tercer trimestre (fig.23), mientras que los endotelios arteriolares son negativos, aunque existe una elevada expresión de este antígeno a nivel periarteriolar (fig.24).

También se ha estudiado la expresión de antígenos HLA-DR en miometrio de tercer trimestre, observándose también en endotelios, así como en células linfoides (fig.25).

En el estroma placentario a término este antígeno es expresado por linfocitos y macrófagos.

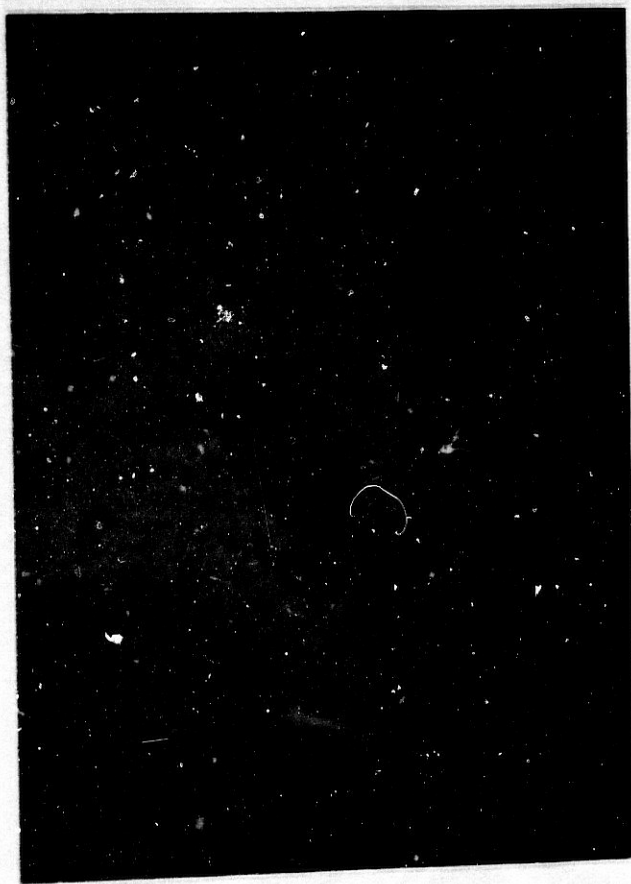
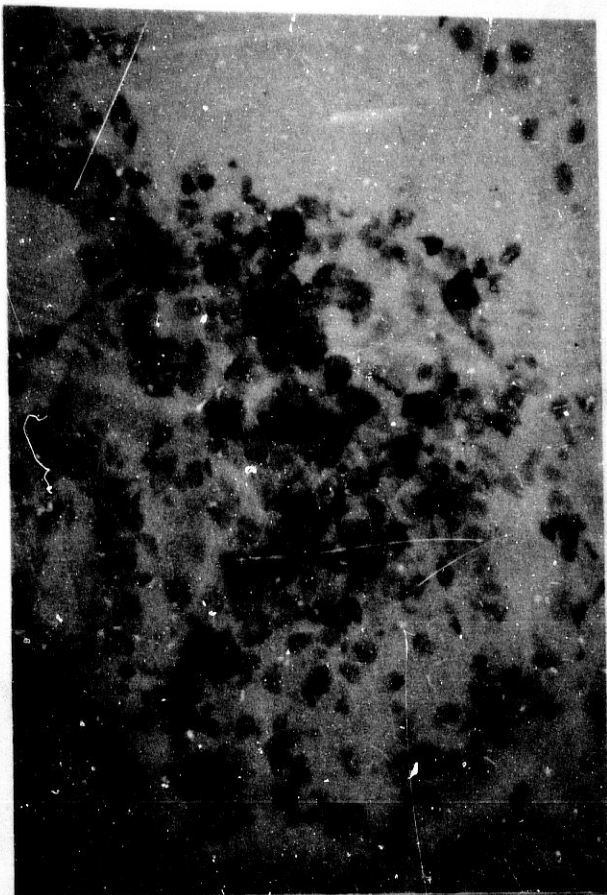
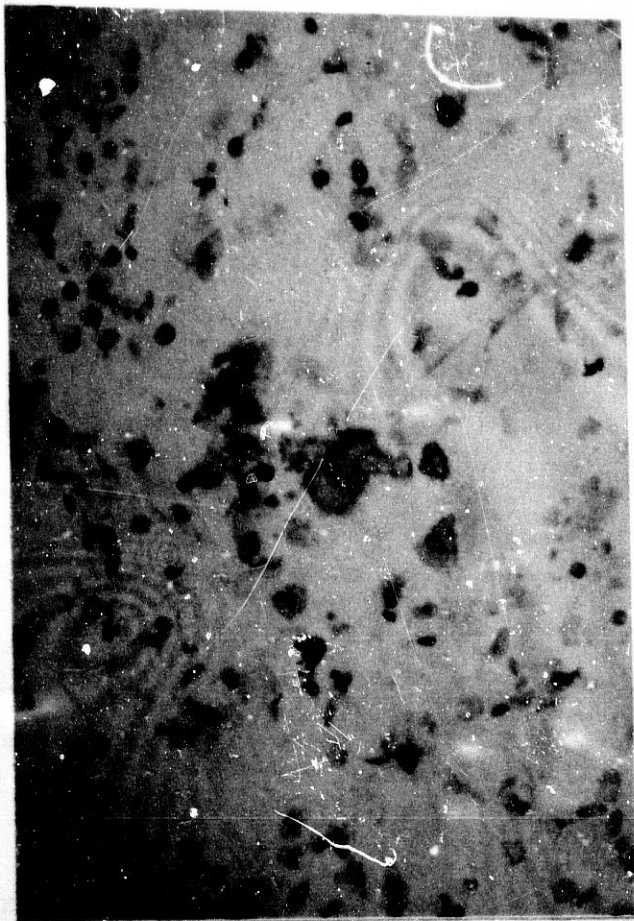


Figura 21. Expresión de HLA-DR. A: Células deciduales positivas en decidua de primer trimestre (x400) B: Acúmulo linfoide en decidua de primer trimestre (x400) C: Macrófago DR⁺ en decidua a término (x400). D: Acúmulo linfoide en decidua a término, entre los linfocitos se observan células de aspecto decidual (D) (x400)

Tabla XI: Porcentaje medio de células HLA-DR⁺ en decidua de primer y tercer trimestre

Células	Primer Trimestre		Tercer Trimestre		R _{exp} (n ₁ ,n ₂)	Significación
	Media	SD	Media	SD		
DR ⁺	27,92	4,96	23,89	11,63	81,5 (9, 12)	NS

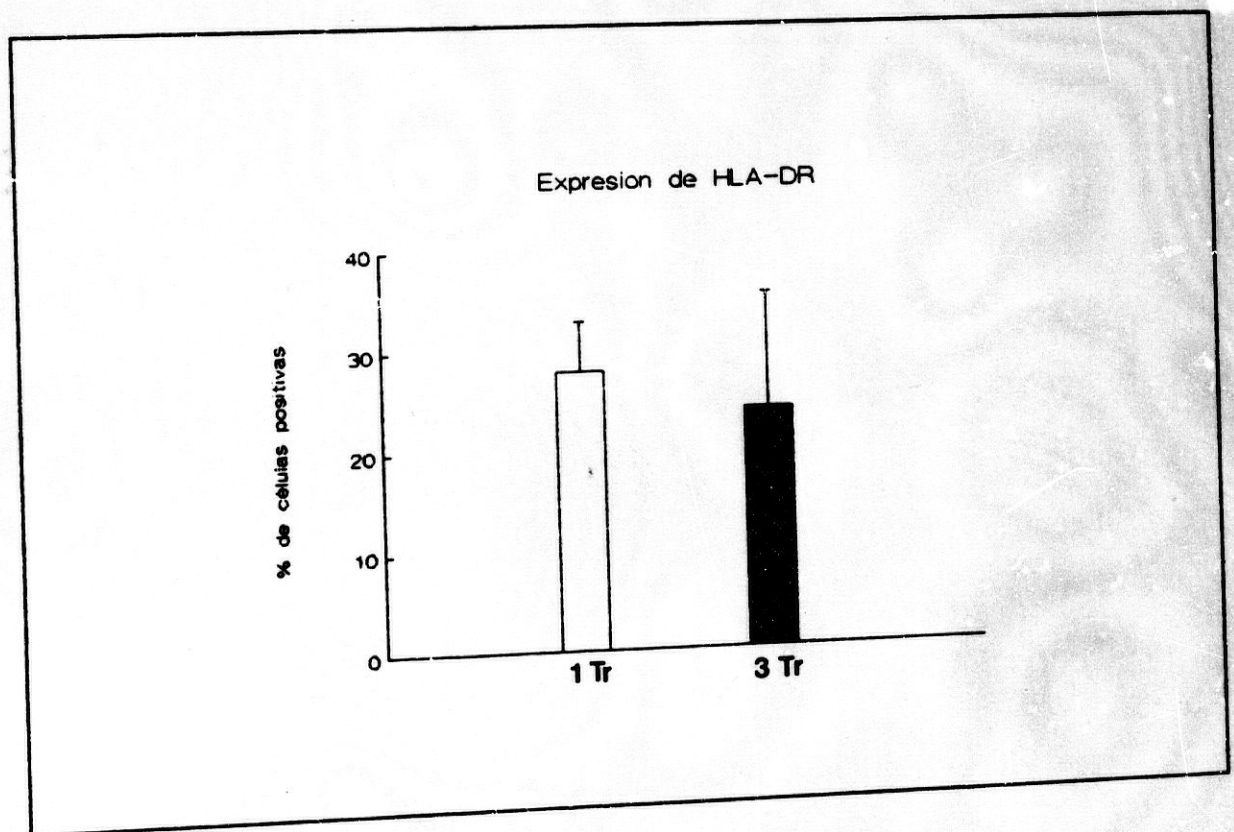


Figura 22. Porcentaje medio de células DR⁺ en decidua de primer y tercer trimestre.

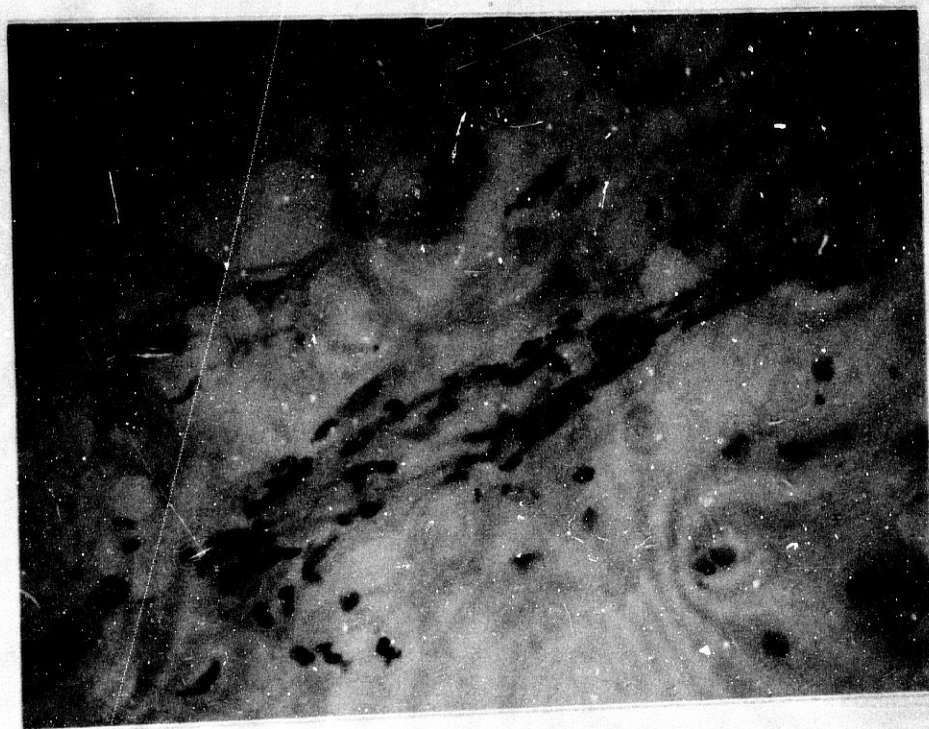
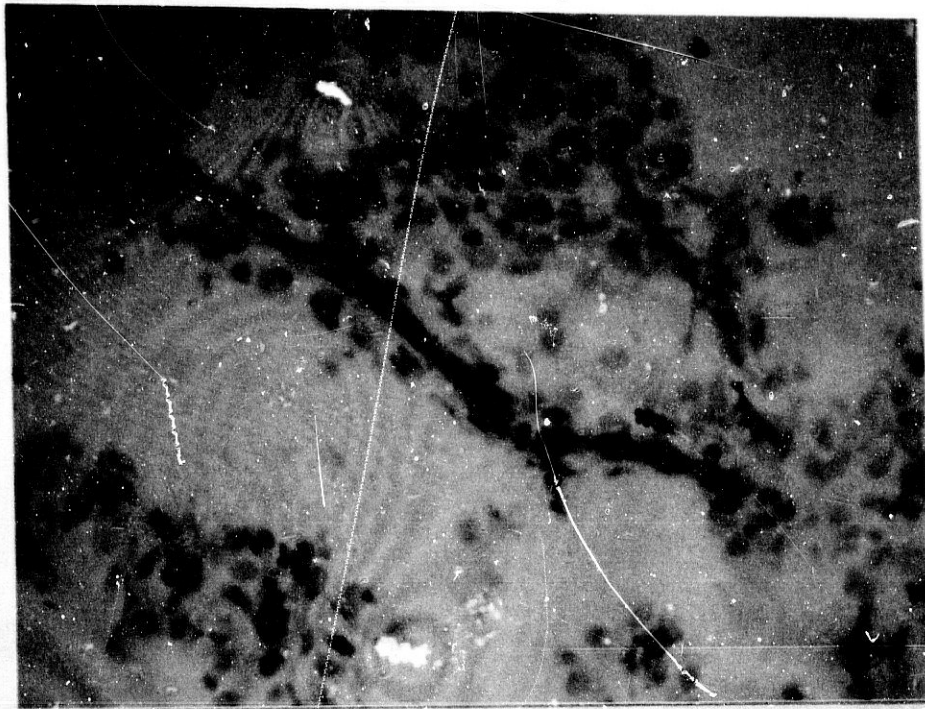


Figura 23. Células endoteliales DR⁺. A: Decidua de primer trimestre (x400)
B: Decidua de tercer trimestre (x400)

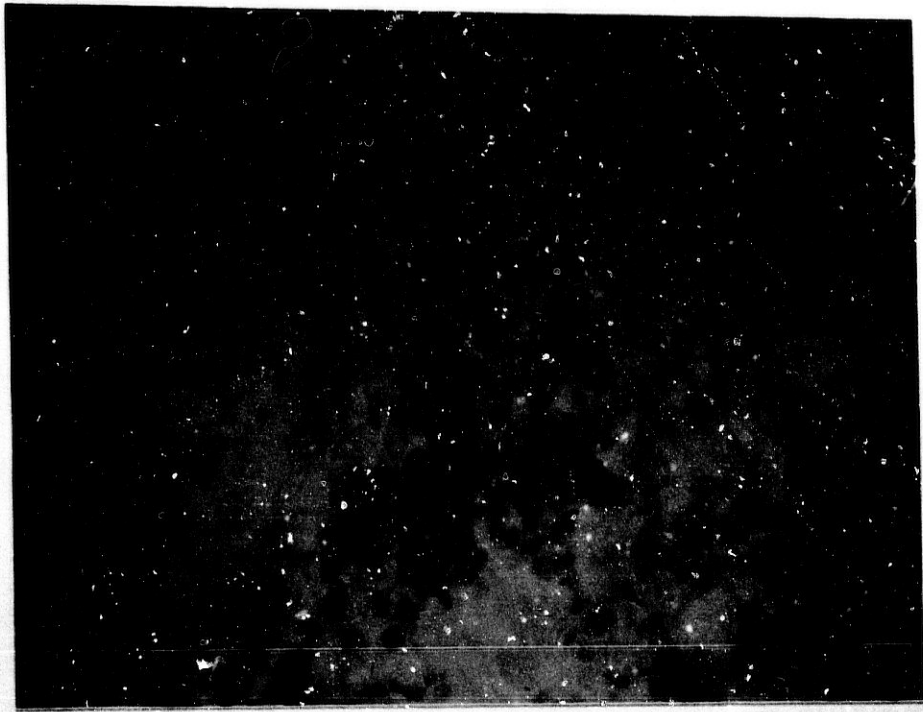


Figura 24. Decidua de primer trimestre. Los endotelios arteriulares son DR⁻, aunque es de destacar la marcada tinción periarteriolar (x400)



Figura 25. Células endoteliales DR⁺ en miometrio a término (x400)

EXPRESION DE VIMENTINA

La vimentina aparece en todas las células mesenquimatosas, como linfocitos, células deciduales y endotelios, estando ausente en trofoblasto y en células glandulares (fig.26)

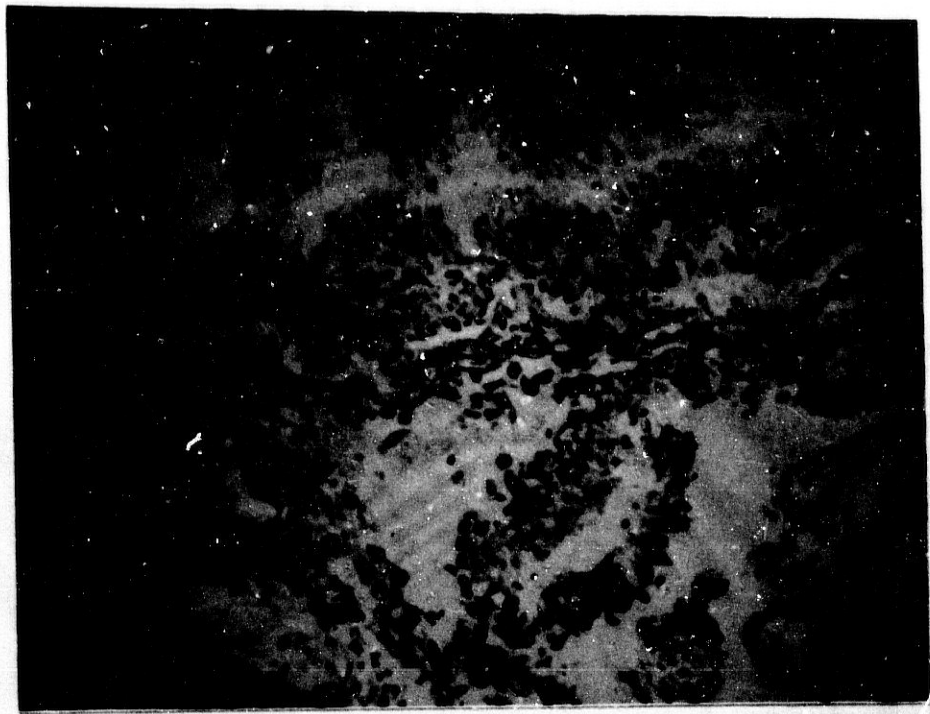


Figura 26. Expresión de vimentina A: Decidua de primer trimestre, donde destaca la negatividad del epitelio glandular, mientras que el resto del tejido es intensamente positivo (x100). B: Placenta a término, el trofoblasto no tiene vimentina a diferencia de las células que componen el estroma vellositario q donde sí se detecta

SEPARACION DE LAS SUSPENSIONES CELULARES MEDIANTE GRADIENTES DE PERCOLL.

Las suspensiones celulares, obtenidas como se describe en "Material y Métodos", procedentes de tejido decidual de primer y tercer trimestre se fraccionaron por centrifugación sobre 6 gradientes de Percoll de distinta densidad (ver "Material y Metodos).

De esta manera se obtuvieron 6 fracciones (fig 27), de las cuales, la que estaba situada sobre el gradiente 1.013 sólo contenía restos celulares, por lo que fue desechada.

Mediante extensiones celulares teñidas con hematoxilina-eosina se llegó a determinar, de forma aproximada, la composición celular de cada capa de células (tabla XII, fig.28).

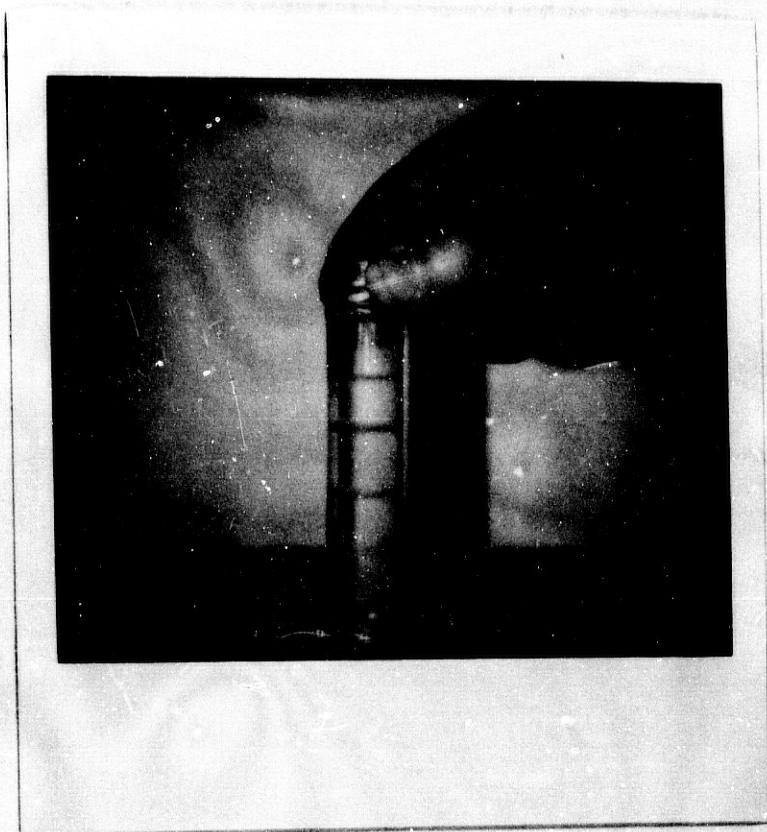
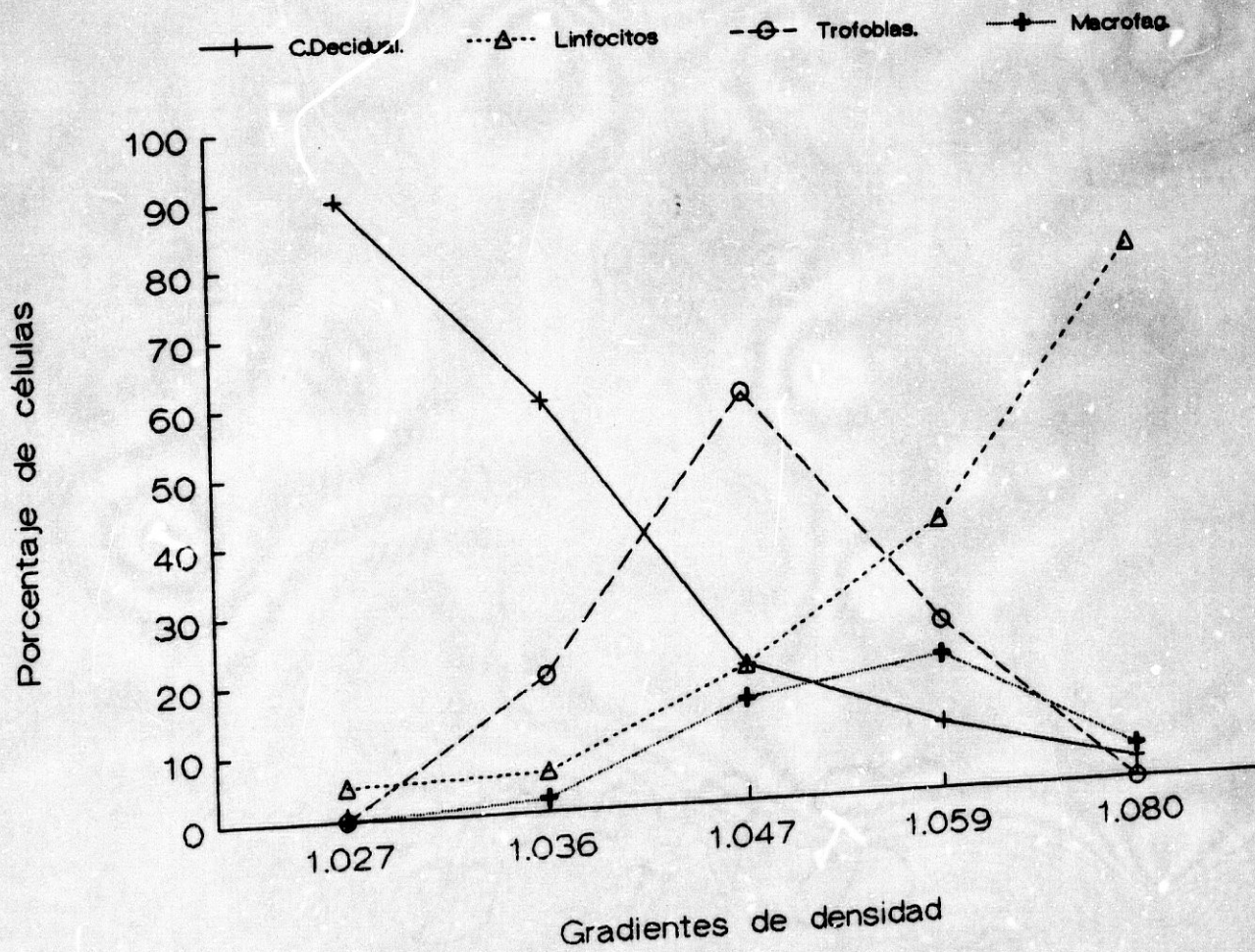
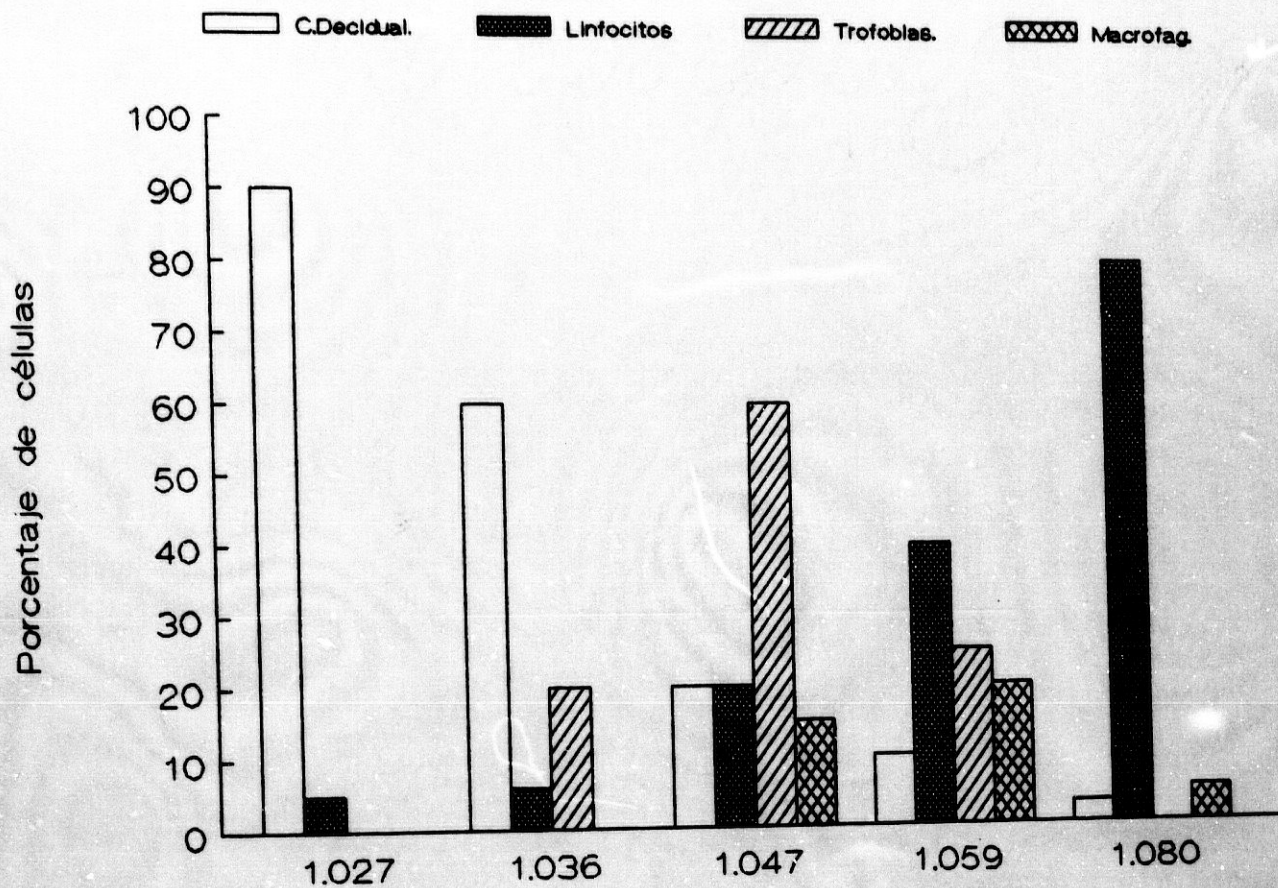


Figura 27. Fracciones celulares obtenidas tras la centrifugación de la suspensión de células deciduales sobre gradientes dicontinuos de Percoll

Tabla XII: Composición celular de las distintas fracciones obtenidas al separar las suspensiones de tejido decidual con gradientes de Percoll.

Fracciones	Densidad	Células
1a	1.027	Células de aspecto decidual (75-100%) Linfocitos (0-10%)
2a	1.036	Células de aspecto decidual (50-75%) Linfocitos (0-10%) Trofoblasto (0-25%)
3a	1.047	Trofoblasto (50-75%) Células de aspecto decidual (10-25%) Linfocitos (10-25%) Células de aspecto macrofágico (10-20%) Granulocitos (0-5%)
4a	1.059	Linfocitos (25-50%) Células de aspecto macrofágico (10-30%) Trofoblasto (0-25%) Células de aspecto decidual (0-10%) Granulocitos (0-10%)
5a	1.080	Linfocitos (80-90%) Granulocitos (10-20%) Células de aspecto macrofágico o decidual (0-10%)

Figura 28



La primera fracción (sobre el gradiente 1.027) esta formada en su mayor parte por células grandes, de aspecto decidual. También podemos encontrar linfocitos en una baja proporción (0-10%) (fig.29).

En la segunda fracción (sobre el gradiente 1.036) predominan también las células de aspecto decidual (50-75%), y en baja proporción aparecen linfocitos (0-10%) y trofoblasto (0-25%) (fig.30).

La tercera fracción (sobre el gradiente 1.047) contiene una gran cantidad de trofoblasto (50-75%), además se encuentran células de aspecto decidual (10-25%), linfocitos (10-20%), células de aspecto macrofágico (10-20%) y granulocitos (0-5%) (fig.31).

La cuarta fracción (sobre el gradiente 1.059) presenta sobre todo células linfoides, algunos granulocitos, células de aspecto macrofágico (10-30%), algunas células de aspecto decidual (0-10%), y restos de trofoblasto (0-25%) (fig. 32).

La quinta fracción (sobre el gradiente 1.080) está integrada fundamentalmente por linfocitos (80-90%) y granulocitos (10-20%), de forma aislada se pueden observar células de morfología decidual o macrofágica (0-10%) (fig 33).

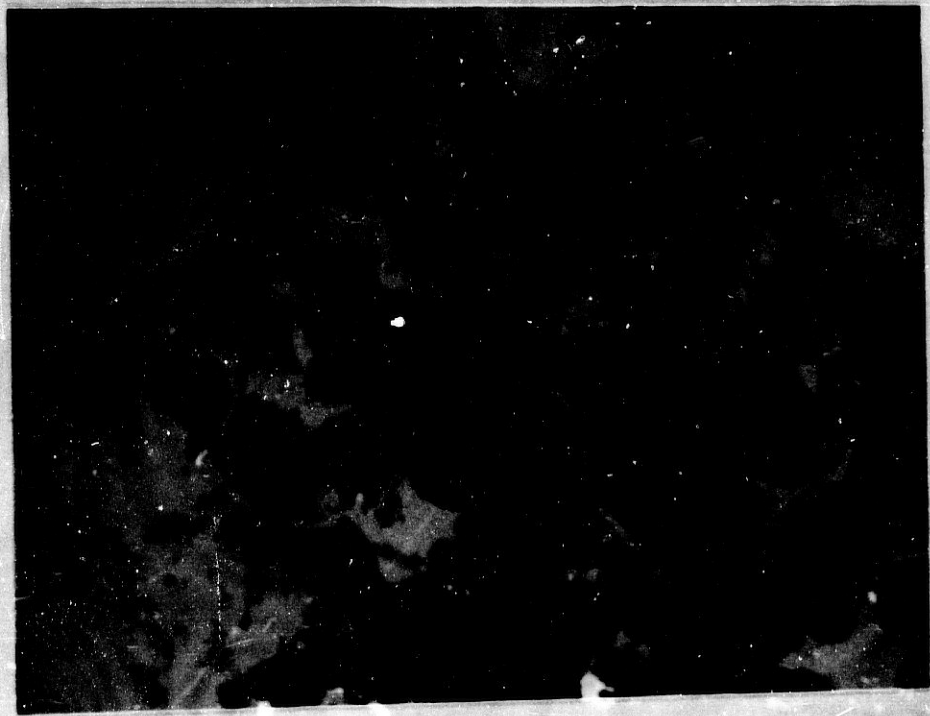
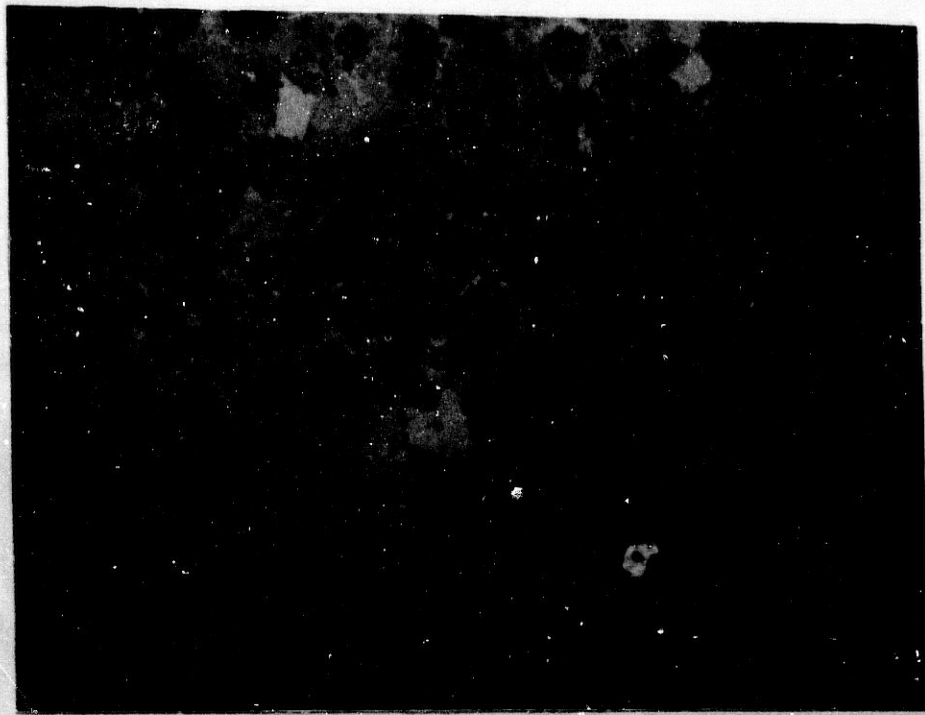


Figura 29. Extensiones de la 1ª fracción celular (de densidad 1.027) de decidua de primer trimestre (A) y de decidua a término (B). En los dos casos se puede observar que esta fracción está integrada fundamentalmente por células deciduales. Tinción de hematoxilina-eosina. (x400)

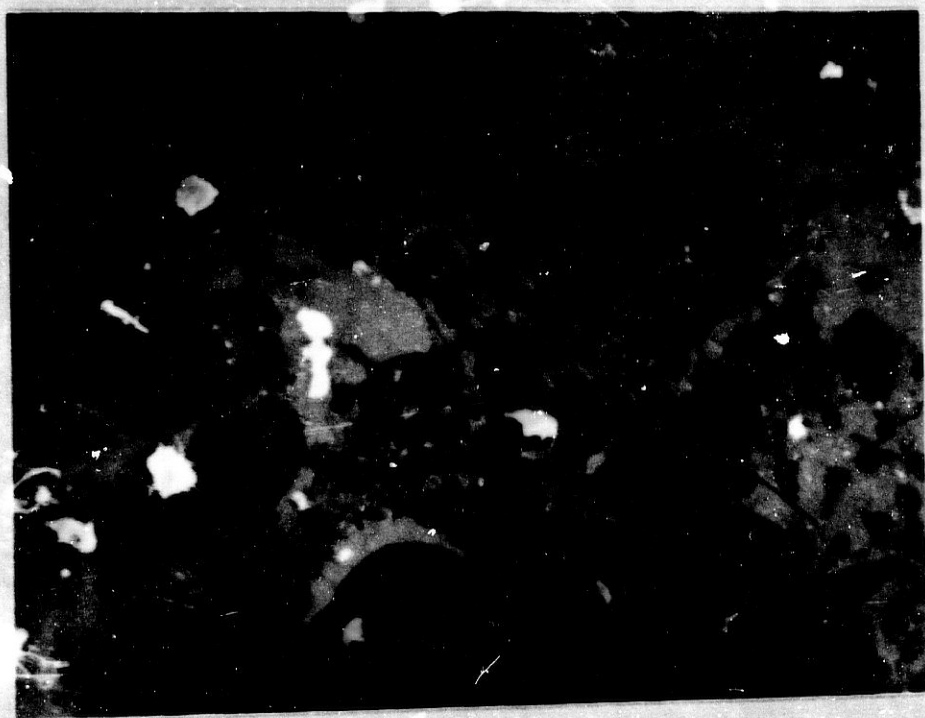
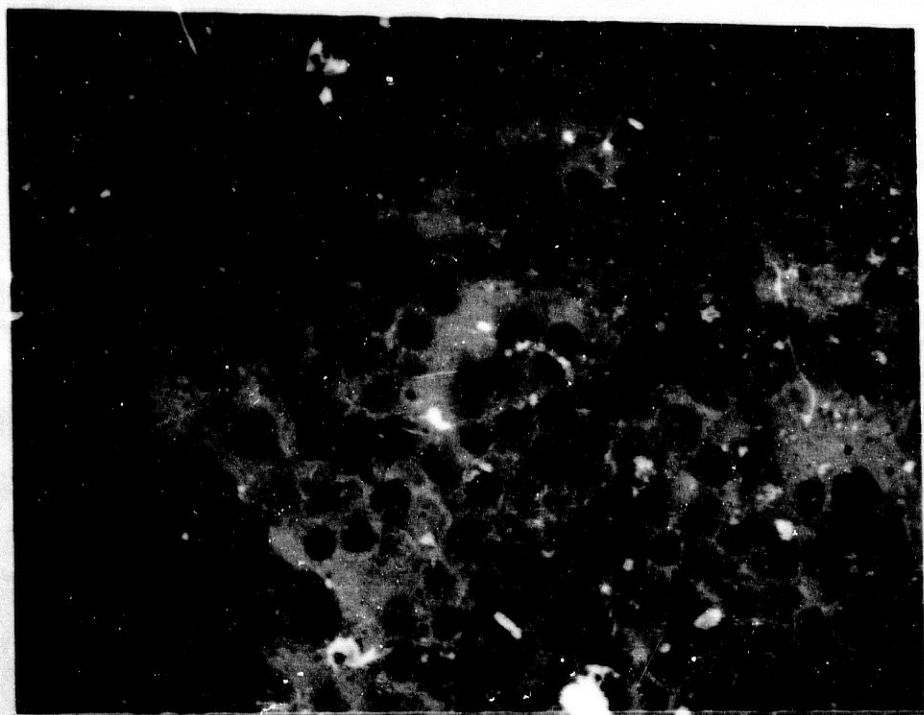


Figura 30. Extensiones de la 2ª fracción celular (de densidad 1.036) de decidua de primer trimestre (A) y de decidua a término (B). Aunque el componente celular más importante de esta fracción son las células deciduales, también observamos restos de trofoblasto, que son más evidentes en la decidua a término. Tinción de hematoxilina-eosina (x400)

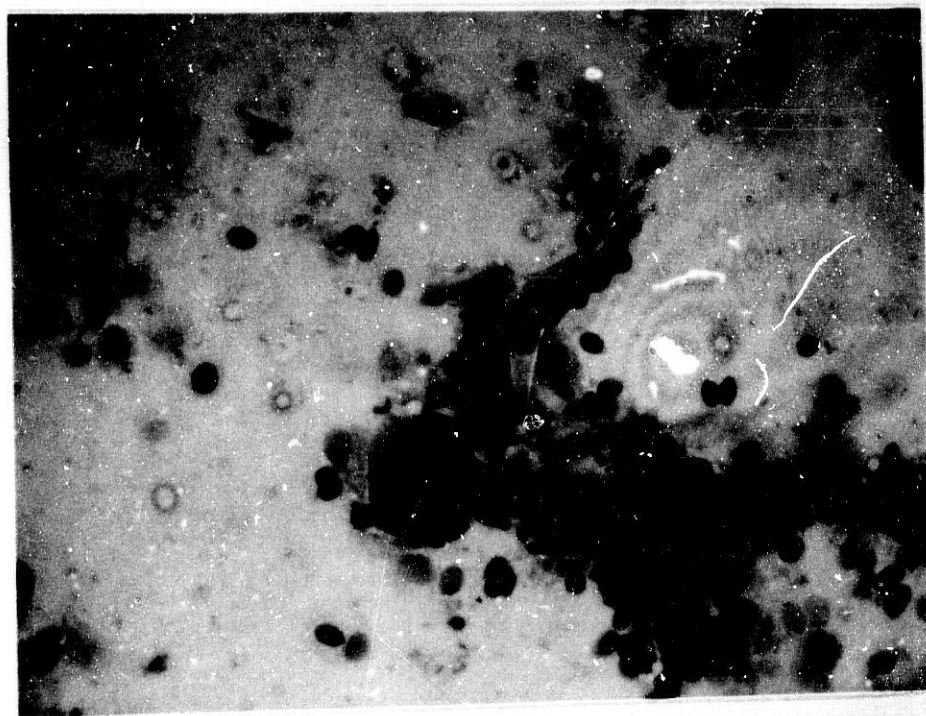
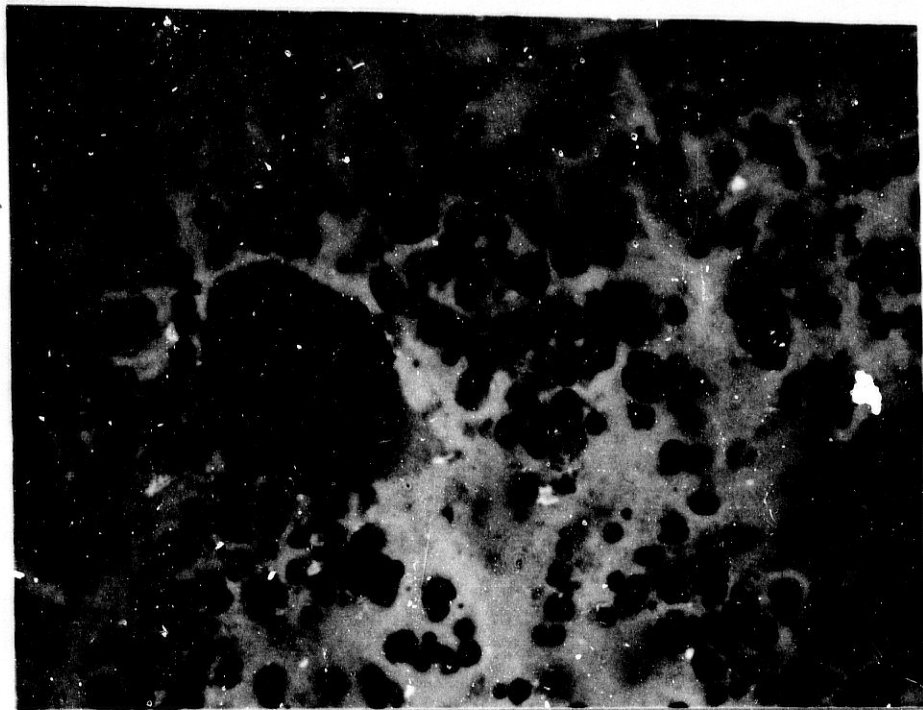


Figura 31. Extensiones de la 3ª fracción celular (de densidad 1.047) de decidua de primer trimestre (A) y de decidua a término (B). En esta fracción disminuyen las células deciduales y aumenta la cantidad de trofoblasto y leucocitos. Tinción de hematoxilina-eosina (x400)

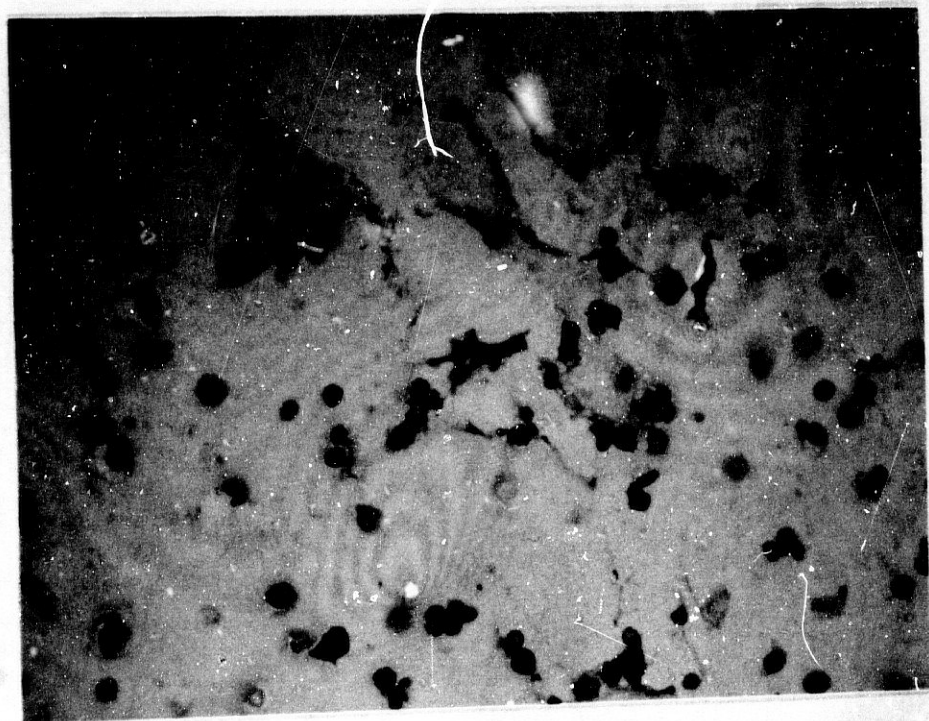
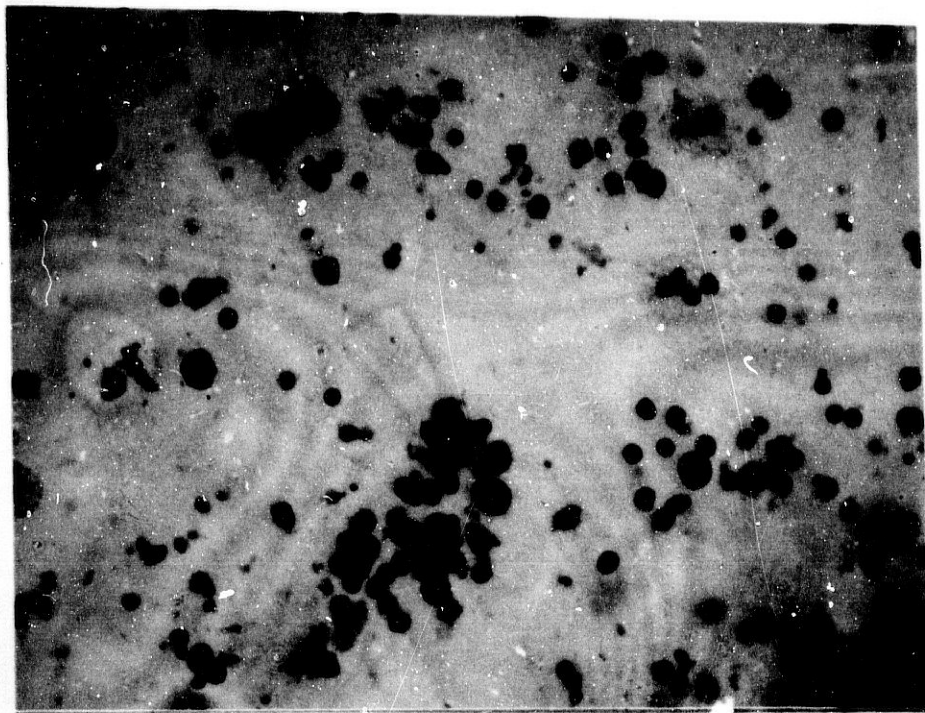


Figura 32. Extensiones de la 4ª fracción celular (de densidad 1.059) de decidua de primer trimestre (A) y de decidua a término (B). Esta fracción está formada en su mayor parte por leucocitos aunque todavía se pueden observar restos de trofoblasto y alguna célula decidual. Tinción de hematoxilina-eosina (x400).

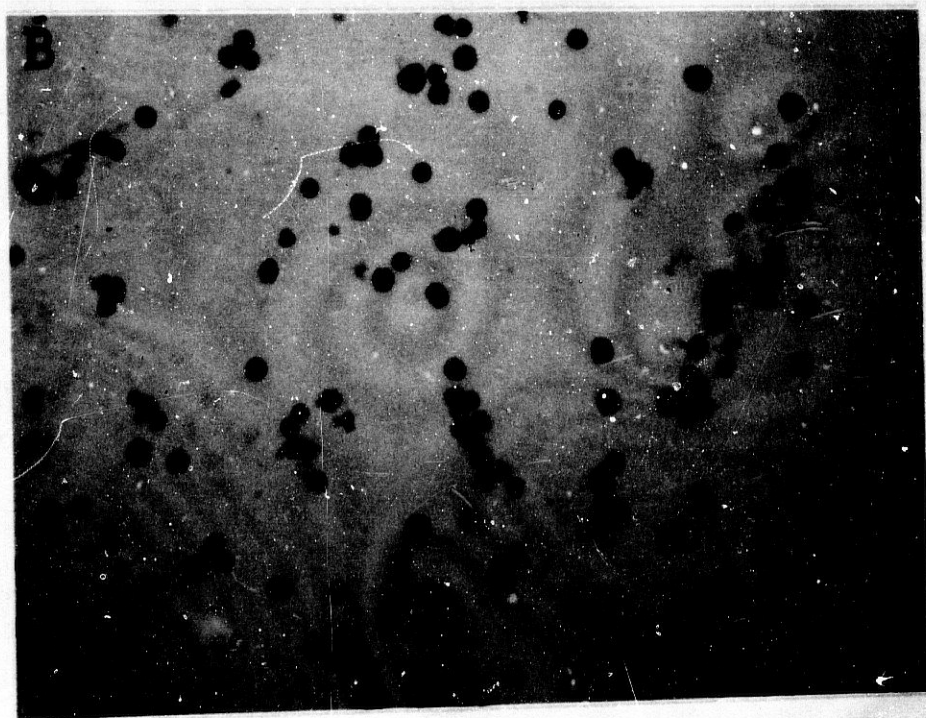
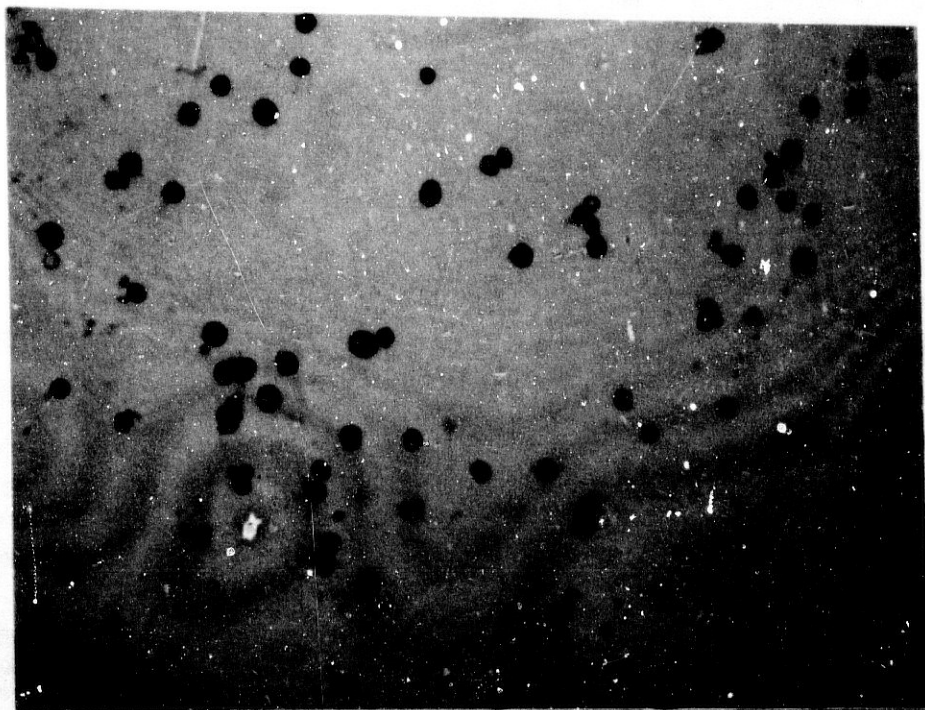


Figura 33. Extensiones de la 5ª fracción celular (de densidad 1.080) de decidua de primer trimestre (A) y de decidua a término (B). En esta fracción se seleccionan sobre todo linfocitos, también se observan algunos granulocitos y células macrófagas y deciduales aisladas.

ESTUDIO DE LAS FRACCIONES CELULARES OBTENIDAS TRAS LA
SEPARACION CON GRADIENTES DE PERCOLL MEDIANTE
INMUNOCITOQUIMICA Y CITOMETRIA DE FLUJO

1. Estudio inmunocitoquímico

En 5 de los 15 casos estudiados de suspensiones celulares de decidua de tercer trimestre, se realizaron extensiones celulares de las 3 primeras fracciones obtenidas tras la separación con gradientes de Percoll (consideramos la primera fracción la de densidad 1.027; la segunda y tercera fracción corresponden a las densidades 1.036 y 1.047 respectivamente). De las dos fracciones restantes no se pudieron realizar extensiones ya que, debido a la escasez de células obtenidas, se usaron todas para el estudio mediante citometría de flujo. En las extensiones se determinó la expresión de CD3, CD14, HLA-DR y CD16.

La expresión de CD3 fue escasa en las tres capas y se limita a células de morfología linfoide.

El antígeno HLA-DR fue ampliamente expresado en todas las capas, apareciendo en células de aspecto decidual y células de aspecto macrofágico (fig.34).

Células CD14⁺ de aspecto macrofágico se observan en las tres capas aunque son escasas en la primera y segunda (fig. 35).

También hemos encontrado una elevada expresión de CD16 por parte de células de aspecto decidual, linfocitos y algunas células de aspecto macrofágico (estas y los linfocitos principalmente en la tercera capa) (fig. 36)



Figura 34. Extensión celular de la 2ª fracción (de densidad 1.036) de decidua a término, donde se observa células deciduales DR⁺ y un macrófago (M) DR⁺ (x400)



Figura 35. Macrófagos CD14⁺ en la 3ª fracción (de densidad 1.047) de decidua a término (x400).

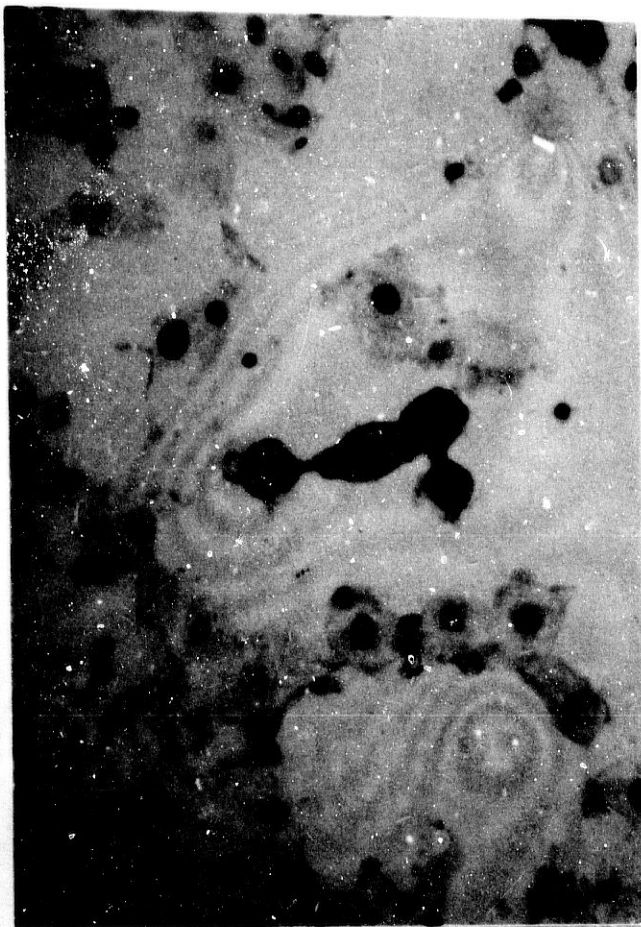


Figura 36. Suspensiones de decidua a término. Expresión de CD16.
A: células deciduales positivas en la 1ª fracción (de densidad 1.027) (x400) B: células deciduales positivas en la 2ª fracción (de densidad 1.036) (x400) C: células linfoides positivas en la 3ª fracción (de densidad 1.047) (x400).

2. Estudio mediante citometría de flujo

Mediante citometría de flujo se han estudiado los marcadores inmunes ya referidos en el "Material y Métodos". A través de un "Análisis de la Varianza de Doble Vía" se realizó un estudio comparativo de la expresión de cada marcador en todas las fracciones celulares. Debido a los requisitos del test analítico se tuvieron que desechar aquellos casos donde no se pudo determinar el marcador estudiado en todas las fracciones.

EXPRESION DE CD2

El porcentaje medio de células CD2⁺ es elevado en todas las fracciones celulares, tanto en primer como en tercer trimestre de gestación.

En primer trimestre el porcentaje medio de células positivas oscila entre un 35% sobre el gradiente de 1.047 y un 54% sobre el gradiente de 1.080 (tabla XIII, fig. 37).

Sin embargo en la decidua a término el porcentaje mínimo está sobre el gradiente de 1.027 con un 46% de células positivas, y el porcentaje máximo sobre el gradiente de 1.059 con un 70% de positividad (tabla XIV, fig. 38).

Sin embargo, ni en la decidua de primer trimestre ni en la decidua a término existen diferencias

estadísticamente significativas en la proporción de células positivas en las cinco fracciones celulares.

Tabla XIII: Evolución de la expresión de CD2 en las fracciones celulares. Suspensiones de tejido decidual de primer trimestre

	1,027	1,036	1,047	1,059	1,080
1,027 (1a)	52,5 ± 5,43 n=6	NS	NS	NS	NS
1,036 (2a)		55,5 ± 11,04 n=6	NS	NS	NS
1,047 (3a)			34,7 ± 10,86 n=6	NS	NS
1,059 (4a)				42,5 ± 5,72 n=6	NS
1,080 (5a)					54,5 ± 9,59 n=6

$F_{exp} = 6,98$ NS 3a 4a 1a 2a 5a

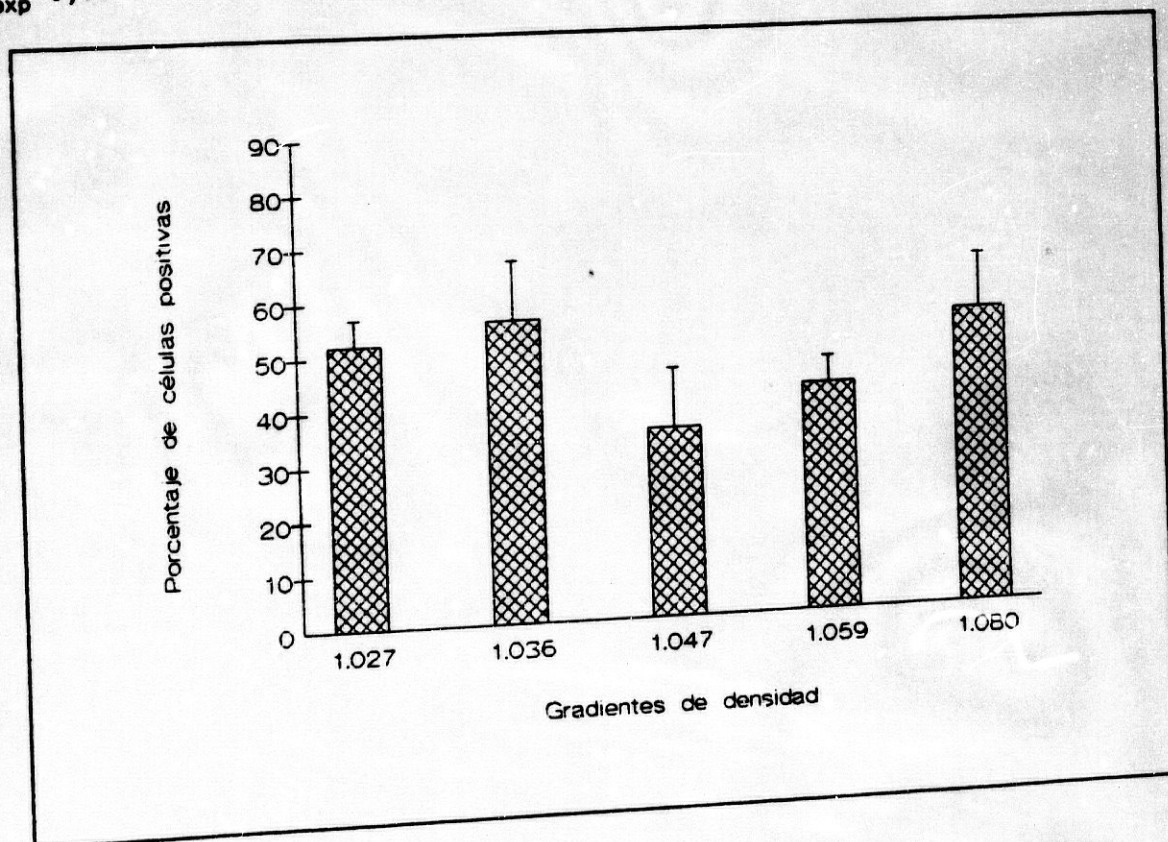


Figura 37. Evolución de la expresión de CD2 en las fracciones celulares. Suspensiones de tejido decidual de primer trimestre

Tabla XIV: Evolución de la expresión de CD2 en las fracciones celulares. Suspensiones de tejido decidual de tercer trimestre

	1,027	1,036	1,047	1,059	1,080
1,027 (1a)	46,2 ± 5,54 n=5	NS	NS	NS	NS
1,036 (2a)		47 ± 8,28 n=5	NS	NS	NS
1,047 (3a)			47,4 ± 22,63 n=5	NS	NS
1,059 (4a)				70,2 ± 11,97 n=5	NS
1,080 (5a)					57 ± 7,55 n=5

$F_{exp} = 5,15$ NS 1a 2a 3a 5a 4a

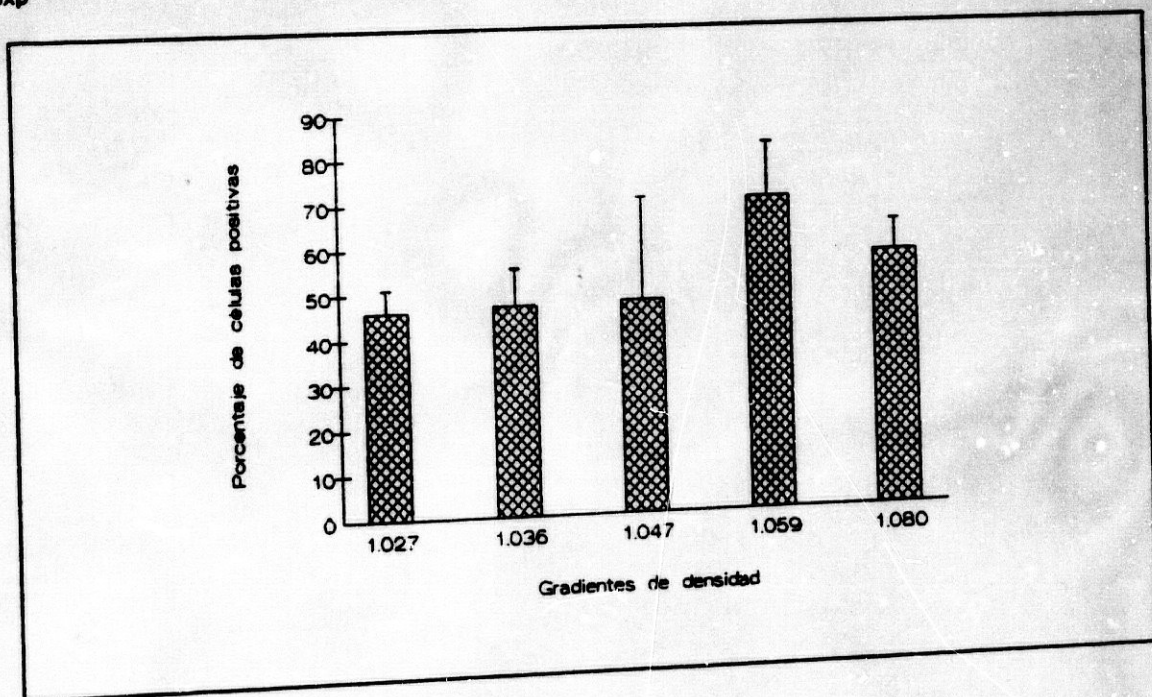


Figura 38. Evolución de la expresión de CD2 en las fracciones celulares. Suspensiones de tejido decidual de tercer trimestre

EXPRESION DE CD16

En suspensiones celulares de primer trimestre el porcentaje medio de células CD16⁺ es similar en las fracciones celulares de menor densidad (1.027 y 1.036), y desciende de forma significativa conforme va aumentando el gradiente de densidad (tabla XV, fig. 39).

En las suspensiones celulares de decidua a término el porcentaje medio de células positivas es similar en las fracciones celulares de densidades 1.027, 1.036 y 1.047, descendiendo significativamente después conforme aumenta la densidad (tabla XVI, fig.40)

Tabla XV: Evolución de la expresión de CD16 en las fracciones celulares. Suspensiones de tejido decidual de primer trimestre

	1,027	1,036	1,047	1,059	1,080
1,027 (1a)	49,3 ± 7,31 n=6	NS	p<0,05	p<0,01	p<0,01
1,036 (2a)		56,8 ± 7,03 n=6	p<0,01	p<0,01	p<0,01
1,047 (3a)			36 ± 8,39 n=6	p<0,05	p<0,01
1,059 (4a)				26,2 ± 10,53 n=6	p<0,01
1,080 (5a)					4,17 ± 0,75 n=6

$F_{exp} = 52,5$ $p < 0,001$ 5a 4a 3a 1a 2a

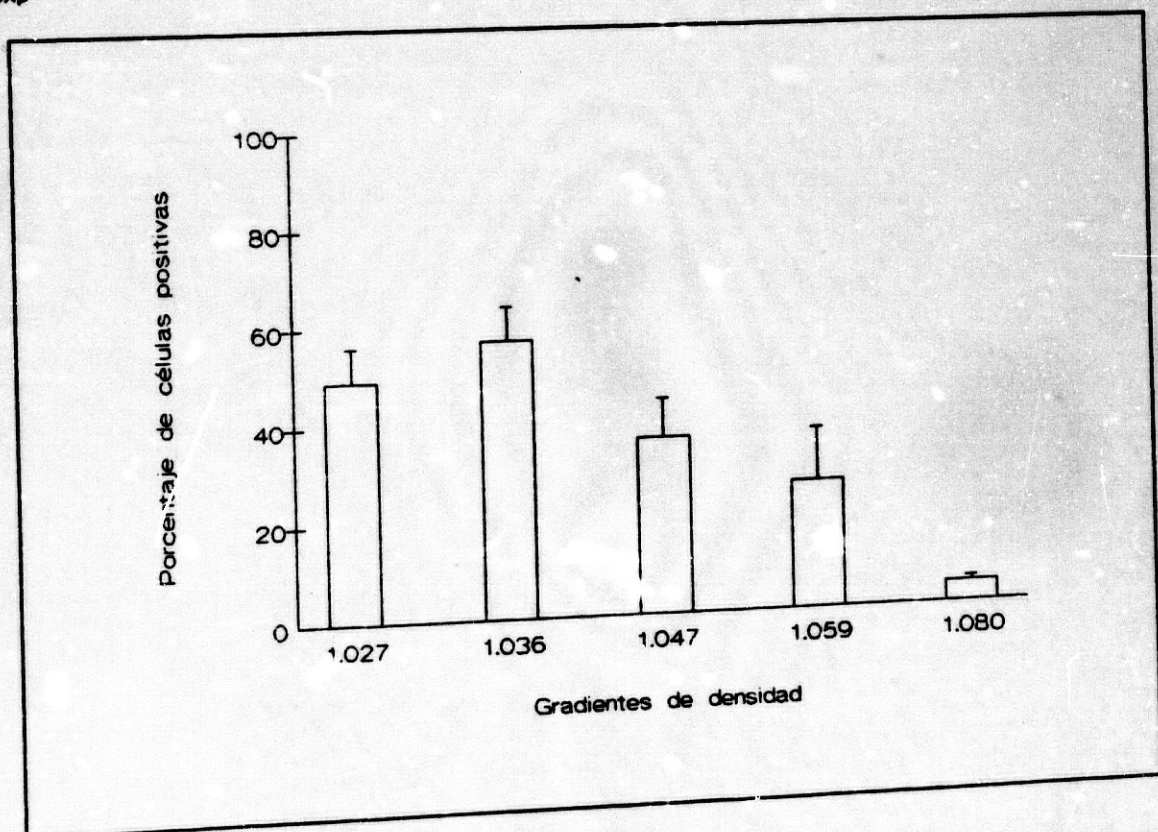


Figura 39. Evolución de la expresión de CD16 en las fracciones celulares. Suspensiones de tejido decidual de primer trimestre

Tabla XVI: evolución de la expresión de CD16 en las fracciones de celulares. Suspensiones de tejido decidual de tercer trimestre.

	1,027	1,036	1,047	1,059	1,080
1,027 (1a)	63,6 ± 14,9 n=8	NS	NS	NS	p<0,01
1,036 (2a)		71,0 ± 9,61 n=8	NS	p<0,05	p<0,01
1,047 (3a)			74,2 ± 16,75 n=8	p<0,01	p<0,01
1,059 (4a)				57,4 ± 11,56 n=8	p<0,01
1,080 (5a)					37 ± 4,35 n=8

$F_{exp} = 9,27$ $p < 0,025$ 5a 4a 1a 2a 3a

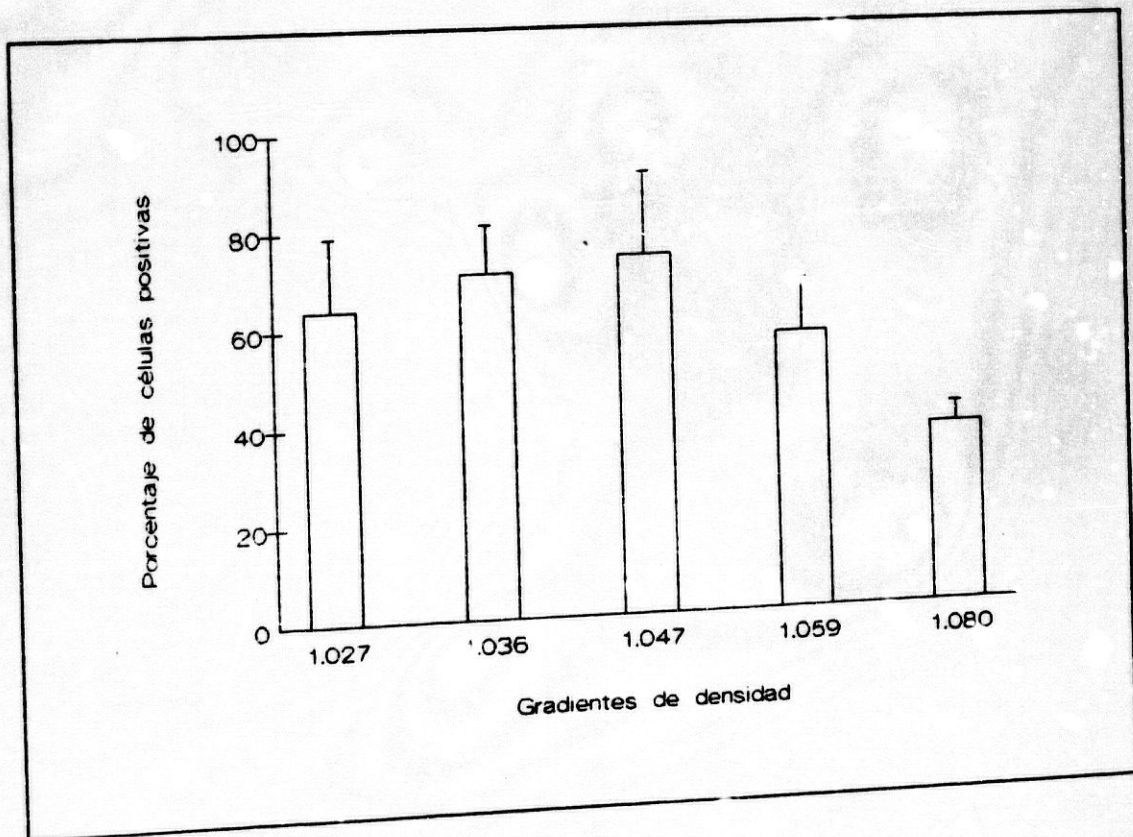


Figura 40. Evolución de la expresión de CD16 en las fracciones de celulares. Suspensiones de tejido decidual de tercer trimestre.

EXPRESION DE CD14

En las suspensiones de decidua de primer trimestre, y en las de decidua a término, el porcentaje de células CD14⁺ es significativamente más elevado en las fracciones de densidad 1.047 y 1.059 siendo similar en el resto de las fracciones (tabla XVII y XVIII, fig 41 y 42). La expresión de CD14 en la 5ª fracción solo se pudo determinar en dos casos de decidua de primer trimestre, en las que el porcentaje de células positivas fue de 1 y 3% respectivamente.

Tabla XVII: Evolución de la expresión de CD14 en las fracciones celulares. Suspensiones de tejido decidual de primer trimestre.

	1,027	1,036	1,047	1,059
1,027 (1a)	5,7 ± 2,75 n=10	NS	p<0,01	p<0,01
1,036 (2a)		4,3 ± 1,7 n=10	p<0,01	p<0,01
1,047 (3a)			11,9 ± 3,45 n=10	NS
1,059 (4a)				12,6 ± 4,62 n=10

$F_{exp}=21,25$ $p<0,025$ 2a 1a 3a 4a

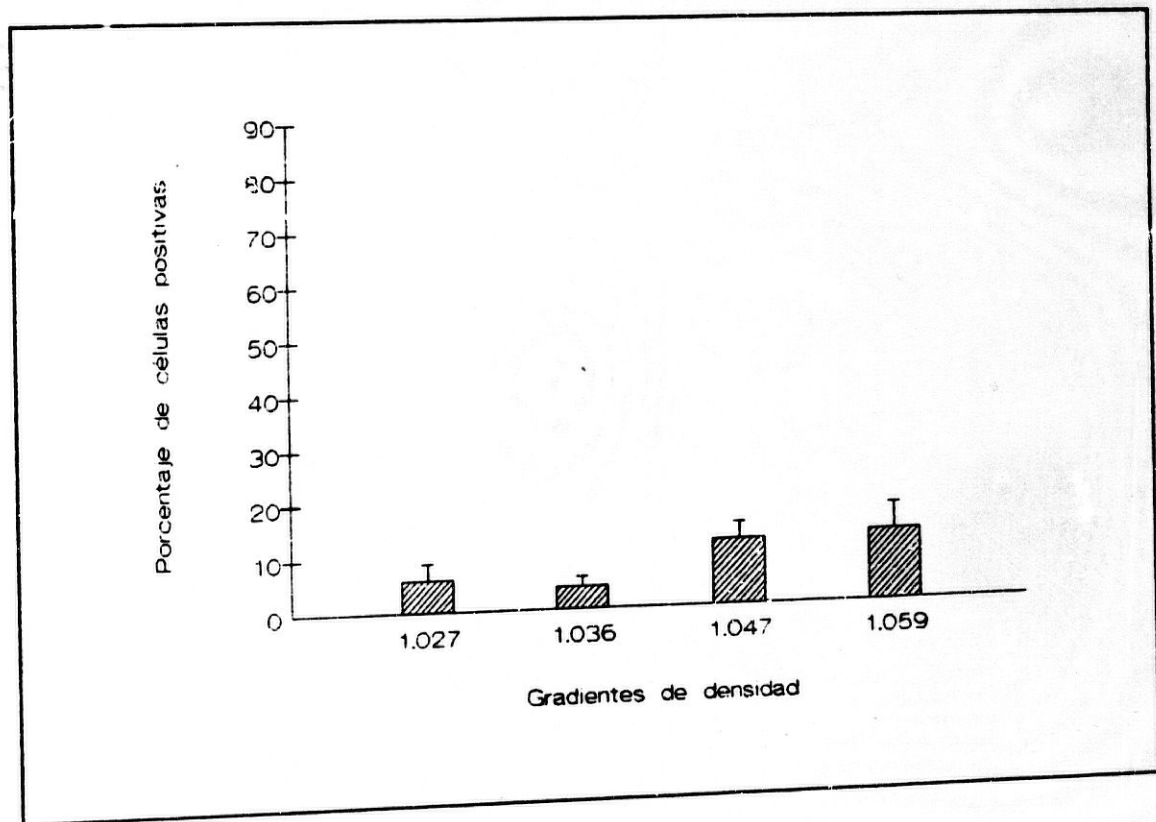


Figura 41. Evolución de la expresión de CD14 en las fracciones celulares. Suspensiones de tejido decidual de primer trimestre.

Tabla XVIII: Evolución de la expresión de CD14 en las fracciones celulares. Suspensiones de tejido decidual de tercer trimestre.

	1,027	1,036	1,047	1,059	1,080
1,027 (1a)	5,9 ± 8,36 n=14	NS	p<0,01	p<0,01	NS
1,036 (2a)		4,7 ± 5,19 n=14	p<0,01	p<0,01	NS
1,047 (3a)			16,5 ± 5,16 n=14	p<0,01	p<0,01
1,059 (4a)				26,0 ± 10,01 n=14	p<0,01
1,080 (5a)					3,2 ± 3,13 n=14

$F_{exp} = 26,34$ $p < 0,005$ 5a 2a 1a 3a 4a

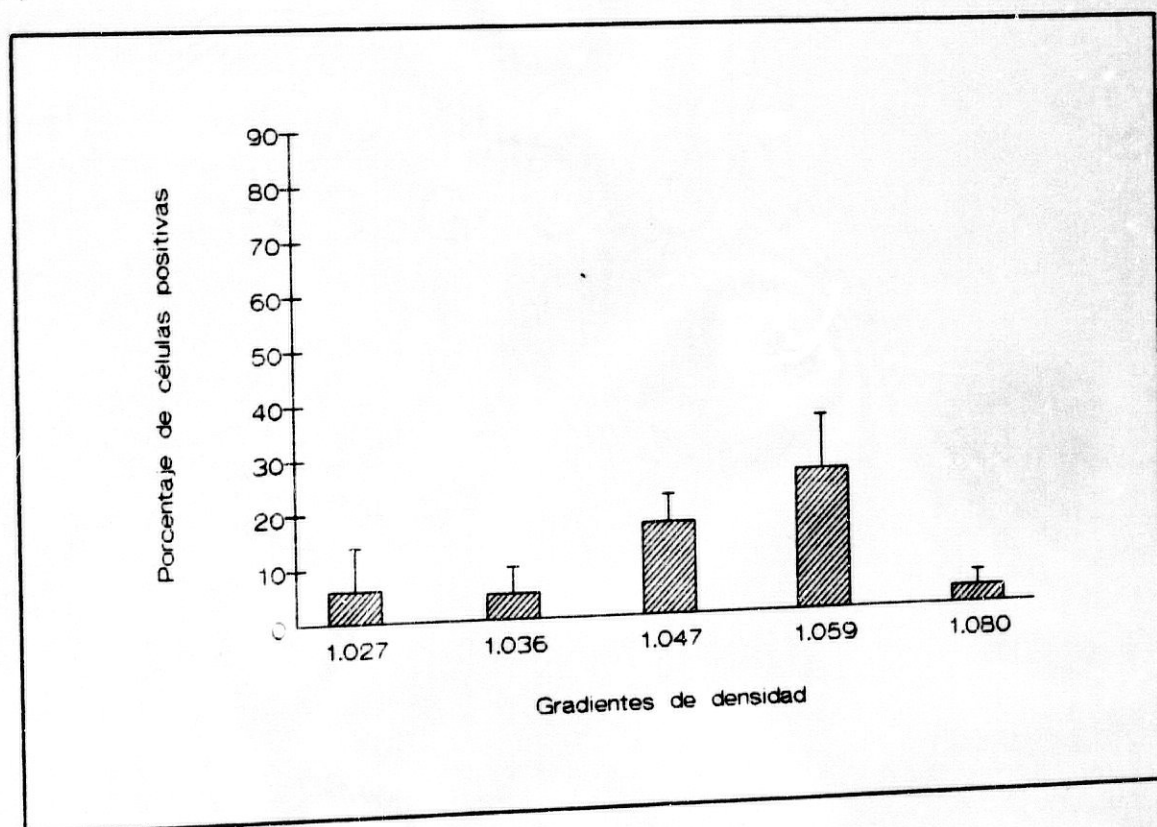


Figura 42. Evolución de la expresión de CD14 en las fracciones celulares. Suspensiones de tejido decidual de tercer trimestre.

EXPRESION DE HLA-DR

En las suspensiones celulares de primer trimestre el porcentaje de células HLA-DR⁺ disminuye conforme va aumentando la densidad. Es significativamente superior en las dos primeras fracciones (tabla XIX, fig 43). No se pudo determinar la expresión de este antígeno en la 5ª fracción debido a la falta de muestra.

En las suspensiones celulares de decidua a término, el porcentaje medio de células positivas es ligeramente superior en la 1ª fracción, es similar en las fracciones 2ª, 3ª y 4ª y descendiende significativamente en la fracción de 1.080 (tabla XX, fig.44).

Tabla XIX: Evolución de la expresión de HLA-DR en las fracciones celulares. Suspensiones de tejido decidual de primer trimestre.

	1,027	1,036	1,047	1,059
1,027 (1a)	38,7 ± 7,35 n=10	NS	p<0,01	p<0,01
1,036 (2a)		34,4 ± 11,5 n=10	p<0,01	p<0,01
1,047 (3a)			22,1 ± 12,28 n=10	NS
1,059 (4a)				19,9 ± 8,69 n=10

$F_{exp} = 12,78$ $p < 0,05$ 4a 3a 2a 1a

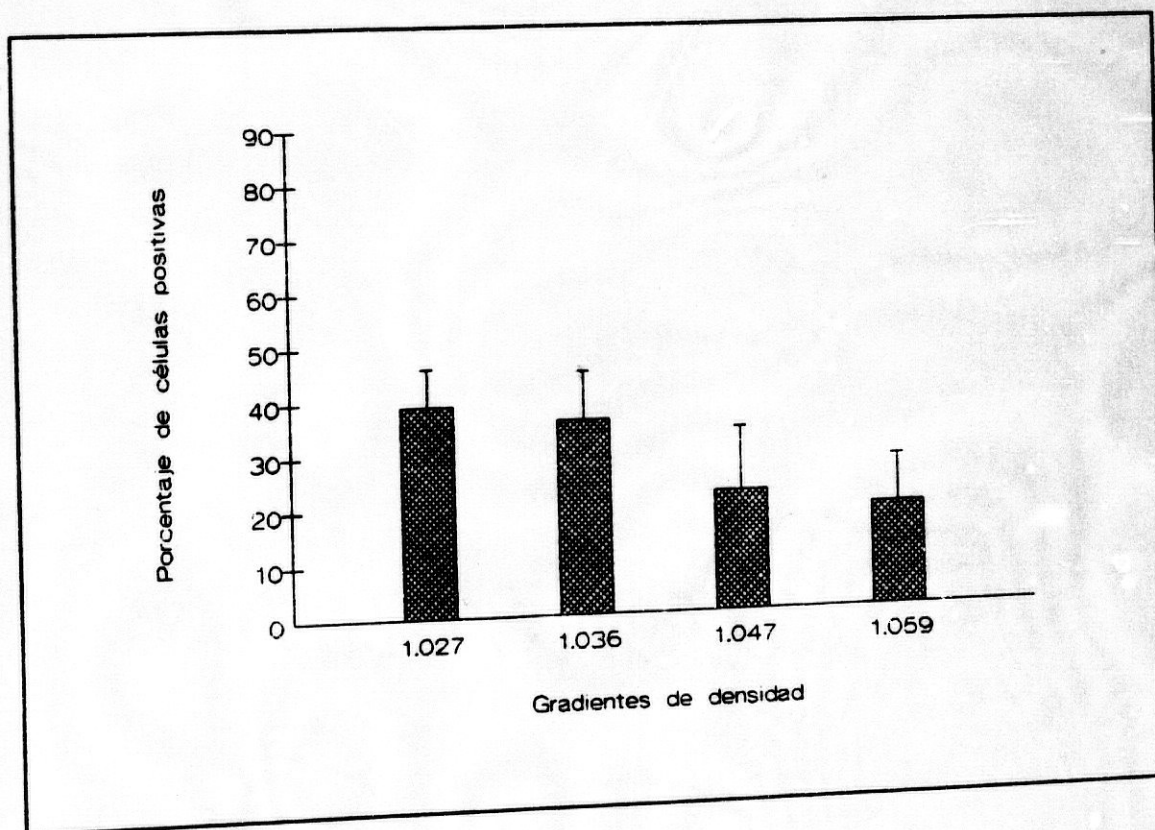


Figura 43. Evolución de la expresión de HLA-DR en las fracciones celulares. Suspensiones de tejido decidual de primer trimestre.

Tabla XX: Evolución de la expresión de HLA-DR en las fracciones celulares. Suspensiones de tejido decidual de tercer trimestre.

	1,027	1,036	1,047	1,059	1,080
1,027 (1a)	44,1 ± 4,87 n=11	NS	p<0,05	p<0,05	p<0,01
1,036 (2a)		41,8 ± 10,47 n=11	NS	NS	p<0,01
1,047 (3a)			33,3 ± 13,97 n=11	NS	p<0,01
1,059 (4a)				32,8 ± 11,87 n=11	p<0,01
1,080 (5a)					8,7 ± 6,13 n=11

$F_{exp} = 34,01$ $p < 0,005$ 5a 3a 4a 2a 1a

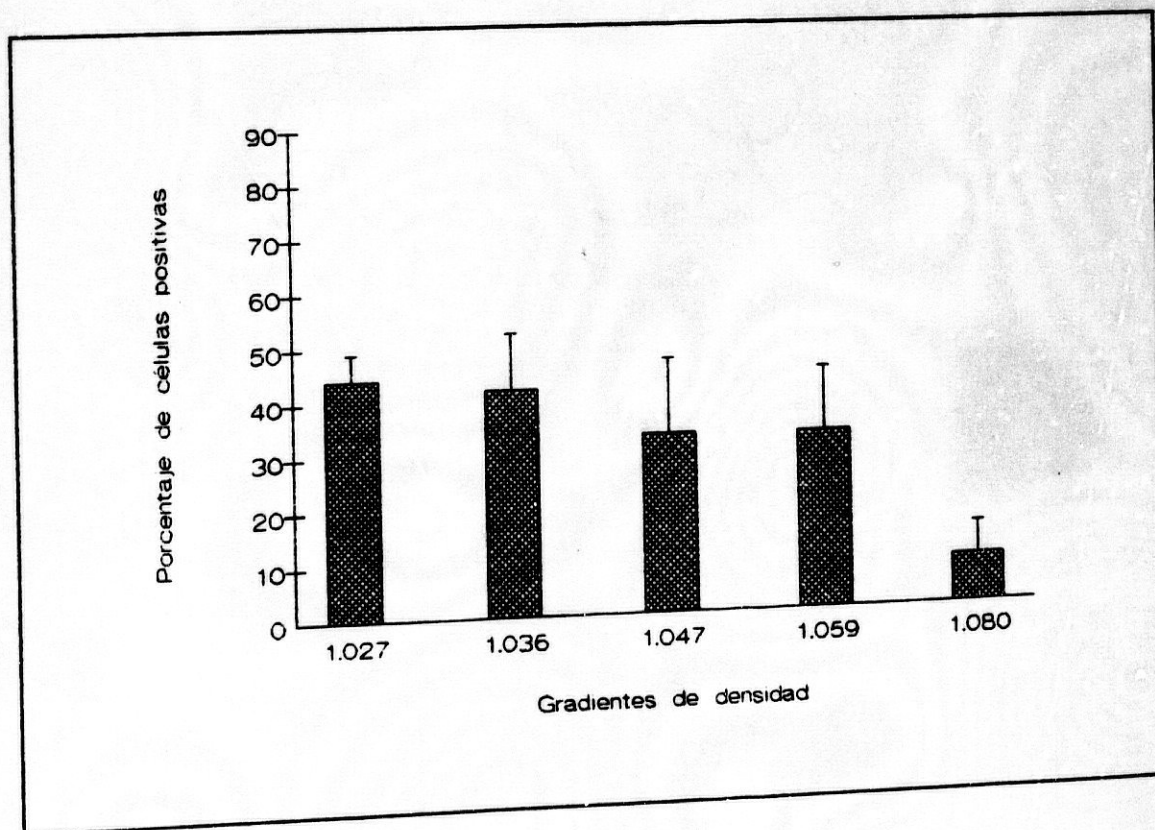


Figura 44. Evolución de la expresión de HLA-DR en las fracciones celulares. Suspensiones de tejido decidual de tercer trimestre.

EXPRESION DE CD3

Al analizar la expresión de CD3 en las distintas fracciones celulares obtenidas al separar las suspensiones de tejido decidual con gradientes de Percoll, observamos que tanto en primer trimestre, como en la decidual a término, el porcentaje medio de células CD3⁺ no supera el 10% en las dos fracciones de menor densidad y va ascendiendo significativamente conforme aumentamos la densidad del gradiente (tabla XXI y XXII, fig. 45 y 46). Este ascenso es más evidente en la decidual a término que en tercer trimestre.

Tabla XXI: Evolución de la expresión de CD3 en las fracciones celulares. Suspensiones de tejido decidual de primer trimestre

	1,027	1,036	1,047	1,059	1,080
1,027 (1a)	3,2 ± 1,64 n=5	NS	NS	p<0,05	p<0,01
1,036 (2a)		2,6 ± 1,14 n=5	NS	p<0,05	p<0,01
1,047 (3a)			7,6 ± 3,85 n=5	NS	p<0,01
1,059 (4a)				14 ± 4,30 n=5	NS
1,080 (5a)					19 ± 12,85 n=5

$F_{exp} = 14,2$ $p < 0,05$ 1a 2a 3a 4a 5a

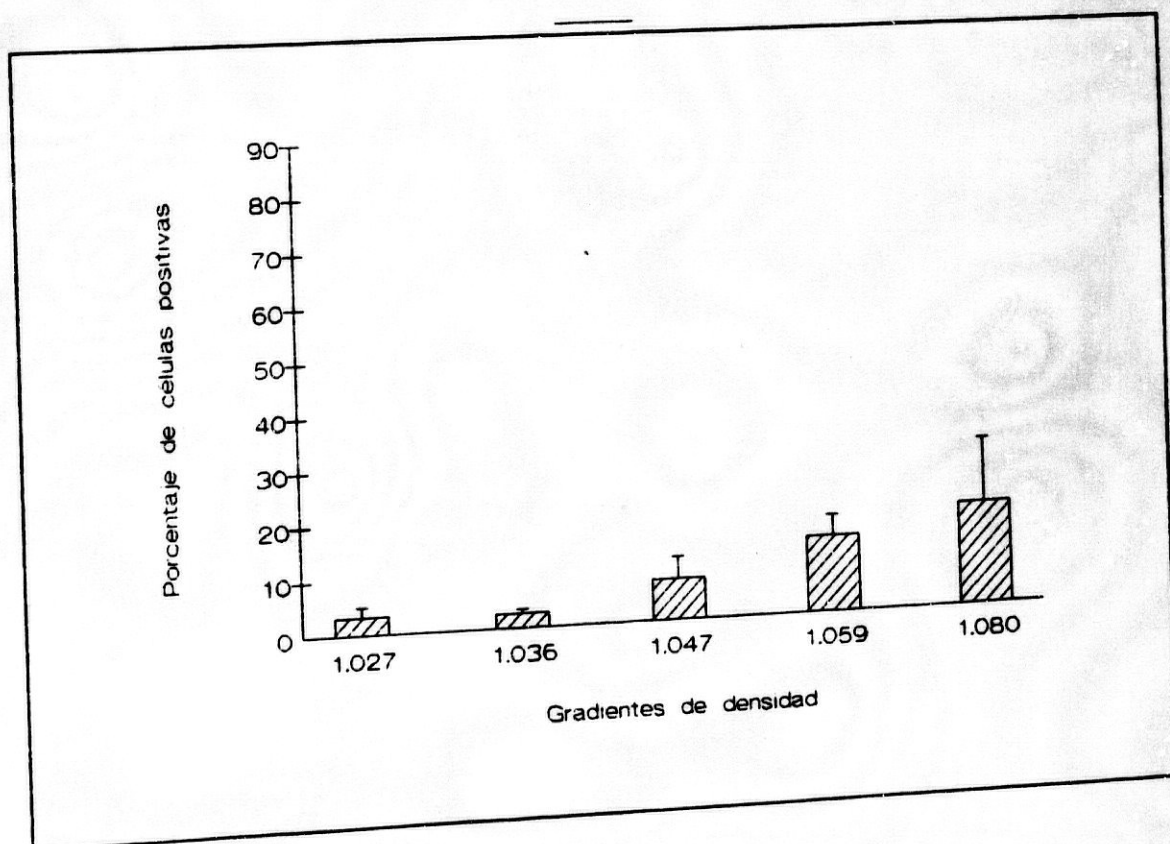


Figura 45. Evolución de la expresión de CD3 en las fracciones celulares. Suspensiones de tejido decidual de primer trimestre

Tabla XXII : Evolución de la expresión de CD3 en las fracciones celulares.
Suspensiones de tejido decidual de tercer trimestre

	1,027	1,036	1,047	1,059	1,080
1,027 (1a)	4,3 ± 2,87 n=11	NS	p<0,01	p<0,01	p<0,01
1,036 (2a)		6,7 ± 3,58 n=11	p<0,05	p<0,01	p<0,01
1,047 (3a)			12,2 ± 3,97 n=11	p<0,05	p<0,01
1,059 (4a)				19,6 ± 10 n=11	p<0,05
1,080 (5a)					41 ± 9,12 n=11

$F_{exp} = 47,2$ $p < 0,001$ 1a 2a 3a 4a 5a

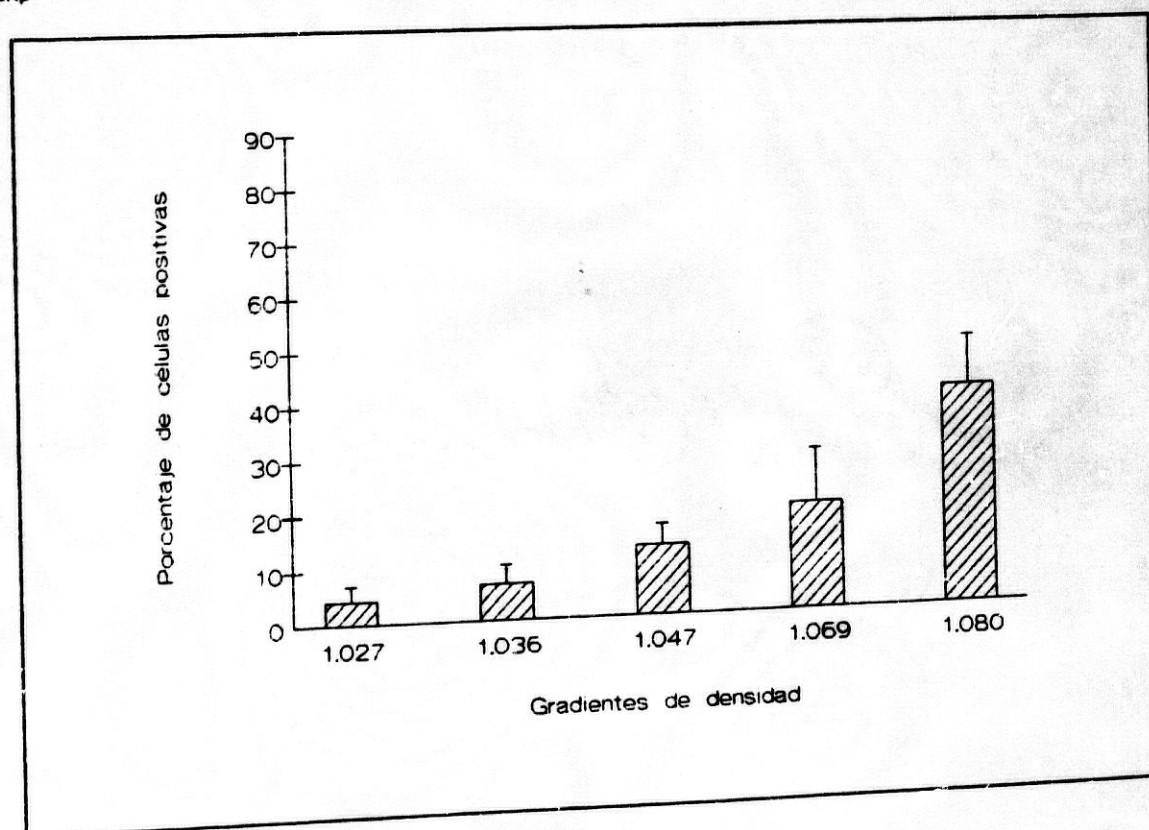


Figura 46. Evolución de la expresión de CD3 en las fracciones celulares.
Suspensiones de tejido decidual de tercer trimestre

EXPRESION DE CD4, CD8 Y CD20

Estos marcadores se analizaron en la fracción de más densidad en las suspensiones procentes de decidua de primer trimestre y a término. En la fracción de densidad 1.059 de suspensiones de decidua a término se analizó también, la expresión de CD8 y CD4. La expresión de estos marcadores no se estudió en todas las fracciones por falta de muestra. Destaca la escasa expresión de CD20 en la fracción de densidad 1.080 y que la proporción de células CD8⁺ es superior a la de CD4⁺ en esta misma fracción y en los dos trimestres estudiados (tabla XXIII, fig.47 y 48)

Tabla XXIII: Expresión de CD4, CD8 y CD20 en las fracciones celulares de decidua de primer y tercer trimestre.

Densidad	Primer Trimestre			Tercer Trimestre			
	n	Media	SD	n	Media	SD	
1.059	CD4	NR	-	10	24,9	10,41	
	CD8	NR	-	10	19,5	9,06	
1.080	CD4	10	6,5	6,87	14	19,57	7,5
	CD8	10	9,3	5,87	13	29,15	6,48
	CD20	4	2,25	0,96	10	8,40	5,40

NR: no realizado

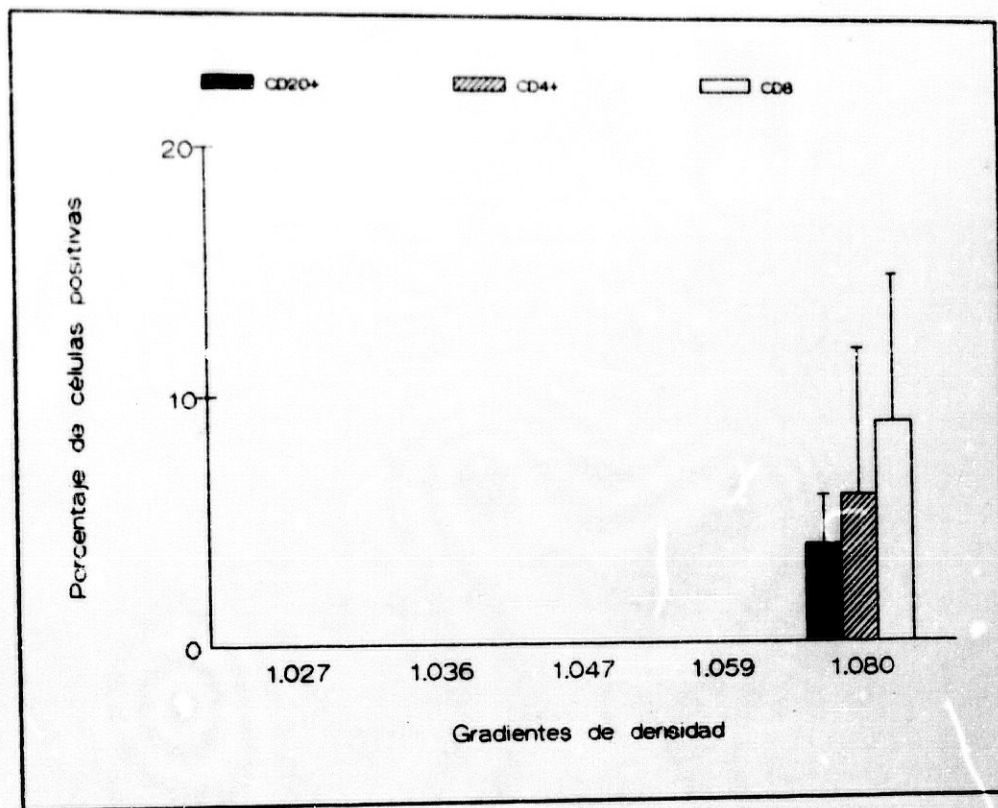


Figura 47. Expresión de CD4, CD8 y CD20 en las fracciones celulares. Decidua de primer trimestre.

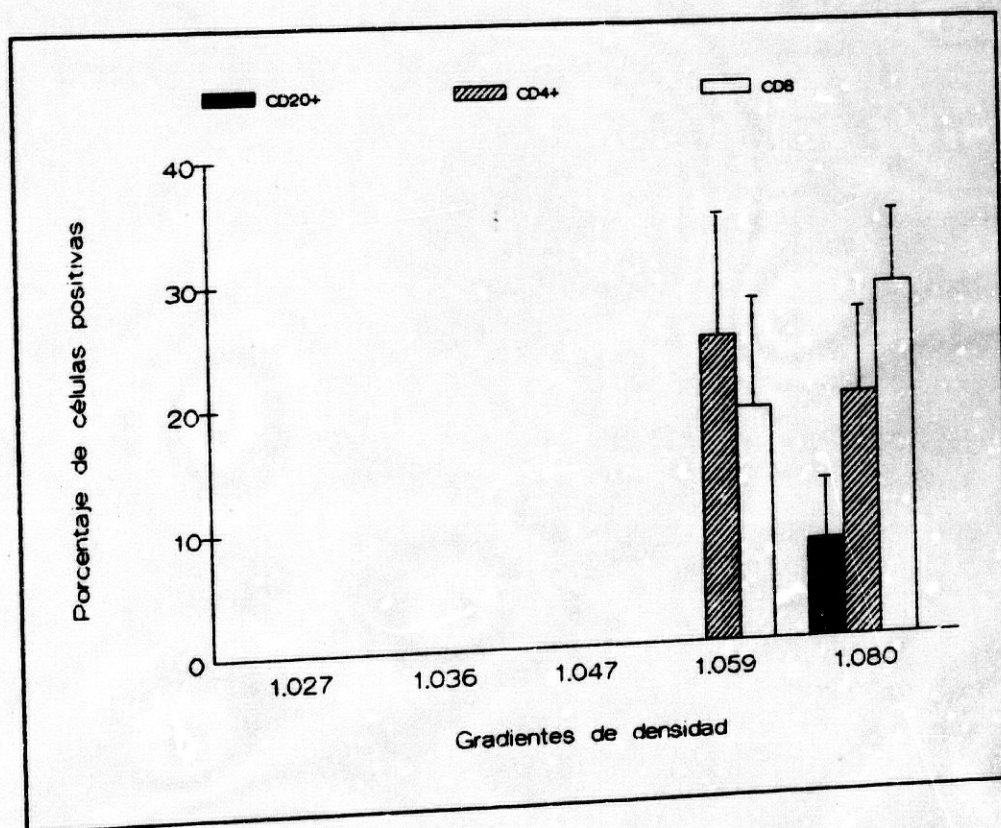


Figura 48. Expresión de CD4, CD8 y CD20 en las fracciones celulares. Decidua de tercer trimestre.

ESTUDIO COMPARATIVO POR CITOMETRIA DE FLUJO DE LAS
FRACCIONES CELULARES SEPARADAS POR GRADIENTES DE DENSIDAD
EN TEJIDO DECIDUAL DE PRIMER Y TERCER TRIMESTRE DE
GESTACION

FRACCION CELULAR DE DENSIDAD 1.027

En esta fracción destaca la elevada expresión de HLA-DR, CD2 y CD16 en los dos trimestres estudiados, mientras que la expresión de CD3 y CD14 es baja.

No se detectan diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje medio de células CD3⁺, CD14⁺, CD16⁺ y HLA-DR⁺ al comparar primer y tercer trimestre. Sin embargo la proporción de células CD2⁺ es significativamente superior en primer trimestre ($p < 0.05$) (tabla XXIV, fig.49).

Tabla XXIV: Porcentaje medio de células CD3⁺, DR⁺, CD14⁺, CD2⁺ y CD16⁺, en la fracción celular de densidad 1,027 de decidua de primer y tercer trimestre

Células	Primer Trimestre		Tercer Trimestre		R _{exp} (n ₁ , n ₂)	Significación
	Media	SD	Media	SD		
CD3 ⁺	4,7	2,63	4,36	2,87	116,5 (10, 11)	NS
DR ⁺	38,7	7,35	46,07	8,05	95,5 (10, 15)	NS
CD14 ⁺	5,7	2,75	5,6	3,16	155 (10, 14)	NS
CD2 ⁺	57,6	8,02	46,0	4,98	28 (6, 10)	p<0,05
CD16 ⁺	60'6	17'36	63'63	14'96	81'5 (8, 10)	NS

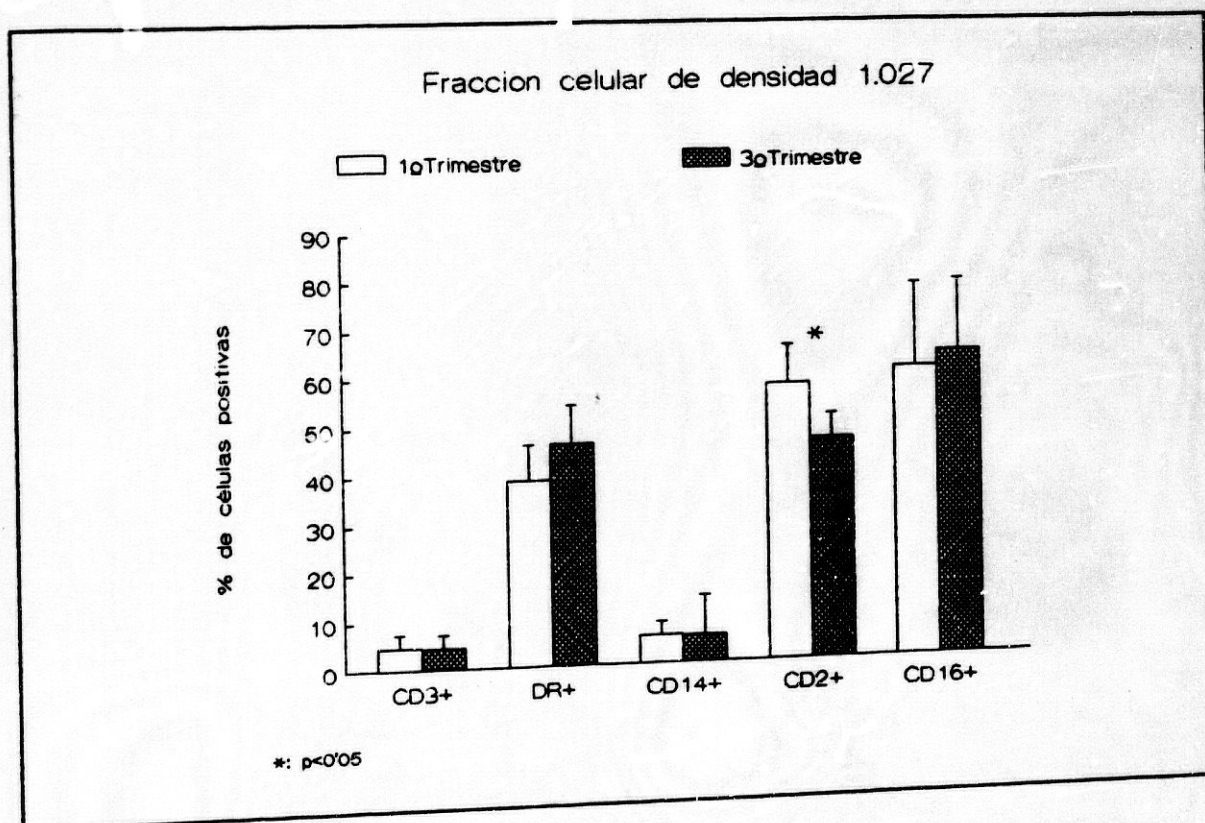


Figura 49. Porcentaje medio de células CD3⁺, DR⁺, CD14⁺, CD2⁺ y CD16⁺, en la fracción celular de densidad 1,027 de decidua de primer y tercer trimestre

FRACCION CELULAR DE DENSIDAD 1.036

El perfil inmune de esta fracción es similar al de la anterior. Los antígenos más expresados son CD16, CD2 y HLA-DR, mientras que la expresión de CD3 y CD14 es escasa.

No existen diferencias significativas al comparar los porcentajes de células positivas para los marcadores inmunes estudiados, en primer y tercer trimestre de embarazo (Tabla XXV, fig.50)

Tabla XXV: Porcentaje medio de células CD3⁺, DR⁺, CD14⁺, CD2⁺ y CD16⁺, en la fracción celular de densidad 1,036 de decidua de primer y tercer trimestre

Células	Primer Trimestre		Tercer Trimestre		R _{exp} (n ₁ ,n ₂)	Significación
	Media	SD	Media	SD		
CD3 ⁺	5,1	3,03	6,69	3,33	100,5 (10, 13)	NS
DR ⁺	35,8	8,89	37,92	13,92	109 (10, 13)	NS
CD14 ⁺	4,3	1,57	4,53	5,10	151 (10, 15)	NS
CD2 ⁺	56,4	9,69	45,83	7,94	32,5 (6, 10)	NS
CD16 ⁺	62,1	9,83	71,00	9,61	75 (8, 10)	NS

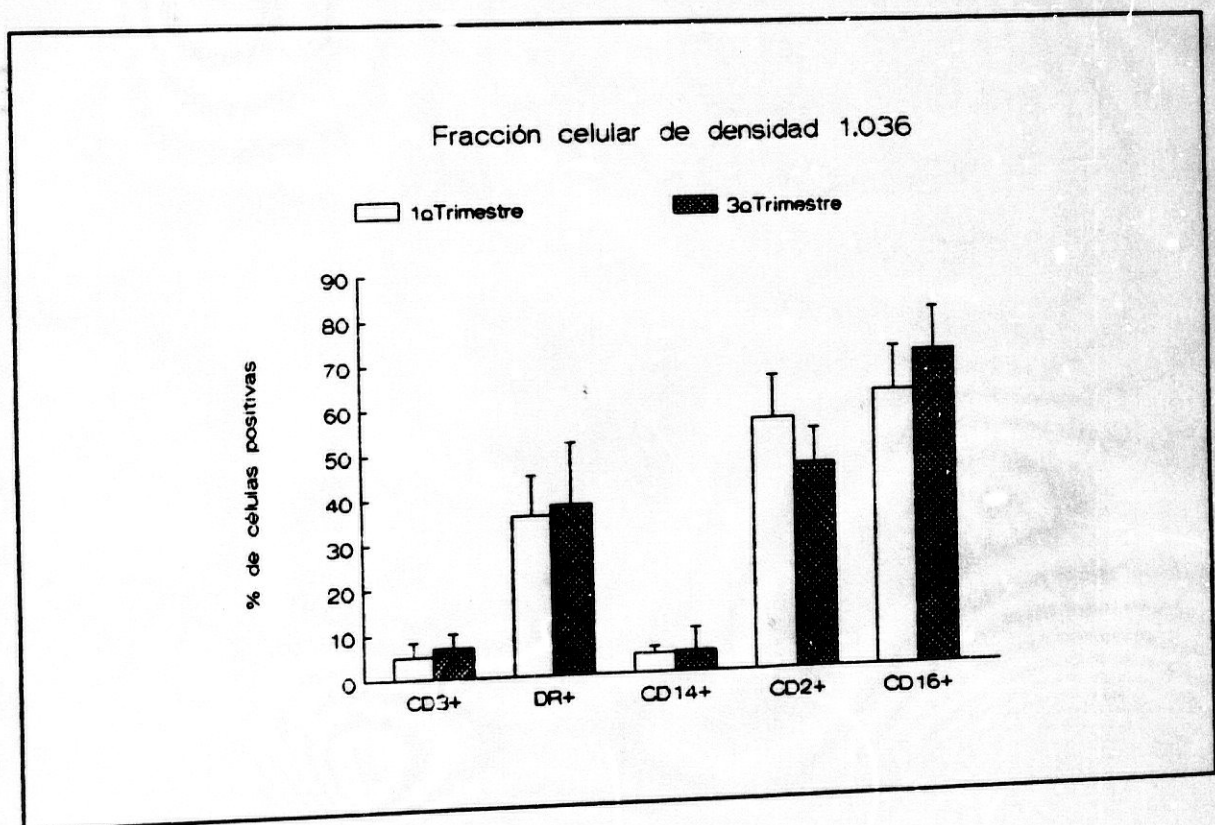


Figura 50. Porcentaje medio de células CD3⁺, DR⁺, CD14⁺, CD2⁺ y CD16⁺, en la fracción celular de densidad 1,036 de decidua de primer y tercer trimestre

FRACCION CELULAR DE DENSIDAD 1.047

La proporción de células CD3⁺, CD14⁺, CD16⁺ es significativamente superior en tercer trimestre ($p < 0.05$ para los dos primeros y $p < 0.01$ para CD16)

Para CD2 y HLA-DR no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre primer y tercer trimestre (tabla XXVI, fig.51)

Tabla XXVI: Porcentaje medio de células CD3⁺, DR⁺, CD14⁺, CD2⁺ y CD16⁺, en la fracción celular de densidad 1,047 de decidua de primer y tercer trimestre

Células	Primer Trimestre		Tercer Trimestre		R _{exp}	(n ₁ , n ₂)	Significación
	Media	SD	Media	SD			
CD3 ⁺	7,6	4,11	12,86	3,94	26	(5, 14)	p<0,05
DR ⁺	22,1	12,28	33,33	17,25	99,5	(10, 15)	NS
CD14 ⁺	11,9	3,45	17,40	6,07	87,5	(10, 15)	p<0,05
CD2 ⁺	36,0	10,52	47,40	22,63	38	(5, 7)	NS
CD16 ⁺	37,8	9,10	74,25	16,75	33	(7, 8)	p<0,01

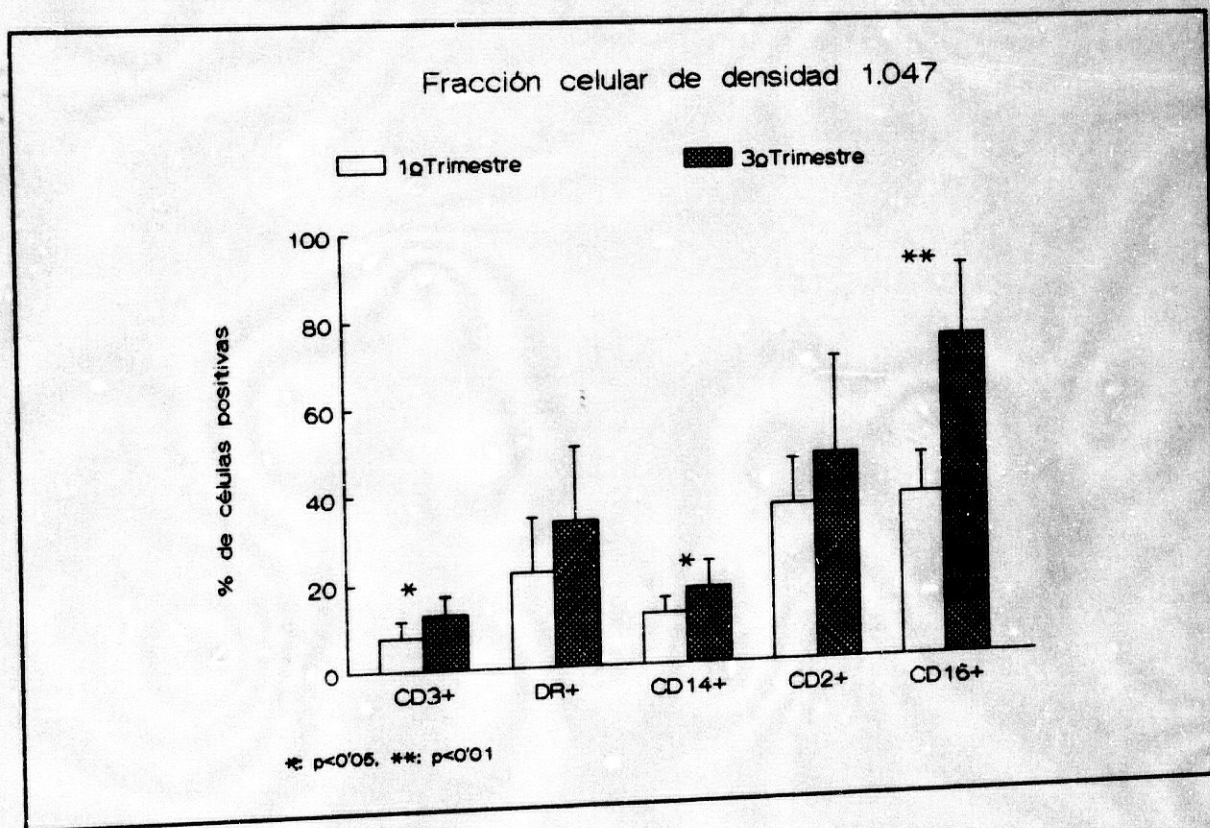


Figura 51. Porcentaje medio de células CD3⁺, DR⁺, CD14⁺, CD2⁺ y CD16⁺, en la fracción celular de densidad 1,047 de decidua de primer y tercer trimestre

FRACCION CELULAR DE DENSIDAD 1.059

El porcentaje medio de células HLA-DR⁺, CD14⁺, CD2⁺ y CD16⁺ es significativamente superior en tercer trimestre ($p < 0.01$ para HLA-DR, CD14, CD16, y $p < 0.05$ para CD2). Aunque el porcentaje de células CD3⁺ es superior también en tercer trimestre, este aumento no es estadísticamente significativo (tabla XXVII, fig 52)

Tabla XXVII: Porcentaje medio de células CD3⁺, DR⁺, CD14⁺, CD2⁺ y CD16⁺, en la fracción celular de densidad 1,059 de decidua de primer y tercer trimestre

Células	Primer Trimestre		Tercer Trimestre		R _{exp} (n ₁ , n ₂)	Significación
	Media	SD	Media	SD		
CD3 ⁺	14	4,30	19,64	10,00	33,5 (5, 11)	NS
DR ⁺	19,4	8,69	35,08	13,32	75,5 (10, 13)	p<0,01
CD14 ⁺	12,6	4,62	26,50	10,01	66 (10, 14)	p<0,01
CD2 ⁺	42,5	5,72	63,57	15,65	25,5 (6, 7)	p<0,05
CD16 ⁺	26,17	10,53	57,38	11,36	21 (6, 8)	p<0,01

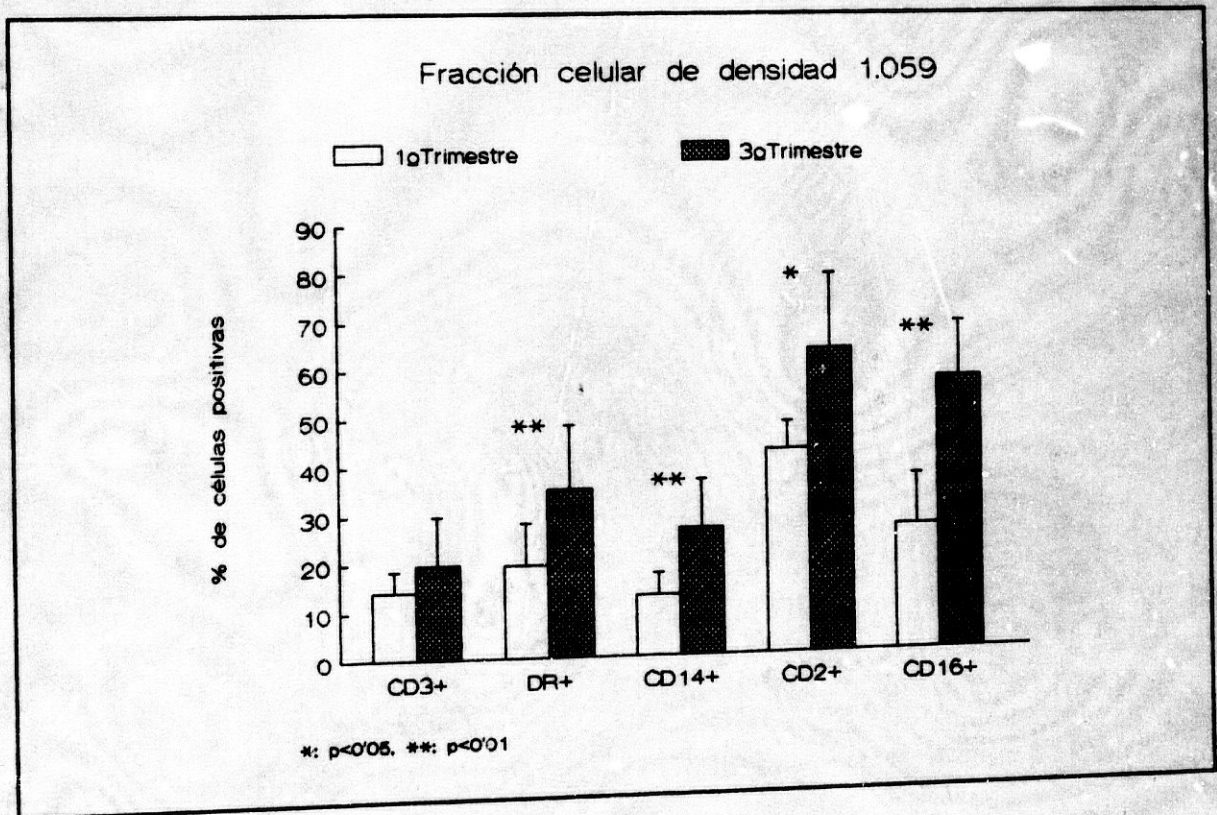


Figura 52. Porcentaje medio de células CD3⁺, DR⁺, CD14⁺, CD2⁺ y CD16⁺, en la fracción celular de densidad 1,059 de decidua de primer y tercer trimestre

FRACCION CELULAR DE DENSIDAD 1.080

Como se ha dicho anteriormente en esta fracción hay un predominio linfocitario con una elevada proporción de células CD2⁺ tanto en primer como en tercer trimestre de gestación.

El resto de marcadores linfocitarios no se expresan de la misma forma en los dos trimestres estudiados. La proporción de células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺ y CD16⁺ es significativamente superior en tercer trimestre ($p < 0.01$ para CD3, CD4, CD8 y CD16, $p < 0.05$ para CD20) (tabla XXVIII, fig.53).

La expresión de HLA-DR fue paralela a la expresión de CD20 por lo que no se ha incluido en los resultados. Así mismo no se detectan apenas células CD14⁺ por lo que tampoco se incluye en los resultados.

Tabla XXVIII: Porcentaje medio de células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺, CD2⁺ y CD16⁺, en la fracción celular de densidad 1,080 de decidua de primer y tercer trimestre

Células	Primer Trimestre		Tercer Trimestre		R _{exp} (n ₁ , n ₂)	Significación
	Media	SD	Media	SD		
CD3 ⁺	15,7	9,90	40,69	8,37	57,5 (10, 13)	p<0,01
CD4 ⁺	6,5	6,87	19,57	7,50	69 (10, 14)	p<0,01
CD8 ⁺	9,3	5,87	29,15	6,48	56 (10, 13)	p<0,01
CD20 ⁺	2,25	0,96	8,40	5,40	12,5 (4, 10)	p<0,05
CD2 ⁺	55,14	8,91	56,14	6,44	50,5 (7, 7)	NS
CD16 ⁺	5	2,31	37	12,28	28 (7, 8)	p<0,01

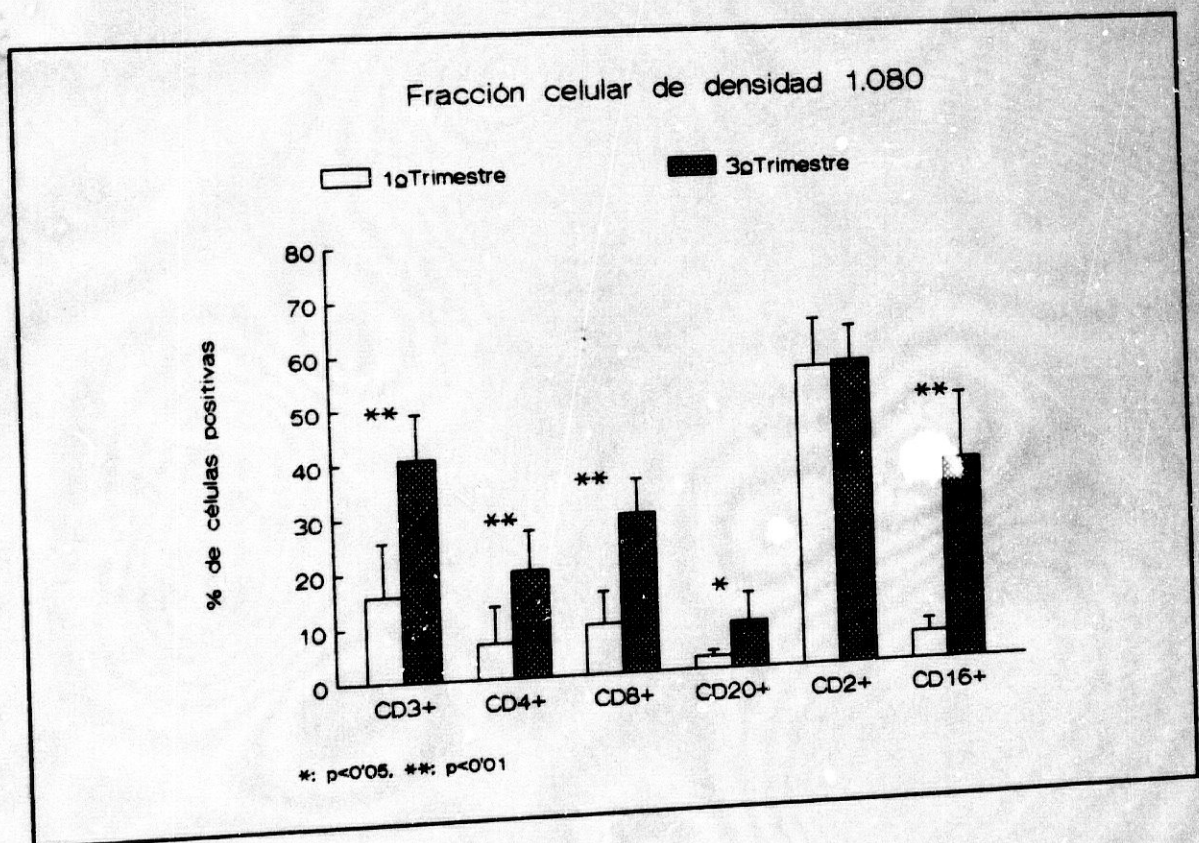


Figura 53. Porcentaje medio de células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺, CD2⁺ y CD16⁺, en la fracción celular de densidad 1,080 de decidua de primer y tercer trimestre

DISCUSSION

Desde el punto de vista inmunológico, el feto debe ser considerado como un injerto semialogénico en el útero materno, ya que expresa antígenos paternos que serán reconocidos como extraños por la madre. A pesar de estos antígenos, el feto no es rechazado por el sistema inmune materno, al menos durante nueve meses.

El estudio de los mecanismos que propician la tolerancia materno-fetal, nos puede llevar a ampliar los conocimientos actuales en diversas áreas de la medicina, como es el caso del trasplante de órganos y el crecimiento tumoral. No cabe duda que con el estudio de los injertos convencionales comprenderemos mejor el embarazo, y viceversa, comprendiendo los mecanismos de supervivencia fetales podremos aumentar la supervivencia de otros aloinjertos. Por otra parte, se ha sugerido que la proliferación trofoblástica se asemeja al crecimiento de determinados tumores, y según algunos autores, el crecimiento de las células trofoblásticas en la decidua humana está basado, en parte, en los mismos mecanismos que permiten la proliferación tumoral.

También la comprensión de los mecanismos de tolerancia materna, nos ayudará en el estudio de diversos estados patológicos en el campo de la Obstetricia, como son: embarazos molares, preeclampsias, abortos de repetición y tumores de origen trofoblástico. Tampoco hay que olvidar el

papel que puede jugar la Inmunología de la Reproducción en el control de la fertilidad y embarazo.

Son varios los mecanismos que evitan el rechazo fetal, y en ello interviene la madre, la unidad fetoplacentaria y la interfase materno-fetal. Debido al contacto íntimo que existe entre las circulaciones sanguíneas materna y fetales, es de suponer, que la mayor parte de estos mecanismos se encuentren a nivel de la interfase materno-fetal y más concretamente a nivel de la decidua.

La reacción decidual se produce como respuesta del endometrio gestante al embrión implantado. Aunque esta reacción ocurre en todo el endometrio, es más intensa en el lugar de la implantación, probablemente debido a un microambiente específico. Las típicas células deciduales representan el componente celular más característico del tejido decidual, que además incluye fibroblastos y otros elementos estromales, leucocitos (linfocitos, monocitos y granulocitos), macrófagos, células granulares endometriales y vasos sanguíneos (Lala y Kearns, 1984). El tejido decidual juega un importante papel en el mantenimiento del embarazo, por lo que debemos prestar una especial atención a la identificación de las células inmunocompetentes en la decidua y a su función en el embarazo normal.

En nuestro trabajo, hemos utilizado dos métodos para el estudio de la decidua humana. Por un lado, se ha realizado un estudio inmunohistológico en decidua de primer

trimestre y a término, con los distintos marcadores inmunes ya referidos en el "Material y Métodos". De esta manera, además de determinar el fenotipo inmune y la morfología de las distintas células que componen el tejido decidual, podemos analizar los patrones de distribución de estas células y sus relaciones con las estructuras (vasos, glándulas, etc.) que componen este tejido. Por otra parte, también se han realizado suspensiones celulares de decidua de primer trimestre y a término. Estas, posteriormente, fueron fraccionadas mediante gradientes de densidad. Con esto, se ha pretendido separar las distintas poblaciones celulares que componen la decidua, para completar el estudio inmunológico. La mayor parte de los autores que estudian suspensiones celulares, las obtienen mediante técnicas de digestión enzimática, con colagenasa/DNAasa, tripsina o pronasa (Parhar y col., 1988; Ritson y Bulmer, 1987a; Kearns y col., 1985a b y c; Starkey y col., 1988). En nuestro estudio las suspensiones celulares se obtienen disgregando el tejido de una forma mecánica, sin la intervención de ninguna enzima. Ritson y Bulmer (1987b) realizan un estudio comparativo entre distintos métodos de dispersión celular de decidua, en el que incluyen tratamientos enzimáticos y disgregación mecánica (como la realizada en nuestro trabajo). Concluyen que las técnicas de dispersión enzimáticas producen una suspensión celular enriquecida artificialmente con células leucocitarias,

probablemente debido, a que estas técnicas disgregan selectivamente células con uniones no demasiado fuertes, como los leucocitos emigrados a la decidua (Gambel y col., 1985). Además, tanto los marcadores de superficie (Ritson y Bulmer, 1987b) como la función celular (Clark y col., 1986), pueden verse afectados por la digestión enzimática. Por todos estos motivos, optamos por técnicas de disgregación mecánica para la obtención de las suspensiones celulares, con las que esperábamos obtener una idea más aproximada de la composición real de la decidua.

EXPRESION DE CD45

El antígeno leucocitario común o CD45 es un marcador característico de los leucocitos. Su expresión en el tejido decidual nos dará idea, tanto del número, como de la distribución de los leucocitos deciduales. En nuestro estudio inmunohistológico hemos detectado una elevada expresión de CD45 en células de morfología linfocitaria y macrofágica en decidua de primer trimestre y a término (fig.3a y 3d). Estos resultados coinciden con lo determinado por Bulmer y Suderland (1983). Nosotros, además, hemos observado células CD45⁺ de aspecto decidual y fusiforme (fig.3b, 3c y 3d). Las células fusiformes adoptan una distribución perivascular (fig.3c) y aparecen sobre todo en la decidua de primer trimestre de gestación.

El hecho de que algunas células deciduales y las

células fusiformes expresen el antígeno CD45, confirma, al menos a parte de estas células, como células inmunes. Estudios en decidua de ratón revelan que los precursores últimos de las células deciduales se encuentran en la médula ósea (Kearns y Lala, 1982), mientras que los precursores inmediatos son células estromales fusiformes del endometrio, que se transforman después de varios ciclos proliferativos en células deciduales (Kearns y Lala 1983). El hallazgo de células fusiformes CD45⁺ y células deciduales CD45⁺, podría confirmar la procedencia de estas últimas de las primeras. Por otra parte, la distribución perivascular de las células fusiformes en la decidua de primer trimestre podría sugerir la llegada de estas células a la decidua desde la médula ósea.

LINFOCITOS T Y B

En el estudio inmunohistológico detectamos, como la mayor parte de los autores (Bulmer y Suderland, 1984; Bulmer y Johnson, 1986; Khong, 1987; Bulmer y col., 1987; Starkey y col., 1988; Lessin y col., 1988), una escasa proporción de linfocitos CD3⁺, así como de linfocitos CD4⁺, y CD8⁺ en decidua de primer trimestre (fig.5). Esta proporción aumenta de forma significativa para los tres marcadores, en la decidua a término ($p < 0.01$) (tabla VIII, fig.9). Las células linfoides se disponen tanto en forma de acúmulos como de forma aislada. Lessin y col. (1988),

estudiando tejido decidual de los tres trimestres de gestación, también afirma que la decidua de primer trimestre contiene un bajo porcentaje de linfocitos T, que se incrementan conforme avanza el embarazo.

En nuestra opinión, este aumento en la decidua a término podría deberse a dos causas: a la disminución progresiva y fisiológica del número de células deciduales que ocurre conforme avanza el embarazo, lo que provocaría un aumento relativo de la proporción de linfocitos, pero no un aumento real de los mismos; o bien, a la migración de linfocitos T procedentes de sangre periférica a lo largo de la gestación.

Al separar las suspensiones de tejido decidual mediante gradientes de densidad observamos que los linfocitos constituyen alrededor del 50% de las células recogidas en la 4ª fracción (de densidad 1.058) y alrededor del 85% de las células que forman la 5ª fracción (de densidad 1.080)(tabla XII, fig.28). En ambas fracciones la proporción de células CD3⁺ fue superior en tercer trimestre, aunque el aumento sólo es significativo en la 5ª fracción ($p < 0.01$) (tabla XXVII, fig.52; tabla XXVIII, fig.53). Además en la 5ª fracción, al estudiar la expresión de CD4 y CD8, también encontramos, de forma paralela, un aumento significativo de las células CD4⁺ y CD8⁺ en tercer trimestre ($p < 0.01$) (tabla XXVIII, fig.53). En estas fracciones (4ª y 5ª) la población linfoide ha sido seleccionada mediante su

densidad, y las células deciduales son escasas o inexistentes, ya que han sido recogidas en las fracciones de menor densidad (1a y 2a)(tabla XII, fig.28). Por lo tanto, el aumento en la expresión de CD3, CD4 y CD8 observado en estas fracciones celulares y en las secciones inmunohistológicas puede ser considerado el reflejo de un aumento real del número de linfocitos T clásicos, probablemente debido a una llegada progresiva de los mismos a la decidua durante la gestación. Esta concentración de linfocitos en la interfase podría estar relacionada con las variaciones descritas por distintos autores en las células T de sangre periférica a lo largo del embarazo (Castilla y col.,1989).

La migración de linfocitos T se llevaría a cabo a través de los endotelios vasculares activados (como más adelante comentaremos, nuestros resultados sugieren la existencia de una activación endotelial en la decidua). Dos citoquinas producidas en la placenta: el IFN-gamma y la IL-1 (Ching y col., 1988; Flynn y col., 1982) intervienen en la activación de los endotelios. La inyección local de IL-1 en los tejidos, da lugar a un rápido reclutamiento de leucocitos desde el compartimento sanguíneo (Sayers y col., 1988),y el IFN-gamma favorece también, aunque en menor intensidad, el paso de leucocitos a los tejidos (Dustin y Springer, 1988). La placenta es una importante fuente de IL-1 (Flynn y col., 1982) y además es capaz de producir

IFN-gamma (Ching y col., 1988). Es por tanto probable, que estas dos citoquinas sean las responsables del aumento de los linfocitos T en la decidua a término, al favorecer su reclutamiento a través de los endotelios vasculares activados.

Diversos autores señalan que las células T maternas podrían tener una función trófica para el tejido placentario. Estas células reconocerían antígenos trofoblasticos y responderían secretando citoquinas tales como la IL-3 y GM-CSF, que actúan estimulando el crecimiento placentario (Athanasakis y col., 1987; Wegmann, 1987). Aunque la IL-3 no se ha detectado en decidua (Clark, 1989), el GM-CSF si está presente en los sobrenadantes deciduales (Wegmann, 1988).

En la 5ª fracción observamos tanto en primer trimestre como en la decidua a término que la proporción de células CD8⁺, es superior a la proporción de células CD4⁺ (tabla XXIII, fig. 47 y 48). Esto nos sugiere que la presencia de los linfocitos T en las suspensiones de tejido decidual no se debe a una contaminación de linfocitos de sangre periférica, donde normalmente el porcentaje de células CD4⁺ es superior al de células CD8⁺. La mayor proporción de células CD8⁺ podría estar relacionada con las células supresoras CD8⁺ con receptor para la progesterona detectadas por Szekeres-Bartho y col. (1985), que contribuirían al mantenimiento de un estado local de inmunosupresión a nivel

decidual.

La menor proporción de células CD3⁺ en la 5ª fracción del primer trimestre de gestación queda confirmada por la baja proporción de células CD4⁺ y CD8⁺. Sin embargo al estudiar la expresión de CD2 en esta fracción del primer trimestre, observamos un número muy superior de células positivas, no existiendo diferencias significativas con la decidua a término (Tabla XXVIII, fig.53). Esto nos indica la existencia en el primer trimestre de una población linfocitaria CD3⁻, CD2⁺ que ha sido descrita por Bulmer y Suderland (1984), y que como más tarde comentaremos puede tratarse de células de la familia NK.

En el estudio inmunohistológico no se detectan linfocitos B CD20⁺ (fig.10) en ninguno de los tejidos estudiados. Sin embargo, si observamos linfocitos B, aunque en muy escasa proporción, en la 5ª fracción de las suspensiones celulares (Tabla XXVIII, fig.53). Como en el caso de los linfocitos T, la proporción de linfocitos B es significativamente superior en la decidua a término ($p < 0,05$). Nuestros resultados coinciden con la mayoría de los autores que no detectan células B en la decidua o lo hacen en muy baja cantidad (Bulmer y Suderland, 1984; Lessin y col., 1988).

MACROFAGOS

Para determinar la presencia de macrófagos en las secciones tisulares de decidua, estudiamos dos marcadores de superficie de estas células el CD11b y el CD14. La expresión de CD11b fue escasa en ambos trimestres de gestación y aparece sobre todo en linfocitos y en algunas células de aspecto macrofágico (fig.11). Nuestros resultados coinciden con los de Bulmer y Johnson (1984) que determinan que la mayor parte de los macrófagos deciduales son CD11b⁻. Los linfocitos CD11b⁺ corresponderían a células NK que como veremos más adelante constituyen una importante población dentro del tejido decidual. Por el contrario, sí hemos detectado macrófagos CD14⁺ (fig.13a y 13b) coincidiendo con la mayoría de los estudios realizados (Bulmer y Johnson, 1984; Kabawat y col, 1985; Bulmer y col., 1988b), que determinan que una población importante dentro de los leucocitos deciduales está constituida por los macrófagos CD14⁺. Al estudiar la expresión de HLA-DR y CD45, observamos como gran parte de las células de aspecto macrofágico son HLA-DR⁺ y CD45⁺ (fig.21b, 21c, 3a y 3b), este resultado está también de acuerdo con los trabajos previos (Sutton y col, 1983; Bulmer y Johnson, 1984; Lessin y col., 1988; Bulmer y col., 1988).

Las células CD14⁺ se disponen tanto de forma aislada como dispersa y también pueden adoptar una distribución perivascular. Así mismo, se han detectado algunos

macrofagos CD4⁺ (fig.8).

Al separar las suspensiones de células deciduales con gradientes de densidad, observamos que las células CD14⁺ se acumulan principalmente en las fracciones 3 y 4 (sobre los gradientes de densidad 1.047 y 1.058 respectivamente) (tablas XVII y XVIII; fig.41 y 42). En ambas fracciones la proporción de células positivas es significativamente superior en la decidua a término ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente) (tablas XXVI y XXVII; fig.51 y 52). Este aumento va acompañado de un aumento paralelo de las células HLA-DR⁺. Este resultado, junto con la aparición de células de aspecto macrofágico HLA-DR⁺ en el análisis inmunocitoquímico (fig.34), confirma la idea de que la mayor parte de los macrófagos CD14⁺ son también HLA-DR⁺.

Lessin y col.(1988), de forma equivalente, determinan un aumento de la proporción de células CD14⁺ en el tercer trimestre de gestación. La mayor proporción de células positivas en la decidua a término puede deberse como anteriormente hemos referido a un reclutamiento leucocitario a través de los endotelios activados.

Los macrófagos deciduales pueden jugar primariamente un papel fagocítico en el embarazo normal, ya que se ha demostrado que poseen actividad fosfatasa ácida y esterasa no-específica (Bulmer y Johnson, 1984; Kabawat y col., 1985). La función fagocítica puede ser importante para eliminar sustancias maternas nocivas para el feto, como

anticuerpos citotóxicos, y para la defensa frente a infecciones. Sin embargo estas células están a menudo íntimamente asociados al trofoblasto extravellocitario en el lecho placentario (Bulmer y col., 1988c) que expresa antígenos HLA de clase I, lo que puede reflejar su participación en las interacciones inmunes materno fetales, bien actuando como células presentadoras de antígeno (Oksenberg y col., 1986) o bien ejerciendo una acción inmunosupresora mediada por la PGE_2 (Lala y col., 1986).

Como hemos visto anteriormente los macrófagos deciduales son HLA-DR⁺ lo que podría conferirles la capacidad de presentación de antígeno (Unanue, 1984), Oksenberg y col. (1986) han demostrado la presencia en la decidua, de células HLA clase II⁺ con capacidad de presentación de antígeno *in vitro* que, según este autor, podrían tratarse de macrófagos. Las células presentadoras de antígeno en la decidua están situadas anatómicamente de forma ideal para procesar y presentar antígenos fetales a los linfocitos maternos. Sin embargo estas células están presentes desde etapas muy precoces del embarazo, antes de que el concepto exprese antígenos MHC (Kirkwood y Billington, 1981). Por lo tanto, quizá estén dirigiendo la respuesta inmune materna a un fenómeno de supresión más que de rechazo. Esta posibilidad está refrendada por otros trabajos que describen como en determinados sistemas, las células B, macrófagos y otras APC pueden dar lugar a una

respuesta mediada por células T supresoras más que por células helper (Ramila y Erb, 1983).

También detectamos macrófagos de Hofbauer CD14⁺ (fig.13) y CD11b⁺ en el estroma de las vellosidades coriales de placentas a término. Estos macrófagos tienen actividad fosfatasa ácida y esterasa no-específica (Bulmer y Johnson, 1984), expresan en su superficie receptores Fcγ, y tienen actividad fagocítica (Wood, 1980; Loke y col., 1982).

CÉLULAS NK

Para Bulmer (1989) otro importante grupo de leucocitos deciduales lo constituye los linfocitos granulares con marcadores de células NK.

Mediante la técnica inmunohistológica hemos estudiado 3 marcadores de células NK en la decidua de primer trimestre y en la decidua a término: CD16, CD56 y CD57.

Aunque el antígeno CD57 (Leu7) se expresa en el 30%-70% de las células NK de sangre periférica (Perussia y col., 1983; Lanier y col., 1983), en nuestros resultados, y coincidiendo con otros autores (Bulmer y Suderland, 1984; Ritson y Bulmer, 1987a), no se detecta este marcador en la decidua (fig.19).

La expresión de CD56 fue extensa en la decidua de primer trimestre y disminuye, aunque no de forma significativa, en la decidua a término (tabla X, fig.16).

Las células CD56⁺ corresponden fundamentalmente a células de aspecto linfoide y a células de morfología decidual (estas aparecen sobre todo en decidua de primer trimestre) que se presentan con una disposición periglandular y perivascular (fig.17).

De forma inversa se comporta el antígeno CD16, cuya expresión en primer trimestre es significativamente inferior a la del tercer trimestre ($p < 0.01$) (tabla X, fig.16). Las células CD16⁺ son linfocitos y algunas células de aspecto decidual (fig.15).

En las distintas fracciones celulares obtenidas tras la separación con gradientes de Percoll, se determinó la expresión del antígeno CD16. No se pudo estudiar la presencia del antígeno CD56 por problemas técnicos.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de células CD16⁺ de las dos primeras fracciones entre decidua de primer trimestre y a término (tablas XXIV y XXV, fig.49 y 50). Sin embargo, a partir de la tercera fracción se observa un aumento estadísticamente significativo del porcentaje medio de células CD16⁺ en la decidua a término ($p < 0.01$) (tablas XXVI, XXVII y XXVIII; fig.51, 52 y 53). Se comprobó que las células CD16⁺ no eran granulocitos mediante un anticuerpo monoclonal que los reconoce, el OKM15-FITC (resultados no mostrados). Luego, el aumento de células CD16⁺ puede ser debido a un aumento de células NK típicas CD16⁺, lo cual

corroborar nuestros resultados inmunohistológicos.

Aunque no se han llevado a cabo experiencias de doble marcaje, estos resultados sugieren la presencia en decidua de primer trimestre de linfocitos CD56⁺, CD16⁻, que según Starkey y col.(1988) son los LGL más abundantes de este periodo. De forma paralela, el incremento en la expresión de CD16 en la decidua a término, sugeriría la existencia en esta última de células CD56⁺, CD16⁺, que también han sido detectadas por Starkey y col.(1988) en primer trimestre aunque en muy baja proporción. Estos dos tipos celulares podrían corresponder a distintas etapas de diferenciación de las células NK deciduales, de tal manera, que las células se diferenciarían progresivamente hacia formas CD16⁺ conforme avanza el embarazo.

Aunque los linfocitos CD16⁺ puedan derivarse de precursores CD16⁻ presentes en la decidua, no podemos excluir la posibilidad de una emigración de linfocitos CD16⁺ de sangre periférica a la decidua. Esta hipotética emigración podría ser la responsable de la disminución de células CD16⁺ observada en sangre periférica en el 2º y 3º trimestre de gestación (Castilla y col., 1989).

El reclutamiento de las células NK en la decidua puede estar mediado por productos de los linfocitos T activados observados en la decidua (Bulmer y Suderland 1984), o por factores solubles procedentes del trofoblasto (Trinchieri, 1989).

Al estudiar la expresión de CD2 en las suspensiones de decidua de primer trimestre, observamos en la 4a y 5a fracción (que como ya se ha señalado es donde se separan la mayor parte de los linfocitos) un elevado porcentaje de células CD2⁺ (tablas XXVII y XXVIII, fig. 52 y 53). Este elevado porcentaje no se corresponde con los valores de CD3 o de CD16, luego las células CD2⁺ de estas fracciones no serían ni linfocitos T clásicos (CD2⁺, CD3⁺) ni células NK CD2⁺, CD16⁺. Relacionando estos resultados con los obtenidos en la inmunohistología (una elevada proporción de células CD56⁺ y baja proporción de células CD16⁺ en decidua de primer trimestre), estas células CD2⁺ podrían corresponder a las LGL CD3⁻, CD2⁺, CD56⁺, CD16⁻, descritas por Starkey y col.(1988) muy abundantes en el primer trimestre de embarazo. También podrían tener relación con los denominados granulocitos endometriales estudiados por Bulmer y col.(1987), de idéntico fenotipo, que se observan en primer trimestre (Bulmer, 1989). Sospechamos que estas dos clases de células (LGL y granulocitos endometriales) son en realidad un unico tipo celular, que es considerado como una variedad de células NK.

Resumiendo nuestros resultados y los de los estudios previos de otros autores, en la decidua de primer trimestre existe una población de células NK cuyo fenotipo es CD3⁻, CD2⁺, CD16⁻, CD56⁺, pueden ser células NK relativamente inmaduras que son generadas por una rápida proliferación de

progenitores de células NK que estaban en la decidua, ya que se han detectado en la fase lutea del ciclo menstrual (Bulmer y col., 1988; Marshall y Jones, 1988; King y col., 1989), o proceder de células que han emigrado recientemente desde la médula ósea (Trinchieri, 1989). Conforme va evolucionando el embarazo estas células maduran adquiriendo el antígeno CD16. Al mismo tiempo, la migración de linfocitos CD16⁺ procedentes de sangre periférica podría contribuir al incremento de células CD16⁺ en la decidua de tercer trimestre de embarazo.

¿Cual es el papel de las células NK en la decidua?

La presencia de células NK en la decidua de primer trimestre puede mediar funciones no citotóxicas. Es posible que las células NK intervengan en la placentación modulando la respuesta inmune materna en la decidua, o produciendo linfoquinas como el GM-CSF que estimula el crecimiento placentario (Athanasakis y col., 1987).

Alternativamente las células NK a través de efectos citotóxicos o por liberación de factores citolíticos tales como el TNF, pueden participar en la necrosis del tejido endometrial facilitando la invasión trofoblástica (Trinchieri, 1989).

No obstante, la hipótesis más extendida, aunque al mismo tiempo la más discutida, es que las células NK tendrían una actividad antitrofoblástica que frenaría la invasión de este tejido. Existen resultados que podrían

confirmar esta idea. Así, en la decidua de ratón se ha detectado actividad NK (Croy y col., 1985). Además el trofoblasto murino presenta estructuras blanco para la células NK (Chatterjee-Hasrouni y col., 1984). Los linfocitos extraídos de la decidua humana de primer trimestre muestran actividad NK frente a células K562, aunque los niveles líticos fueron bajos al compararlos con linfocitos de sangre periférica (King y cols., 1989; Manaseki y Searle, 1989). Cuando se cultivan estos linfocitos deciduales durante un corto periodo de tiempo (16 horas) la actividad NK de los mismos es similar a la de los linfocitos de sangre periférica (Manaseki y Searle, 1989). Esto puede ser debido al recambio metabólico de los derivados placentarios que inhiben la actividad NK (Kolb y col., 1984; Chaouat y col., 1986), o a la producción *in vitro* de linfoquinas como la IL-2 e IFN que activan las células NK (Trinchieri y Perussia, 1984)

Sin embargo, el trofoblasto humano es resistente a la lisis mediada por CTL y células NK deciduales (Redman y col., 1987; King y col., 1989). La resistencia frente a CTL es explicable ya que el sincitiotrofoblasto carece de antígenos HLA de clase I. Por el contrario, es contradictoria la resistencia a la citólisis mediada por células NK, ya que en células tumorales se ha observado que la susceptibilidad a células NK va asociada a una falta de expresión de antígenos de clase I (Shimizu y DeMars, 1989).

Esta consideración podría explicarse si se tiene en cuenta que las células placentarias sintetizan IFN-gamma, y aunque esta citoquina es un activador de las células NK, paradójicamente induce en las células blanco resistencia a la lisis (Trinchieri y Santoli, 1978; Trinchieri y col., 1981; Welsh y col., 1981). En principio esta resistencia puede venir mediada por una inducción de antígenos HLA de clase I. Sin embargo Hunt y col. (1987) afirma que el trofoblasto resiste la inducción de la expresión de estos antígenos. La resistencia a la lisis que presenta el trofoblasto, podría deberse a cambios en la rigidez de la membrana producidos por una modulación lipídica (Roozmond y col., 1987). Szekeres-Bartho y cols. (1989) demuestran que células trofoblásticas tratadas con hemisucinato de colesterol, que aumenta la rigidez de la membrana, se vuelven susceptibles a la lisis mediada por células NK. Este efecto es bloqueado preincubando las células trofoblásticas con progesterona, hormona que se encuentra habitualmente en la interfase materno-fetal durante el embarazo normal.

A pesar de la falta de sensibilidad a las células NK, el trofoblasto humano es sensible a los mecanismos de ADCC (Pross y col., 1985). Sólo las células NK CD16⁺ son capaces de lisar a través de mecanismos de ADCC (Trinchieri, 1989). El trofoblasto murino, además, es susceptible a la lisis por células LAK que se han originado a partir de células NK

(Drake y Head, 1989). Según nuestros resultados, la proporción de células CD16⁺ es baja en el primer trimestre de gestación y aumenta al final del embarazo. Esto podría sugerir que en la decidua de primer trimestre, las células NK inmaduras son incapaces de rechazar el trofoblasto, más bien favorecerían su implantación, como se ha apuntado anteriormente. La capacidad lítica, probablemente asociada a la expresión de CD16, se va adquiriendo conforme progresa el embarazo, con objeto de controlar el crecimiento trofoblástico.

Una excesiva actividad NK, por otra parte, podría conducir a situaciones patológicas. Estudios en modelos murinos, donde hay una elevada incidencia de abortos, (Gendron y Baines, 1988) detectan, utilizando anti asialo-GM1, una gran población de células NK en las unidades fetoplacentarias, incluso antes de que el aborto sea detectable. Se ha observado además que células LAK son capaces de infiltrar al feto en los primeros estadios de desarrollo provocando abortos (Chaouat y col., 1988) incluso en ratones con inmunodeficiencia combinada severa donde hay una ausencia de linfocitos T y B (Clark y col., 1989). Por otra parte, la depleción *in vivo* con anticuerpos frente a asialo-GM1 previene los abortos (Gendron y Baines, 1988).

CELULAS DECIDUALES

En la bibliografía revisada existe una gran confusión acerca del término "células deciduales". Hay autores como Lessin y col.(1988) que identifican las células deciduales con los macrófagos deciduales, y otros como Starkey y col.(1988) que las relaciona con LGL.

En todo este trabajo, hemos identificado a las células deciduales mediante los criterios morfológicos referidos por Lala y col.(1984) e incluidos en el Material y Métodos. De acuerdo con esto, observamos que al fraccionar las suspensiones de tejido decidual con los gradientes de Percoll, las células deciduales típicas se separan en la 1ª y 2ª fracción, siendo el componente celular más abundante y casi exclusivo en ambas fracciones (tabla XII, fig.28, 29 y 30).

Al estudiar estas dos fracciones por citometría de flujo en primer y tercer trimestre, observamos, una elevada expresión de CD2, CD16 y HLA-DR (tablas XXIV y XXV, fig.49 y 50). El hecho de que CD14 no se exprese en la 1ª y 2ª fracción (tablas XVII y XVIII, fig.41 y 42), sugiere que estas células DR⁺ no son macrófagos, en contra de lo que la mayor parte de los autores considera. Sin embargo, el que estas células expresen los antígenos CD2 y CD16 nos puede hacer pensar que puedan estar relacionadas con células NK. La expresión de DR no es discordante con esta hipótesis, ya

que las células NK tienen capacidad de expresar antígenos HLA-DR cuando se activan (Perussia y col., 1987), incluso Brooks y Moore (1986) refieren la expresión de HLA-DR, DP y DQ en una subpoblación de células NK. Además está demostrado que la morfología LGL no es la única de las células NK y que no todas las células NK tienen la típica morfología LGL durante todos los estadios de diferenciación y activación funcional (Dvorak y col., 1983).

El análisis inmunocitoiógico de las células de la primera y segunda fracción de suspensiones de decidua a término, nos confirma la presencia de células de aspecto decidual que expresan HLA-DR y CD16 (fig. 34, 36a y 36b).

El no haber podido determinar la expresión de CD56 mediante citometría de flujo nos impide aclarar totalmente el fenotipo de las células deciduales. Queda además que determinar, por tanto, su posible relación con los linfocitos CD16⁺, CD56⁺ descritos anteriormente.

EXPRESION DE ANTIGENOS HLA-DR. CELULAS ENDOTELIALES

Como se ha venido comentando a lo largo de la Discusión, la expresión de antígenos HLA-DR es elevada en la interfase materno fetal. Nuestros estudios inmunohistológicos nos muestran tanto en decidua de primer trimestre como en decidua a término la presencia de estos antígenos en linfocitos, macrófagos, células de morfología decidual, células fusiformes y endotelios (fig 21 y 22).

En general, los antígenos HLA de clase II son expresados en linfocitos B, macrófagos activados y linfocitos T activados (Kissmeyer-Nielsen, 1975; Fu y col., 1978; Klareskog y Forsum, 1986), y su expresión ha sido asociada a estados de inmunoactivación (Fu y col., 1978; Daar y col., 1984; Pober, 1988;).

La detección por inmunohistología de linfocitos HLA-DR⁺ (fig. 21b y 21c) nos haría pensar en un principio que podrían tratarse de células B, sin embargo y coincidiendo con la mayoría de los autores (1987; Bulmer y Suderland, 1984; Lessin y col., 1988), la proporción de células B, detectada por nosotros, es nula o muy baja en los tejidos estudiados. Bulmer y Johnson (1985b), usando doble marcaje inmunoenzimático, detectan en decidua de primer trimestre algunas T DR⁺, que podrían corresponder a células T activadas. Khong (1987) describe en la decidua a término, linfocitos CD8⁺, HLA-DR⁺. Como se ha dicho anteriormente los granulocitos endometriales pueden expresar también HLA-DR (Ritson y Bulmer, 1987a).

La expresión de antígenos HLA-DR en macrófagos y células deciduales ya ha sido comentada.

Por otra parte, las células fusiformes de la decidua de primer trimestre, que podrían ser las precursoras de las células deciduales, son en su mayor parte HLA-DR⁺ y adoptan una disposición perivascular (fig. 24).

En nuestros resultados observamos tanto en decidua de

primer trimestre como en decidua y miometrio a término una marcada expresión de antígenos HLA-DR en las células endoteliales de las vénulas y capilares (fig.23 y 25), mientras que los endotelios arteriulares (fig.24) y los vasos del trofoblasto no expresan este marcador.

Antígenos HLA de clase II están presentes en suero en una forma antigenicamente funcional (Wilson y col., 1979). Por lo tanto, como resultado de una absorción pasiva de las antígenos de clase II séricos a los tejidos, se pueden producir tinciones inmunohistológicas artefactuales. Creemos que esta posibilidad no se da en nuestros resultados, ya que como se ha dicho anteriormente, las células endoteliales arteriulares son DR⁻.

La expresión de antígenos DR en los endotelios de la decidua y del miometrio podría estar inducida por el IFN- τ , según ha sido demostrado en otros tejidos (Pober y col., 1983; Collins y col., 1984). Esta citoquina es sintetizada por las células del estroma placentario (Chin y col., 1988). De acuerdo con Pober (1988), el hecho de que las células endoteliales expresen antígenos HLA de clase II es un signo de activación.

Las células endoteliales activadas han mostrado poseer un una gran variedad de propiedades inmunes: reclutamiento selectivo de linfocitos a los diferentes órganos (Gallatin y col., 1983; Streeter y col., 1988), migración específica de monocitos y neutrófilos a sitios de inflamación tisular

(Lewinsohn y col., 1987), y capacidad de presentación de antígeno (Hischberg y col., 1980).

La función de las células endoteliales activadas en miometrio y decidua puede estar relacionada con el crecimiento trofoblástico ya que las células endoteliales son una fuente importante de citoquinas entre las cuales se encuentra el GM-CSF (Broudy y col., 1987; Sieff y col., 1988) que estimula el crecimiento placentario (Athanasakis y col., 1987; Wegmann y col., 1987). Además, como se ha descrito en otros tejidos, cabe la posibilidad de que las células endoteliales clase II⁺ actuaran como células presentadoras de antígeno a células T supresoras (Oksenberg y col., 1988). Por otra parte, el hecho de que las vénulas y capilares sean DR⁺, mientras que las arteriolas son negativas, sugiere una situación funcional semejante a la de las HEV (High Endothelial Venules) de los ganglios y tejidos linfáticos, a través de las cuales se produce la llegada de linfocitos a estos tejidos (Stamper y Woodruff, 1976). De acuerdo con esta hipótesis, los endotelios activados podrían estar relacionados con la migración de leucocitos a la decidua, que precisamente ha sido descrita en estos resultados. Así mismo, el que los vasos del miometrio sean también positivos, nos puede indicar que la llegada de leucocitos no solo afecta a la decidua, sino también a las regiones cercanas.

ANTIGENOS HLA DE CLASE I

Está generalmente aceptado que aquellas células trofoblásticas en contacto directo con la sangre materna y que son las que componen el sincitiotroblasto veloso, no expresan antígenos HLA de clase I ni de clase II (Suderland y col., 1981; Johnson y col., 1981; Faulk y McIntyre, 1983; Johnson, 1984; Bulmer y Johnson, 1985a). Nuestros resultados vienen a sumarse a todos los estudios previos, no detectamos ningún tipo de antígeno HLA en el sincitiotroblasto de primer o de tercer trimestre (fig. 20a y 20b).

Sin embargo, sí hemos observado expresión de antígenos HLA de clase I, aunque leve, en el citotroblasto extravellositario a término, mediante el anticuerpo monoclonal W6/32 (fig. 20c). Está descrito que este antígeno del citotroblasto humano es una glicoproteína no polimórfica con una cadena pesada de solo 40KD asociada con la β 2-microglobulina (Ellis y col., 1986). Se ha especulado sobre la posibilidad de que sea un antígeno del locus C o alguna molécula HLA no-clásica del sistema HT (Ellis y col., 1986).

Hay autores que determinan una pérdida de expresión de antígenos HLA de clase I por parte de las células del epitelio glandular de la decidua de primer trimestre (Johnson y Bulmer, 1984). Sin embargo en nuestros

resultados detectamos la expresión de este antígeno en todas las glándulas. No encontramos explicación a esta discrepancia. Bulmer y Johnson (1985b) describen glándulas HLA-DR⁺ en decidua de primer trimestre. Resulta difícil de entender como el epitelio glandular puede perder los antígenos HLA de clase I y adquirir al mismo tiempo antígenos HLA de clase II.

Resumiendo todos nuestros resultados, observamos que las poblaciones celulares en la decidua humana varían a lo largo del embarazo. En primer lugar, destaca un aumento de leucocitos (linfocitos T clásicos, macrófagos y células NK CD16⁺) en la decidua a término. La mayor parte de los linfocitos de la decidua de primer trimestre, seleccionados en la fracción de densidad 1,080, son CD3⁻ CD2⁺ CD16⁻, mientras que los linfocitos de la decidua a término presentan un fenotipo distinto ya que se trata de linfocitos T clásicos CD3⁺ y de células NK CD16⁺ (estas se seleccionan entre la 3ª y la 5ª fracción). Las células deciduales típicas se seleccionan fundamentalmente en la 1ª y 2ª fracción. En estas fracciones, y en los dos tipos de decidua estudiados, la expresión de CD2, CD16 y DR fue elevada. Los macrófagos se han seleccionado en la 3ª y 4ª fracción, de acuerdo con los resultados de la inmunohistoquímica y de la inmunocitoquímica son DR⁺. Por último cabe destacar, el estado de inmunoactivación que

existe en la decidua de primer y tercer trimestre y que se refleja por la elevada expresión de HLA-DR en células donde normalmente no se expresa, como es el caso de los endotelios venulares. Este estado de activación puede ser debido a la presencia en la interfase materno fetal de sustancias activadoras como el IFN-gamma, y puede estar relacionado con los mecanismos de inmunosupresión que se han descrito en la interfase materno-fetal, y/o con el reclutamiento leucocitario que parece producirse en la decidua humana a lo largo de la gestación.

CONCLUSIONES

1. Una subpoblación de células deciduales típicas expresa marcadores inmunes relacionados con las células NK (CD2, CD56 y CD16).

2. A lo largo del embarazo se produce un incremento de la proporción de leucocitos a nivel decidual, que incluye linfocitos T CD3⁺, linfocitos B CD20⁺, macrófagos CD14⁺ y células NK CD16⁺.

3. Los linfocitos con marcadores de células NK (CD2 y CD56 en primer trimestre, y CD2, CD16 y CD56 en decidual a término) constituyen la población leucocitaria más abundante de la decidual, seguidos de los macrófagos CD14⁺, linfocitos T clásicos CD3⁺ y una mínima proporción de células B y granulocitos.

4. En la decidual humana existe un estado de activación inmune que viene reflejado por la expresión de antígenos HLA-DR en una amplia variedad de células: macrófagos, linfocitos, células deciduales y células endoteliales.

BIBLIOGRAFIA

ALBRECHTSEN D, SOLHEIM B, THORSBY E. Antiserum inhibition of the mixed lymphocyte culture (MLC) interaction. Inhibitory effect of antibodies reactive with HLA-D associated determinants. *Cell Immunol.* 1977; 28:258.

ANDERSEN RM, MONROE CW. Experimental study of the behaviour of adult human skin homografts during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1962; 84:1096.

ANDERSON JM. Transplantation immunology of certain mammalian mothers and progeny. *Proc R Soc Br* 1970; 176:115.

ATHANASSAKIS I, BLEACKLEY RC, PAETKAU V, GUILBERT L, BARR PJ, WEGMANN TG. The immunostimulatory effect of T cells and T cell lymphokines on murine fetally derived placental cells. *J Immunol* 1987, 138:37.

AVRUCH J, NEMENOFF RA, BLACKSHEAR PJ, PIERCE MW, OSATHANONDH R. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in detergent extracts of human placental membranes. Comparison to epidermal growth factor-stimulated phosphorylation. *J Biol Chem* 1982; 257:15162.

BAILEY K, HERROD HG, YOUNGER R, SJAVER D. Functional aspects in pregnancy. *Obstet Gynecol* 1985; 66:211.

BAINES MG, MILLAR KG, PROSS HF. Allograft enhancement during normal murine pregnancy. *J Reprod Immunol* 1980; 2: 141.

BALEY JE, SCHACTER BZ. Mechanism of diminished natural killer cell activity in pregnant women and neonates. *J Immunol* 1985; 134:3042.

BALOW JE, ROSENHAL AS. Glucocorticoid suppression of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* 1973; 137:1031.

BARG M, BURTON RC, SMITH JA, LUCKENBACH GA, DECKER J, MITCHELL GF. Effect of placental tissue on immunological responses. *Clin Exp Immunol* 1978; 34:441.

BARNETT MA, LEARMONTH RP, PIHL E, WOOD EC. T helper lymphocyte depression in early human pregnancy. *J Reprod Immunol* 1983; 5:55.

BARNETT MA, ROLLAND JM, LEARMONTH RP, WALTERS WA, PIHL E. Lymphocyte subclasses in pregnancy induced hypertension. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1984; 24:202.

BARTOCCI A, PAPADEMETRIOU V, SCHLICK E, NISULA BD, CHIRIGOS MA. Effect of crude and purified human chorionic gonadotrophin on murine delayed-type hypersensitivity: A role for prostaglandins. *Cell Immunol* 1982; 71:326.

BARTOCCI A, WELKER RD, SCHLICK E, CHIRIGOS MA, NISULA BD. Immunosuppressive activity of human chorionic gonadotrophin preparations in vivo: evidence for gonadal dependence. *Cell Immunol* 1983; 82:334.

BEER AE. The paradox of feto-placental units as allografts. En: Talwar G (Eds.), *Recent advances in reproduction and regulation of fertility* 1979. Elsevier-North, Amsterdam, Holland, pp 501-513.

BEER AE, BILLINGHAM RE. Immunobiology of mammalian reproduction. *Adv Immunol* 1971; 14:1.

BEER AE, BILLINGHAM RE. Maternal immunological recognition mechanisms during pregnancy. En: Whelan J (Eds.), *Maternal recognition of pregnancy* 1979. Excerpta Medica, Amsterdam, pp 293-322.

BERTOTTO A, DEFELICIS ARCANGELI C, MAZZARINO I, VACCARO R, GERLI R, FERRARESE R, CUCCHIA GC. T-cell subsets distribution in chronically aborting women. *Lancet* 1984; 1:108.

BILLINTONG WD, DAVIES M. Maternal antibody to placental syncytiotrophoblast during pregnancy. En: Gill TJ y Wegmann TG (Eds.), *Immunoregulation and fetal survival* 1987. Oxford University Press, New York, pp 15-26.

BOHN H. Biochemistry of placental proteins. En: Bischof A, Klopfer A (Eds.), *Protein of the placenta* 1985. Karger, Basel, pp 1-21.

BORELLI I, AMOROSOSO A, RCCHIARDI P, CURTONI ES. Evaluation of different technical approaches for the research of human anti-Ia alloantisera. *Tissue antigens* 1982; 19:380.

BOSE R. Human embryo associated immunosuppressor factor(s) from pre and post-implantation stages share some similarities. *Immunol Lett* 1989; 20:261.

BREYERE EJ, BARRETT MK. Prolonged survival of skin homografts in parous female mice. *J Natl Cancer Inst* 1960b; 25:1405.

BROCHIER J, ROITT IM, FESTENSTEIN H. Inhibition of lymphocyte proliferative responses by anti-HLA alloantisera. *Eur J Immunol* 1974; 4:709.

BROOKS CF, MOORE M. Presentation of a soluble bacterial antigen and cell-surface alloantigens by large granular lymphocytes (LGL) in comparison with monocytes. *Immunology* 1986; 58:343.

BROUDY VC, KAUSHANUSKY K, HARLAN JM, ADAMSON JW. Interleukin 1 stimulates human endothelial cells to produce granulocyte-macrophage colony stimulating factor and granulocyte colony stimulating factor. *J*

Immunol 1987; 139:464.

BRUNHAM RC, MARTIN DH, HUBBARD TW, KUO CC, CRITCHLOW CW, CLESS LD, ESCHENBACH DA, HOLMES KK. Depression of the lymphocyte transformation response to microbial antigens and to phytohemagglutinin during pregnancy. *J Clin Invest* 1983; 72:1629.

BULMER JN. Decidual cellular responses. *Current Opinion in Immunology* 1989; 1:1141.

BULMER JN, BILLINGTON WD, JOHNSON PM. Immunohistologic identification of trophoblast populations in early human pregnancy with the use of monoclonal antibodies. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148:19.

BULMER JN, HOLLINGS D, RITSON A. Immunocytochemical evidence that endometrial stromal granulocytes are granulated lymphocytes. *J Pathol* 1987; 153:281.

BULMER JN, JOHNSON PM. Macrophage populations in the human placenta and amniochorion. *Clin Exp Immunol* 1984; 57:393.

BULMER JN, JOHNSON PM. Antigen expression by trophoblast populations in the human placenta and their possible immunobiological relevance. *Placenta* 1985a; 6:127.

BULMER JN, JOHNSON PM. Immunohistological characterization of the decidual leucocytic infiltrate related to endometrial gland epithelium in early human pregnancy. *Immunology* 1985b; 55:35.

BULMER JN, JOHNSON PM. The T-lymphocyte population in first trimester human decidua does not express the interleukin-2 receptor. *Immunology* 1986; 58:685.

BULMER JN, JOHNSON PM, BULMER D. Leukocyte populations in human decidua

and endometrium. En: Gill TJ y Wegmann TG (Eds.), Immunoregulation and fetal survival 1987. Oxford University Press, New York, pp 111-134.

BULMER JN, LUNNY DP, HAGIN SV. Immunohistochemical characterization of stromal leucocytes in nonpregnant human endometrium. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988a; 17:83.

BULMER JN, MORRISON L, SMITH JC. Expression of class II MHC gene products by macrophages in human uteroplacental tissue. *Immunology* 1988b; 6:707.

BULMER JN, SMITH JC, WELLS M. Maternal and fetal cellular relationship in the human placental basal plate. *Placenta* 1988c; 9:237.

BULMER JN, SUDERLAND CA. Bone-marrow origin of endometrial granulocytes in the early human placental bed. *J Reprod Immunol* 1983; 5:383.

BULMER JN, SUDERLAND CA. Immunohistological characterization of lymphoid cell populations in the early human placental bed. *Immunology* 1984; 52:349.

BURSTEIN RH, BLUMENTHAL HT. Immune reaction of normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1969; 104:671.

CANEPA S, HOROWITZ R, DEGENNE D, MAGNIN G, VALAT C, BARDOS P. Correlation of plasma hormone levels and peripheral circulating lymphocyte subpopulations during normal pregnancy. *Immunol Lett* 1984; 8:159.

CARSON SA, CHASE R, ULEP E, SCOMMEGNA A, BENVENISTE R. Ontogenesis and characteristics of epidermal growth factor receptors in human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 147: 932.

CASTILLA JA, RUEDA R, VARGAS ML, GONZALEZ-GOMEZ F, GARCIA-OLIVARES E.

CASTILLA JA, RUEDA R, VARGAS ML, GONZALEZ-GOMEZ F, GARCIA-OLIVARES E. Decreased levels of circulating CD4⁺ T lymphocytes during normal human pregnancy. *J Reprod Immunol* 1989; 15:103.

CASTILLA JA, VARGAS ML, GARCIA-TORTOSA C, GARCIA-PACHECO M, GONZALEZ-GOMEZ F, GARCIA-OLIVARES E. Short-lived suppressor cell activity during pregnancy. *J Reprod Immunol* 1990; (en prensa).

CASTILLA JA, VARGAS ML, RUEDA R, GARCIA-OLIVARES E. Lymphocyte response to mitogens during pregnancy and puerperium. *Rev Diagnos Biol* 1990; (en prensa).

CERNI C, TATRA G, BOHN H. Immunosuppression by human placental lactogen (HPL) and the pregnancy-specific beta₁-glycoprotein (SP-1). *Arch Gynecol* 1977; 223:1.

CHAOUAT G y col. En: Beard y Sharp (Eds.), *Early pregnancy failure: mechanisms and treatment* 1988. Peacock Press, pp 89-102.

CHAOUAT G, KOLB J, RIVIERE M, LANKER D. Immunoactive products of placenta . V: Soluble factors from murine placenta can block effector stages of antipaternal cell-mediated immunity. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1986; 12:70.

CHARDONNENS X, JEANNET M. Lymphocyte mediated cytotoxic and humoral antibodies in pregnancy. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1980; 61:467.

CHATTERJEE-HASROUNI S, PARHAR RS, LALA PK. An evaluation of the maternal natural killer cell population during the course of murine pregnancy. *Cell Immunol* 1984; 84:264.

CHEGINI N, RAO CV. Epidermal growth factor binding to human amnion, chorion, decidua and placenta from mid an term pregnancy: quantitative light microscopic and autoradiographic studies. *J Clin Endocrinol*

Metabol 1985; 61:529.

CHIN TW, ANK BJ, STROM SR, STIEHM ER. Enhanced interferon production and lymphokine activated cytotoxicity of human placental cells. Cell Immunol 1988; 113:1.

CLARK DA. Cytokines and pregnancy. Current Opinion in Immunology 1989; 1:1148.

CLARK DA, BANWATT DK, MANUEL J, FULOP G, CROY BA. SCID mice in reproductive biology. En: Phillips RA, Boswa M, Schuler W eds, The SCID mouse 1989. Proceeding of the Symposium at the Basel Institute of Immunology. Springer-Verlag, Heidelberg; (en prensa).

CLARK DA, FALBO M, ROWLEY RB, BANWATT D, STEDRONSKA-CLARK Y. Active suppression of host-vs-graft reaction in pregnant mice IX. Soluble suppressor activity obtained from allopregnant mouse decidua that blocks the cytolytic effector response to IL-2 is related to transforming growth factor- β . J Immunol 1988, 141:3833.

CLARK DA, SLAPSYS R, CHAPUT, WALKER C, BRIERLEY J, DAYA S, ROSSENTHAL KL. Immunoregulatory molecules of trophoblast and decidual suppressor cell origin at the maternofetal interface. Am J Reprod Immunol Microbiol 1986; 10:100.

COHEN B, ORN LA, GRONVIK KO, GIDLUND M, WIGZELL H, MURGITA RA. Scand J Immunol 1986; 23:211.

COLLINS T, KORMAN AJ, WAKE CT, BOS JM, KAPPES DJ, FIERS W, AULT KA, GIMBRONE MA, STROMINGER JL, POBERS JS. Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain in human endothelial cells and dermal fibroblast. Proc Natl Acad Sci 1984; 81:4917.

CONTRACTOR SF. Metabolic and enzyme activity in human trophoblast. En: Loke YW y Whyte A (Eds.), Biology of trophoblast 1983. Elsevier, Amsterdam, pp 231-281.

CONTRACTOR SF, DAVIES H. Effect of human chorionic somatomammotrophin and human chorionic gonadotrophin on phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation. Nature 1973; 243:284.

COOPER DW, AITKEN RJ. Failure to detect altered rosette inhibition titres in human pregnancy serum. J Reprod Fertil 1980; 61:241.

COULAM CB, SILVERFIELD JC, KAZMAR RE, FATHMAN CG. T-lymphocyte subsets during pregnancy and the menstrual cycle. Am J Reprod Immunol 1983; 4:88.

CRAINIE M, SEMELUK A, LEE KC, WEGMANN T. Regulation of constitutive and lymphokine-induced Ia expression by murine α -fetoprotein. Cell Immunol 1989; 118:41.

CROY BA, GAMBEL P, ROSSANT J, WEGMANN TG. Characterization of murine decidual natural killer (NK) cells and their relevance to the success of pregnancy. Cell Immunol 1985; 9:315.

CROY BA, KASSOUF SA. Evaluation of the murine metrial gland for immunological function. J Reprod Immunol 1989; 15:51.

CROY BA, ROSSANT J, CLARK DA. Histological and immunological studies of post-implantation death of *Mus caroli* embryos in the *Mus musculus* uterus. J Reprod Immunol 1982; 4:227.

CURRIE GA, VAN DOORNICK W, BAGSHAWE KD. Effect of neuraminidase on the immunogenicity of early mouse trophoblast. Nature 1968; 219:191.

DAAR AS, FUGGLE SV, FABRE JW, TING A, MORRIS PJ. The detailed distribution of MHC class II antigens in normal human organs. *Transplantation* 1984; 38:293.

DAVID G, VOLCKRINGER P, MERCIER-PAROT L. Mise en évidence d'une phase de tolérance immunologique postgestative chez la souris. *Cr Ass Anat* 1967; 52:387.

DAVIES, M. PARRY JE, SUTCLIFFE RG. Examination of different preparations of human placental plasma membranes proteins for the binding of insulin, transferrin and immunoglobulin. *J Reprod Fertil* 1981; 63:315.

DAYA S, CLARK DA. Immunosuppressor factor(s) produced by decidua-associated suppressor cells: a proposed mechanism for fetal cells graft survival. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1986; 11:98.

DAYA S, JOHNSON PM, CLARK DA. Trophoblast induction of suppressor-type cell activity in human endometrial tissue. *Am J Reprod Immunol* 1989; 19:65.

DAYA S, ROSENTHAL KL, CLARK DA. Immunosuppressor factor(s) produced by decidua associated suppressor cells: a proposed mechanism for fetal allograft survival. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156:344.

DEGENNE D, CANEPA S, LECOMTE C, RENOUX M, BARDOS P. Serial study of T-lymphocytes subsets in women during very early pregnancy. *Clin Immunol Immunopathol* 1988; 48:187.

DESOYE G, DOHR GA, MOTTER W, WINTER R, URDL W, PUSCH H, UCHANSKA-ZIEGLER B, ZIEGLER A. Lack of HLA class I and class II antigens on human preimplantation embryos. *J Immunol* 1988; 140:4157.

DOUGHTY RW, GELSTHORPE K. Some parameters of lymphocyte antibody activity through pregnancy and further eluates of placental material. *Tissue Antigens* 1976; 8:43.

DRAKE BL, HEAD JR. Murine trophoblast are susceptible to lymphokine-activated killer (LAK) cell lysis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988; 16:114.

DRAKE BL, HEAD JR. Murine trophoblast can be killed by lymphokine-activated killer cells. *J Immunol* 1989; 143:9.

DUC HT, RIGHENZI S, MONNOT P, NAKAGAWA S, VOISIN GA. In vitro immunomodulatory effects of placental substances on preparatory MLR and resulting modifications of lymphocyte reactivities. *J Reprod Immunol* 1987; 11:221.

DURANDY A, BRAMI C, GRISCELLI C. The effects of indomethacin administration during pregnancy on womens' and newborns' T-suppressor lymphocyte activity and H1A class II expression by newborns' leucocytes. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1985; 8:472.

DUSTIN ML, SPRINGER TA. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with adhesion molecule (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol* 1988; 107:321.

DVORAK AM, GALLI SJ, MARCUM JA, NABEL G, DER SIMONIAN H, GOLDIN J, MONAHAN RA, PYNE K, CANTOR H, ROSENBERG RD, DVORAK HF. Cloned mouse cells with natural killer functions and cloned suppressor T cells express ultrastructural and biochemical features not shared by cloned inducer T cells. *J Exp Med* 1983; 157:843.

EADES DIC, CORNELIUS P, PEKALA PH. Characterization of the tumor necrosis factor receptor in human placenta. *Placenta* 1988; 9:247.

EDIDIN M. Histocompatibility genes, transplantation antigens and pregnancy. En: Kahan BD y Reisfel RA (Eds.), Transplantation antigens 1972. Academic Press, New York, pp 75-114.

ELLIS SA, SARGENT IL, REDMAN CWG, McMICHAEL AJ. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology* 1986; 59:595.

FAULK WP, McINTYRE JA. Immunological studies of human trophoblast: markers, subsets and functions. *Immunol Rev* 1983; 75:139.

FAULK WP, McINTYRE JA. Role of Anti-TLX antibody in human pregnancy. En: Clark DA y Croy BA (Eds.), *Reproductive Immunology* 1986. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 106-114.

FAULK WP, McINTYRE JA, KAJINO T, TORRY DS. TA1 and TLX antigens in human pregnancy. En: Chaouat G (ed.), *Reproductive Immunology: maternofetal relationship* 1987. INSERM, Paris, pp 51-62.

FAULK WP, TEMPLE A, LOVINS RE, SMITH NC. Antigens of human trophoblast: a working hypothesis for their role in normal and abnormal pregnancies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 1947.

FEINMAN MA, KLIMAN HJ, MAIN EK. HLA antigen expression and induction by gamma-interferon in cultures trophoblasts. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157:1429.

FIDDES TM, O'REILLY DB, CETRULO CL, y MILLER W, OSBAND M, ROCKLIN RE. Phenotypic and functional evaluation of suppressor cells in normal pregnancy and in chronic aborters. *Cell Immunol* 1986; 97:407.

FINN CA. Species variation in implantation. *Prog Reprod Biol* 1980; 7:253.

FINN CA, PORTER DG. En: The uterus 1975. Elek Science, Londres, pp 74-95.

FINN R, HILL CA, GOVAN AJ, RALFS IG, GURNEY FJ, DENYE V. Immunological responses in pregnancy and survival of fetal homograft. Br Med J 1972; 3:150.

FISHER A, DURANDY A, GRISCELLI C. Role of prostaglandin E₂ in the induction of nonspecific T lymphocyte suppressor activity. J Immunol 1981; 123:1452.

FLYNN A, FINKE JH, HILFIKER ML. Placental Mononuclear phagocytes as a source of Interleukin-1. Science 1982; 29:475.

FU SM, CHIRAZZI N, YANG CI. Ia bearing T lymphocytes in man. J Exp Med 1978; 148:1423.

GALLATIN WM, WEISSMAN IL, BUTCHER EC. A cell surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. Nature 1983; 304:30.

GAREWAL G, SEHGAL S, AIKAT BK, GUPTA AN. Cell-mediated immunity in pregnant patients with and without a previous history of spontaneous abortions. Br J Obstet Gynecol 1978; 85:221.

GENDRON RL, BAINES MG. Infiltrating decidual natural killer cells are associated with spontaneous abortion in mice. Cell Immunol 1988; 113:261.

GLASSMAN AB, BENNETT CE, CHRISTOPHER JB, SELF S. Immunity during pregnancy: lymphocyte subpopulations and mitogen responsiveness. Ann Clin Lab Sci 1985; 15:357.

GOLANDER A, ZAKUTH V, SHECHTER Y, SPIKER Z. Suppression of lymphocyte reactivity in vitro by a soluble factor secreted by explants of human decidua. *Eur J Immunol* 1981; 11:849.

GOODFELLOW CF. Maternal lymphocyte responses during normal and abnormal pregnancies, measured in vitro using composite trophoblast antigens and phytohaemagglutinin. *Immunol Rev* 1983; 75:61.

GOODWIN JS, CEUPPENS J. Regulation of immune response by prostaglandins. *J Clin Immunol* 1983; 3:295.

GREENBERG LJ, REINSMOEN N, YUNIS EJ. Dissociation of stimulation (MLR-S) and response (MLR-R) in mixed leucocyte culture by serum blocking factors. *Transplantation* 1973; 16:520.

GULYANSKY LN, FYODOROV GN. The suppression of "graft-versus-host" reaction by human chorionic gonadotrophin. *Am J Reprod Immunol* 1985a; 7:64.

GULYANSKY LN, PETRUNIN DD, FYODOROV GN, TATARINOV US, TYURINA YG, GOLOVISTIKOV IN. Studies on immunoregulatory properties of human chorionic gonadotrophin, trophoblastic betaglucoprotein, placental alpha₁ and alpha₂ microglobulins. *Am J Reprod Immunol* 1985b; 7:67.

GUSDON JP, HEISE ER, QUINN KJ, MATTHEWS LC. Lymphocyte subpopulations in normal and pre-eclampsies. *Am J Reprod Immunol* 1984; 5:28.

HAMAOKA T, MATSUZAKI N, ITOH K, TSUJI Y, IZUMI Y, FUJIWARA H, ONO S. Human trophoblast and tumor cell-derived immunoregulatory factor. En: Isojima S, Billington WD (Eds.), *Reproductive Immunology* 1983. Elsevier, Amsterdam, p. 133.

HEAD JR, DRAKE BL, ZUCKERMANN F. Major histocompatibility antigens on trophoblast and their regulation: Implications in the maternal

relationship. Am J Reprod Immunol Microbiol 1987; 15:12.

HERON I. Cardiac allograft rejection during and following pregnancy in the inbred rat. Transplantation 1971; 12:144.

HERON I. Prolonged survival of heart allografts transplanted in rats and rabbits following pregnancy. Transplantation 1972; 14:551.

HERZENBERG LA, BIANCHI DW, SCHRODER J, CANN HM, IVERSON GM. Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. Proc Natl Acad Sci 1979; 76:1453

HIRSCHBERG H, BERGH OJ, THORSBY E. Antigen-presenting properties of human vascular endothelial cells. J Exp Med 1980; 152:249.

HOLDSTOCK G, CHASTENAY BF, KRAWITT EL. Effects of testosterone, estradiol and progesterone on immune regulation. Immunol 1982; 47:449.

HOLLAND D, BRETSCHER P, RUSSELL AS. Immunologic and inflammatory responses during pregnancy. J Clin Lab Immunol 1984; 14:177.

HOOPER DC, HOSKIN DW, GRONVIK KO, MURGITA RA. Murine neonatal spleen contain natural T and non T suppressor cells capable of inhibiting newborn autoreactive T-cell proliferation. Cell Immunol 1985; 99:461.

HORNE CHW, TOWLER CM, PUGH-HUMPHREY RGP, THOMSON AW, BOHN H. Pregnancy-specific beta₁-glycoprotein - a product of the syncytiotrophoblast. Experientia 1976; 32:1197.

HOSKIN DW, HAMEL S, HOOPER DC, MURGITA RA. In vitro activation of bone-marrow-derived T and non T-cell subsets by α -fetoprotein. Cell Immunol 1985; 96:163.

HSI BL, SAMSON M, GRIVAUX C, FENICHEL P, HUNT JS, YEH CJG. Topographical expression of class I major histocompatibility complex antigen on human amniotic epithelium. *J Reprod Immunol* 1988; 13:183.

HSI BL, YEH CJG, FAULK WP. Class I antigens of the major histocompatibility complex on cytotrophoblast of human chorion laeve. *Immunology* 1984; 52:621.

HSU CCS. Peripheral blood lymphocyte responses to phytohemagglutinin and Pokeweed mitogen during pregnancy. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974; 146:771.

HULKA JF, BRINTON V, SCHAAF J, BANEY C. Appearance of antibodies to trophoblast during the post-partum period in normal human pregnancies. *Nature* 1963; 198: 501.

HUNT JS, ANDREWS GK, FISHBACK JL, FEES, WOOD GW. Amnion membrane epithelial cells express class I HLA and contain class I HLA mRNA. *J Immunol* 1988; 140:2790.

HUNT JS, ANDREWS GK, WOOD GW. Normal trophoblast resist induction of class I HLA. *J Immunol* 1987; 138:2481.

HUNT JS, WOOD GW. Gamma interferon induces class I HLA and beta-2-microglobulin expression by human amnion cells. *J Immunol* 1986; 136:364.

JAFFE RB. Protein hormones of the placenta, decidual and fetal membranes. En: Yen SSC, Jaffe RB (Eds.), *Reproductive endocrinology* 1986. WB Saunders, Philadelphia, pp 758-769.

JENKINSON EJ, BILLINGTON WD. Cell surface properties of early mammalian embryos. En: Sherman MI (Ed.), *Concepts in mammalian embryogenesis* 1977. Massachusetts Institute of Technology Press, Cambridge, pp 235-266.

JOHNSON PM. Immunohistological and serological applications of monoclonal antibodies to human trophoblast membrane antigens in pregnancy and malignancy. En: Isojima S, Billington WD (Eds.), Reproductive Immunology 1983. Elsevier, Amsterdam, pp 103-110.

JOHNSON PM. Immunobiology of the human trophoblast. En: Crighton DB, (Eds.), Immunological aspects of reproduction in mammals 1984. Butterworths, London, pp 109-131.

JOHNSON PM, BROWN PJ, FAULK WP. Immunobiological aspects of the human placenta. En: Finn CA (Ed.), Oxford reviews of reproductive biology, vol. 2, 1981. Oxford University Press, Oxford, pp 7.

JOHNSON PM, BULMER JN. Uterine gland epithelium in human pregnancy often lacks detectable maternal MHC antigens but does express fetal trophoblast antigens. J Immunol 1984; 132:1608.

JOHNSON PM, CHIA KV, HART CA, GRIFFITH HB, FRANCIS WJA. Trophoblast membrane infusion for unexplained recurrent miscarriage. Br J Obstet Gynecol 1988; 95:342.

JOHNSON PM, MOLLOY CM. Localization in human term placental bed and amniochorion of cells bearing trophoblast antigens identified by monoclonal antibodies. Am J Reprod Immunol 1983; 4:33.

JOHNSON PM, RISK JM, BULMER JN, NIEWOLA Z, KIMBER I. Antigen expression at human maternofetal interfaces. En: Gill TJ III, Wegmann TG, Nisbet-Brown E (Eds.), Immunoregulation and Fetal Survival 1987. Oxford Univ Press, New York, pp 181-196.

JONES WR, HAWES CS, KEMP AS. Studies in cell-mediated immunity in human pregnancy. En: Wegmann TG, Gill TJ III (Eds.), Immunology of Reproduction 1983. Oxford Univ Press, New York, pp 363-370.

JONKER M, VAN LEEUWEN A, VAN ROOD JJ. Inhibition of the mixed leukocyte reaction by alloantisera in man. II. Incidence and characteristics of MLC-inhibiting antisera from multiparous women. *Tissue Antigens* 1977; 9:246.

KABAWAT SE, MOSTOUFI-ZADEHM, DRISCOLL SG, BHAN AK. Implantation site in normal pregnancy: a study with monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1985; 118:76.

KAJINO T, FAULK WP, McINTYRE JA. Antigens of human trophoblast: trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigens on platelets. *Am J Reprod Immunol* 1987; 14:70.

KAJINO T, TORRY DS, McINTYRE JA, FAULK WP. Trophoblast antigens in human plasma seminal. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988b; 17:91.

KAWATA K, PARNES JR, HERZENBERG LA. Transcriptional control of HLA-A, B, C antigen in human placental cytotrophoblast isolated using trophoblast and HLA specific monoclonal antibodies and the fluorescence-activated cell sorter. *J Exp Med* 1984; 160:633.

KEARNS M, LALA PK. Bone marrow origin of decidual cell precursors in the pseudopregnant mouse uterus. *J Exp Med* 1982; 155:1537.

KEARNS M, LALA PK. Life history of decidual cells. A review. *Am J Reprod Immunol* 1983; 3:78.

KEARNS M, LALA PK. Characterization of hematogenous cellular constituents of the murine decidua: a surface marker study. *J Reprod Immunol* 1985a; 8:213.

KEARNS M, LALA PK. Radioautographic analysis of surface markers on decidual cells shared by cells of the lymphomyeloid tissues. *Am J*

Reprod Immunol Microbiol 1985b; 9:39.

KEARNS M, LALA PK. Monoclonal antibodies defining marker(s) unique to the decidual cell lineage. Transplant Proc 1985c; 17:911.

KEARNS M, PARHAR RS, LALA PK. Decidual cell-specific surface antigen(s) recognized by monoclonal antibodies: tissue and species distribution. J Immunol 1985; 135:1046.

KHONG TY. Immunohistologic study of the leukocytic infiltrate in maternal uterine tissues in normal preeclamptic pregnancies at term. Am J Reprod Immunol Microbiol 1987; 15:1.

KING A, BIRKBY C, LOKE YW. Early human decidual cells exhibit NK activity against the K562 cell line but not against first trimester trophoblast. Cell Immunol 1989; 118:337.

KING A, LOKE YW. Differential expression of blood-group-related carbohydrate antigens by trophoblast subpopulations. Placenta 1988; 9:513.

KING A, WELLINGS V, GARDNER L, LOKE YW. Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. Hum Immunol 1989; 24:195.

KIRBY DRS, BILLINGTON WD, BRADBURY S, GOLDSTEIN DG. Antigen barrier of the mouse placenta. Nature 1964; 204:548.

KIRKWOOD KJ, BILLINGTON WD. Expression of serologically detectable H-2 antigens on mid-gestation mouse embryonic tissues. J Embriol Exp Morphol 1981; 61:207.

KISSMEYER-NIELSEN F (Ed.) Histocompatibility testing 1975. Munksgaard, Copenhagen.

KLARESKOG L, FORSUM U. Tissue distribution of class II transplantation antigens: presence on normal cells. En: Solheim BG, Moller E, Ferrone S (Eds.), HLA class II antigens: a comprehensive review of structure and function 1986. Springer-Verlag, Berlin, pp 339-351.

KNOBLOCH V, JOUJA V. Feto-maternal relationship in normal pregnancy in mixed lymphocyte cultures. Arch Gynäk 1976; 220:249.

KOLB JP, CHAOUAT G, CHASSOUX D. Immunoactive products of placenta. III. Suppression of natural killer activity. J Immunol 1984; 132:2305.

KUEHL FA, HUMES JL, EGAN RW, HAM EA, BEVERIDGE GC, VAN ARMAN CG. Role of prostaglandins endoperoxide PGG₂ in inflammatory process. Nature 1977; 265:170.

LALA PK, CHATTERJEE-HASROUNI S, KEARNS M, MONTGOMERY B, COLAVINCENZO V. Immunobiology of the feto-maternal interface. Immunol Rev 1983; 75:87.

LALA PK, KEARNS M, COLAVINCENZO V. Cells of the feto-maternal interface: Their role in the maintenance of viviparous pregnancy. Am J Anat 1984; 170:501.

LALA PK, KENNEDY TG, PARHAR RS. Suppression of lymphocyte alloreactivity by early gestational human decidua. Cell Immunol 1988; 116:411.

LALA PK, KIM P. An examination of paternal type major histocompatibility antigens on the murine preimplantation blastocysts. Anat Rec 1984; 208:98A.

LALA PK, PARHAR RS, KEARNS M, JOHNSON S, SCODRAS JM. Immunologic aspects of the decidual response. En: Clark DA, Croy BA (Eds.), Reproductive Immunology 1986. Elsevier Science, Amsterdam, p. 190.

LANIER LL, LE AM, PHILLIPS JH, WARNER NL, BABCOCK GF. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu7 (HNK-1) and Leu11 (NK-15) antigens. *J Immunol* 1983; 131:1789.

LAWLER SD, UKAEJIOFO EO, REEVES BR. Interactions of maternal and neonatal cells in mixed-lymphocyte cultures. *Lancet* 1975; 2:1185.

LEE H, GREGORY CD, REES GB, SCOTT GB, GOLDING PR. Cytotoxic activity and phenotypic analysis of natural killer cells in early normal human pregnancy. *J Reprod Immunol* 1987; 12:35.

LESSIN DL, HUNT JS, KING CR, WOOD W. Antigen expression by cells near the maternal-fetal interface. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988; 16:1.

LEWINSOHN DM, BARGATZE RF, BUTCHER EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes, and other leukocytes. *J. Immunol* 1987; 138:4313

LOKE YW. Trophoblast antigen expression. *Current opinion in Immunology* 1989; 1:1131.

LOKE YW, BUTTERWORTH BH. Heterogeneity of human trophoblast populations. En: Gill TJ y Wegmann TG (Eds.), *Immunoregulation and fetal survival* 1987. Oxford University Press, New York, pp 197-209.

LOKE YW, EREMIN O, ASHBY J, DAY S. Characterization of the fagocytic cells isolated from the human placenta. *J Reticuloendothel Soc* 1982; 31:317.

LU CY, CHANGELIAN PS, UNANUE ER. Alpha protein inhibits macrophage expressions of Ia antigens. *J Immunol* 1984; 132:1722.

LUCIVERO G, SELVAGGI L, DELL'OSSO A, ANTONACI S, IANNONE A, BETTOCHI A, BONOMO L. Mononuclear cell subpopulations during normal pregnancy. I. Analysis of cell surface markers using conventional techniques and monoclonal antibodies. *Am J Reprod Immunol* 1983; 4:142.

MAES RF, CLAVERIE N. The effects of preparations of human chorionic gonadotrophin on lymphocyte stimulation and immune response. *Immunology* 1977; 33:351.

MAJUMDAR S, DAHIYA R, MAPA MK, y col. Lymphocyte response to PHA in the presence of sera of pregnant women and its correlation with serum levels of placental specific B₁-glycoprotein. *Indian J Med Res* 1984; 79:502.

MAKMAN MH, DVORKIN B, WHITE A. Influence of cortisol on the utilization of precursors of nucleic acids and protein by lymphoid cells in vitro. *J Biol Chem* 1968; 243:1485.

MANASEKI S, SEARLE RF. Natural killer (NK) cell activity of first trimester human decidua. *Cell Immunol* 1989; 121:166.

MAROULIS GB, BUCKLEY RH, YOUNGER JB. Serum immunoglobulin concentration during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1971; 109:971.

MARSHALL RJ, JONES DB. An immunohistochemical study of lymphoid tissue in human endometrium. In *J Gynecol Pathol* 1988; 7:225.

MASSON PL, DELIRE M, CAMBIASO CL. Circulating immune complexes in normal human pregnancy. *Nature* 1977; 266:542.

MATSUI S, YOSHIMURA N, OKA T. Characterization and analysis of soluble suppressor factor from early human decidual cells. *Transplantation* 1989; 47:678.

alkaline phosphatase defined by monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 1982; 30:21.

MCLEOD AM, MASON RJ, STEWART KN, POWER DA, AHEWAN WG, EDWARDN, CATTO GRD. Fc-receptor-blocking antibodies develop after blood transfusions and correlat with good graft outcome. *Transplant Proc* 1983; 15:1019.

MEHROTRA NN. Depression of T-cell activity during pregnancy: I. Factor(s) in pregnancy serum affecting T-cell reactivity. *Indian J Exp Biol*; 1982; 20:359.

METCALF WK, METCALF NF. Platelets, pregnancy and phytohemagglutinin. *Am J Obstet Gynecol* 1972; 114:602.

MONTGOMERY WP, YOUNG RC, ALLER MD, HORDEN KA. The tuberculin test in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1968; 100:829.

MOORE MP, CARTER NP, REDMAN CWG. Lymphocyte subsets defined by monoclonal antibodies in human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1983a; 4:161.

MOORE MP, CARTER NP, REDMAN CWG. Lymphocyte subsets defined by monoclonal antibodies in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynecol* 1983b; 90:326.

MORSE JH, STEARNS G, ARDEN J, AGOSTO GM, CANFIELD RE. The effects of crude and purified human gonadotrophin on in vitro stimulated human lymphocytes cultures. *Cell Immunol* 1976; 25:178.

MORTON H, HEGH V, CLUNIE GJA. Studies of the rosette inhibition test in pregnant mice; evidence of immunosuppression?. *Proc R Soc BR* 1976; 193:413.

MORTON H, ROLFE B, CLUNIE GJA, ANDERSON MJ, MORRISON J. An early

pregnancy factor detected in human serum by the rosette inhibition test. *Lancet* 1977; 1:394.

MUKHTAR, STEWART, Comunicación personal 1989.

MUNKER R, GASSON J, OGAWA M, KOEFFLER HP. Recombinant human TNF induces production of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor. *Nature* 1986; 323:79.

MUNROE JS. Progesteroids as immunosuppressive agents. *J Reticuloendothel Soc* 1971; 9:361.

MURGITA RA, GOIDL EA, KONTOAINEN S, WIGZELL H. Alpha-protein induces suppressor T cells in vitro. *Nature* 1977; 267:257.

MURGITA RA, PECK AB, WIGZELL H. Immunosuppressive elements in the fetal and neonatal environment. En: Wegmann TG, Gill TJ III (Eds.), *Immunology of reproduction* 1983. Oxford Univ Press, New York, pp 317-340.

MURGITA RA, TOMASI TB. Suppression of the immune response by alpha-protein. II. The effect of mouse alpha-fetoprotein on mixed lymphocyte reactivity and mitogen induced lymphocyte transformation. *J Exp Med* 1975b; 141: 440.

NAKAKITA T. Immunological study on conception. The detection of antibody to human trophoblast by immune adherence. *Nagoya Med J* 1972; 17:89.

NELSON JH, LU T, HALL JE, KROWN S, NELSON JM, FOX CW. The effect of trophoblast on immune state of women. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 117:689.

O'HEARN M, STITES DP. Inhibition of murine suppressor cell function by

progesterone. Cell Immunol 1983; 76:340.

OKSENBERG JR, MOR YOSEF S, EZRA Y, BRAUTHBAR Ch. Antigen presenting cells in human decidual tissue: III. Role of accessory cells in activation of suppressor cells. Am J Reprod Immunol Microbiol 1988; 16:151.

OKSENBERG JR, MOR YOSEF S, PERSITZ E, SCHENKER J, MOZES E, BRAUTHBAR Ch. Antigen presenting cells in human decidual tissue. Am J Reprod Immunol Microbiol 1986; 11:82.

OLINESCU A, LAKY M, POPESCU DE, DUMITRESCU A, GANEA D. Scand J Immunol 1978; Suppl 8:397.

OSTENSEN M, LUNDGREN R, HUSBY G, REKVIG G, REKVIG OK. Studies on humoral immunity in pregnancy: immunoglobulins, alloantibodies and autoantibodies in healthy pregnant women and in pregnant women with rheumatoid disease. J Clin Lab Immunol 1983b; 11:143.

PARHAR RS, KENNEDY TG, LALA PK. Suppression of lymphocyte alloreactivity by early gestational human decidua. I. Characterization of suppressor cells and suppressor molecules. Cell Immunol 1988; 116:392.

PARR EL, PARR MB, YOUNG JD-E. Localization of a poreforming protein (perforin) in granulated metrial gland cells. Biol Reprod 1987; 37:1327.

PEARSE WH, KAIMAN H. Human chorionic gonadotrophin and skin allograft survival. Am J Obstet Gynecol 1967; 98:573.

PECK AB, MURGITA RA, WIGZELL H. Cellular and genetic restrictions in the immunoregulatory activity of alpha-fetoprotein . II. Alpha-fetoprotein-induced suppression of cytotoxic T lymphocyte development.

J Exp Med 1978; 147:667.

PECK AB, MURGITA RA, WIGZELL H. Cellular and genetic restrictions in the immunoregulatory activity of alpha-fetoprotein. III. Role of the MHC-stimulating cell population in alpha-fetoprotein-induced suppression of T-cell-mediated cytotoxicity. J Immunol 1982; 128:1134.

PERUSSIA B, RAMONI C, ANEGON I, CUTURI MC, FAUST J, TRINCHIERI G. Preferential proliferation of natural killer cells among peripheral blood mononuclear cells cocultured with B lymphoblastoid cell lines. Nat Immunol Cell Growth Regul 1987; 6:171.

PERUSSIA B, STARR S, ABRAHAM S, FANNING V, TRINCHIERI G. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. J Immunol 1983; 131:1789.

PETROV RV, SOTNIKOVA NY, BABAKOVA LA. Lymphocyte receptors for trophoblastics beta₁-glycoproteins (TBG). Am J Reprod Immunol 1985; 7:57.

PETRUCCO OM, SEAMARK RF, HOLMES K, FORBES IJ, SYMONS RG. Changes in lymphocyte function during pregnancy. Br J Obstet Gynecol 1976; 83:245.

PETTIROSSI HA, WECHTER WJ, KOUNTZ SL. Prolongation of rat heart allografts survival by a synthetic progestagen (melengestrol acetate and ara-cytidine acylates). Transplantation 1976; 21:408.

POBER JS. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. Am J Pathol 1988; 133:426.

POBER JS, GIMBRONE MA, CUTRAN RS, REISS CS, BURAKOFF SJ, FIERS W, AULT KA. Ia expression by vascular endothelium is inducible by activated T cells and by human gIFN. J Exp Med 1983; 157:1339.

PRESENT PA, COMSTOCK GW. Tuberculin sensitivity in pregnancy. *Am Rev Resp Dis* 1975; 122:607.

PROSS H, MITCHELL H, WERKMEISTER J. The sensitivity of placental trophoblast cells to intraplacental and allogenic cytotoxic lymphocytes. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1985; 8:1.

PURTILO DT, HALLGREN HM, YUNIS EJ. Depressed maternal lymphocyte response to phytohaemagglutinin in human pregnancy. *Lancet* 1972; 1:769.

RAGHUPATHY R, BHAGIRATH S, WEGMANN TG. Fate of antipaternal H-2 antibodies bound to the placenta in vivo. *Transplantation* 1984; 37:296.

RAMILA G, ERB P. Accessory cell dependent selection of specific T cell functions. *Nature* 1983; 304:442.

RANDAZZO B, PFEFFER P, HIRSCHBERG T, HIRSCHBERG H. Opposing effects of methylprednisolone on in vitro alloantigen-induced cytotoxic and suppressor lymphocytes in man. *J Clin Lab Immunol* 1980; 4:175.

REDMAN CWG, ARENAS J, MASON DY, SARGENT IL, SUTTON L. Maternal alloimmune recognition of the fetus in human pregnancy. En: Gill TJ y Wegmann TG (Eds.), *Immunoregulation and fetal survival* 1987. Oxford University Press, New York, pp 210-229.

REDMAN CWG, McMICHAEL AJ, STIRRAT GM, SUNDERLAND CA, TING A. Class I major histocompatibility complex antigens on human extravillous trophoblast. *Immunology* 1984; 52:457.

RICHARDS RC, BEARDMORE JM, BROWN PJ, MOLLOY CM, JOHNSON PM. Epidermal growth factor receptors on isolated human placental syncytiotrophoblast plasma membrane. *Placenta* 1983; 4:133.

RINALDO CR, HO M, HAMOUDI WH, y col. Lymphocyte subsets and natural killer cell responses during cytomegalovirus mononucleosis. *Infect Immunity* 1983; 40:472.

RINEHART JJ, WEST D, ACKERMAN GA. Corticosteroid alteration of human monocyte to macrophage differentiation. *J Immunol* 1982; 129:1436.

RISK JM, JOHNSON PM. Antigen expression by human trophoblast and tumour cells: models for gene regulation?. En: Beer AE, Toder V (Eds.), *Contributions to Gynecology and Obstetrics*, vol. 14, 1985. Karger, Basel, pp 74-82.

RITSON A, BULMER JN. Endometrial granulocytes in human decidua react with a natural-killer (NK) cell marker, NKH1. *Immunology* 1987a; 62:329.

RITSON A, BULMER JN. Extraction of leucocytes from human decidua. A comparison of dispersal techniques. *J Immunol Methods* 1987b; 104:231.

ROBERT M, BETUEL H, REVILLARD JP. Inhibition of the mixed lymphocyte reaction by sera from multipara. *Tissue antigens* 1973; 3:39.

ROLFE BE, CAVANAGH AC, QUINN KA, MORTON H. Early pregnancy factor-A suppressor releasing hormone. *Am J Reprod Immunol* 1985; 7:63.

ROOZEMOND RC, MEVISSSEN M, URLI DC, BONAVIDA B. Effect of altered membrane structure on NK cell-mediated cytotoxicity. III. Decreased susceptibility to natural killer cytotoxic factor (NKCF) release by membrane rigidification. *J Immunol* 1987; 139:1739.

SAJI F, KOYAMA M, KAMEDA T, NEGORO T, NAKAMURO K, TANIZAWA O. Effect of a soluble factor secreted from cultured human trophoblast cells on *in vitro* lymphocyte reaction. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987; 13:121.

SAYERS TJ, WILTROUT TA, BULL CA. effect of cytokines on

polimorphonuclear neutrophil infiltration in the mouse. Prostaglandin and leukotriene independent induction of infiltration by IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1988; 141:1670.

SCHAFER DF, PISKAC A, KENNEDY K, EISENACH J, BENNION J, BROWN G, DUNKER K, FREEMAN S, HAERR C. Decreased levels of T helper cells in pregnancy. *N Engl J Med* 1982; 307:1582.

SCHREIBER AB, SCHLESSINGER J, EDIDIN M. Interaction between major histocompatibility complex antigens and epidermal growth factor receptors on human cells. *J Cell Biol* 1984; 98:725.

SCHREIDER AD. Clinical immunology of the corticosteroids. *Prog Clin Immunol* 1977; 3:103.

SEARLE RF, JENKINSON EJ, JOHNSON MH. Immunogenicity of the mouse trophoblast and embryonic sac. *Nature* 1975; 255:199.

SEARLE RF, MATTHEWS CJ. Differential expression of class II major histocompatibility complex and Thy 1.2 antigens on mouse decidua. *Placenta* 1988, 9:57.

SHALNEV BI, SUSKOVA VS, GOTSIRIDZE OA. Effect of the chorionic gonadotrophin on immune response. *Am J Reprod Immunol* 1985; 7:62.

SHIMIZU Y, DeMARS R. Demonstration by class I gene transfer that reduced susceptibility of human cells to natural killer cell-mediated lysis is inversely correlated with HLA class I antigen expression. *Eur J Immunol* 1989; 19:447.

SIEFF CA, NIEMEYER CM, MENTZER SJ, FALLER DV. Interleukin-1, Tumor Necrosis Factor, and the production of Colony-Stimulating factors by cultured mesenchymal cells. *Blood* 1988; 72:1316.

SIMMONS RL, PRICE AL, OZERKIS AJ. The immunologic problems of pregnancy. V. The effect of estrogen and progesterone on allograft survival. *Am J Obstet Gynecol* 1968; 100:908.

SLAPSYS RM, YOUNGLAI E, CLARK DA. A novel suppressor cell develops in uterine decidua in response to fetal trophoblast-type cells. *Reg Immunol* 1988; 1:182.

SMART YC, COX J, ROBERTS TK, BRINSMEAD MW, BURTON RC. Differential effect of cigarette smoking on recirculating T lymphocyte subsets in pregnant women. *J Immunol* 1986; 137:1.

SMITH SK, KELLY RW. The release of PGF_{2a} and PGE₂ from separated cells of human endometrium and decidua. *Prostagland Leuk Essent Fatty Acids* 1988, 33:91.

SNELL y col. *Histocompatibility Academy press*, 1976.

SOUBIRAN P, ZAPITELLI JP, SCHAFFAR L. IL2-like material is present in human placenta and amnion. *J Reprod Immunol* 1987; 12:225.

SRIDAMA V, PACINI F, YANG SL, MOAWAD A, REILLY M, DeGROOT LJ. Decreased levels of T helper T cells. A possible cause of immunodeficiency in pregnancy. *N Engl J Med* 1982; 307:352.

SRIDAMA V, PACINI F, YANG SL, MOAWAD A, REILLY M, DeGROOT LJ. T-cell subsets in patients with pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 147:566.

STAMPER HB, WOODRUFF JL. Lymphocyte homing into lymph nodes: in vitro demonstration of the selective affinity of recirculating lymphocytes for high endothelial venules. *J Exp Med* 1976; 144:828.

STANKOVA J, PLESZCZYNSKI RM. Suppressor cells in the human maternal-

fetal relationship. *J Reprod Immunol* 1984; 6:49.

STARKEY PM, SARGENT IL, REDMAN WG. Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. *Immunology* 1988; 65:129.

STEIN-WERBLOWSKY R. On the retention of the fetus as a homograft. *Am J Reprod Immunol* 1981; 1:180.

STERN PL, BERESFORD N, THOMPSON S, JOHNSON PM, WEBB P, HOLE N. Characterization of the human trophoblast-leukocyte antigenic molecules defined by a monoclonal antibody. *J Immunol* 1986; 137:1604.

STEWART I. A morphological study of granulated metrial gland cells and trophoblast cells in the labyrinthine placenta of the mouse. *J Anat* 1984; 139:627.

STEWART I, MUKHTAR DDY. The killing of mouse trophoblast cells by granulated metrial gland cell in vitro. *Placenta* 1988; 9:417.

STEWART I, PEEL S. Granulated metrial gland cells at implantation sites of the pregnant mouse uterus. *Anat Embryol* 1980; 160:227.

STIMSON WH. Studies on the immunosuppressive properties of a pregnancy-associated alpha-macroglobulin. *Clin Exp Immunol* 1976; 25:199.

STIMSON WH. Pregnancy-associated alpha₂-glycoprotein, pregnancy-specific beta₁-glycoprotein and pregnancy-associated plasma proteins A and B. *Biol Reprod* 1978; 31: 225.

STIMSON WH. The influence of pregnancy-associated serum proteins and steroids on the maternal immune response. En: Wegmann TG, Gill TJ III (Eds.), *Immunology of reproduction* 1983. Oxford Univ Press, New York, pp 281-301.

STIMSON WH, HUNTER IC. An investigation into the immunosuppressive properties of estrogen. *J Endocrinol* 1976; 69:42.

STIMSON WH, McADAM A, HUTCHINSON RS. An assay for antigen-antibody complexes in human sera using C1q-enzyme conjugates. *J Clin Lab Immunol* 1981; 5:129.

STIMSON WH, STRACHAN AF, SHEPHERD A. Studies on the maternal immune response to placental antigens: absence of a blocking factor from the blood of abortion prone women. *Br J Obstet Gynecol* 1979; 86:41.

SYITES DP, SIITERI PK. Steroids as immunosuppressants in pregnancy. *Immunol Rev* 1983; 75:117.

STRAUBE W, KLAUSCH B, HOFMAN R, JENSEN HL, GUNTHER J, KOHLER H. Immunochemical investigations on the protein of the "pregnancy zone". *Arch Gynecol* 1975; 218:313.

STREETER PR, BERG EL, ROUSE BTN, BARGATZE RF, BUTCHER EC. A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature* 1988; 331:41.

SUNDERLAND CA, NAIMEN M, MASON DY, REDMAN CWG, STIRRAT GM. The expression of MHC antigens by human chorionic villi. *J Reprod Immunol* 1981; 3:323.

SUTTON L, MASON DY, REDMAN WG. HLA-DR positive cells in the human placenta. *Immunology* 1983; 29:103.

SUTTON L, GADD W, MASON DY, REDMAN WG. Cells bearing class II MHC in the human placenta and amniochorion. *Immunology* 1986; 58:23.

SWARUP G, COHEN S, GARBERS DL. Selective dephosphorylation of proteins containing phosphotyrosine by alkaline phosphatases. *J Biol Chem* 1981; 256:8197.

SZEKERES-BARTHO J, FALKAY G, CSERNUS V, TOROK A, PACSA AS. Progesterone-treated lymphocytes release a substance inhibiting cytotoxicity and prostaglandin synthesis. *Am J Reprod Immunol* 1985; 7:62.

SZEKERES-BARTHO J, KILAR F, FALKAY G, y col. The mechanism of the inhibitory effect of progesterone lymphocyte cytotoxicity. I. Progesterone-treated lymphocytes release a substance inhibiting cytotoxicity and prostaglandin synthesis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1985; 9:15.

SZEKERES-BARTHO J, NEMETH A, VARGA P, CSERNUS V, KOSZEGI T, PAAL M. Membrane fluidity of trophoblast cells and susceptibility to natural cytotoxicity. *Am J Reprod Immunol* 1989; 19:92.

TALLON DF, ARACH CORCORAN DJ, O'DWYER EM, GREALLY JF. Circulating lymphocyte subpopulations in pregnancy: a longitudinal study. *J Immunol* 1984; 132:1784.

TAYLOR C, FAULK WP. Prevention of recurrent abortion with leucocyte transfusions. *Lancet* 1981; 2:68.

THONG YH, RUSSELL BS, STEELE W, VINCENT MM, HENSEN SA, BELLANTI JA. Impaired in vitro cell-mediated immunity to rubella virus during pregnancy. *New Engl J Med* 1973; 289: 604.

THORENS B, MERMOD JJ, VASSALLI P. Phagocytosis and inflammatory stimuli induce GM-CSF mRNA in macrophages through postranscriptional regulation. *Cell* 1987; 48:671.

TONGIO MM, MAYER S, LEBEC A. Transfer of HLA antibodies from the mother to the child. *Transplantation* 1975; 20:163.

TRINCHIERI G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989; 47:189.

TRINCHIERI G, GRANATO D, PERUSSIA B. Interferon-induced resistance of fibroblast to cytolysis mediated by natural killer cells: specificity and mechanism. *J Immunol* 1981; 126:335.

TRINCHIERI G, PERUSSIA B. Human natural killer cells: biologic and pathologic aspects. *Lab Invest* 1984; 50:489.

TRINCHIERI G, SANTOLI D. Antiviral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Enhancement of human natural killer cell activity by interferon and antagonistic inhibition of susceptibility of target cells to lysis. *J Exp Med* 1978; 147:1314.

UNANUE ER. Antigen-presenting function of the macrophage. *Ann Rev Immunol* 1984; 2:395.

VALDIMARSSON H, MULHOLLAND C, FRIDRIKSDOTTIR V, COLEMAN DV. A longitudinal study of leucocyte blood counts and lymphocyte responses in pregnancy: A marked early increased of monocyte-lymphocyte ratio. *Clin Exp Immunol* 1983; 53:437.

VANDERBEEKEN Y, Vlieghe MP, DELEPESSE G, DUCHETEAU J. Characterization of immunoregulatory T cells during pregnancy by monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol* 1982; 48:118.

VANDERBEEKEN Y, Vlieghe MP, DUCHETEAU J, DELEPESSE G. Suppressor T lymphocytes in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1984; 5:20.

VIRAG I, SCHECTER E, ELGAT M, ZAKUT H, MEYTES D. Lymphocyte subsets in habitual abortion. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1986; 12:7.

VLADIMIRSKY F, CHEN L, AMSTERDAN A, ZOR U, LINDNER HR. Differentiation of decidual cells in cultured of rat endometrium. *J Reprod Fertil* 1977; 49:61.

VOLKOVA LS, MAYSKY IN. Immunological interaction between mother and embryo. En: Edwards RG (Ed.), *Immunology and reproduction* 1969. International Planned Parenthood Federation, London, pp 211-250.

WANG MY, RIDER V, HEAP RB, FEINSTEIN A. Action of antiprogestosterone monoclonal antibody in blocking pregnancy after postcoital administration in mice. *J Endocrinol* 1984; 101:95.

WATTANASAK K, MATANGKASOMBUT P. Specific human maternal lymphocyte cytotoxic effects on cord blood lymphocytes. En: Branatov K (Ed), *Immunology of Reproduction. Proceedings of 3rd International Symposium*, Bul. Acad Sci, Sofia. pp.862-866.

WEGMANN TG. Placental immunotropism: maternal T cells enhance placental growth and function. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987; 15:67.

WEGMANN TG. Maternal T cells promote placental trophoblast growth and prevent spontaneous abortion. *Immunol Lett* 1988, 17:297.

WEGMANN TG, GILL TJ III (Eds.), *Immunology of reproduction* 1983. Oxford Univ Press, New York.

WEGMANN TG, MOSSMAN TR, CARLSON G, OLINGK O, SINGH B. The ability of the murine placenta to absorb monoclonal anti-fetal H-2k antibody from the maternal circulation. *J Immunol* 1979b; 122:270.

WEGMANN TG, SINGH B, CARLSON GA. Allogenic placenta is a paternal

strain immunoabsorbent. *J Immunol* 1979a; 122:270.

WELLS M, HSI BL, FAULK WP. The expression of class I antigens of the major histocompatibility complex on cytotrophoblast of the human placental basal plate. *Am J Reprod Immunol* 1984; 6:167.

WELSH RM, KARE K, HANSSON M, KUNKEL LA, KIESSLING RW. Interferon-mediated protection of normal and tumor target cells against lysis by mouse natural killer cells. *J Immunol* 1981; 126:219.

WILD AE. Placental antibody transport and immune protection: their cellular mechanisms. En: Beaconsfield P, Villee C (Eds), *Placenta: a neglected experimental animal* 1979. Pergamon, London, pp 306-315.

WILSON BS, INDIVERI F, PELLEGRINO MA, FERRORE S. Production and characterization of DR xenoantisera: use for detection of serum DR-antigens. *J Immunol* 1979; 122:1967.

WOOD GW. Mononuclear phagocytes in the human placenta. *Placenta* 1980; 1:113.

YANG SY, MORISHIMA NH, COLLINS T, ALTON MS, POLLACK E, YUNIS J, DUPONT B. Comparison of one-dimensional IEF patterns for serologically detectable HLA-A and B allotypes. *Immunogenetics* 1984; 19:217.

ZUCALI JR, DINARELL CA, OBLON DA, GROSS MA, ANDERSON L, WEINER RS. Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony stimulating activity and prostaglandin E₂. *J Clin Invest* 1986; 77:1857.

ZUCKERMANN FA, HEAD JR. Murine trophoblast resists cell-mediated lysis. I. Resistance to allospecific cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1987; 139:2856.

ZUCKERMANN FA, HEAD JR. Murine trophoblast resists cell-mediated lysis.
II. Resistance to natural cell-mediated cytotoxicity. *Cell Immunol*
1988; 116:274.