



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica  
Sezione di Medicina Interna

Settore Scientifico-Disciplinare MED 46

Dottorato di Ricerca in Scienze Cliniche  
Scuola di dottorato in Medicina Clinica e Sperimentale  
XXVII Ciclo

Tesi sperimentale

**“Ruolo dei linfociti T helper CD4+ Th17 nella  
gravidanza”**

**Dottoranda**

Dott.ssa Ornella Kullolli

**Tutor**

Prof.ssa Marie-Pierre Piccinni

**Coordinatore**

Prof. Francesco Annunziato

Anni 2012/2015

# INDICE

<b>Introduzione .....</b>	
1. Le risposte immunitarie adattative .....	
1.1. Presentazione dell'antigene ai linfociti T.....	
1.2. I linfociti T .....	
1.3. Meccanismi effettori dei linfociti T (citotossicità e produzione di citochine) .....	
1.4. Differenziazione dei linfociti T helper CD4+ in cellule effettrici Th1, Th2 e Th17 .....	
1.4.1. Linfociti Th1 .....	
1.4.2. Linfociti Th2 .....	
1.4.3. Linfociti Th17 .....	
1.5. Tolleranza e rigetto acuto nel trapianto d'organo .....	
2. Ruolo del sistema immunitario nella gravidanza.....	
2.1. Il feto è un semi-allotrapianto .....	
2.2. Placenta e trofoblasto .....	
2.3. Molecole HLA di classe I espresse sulle cellule del trofoblasto .....	
2.4. La presenza di cellule immunitarie all'interfaccia materno-fetale e il loro ruolo nel successo/ fallimento della gravidanza .....	
2.4.1. Cellule Natural Killer Uterine .....	
2.4.2. Macrofagi e cellule dendritiche uterini .....	
2.4.3. Ruolo dei linfociti T deciduali .....	
- Linfociti T regolatori (Treg) nella gravidanza .....	
- Linfociti CD4+ Th1 e Th2 nella gravidanza .....	
- Linfociti CD4+ Th17 nella gravidanza .....	
<b>Scopo della tesi .....</b>	

## **Materiali e Metodi .....**

1. Reagenti .....
2. I Soggetti .....
3. Purificazione delle cellule T CD4+ del sangue periferico e della decidua ottenute da donne con gravidanza normale .....
4. Citometria a flusso .....
5. Generazione di cloni T CD4+ da biopsie deciduali di gravidanza normale, e di aborto spontaneo ricorrente, e da biopsia tubarica da gravidanza ectopica .....
6. Induzione della produzione di citochine dai cloni di cellule T .....
7. Determinazione delle concentrazioni di citochine nei supernatanti con bead-based multiplex immunoassays .....
8. Produzione e espressione di mRNA per citochine nelle linee cellulari T specifiche per l'antigene in assenza o presenza di HLA-G5 .....
9. Quantificazione del mRNA con real-time quantitativa RT-PCR di IL-4, IL-17A, IL-17F, IL-23R, IFN- $\gamma$ , ROR-C e GATA-3 .....
10. Analisi statistiche .....

## **Risultati .....**

1. Produzione associata di IL-4 e IL-17A da parte dei linfociti T CD3+ CD4+ della decidua di donne con gravidanza normale .....
2. Espressione delle molecole di tipo Th2 e Th17 dalle cellule T CD3+ CD4+ deciduali nella gravidanza normale .....
3. Aumento della produzione di IL-4, IL-17A, IL-17F e IL-22 da parte dei cloni di cellule T deciduali nella gravidanza normale .....
4. Prevalenza di cellule CD4+ Th17/Th2 nella decidua di gravidanza normale mentre le cellule Th17 e Th17/Th1 sono prevalenti nella decidua di aborto spontaneo ricorrente inspiegato .....
5. Le cellule T CD4+ Th17/Th2 sono esclusivamente presenti al sito dell'impianto nella gravidanza ectopica .....
6. HLA-G5 media lo sviluppo delle cellule Th17/Th2 tramite l'aumento

della produzione i IL-4 e IL-17A dalle cellule T helper CD4+ .....

**Discussione** .....

**Bibliografia** .....

## **ABBREVIAZIONI**

**APC** antigen presenting cell

**IL** interleukin

**HLA** human leucocyte antigen

**IFN** interferone

**M-CSF** macrophage-colony stimulating factor

**MHC** major histocompatibility complex (complesso maggiore d'istocompatibilità)

**LIF** leukemia inhibitory factor

**TNF** tumor necrosis factor (fattore di necrosi tumorale)

**Th** linfociti T helper

**CMN** cellule mononucleate del sangue periferico

**NK** cellule natural killer

**Ac** anticorpi

**Ig** immunoglobuline

**Ag** antigeni

**TCR** T cell receptor

**CD** cluster of defferentiation

**CTL** linfociti T citotossici

## INTRODUZIONE

### **1. Le risposte immunitarie adattative**

Il sistema immunitario è costituito da cellule e molecole in grado di rispondere in maniera coordinata e specifica a milioni di sostanze estranee all'organismo, chiamate genericamente antigeni, e riesce a riconoscere in modo altamente specifico fra milioni di essi, diversi anche solo per minime variazioni della loro composizione.

I meccanismi attraverso i quali questo sistema agisce costituiscono la cosiddetta risposta immunitaria. Il sistema immunitario partecipa inoltre alla regolazione della crescita e della differenziazione di certi tipi cellulari, fornisce una sorveglianza contro i tumori e scatena reazioni che portano al rigetto dei trapianti di organi non compatibili.

Il sistema immunitario ha la capacità di “ricordare” le molecole con cui è entrato in contatto in modo da rispondere più velocemente e in maniera più efficace ad una successiva esposizione alla stessa sostanza, tutto questo viene definita come memoria immunologica. Un sistema immunitario sano e correttamente funzionante ha la capacità di discriminare tra molecole proprie dell'organismo (*self*) e molecole estranee (*non-self*). Solitamente l'organismo è tollerante verso i propri antigeni (*self*) perché i linfociti che li riconoscono vengono eliminati per apoptosi o inattivati, oppure indotti a cambiare specificità. Se i meccanismi di tolleranza vengono meno si sviluppano risposte immunitarie verso antigeni autologhi, fenomeno noto come autoimmunità.

Le modalità di azione nell'attuare la difesa contro molecole estranee sono generalmente suddivise in base alle loro caratteristiche e ai meccanismi d'azione coinvolti, in due grandi categorie: immunità innata e immunità specifica o acquisita. L'immunità innata rappresenta la prima linea di difesa dell'organismo contro le infezioni ed è costituita da cellule e molecole preesistenti all'incontro con il patogeno. Questo tipo di immunità garantisce una risposta rapida verso microbi invasori e verso cellule *self* infettate, danneggiate o morte e ha la caratteristica di reagire in maniera sostanzialmente identica ad infezioni ripetute riconoscendo strutture comuni a più patogeni. I principali componenti dell'immunità innata sono rappresentati dalle barriere naturali, come gli epitelii, monociti/macrofagi, e da altre

cellule ad azione citotossica (cellule Natural Killer), dalle proteine del complemento e delle citochine, importanti proteine ad azione pleiotropica che svolgono numerosi funzioni tra cui regolare e coordinare varie attività dell'immunità innata.

L'immunità acquisita (o specifica), è indotta dal patogeno e a differenza di quella innata, è altamente specifica verso determinati antigeni ed è in grado di distinguere anche tra microbi e molecole strettamente correlate. Inoltre ha la peculiarità di rispondere più efficientemente e in maniera più vigorosa ad esposizioni ripetute ad uno stesso antigene grazie ad una memoria immunologica che si instaura nell'organismo. I principali componenti dell'immunità specifica sono i linfociti T e B e gli anticorpi. In base al meccanismo d'azione coinvolto, l'immunità specifica viene generalmente suddivisa in immunità umorale e immunità cellulo-mediata. L'immunità umorale è mediata dagli anticorpi (o immunoglobuline), sono molecole circolanti di natura proteica prodotte dai linfociti B. Gli anticorpi riconoscono e legano specifici antigeni microbici o tossine neutralizzandoli e favorendone l'eliminazione. L'immunità cellulare, invece, è mediata dall'azione dei linfociti T che, producendo citochine e attivando così i fagociti, permettono di eliminare le cellule infettate e i microbi presenti all'interno dei fagociti stessi e che quindi non sono accessibili agli anticorpi circolanti (Abbas A, *et al.*, Settima edizione).

In questa introduzione ci focalizzeremo sulle risposte dell'immunità acquisita mediate dai linfociti T, sul differenziamento dei linfociti T CD4<sup>+</sup> e sul ruolo dei linfociti T nella riproduzione (gravidanza).

### **1.1. Presentazione dell'antigene ai linfociti T**

I linfociti T  $\alpha\beta$  non sono in grado di riconoscere antigeni solubili e isolati, ma legano soltanto peptidi antigenici associati alle molecole MHC dell'ospite. La risposta immunitaria cellulo-mediata quindi necessita, oltre che di cellule effettrici (i linfociti), anche di cellule accessorie il cui ruolo principale è quello di presentare l'antigene sulla loro superficie cellulare, in associazione a molecole autologhe del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), ai linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Al contrario, i linfociti T  $\gamma\delta$  riconoscono gli antigeni direttamente, grazie alla molecola CD1 senza bisogno di una loro processazione. Le cellule accessorie specializzate nella presentazione dell'Ag sono dette cellule presentanti l'antigene (APC) ed

esprimono le molecole MHC necessarie per il riconoscimento dell'antigene da parte del recettore per l'antigene (TCR). Le cellule presentanti l'antigene (APC), rappresentate dalle cellule dendritiche, dai macrofagi, monociti, cellule di Langherans della cute, e linfociti B, interagiscono con i linfociti T *naive* durante la fase di riconoscimento dell'Ag delle risposte immunitarie e con le cellule differenziate durante la fase effettrice. La funzione delle APC è quindi di presentare l'antigene, il cui legame con il TCR non è però sufficiente per attivare i linfociti T e quindi necessita l'intervento del CD3 e della catena  $\zeta$  (zeta) di molecole autologhe codificate dai geni MHC. Le molecole MHC si suddividono in due distinti gruppi chiamati classe I e classe II. I complessi peptide-molecola MHC di classe I vengono riconosciuti dai linfociti T  $CD8^+$  mentre i complessi peptide-molecola MHC di classe II sono riconosciuti dai linfociti T  $CD4^+$ . Le APC oltre ad esporre i complessi MHC-peptide riconosciuti dal TCR, forniscono anche delle molecole costimolatorie necessarie per la completa attivazione linfocitaria. Le APC attivate infatti esprimono le molecole CD80 e CD86 che interagiscono con il CD28 sul linfocita T trasmettendo il segnale di trasduzione. Inoltre le APC sono in grado di secernere citochine che determinano la polarizzazione dei linfociti T helper verso Th1, Th2, Th0 o Th17.

## 1.2. I linfociti T

I linfociti T sono le cellule effettrici della risposta immunitaria cellulo-mediata, e come le altre cellule del sistema immunitario, derivano da precursori che si originano a partire dalle cellule staminali ematopoietiche del midollo osseo. Nel midollo osseo i precursori dei linfociti T originano da un progenitore linfoide comune ed in seguito raggiungono la zona corticale del timo per diventare cellule T immunocompetenti (linfociti T maturi) che hanno acquisito durante la maturazione un T Cell Receptor (TCR) funzionale ( $\alpha/\beta$  o  $\gamma/\delta$ ) e l'espressione di CD4 o CD8 sulla membrana ( $CD4^+ CD8^-$  per i linfociti T  $\alpha/\beta$  e  $CD4^- CD8^+$  per i linfociti T  $\gamma/\delta$ ). Durante la maturazione nella midollare del timo vengono anche eliminati per apoptosi i linfociti T che hanno un'elevata affinità per gli antigeni del *self* presentati dalle cellule epiteliali timiche, questo processo si chiama “*selezione negativa*”. Con “*selezione positiva*” invece, si selezionano i linfociti T maturi, che non hanno un'alta affinità per gli antigeni *self* e che entreranno in circolo

e negli organi linfoidi secondari. Durante il processo di maturazione le cellule T acquisiscono dunque un recettore per l'antigene senza avere mai incontrato l'antigene per cui sono specifiche e successivamente si differenziano in cellule T CD4<sup>+</sup> (cellule T Helper, Th) o in cellule T CD8<sup>+</sup> (cellule T citotossiche, CTL).

L'immunità cellulare dipende dall'interazione specifica tra le cellule T e l'antigene per il quale il linfocita T ha una stretta specificità. L'antigene è rappresentato da ogni sostanza che si può legare specificamente al TCR dei linfociti T. Le cellule T infatti riconoscono, in virtù del TCR, antigeni peptidici associati a proteine codificate dai geni del MHC ed espresse sulla superficie delle cellule dell'ospite e non sono in grado di riconoscere antigeni solubili.

I linfociti T che non hanno mai incontrato l'antigene verso cui sono specifici sono detti *naive* (o vergini). I linfociti T attivati, dopo l'incontro con l'antigene presentato dalle cellule presentanti l'antigene (APC) in associazione con le molecole del MHC, diventano linfociti T effettori in grado di produrre citochine se sono cellule T CD4<sup>+</sup> o di espletare un'attività citotossica se sono cellule CD8<sup>+</sup>.

Oltre al TCR i linfociti T esprimono altre molecole di superficie, il CD4 (sulle cellule T helper) o il CD8 (sulle CTL) nel complesso recettoriale che inducano nella trasduzione del segnale. Il 65% dei linfociti circolanti è CD4<sup>+</sup>, mentre il 35% è CD8<sup>+</sup>. I linfociti T citotossici riconoscono gli antigeni in associazione a molecole MHC di classe I (riconoscimento ristretto per classe I), vengono attivati e uccidono le cellule infettate, che presentano antigeni virali o di batteri intracellulari, e le cellule che esprimono antigeni tumorali. I linfociti T CD4<sup>+</sup>, invece, riconoscono antigeni presentati in associazione a molecole MHC di classe II (riconoscimento ristretto per classe II) e secernono citochine che stimolano la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T stessi e dei linfociti B e l'attivazione dei macrofagi. I linfociti T helper CD4<sup>+</sup> si suddividono in più popolazioni (Th1, Th2, Th0, Th17...) sulla base di citochine da essi prodotte.

Le citochine sono una classe eterogenea di glicoproteine secretorie prodotte dalle cellule del Sistema Immunitario che si comportano da mediatori verso cellule bersaglio esprimenti recettori specifici per le citochine. Sono molecole prodotte essenzialmente durante la fase di attivazione e durante la fase effettrice sia dell'immunità naturale che di quella specifica. Inducono la crescita e il differenziamento dei linfociti e altri tipi cellulari (cellule ematopoietiche) e

l'attivazione di diversi tipi cellulari durante la fase effettrice. I recettori per le citochine legano nella porzione extracellulare la citochina per la quale sono specifici, mentre la porzione citoplasmatica è deputata all'innesco della cascata di trasduzione del segnale. La via di trasduzione meglio definita è quella che attiva, mediante il legame citochina-recettore, le tirosin-chinasi dette Janus (Janus Kinase, JAK), con conseguente attivazione dei fattori di trascrizione STAT (Signal Transducers and activators of transcription).

Un altro tipo di linfociti T, detti linfociti T regolatori (Treg), svolge principalmente la funzione di inibire le risposte immunitarie. I linfociti T regolatori sono una sottopopolazione dei linfociti T CD4<sup>+</sup> il cui ruolo è quello di sopprimere le risposte immunitarie contro antigeni estranei (inducendo l'omeostasi) e mantenere la tolleranza periferica al *self*, in particolare inibendo la proliferazione dei linfociti T effettori specifici per gli antigeni del *self*.

La tolleranza periferica si instaura nei tessuti periferici quando i linfociti maturi che riconoscono antigeni autologhi non sono stati eliminati dalla selezione negativa negli organi linfoidi primari (Timo) della "tolleranza centrale". I linfociti maturi che riconoscono antigeni *self* vanno in apoptosi o vengono inibiti dai linfociti T regolatori tramite l'azione di citochine soppressive, come il TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-4 (Abbas A, *et al.*, Settima edizione). La maggior parte di queste cellule con funzione regolatoria esprime elevati livelli della molecola CD25 (catena  $\alpha$  del recettore per l'IL-2) e il fattore trascrizionale FoxP3. Le CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> mostrano un'attività soppressiva mediata dall'interazione cellula-cellula. Questa azione immunosoppressiva si realizza mediante un contatto diretto cellula-cellula grazie all'intervento della molecola di membrana CTLA-4 inducendo le cellule T ad entrare in uno stato di anergia funzionale, all'intervento del TGF- $\beta$  che impedisce l'espressione della catena  $\alpha$  del recettore dell'IL-2, e all'intervento di IL-10 e TGF-1 $\beta$  che attivano il fattore trascrizionale Foxp3 che impedisce l'interazione tra i fattori di trascrizione AP-1 e NFAT sul promotore del gene che codifica per IL-2, inibendo la sintesi di IL-2 da parte delle cellule T attivate, e dunque la proliferazione cellulare dei linfociti T. Quindi la tolleranza dei linfociti T regolatori si esplica in gran parte mediante la secrezione di IL-10/IL-4, che inibisce l'attività dei macrofagi e delle cellule dendritiche, i due principali componenti delle cellule APC, nonché la secrezione di TGF- $\beta$  che tende ad inibire la risposta dei linfociti e dei macrofagi.

### **1.3. Meccanismi effettori dei linfociti T (citotossicità e produzione di citochine)**

Il sistema T dispone di due meccanismi effettori: la citotossicità diretta e la produzione di citochine.

I linfociti T effettori o della memoria devono incontrare una APC che presenti lo stesso antigene che li ha attivati. Poiché le infezioni possono trovarsi in qualsiasi tessuto i linfociti T devono poter migrare dal sangue nel tessuto dove è presente il focolaio di infezione. Tale migrazione è stimolata dalle citochine prodotte inizialmente dai macrofagi e dalle cellule endoteliali e, in seguito, dai linfociti T attivati dall'antigene. Questo comporta il legame stabile tra l'endotelio e i linfociti T e la conseguente migrazione nel tessuto interessato. Nel tessuto i linfociti incontrano l'antigene presentato dalle APC.

Le cellule effettrici  $CD4^+$  Th1, attivate dal complesso antigene-molecola MHC di classe II, attivano i macrofagi tramite  $IFN-\gamma$  e il CD40. Vengono così attivati nei macrofagi i fattori di trascrizione con l'aumento dei prodotti effettori come gli enzimi lisosomiali, l'ossido nitrico e intermedi reattivi dell'ossigeno. Essi producono alcune citochine come il  $TNF-\alpha$ . I macrofagi rimuovono anche le parti tissutali danneggiate facilitando la riparazione. I macrofagi attivati, oltre ad esplicare le funzioni effettrici diventano più efficienti nella presentazione dell'antigene.

Le cellule effettrici  $CD4^+$  Th2 sopprimono l'attivazione macrofagica, data dalle cellule Th1, mediante la secrezione di citochine quali IL-4 che antagonizza l'azione dell' $IFN-\gamma$ . Le cellule Th2 producono anche IL-10 che inibisce anch'essa i macrofagi. La risposta Th2 si sviluppa nelle fasi tardive della risposta cellulomediata. Le cellule Th2 possono anche indurre reazioni infiammatorie mediate da granulociti eosinofili e mastociti. Tali cellule sono attive nella distruzione di parassiti chiamati elminti, che vengono eliminati da parte dei granuli secreti dai granulociti eosinofili e dai mastociti in seguito a stimolazione da parte di IL-4 e IL-5 prodotte dai linfociti Th2.

La cellula Th17 che produce IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-21 e IL-26 è indotta dalla produzione da parte delle cellule dendritiche di IL-23 e IL-6. La principale funzione effettrice dei linfociti Th17 è quella di indurre l'infiammazione neutrofilica, che serve a eliminare batteri e funghi. Le cellule Th17 giocano un ruolo importante anche nell'insorgenza di malattie autoimmuni nel topo (Artrite Reumatoide, Lupus

Eritematosa Sistemica, Encefalite Sperimentale Autoimmune equivalente alla Sclerosi Multipla) e nell'inflammazione.

Le cellule effettrici CD8<sup>+</sup> ristrette per l'MHC di classe I, attivate dal legame con la cellula infettata, rilasciano granuli citoplasmatici sulla superficie della cellula bersaglio. Tali granuli contengono diverse categorie di proteine, chiamate citotossine, che comprendono: le perforine, che polimerizzano generando pori sulla cellula bersaglio, evento che può determinare la lisi osmotica della cellula per l'ingresso di acqua, oppure l'innesco dell'apoptosi per l'entrata di calcio nella cellula; i granzimi che sono delle serino-proteasi, che agiscono sulle caspasi e iniziano la cascata apoptotica. L'induzione dell'apoptosi, da parte dei CD8<sup>+</sup>, può derivare anche dal legame tra Fas ligando (sulla membrana dei CTL) e il suo recettore (espresso sulla superficie di molti tipi cellulari), che porta all'attivazione della cascata caspasi. Dopo l'azione citolitica il CTL, per una diminuita affinità delle molecole accessorie e prima che la cellula bersaglio muoia, si dissocia dalla cellula infettata. I linfociti CD8<sup>+</sup> attivati secernono citochine quali l'IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ .

#### **1.4. Differenziazione dei linfociti T helper CD4<sup>+</sup> in cellule effettrici Th1, Th2 e Th17**

I linfociti T CD4 helper sono i linfociti T ristretti per le molecole MHC di classe II. La classificazione dei linfociti T CD4<sup>+</sup> in varie sottopopolazioni viene fatta sulla base del profilo di citochine da essi prodotte (Mosmann TR, *et al.*,1989; Romagnani S, 1991). Le varie sottopopolazioni cellulari, infatti, sono caratterizzate dalla secrezione di citochine, per l'espressione di specifici fattori trascrizionali, per le modificazioni epigenetiche che si trovano in corrispondenza dei geni che codificano per le varie citochine e per l'espressione di molecole di adesione e recettori chemochinici importanti per il reclutamento delle cellule verso determinati tessuti. Le citochine che caratterizzano questi tre tipi di linfociti T CD4<sup>+</sup> sono: l'IFN- $\gamma$  per i linfociti Th1; l'IL-4, l'IL-5 e l'IL-13 per i Th2; l'IL-17A, IL-17F e l'IL-22 per i Th17. Queste citochine sono responsabili sia delle funzioni effettrici sia del ruolo patogenetico delle rispettive sottopopolazioni e partecipano inoltre al loro sviluppo e all'espansione.

### 1.4.1. Linfociti Th1

Nell'uomo i linfociti T helper  $CD4^+$  di tipo 1 (Th1) producono principalmente interleuchina 2 (IL-2), fattore di necrosi tumorale- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) (o linfotossina) e interferone  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e rappresentano i principali effettori della risposta immunitaria mediata dai fagociti che è altamente protettiva verso infezioni sostenute da parassiti intracellulari (Mosmann TR, *et al.*, 1989; Romagnani S, 1991). Il ruolo principale dei linfociti Th1 è quindi quello di attivare i macrofagi affinché fagocitino ed eliminino i microrganismi invasori.

La differenziazione dei linfociti T  $CD4^+$  in cellule effettrici Th1 dipende principalmente dalle citochine IL-12, IL-18 e IFN- $\alpha$  prodotte dalle APC e avviene in risposta a batteri intracellulari e che infettano le cellule dendritiche e i macrofagi. IL-12, IL-18 e IFN- $\alpha$  attivano i fattori trascrizionali T-bet, STAT-1 e STAT-4 che portano all'espressione di un profilo citochinico di tipo Th1. Dopo il riconoscimento dell'antigene l'attivazione del fattore trascrizionale STAT1 che attiva T-bet a sua volta attiva la produzione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule Th1. Quindi le cellule Th1 così differenziate iniziano a produrre IFN- $\gamma$  che promuove un'ulteriore polarizzazione in senso Th1 determinando una potente amplificazione della reazione. Inoltre, l'IFN- $\gamma$  inibisce il differenziamento in senso Th2 e Th17, favorendo così la polarizzazione della risposta immunitaria verso un'unica direzione.

Oltre che dalle citochine presenti nel microambiente durante le fasi precoci della risposta immunitaria, la polarizzazione dei linfociti T  $CD4^+$  *naive* può essere influenzata anche da alcuni ormoni. Infatti, la relaxina, ormone polipeptidico prodotto in maniera predominante dal corpo luteo e dalla decidua durante la gravidanza, è un induttore della differenziazione verso Th1, favorendo lo sviluppo di cellule secernenti IFN- $\gamma$ , mentre non ha nessun effetto sulla produzione di IL-4 (Piccinni MP, *et al.*, 1999). Il 17 $\beta$ -estradiolo e la gonadotropina corionica umana (hCG) invece non sembrano avere alcun effetto sulla differenziazione delle cellule T in senso Th1 o Th2 (Piccinni MP, *et al.*, 1995).

### **1.4.2. Linfociti Th2**

Le cellule di tipo Th2 sono responsabili prevalentemente della risposta immunitaria fagocita-indipendente, per esempio verso alcuni nematodi (Mosmann TR, *et al.*, 1989; Romagnani S, 1991). La cellula Th2 produce principalmente interleuchina 4 (IL-4) e interleuchina 13 (IL-13), le quali stimolano la produzione di IgE e IgG1 nel topo, IgG4 nell'uomo da parte dei linfociti B, e l'interleuchina 5 (IL-5), che promuove la crescita, la differenziazione e l'attivazione degli eosinofili. Nella produzione di IL-4, insieme a quella di IL-5 e IL-13 interviene l'espressione del fattore di trascrizione GATA-3 che è attivato da STAT6 precedentemente stimolato dalla stessa IL-4. GATA-3 blocca anche la produzione di IL-12 bloccando la polarizzazione verso Th1. I linfociti Th2 producono anche l'interleuchina 10 (IL-10), citochina non esclusivamente di tipo Th2 che, insieme alla IL-4, inibiscono l'attivazione dei macrofagi.

La differenziazione in senso Th2 è mediata dalla IL-4 insieme alla IL-25, alla IL-33 e al thymic stromal lymphopoietin (TSLP), citochine prodotte da cellule T o altri tipi cellulari (cellule epiteliali, basofili). La risposta Th2 caratterizzata dalla produzione di IL-4 da parte delle cellule T CD4, la quale può essere prodotta anche dai mastociti, basofili o eosinofili in seguito a contatto con gli elminti oppure a basse concentrazioni dagli stessi linfociti Th2 che, in caso di persistenza dell'antigene e della mancata infiammazione, aumenterà la sua produzione auto-stimolandosi.

Il progesterone e i glucocorticoidi sono in grado di stimolare la differenziazione in senso Th2; in particolare il progesterone, a concentrazioni paragonabili a quelle presenti all'interfaccia materno-fetale durante la gravidanza, è un potente induttore della produzione di citochine di tipo Th2, (produzione di IL-4 e IL-5) (Piccinni MP, *et al.*, 1995).

Esiste anche un'altra sottopopolazione di linfociti T helper in grado di produrre sia citochine di tipo Th1 che citochine di tipo Th2. Questa sottopopolazione viene chiamata Th0 (Mosmann TR, *et al.*, 1996).

### **1.4.3. Linfociti Th17**

Le cellule T helper CD4<sup>+</sup> Th17, sono una sottopopolazione di cellule T CD4<sup>+</sup> distinta

dalle cellule T helper Th1 e Th2, che producono in particolare IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26 ed esprimono il fattore di trascrizione retinoic-acid-related-orphan receptor (RORC). La polarizzazione in senso Th17 è stimolata, nel topo, da citochine pro-infiammatorie come l'IL-6, l'IL-1, l'IL-23 e il TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) prodotte in risposta a batteri e funghi. L'IL-23 sembra essere più importante per la proliferazione e il mantenimento dei linfociti Th17, piuttosto che per la loro induzione (Aggarwal S, *et al.*, 2003), mentre per quanto riguarda il TGF- $\beta$  è stato dimostrato nel topo che questa citochina interviene nel processo di differenziazione dei linfociti Th17 in associazione con le citochine IL-6 e IL-1 (Bettelli E, *et al.*, 2006; Mangan PR, *et al.*, 2006; Veldhoen M, *et al.*, 2006). Inoltre recentemente è stato osservato che anche la IL-21, prodotta dai linfociti Th17 stessi, può agire con modalità autocrina come segnale di amplificazione (Nurieva R, *et al.*, 2007; Korn T, *et al.*, 2007). I linfociti Th17 sono particolarmente abbondanti nelle mucose, specialmente in quella del tratto gastrointestinale e il loro sviluppo è stimolato da citochine pro-infiammatorie in risposta a batteri e funghi.

Il principale ruolo delle cellule Th17 è la protezione contro i batteri extracellulari, che media l'attivazione di cellule epiteliali, macrofagi, fibroblasti e cellule endoteliali, che a loro volta producono chemochine e citochine responsabili del reclutamento di granulociti neutrofili in grado di eliminare i batteri e contribuiscono all'infiammazione cronica del tessuto. Le cellule Th17 umane presentano caratteristiche differenti dalle corrispettive cellule murine. In particolare le cellule Th17 umane esprimono sulla propria superficie i recettori chemochinici CCR6 e CCR4, il recettore per la IL-23 (IL-23R), ma anche l'IL-12R $\beta$ 2 e il CD161 (Acosta-Rodriguez EV, *et al.*, 2007; Annunziato F, *et al.*, 2007; Cosmi L, *et al.*, 2008). Inoltre alcune cellule Th17 umane esprimono il fattore trascrizionale T-bet oltre a ROR $\gamma$ t, sono indotte in presenza di IL-12 nel microambiente a produrre IFN- $\gamma$  oltre alla IL-17A (Annunziato F, *et al.*, 2007;). Le cellule Th17 che producono IL-17A e IFN- $\gamma$  sono chiamate cellule Th1/Th17 e entrambe le Th17 e Th1/Th17 manifestano anche una plasticità verso le cellule Th1 in risposta alla IL-12 prodotta dalle APCs. La plasticità delle cellule Th17 verso cellule Th1 è stato recentemente dimostrato anche nei topi, ed è dipendente dall'attività della IL-12, o della prolungata esposizione alla IL-23. Le cellule T CD4<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> *naive* che si comportano come precursori delle cellule Th17 potrebbero differenziarsi in cellule Th1/Th17 e in fine in cellule Th1, in risposta a citochine presenti nel microambiente delle cellule T CD4<sup>+</sup>. Inoltre la

produzione di IL-17 e IL-4 da parte delle cellule helper CD4<sup>+</sup> è stata riportata recentemente in alcune malattie allergiche (Cosmi L, *et al.*, 2010). In effetti, una piccola percentuale di cellule T CCR6<sup>(+)</sup>CD161<sup>(+)</sup>CD4<sup>(+)</sup> producono sia IL-17A che IL-4, e sono state definite cellule di tipo Th17/Th2. I cloni Th17/Th2 producono anche IL-5, IL-8, IL-9, IL-13, IL-21 e IL-22 e mostrano la capacità di indurre la secrezione in vitro delle IgE. Tra le cellule T CD4<sup>+</sup> circolanti dai soggetti normali, pochissime cellule Th17/Th2 sono state messe in evidenza (0,04%), ma la percentuale di cellule Th17/Th2 è significativamente aumentata nel circolo dei pazienti con asma cronica (1,3%). Inoltre le cellule Th17/Th2 non derivano in alcun modo dalle cellule T *naive* CD4<sup>+</sup> del sangue del cordone ombelicale sotto qualsiasi condizione sperimentale. Tuttavia, quando le cellule T circolanti della memoria CCR6<sup>(+)</sup> CD161<sup>(+)</sup>CD4<sup>(+)</sup> sono state clonate in condizioni di polarizzazione appropriate come in presenza di IL-4, queste cellule hanno dato origine a cloni Th17/Th2. Quindi un microambiente ricco di IL-4 può indurre un switch delle cellule della memoria Th17 in cellule Th17/Th2.

Infine, a differenza delle cellule Th17 murine che originano da un precursore comune ai linfociti T regolatori FoxP3 in presenza di IL-6 e TGF- $\beta$ , i linfociti Th17 umani originano da precursori CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> che esprimono costitutivamente ROR $\gamma$ t e il recettore per l'IL-23, in risposta all'attività combinata di IL-1 $\beta$  e IL-23 (Cosmi L, *et al.*, 2008). Il TGF- $\beta$  non sembra invece essere direttamente necessario per la differenziazione in senso Th17 nell'uomo, ma può solamente inibire l'espressione di T-bet e lo sviluppo di cellule CD4<sup>+</sup> in senso Th1 (Santarlaschi V, *et al.*, 2009). La polarizzazione dei linfociti T CD4<sup>+</sup> *naive* in cellule Th17, come per le cellule Th1 e Th2, può essere influenzata anche da ormoni. Recentemente è stato dimostrato che il progesterone inibisce la produzione di IL-17 e sopprime le risposte Th17 (Xu L, *et al.*, 2013).

### **1.5. Tolleranza e rigetto acuto nel trapianto d'organo**

Il trapianto d'organo prevede la sostituzione di una componente di un organismo vivente (tessuto, organo od insiemi complessi), espantata da altro individuo. L'individuo che fornisce il trapianto è detto donatore e quello che lo riceve è detto

ricevente oppure ospite. Esistono diverse tipologie di trapianto: trapianto **autologo o autotrapianto** (trapianto da uno stesso individuo), trapianto **singenico** (trapianto tra due individui geneticamente identici o singenici), trapianto **allogenico o allotrapianto** (trapianto tra due individui geneticamente diversi appartenenti alla stessa specie), trapianto **xenogenico o xenotrapianto** (trapianto appartenenti a specie diverse). Le molecole riconosciute come estranee nell'allotrapianto sono chiamate alloantigeni, invece gli linfociti e gli anticorpi che reagiscono contro gli alloantigeni vengono definiti alloreattivi.

Le cellule o gli organi trapiantati tra individui geneticamente identici (gemelli identici o individui dello stesso ceppo inbred, negli animali) non vengono mai rigettati. Le cellule o gli organi trapiantati tra individui geneticamente non identici o tra individui di due ceppi inbred diversi di una stessa specie invece, sono quasi sempre rigettati. Il rigetto dei trapianti è dovuto ad una risposta immune antigene-specifica con memoria immunologica, che si manifesta nei 7-14 giorni successivi al trapianto (chiamato rigetto di primo livello), ed è più veloce nel caso di un secondo trapianto dallo stesso donatore allo stesso ricevente (chiamato rigetto di secondo livello).

Il riconoscimento delle cellule trapiantate come *self* o estranee è determinato da geni polimorfi, chiamati geni di istocompatibilità, che differiscono tra gli individui di una stessa specie. Le molecole MHC umane si chiamano antigeni leucocitari umani (Human Leukocyte Antigens, HLA). Le molecole MHC allogeniche possono essere presentate ai linfociti T del ricevente direttamente sulla superficie delle APC del donatore (via diretta) oppure gli alloantigeni possono essere captati dalle APC dell'ospite che infiltrano il trapianto o risiedono negli organi linfoidi drenanti ad essere processati e presentati ai linfociti T del ricevente come peptidi associati a molecole MHC *self* (via indiretta).

Considerando le caratteristiche istopatologiche o la sua cinetica più che i meccanismi responsabili, il rigetto del trapianto si classifica in tre tipi:

1. Il rigetto iperacuto, avviene entro pochi minuti o al massimo qualche ora dal trapianto ed è dovuto essenzialmente a lesioni mediate da immunocomplessi a livello dell'endotelio dei vasi che attivano il complemento. E' caratterizzato dall'occlusione trombotica dei vasi del trapianto ed è mediata da anticorpi preesistenti nel circolo dell'ospite che riconoscono gli antigeni dei gruppi sanguigni ABO sulle cellule endoteliali del donatore.

2. Il rigetto acuto è un processo di danno vascolare e parenchimale dovuto all'azione dei linfociti T alloreattivi e degli anticorpi. Il rigetto acuto avviene in genere da cinque a dieci giorni dopo l'intervento se il paziente non sta ricevendo farmaci immunosoppressori, in caso contrario invece può svilupparsi in tempi lunghi, e può causare danni definitivi all'organo trapiantato se non è subito riconosciuto. Questa cinetica ritardata è dovuta ai tempi necessari per l'attivazione dei linfociti T effettori e per la produzione degli anticorpi.
3. Rigetto cronico indica tutte le perdite di funzionalità dell'organo trapiantato sul lungo periodo. Il rigetto cronico degli organi vascolarizzati è caratterizzato dall'occlusione delle arterie, come conseguenza della proliferazione delle cellule muscolari lisce dell'intima. Questo determina la perdita di funzionalità del trapianto soprattutto a causa del conseguente danno ischemico. Il rigetto cronico causa in genere la perdita dell'organo e la necessità di un nuovo trapianto entro una decina d'anni.

Come abbiamo accennato sopra il rigetto acuto è dovuto all'azione dei linfociti T alloreattivi, quindi sia i linfociti T  $CD4^+$  che i linfociti T  $CD8^+$  che una volta attivati dagli alloantigeni causano il rigetto del trapianto attraverso meccanismi distinti.

Le cellule  $CD8^+$  invece si differenziano in linfociti T citotossici (cytotoxic T Lymphocytes, CTL) in grado di uccidere le cellule del trapianto che esprimono molecole MHC di classe I allogeniche, in più secernono anche citochine che contribuiscono al danno. I CTL  $CD8^+$  riconoscono gli alloantigeni del trapianto e sono quindi in grado di uccidere le cellule, nel tessuto trapiantato, che esprimono gli stessi alloantigeni. Invece, i CTL  $CD8^+$  generati attraverso la via indiretta sono ristretti per MHC *self* e non sono in grado di uccidere le cellule allogeniche. Quando invece i linfociti T alloreattivi sono stimolati per via indiretta, il meccanismo principale del rigetto non è l'uccisione da parte dei CTL ma l'infiammazione provocata dalle citochine prodotte dalle cellule T effettrici  $CD4^+$ . Inoltre anticorpi alloreattivi formati dopo il trapianto possono contribuire al danno vascolare legandosi agli alloantigeni, soprattutto a molecole HLA, sulla superficie delle cellule dell'endotelio vascolare. Il legame degli alloanticorpi alla superficie delle cellule endoteliali induce l'attivazione locale del complemento, che determina la lisi cellulare, il reclutamento e l'attivazione dei neutrofili e la formazione del trombo.

Il rigetto dell'allotrapianto è definito prevalentemente come una risposta immunitaria Th1-mediata e le citochine di tipo Th2 inibendo le risposte Th1 inducono la

tolleranza all'allotrapianto. Il paradigma Th1/Th2 nel rigetto e nella tolleranza al trapianto è stato messo in dubbio da risultati ottenuti con topi knockout per geni di alcune citochine. Questi risultati dimostrano che il rigetto può procedere in assenza di IL-2 o IFN- $\gamma$  (citochine di tipo Th1), mettendo in discussione la validità del paradigma Th1/Th2 nel trapianto (Strom TB, *et al.*, 1996; Waaga AM, *et al.*, 2001; Suthanthiran M, e Strom TB, 1995; Burns WR, *et al.*, 2005). Ma le citochine mostrano di avere la proprietà di ridondanza (più citochine possono avere le stesse funzioni). Eliminare il gene per una citochina non significa eliminare completamente la funzione. Recentemente, una sottopopolazione di cellule T helper diversa da Th1 e Th2, la cellula Th17, che produce IL-17A e IL-17F come la cellula Th1 mostra di avere un ruolo nel rigetto acuto all'allotrapianto (Chen H, *et al.*, 2009; Yuan X, *et al.*, 2008). Mentre le cellule T reg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, come le cellule Th2, sembrano indurre la tolleranza all'allotrapianto (Graca L, *et al.*, 2002).

## **2. Ruolo del sistema immunitario nella gravidanza**

### **2.1 Il feto è un semi-allotrapianto**

La gravidanza è una condizione clinica che evolve regolarmente anche grazie al determinarsi di un preciso e delicato equilibrio del sistema immunitario. L'embrione, poiché esprime molecole MHC paterni di classe I (HLA-C), è stato considerato come un semiallotrapianto, e quindi rappresenta un potenziale bersaglio per il sistema immunitario materno (Van Nieuwenhoven ALV, *et al.*, 2003; Haig D, 1993). Per fortuna l'organismo materno non attiva reazioni cellulari immunitarie rivolte contro il feto. Il feto, quindi, è un allotrapianto ben tollerato. Infatti uno dei principali paradossi della vita è proprio la tolleranza immunologica verso il feto che si instaura durante la gravidanza e grazie alla quale il feto, geneticamente diverso dalla madre, sopravvive e si sviluppa (Finn R, *et al.*, 1977). La gravidanza rappresenta una condizione immunologica unica nella quale deve essere presente un equilibrio tra tolleranza verso il feto ed risposte immunitarie per proteggere il feto dalle infezioni senza compromettere la salute del feto. Probabilmente una forte pressione selettiva

ha portato all'evoluzione di numerosi meccanismi che proteggono il feto dal sistema immunitario materno, ma la maggior parte di questi meccanismi è ancora poco conosciuta. A questo fenomeno è probabile che contribuiscano molteplici caratteristiche di tipo molecolare e di barriera della placenta, oltre a uno stato di immunosoppressione locale. Anche se molti meccanismi sono coinvolti per proteggere il feto, la riproduzione nell'uomo non è perfettamente efficiente, dimostrato dal fatto che una gravidanza su cinque termina con un aborto spontaneo. In effetti la maggior parte degli aborti spontanei avvengono durante il primo trimestre di gestazione e sono dovuti ad anomalie cromosomiche sporadiche (Williams Z, 2012). Altre cause dovute a fattori materni (disordini della coagulazione, malattie autoimmuni, disordini endocrini e difetti dell'endometrio) senza escludere le anomalie genetiche materne e paterne, sono responsabili degli aborti spontanei. L'aborto spontaneo ricorrente è definito come la perdita di tre o più gravidanze durante il primo trimestre. L'aborto spontaneo ricorrente riguarda circa l'1% della popolazione. Quasi la metà dei casi di aborto spontaneo ricorrente ad eziologia sconosciuta, sono definiti aborti spontanei ricorrenti “*sine causa*”, e una parte di questi potrebbe coinvolgere risposte immunologiche cellulo-mediate (Piccinni MP, 2006).

## **2.2 Placenta e trofoblasto**

Il rigetto/tolleranza al feto e dunque il riconoscimento del feto da parte del sistema immunitario materno avviene nella zona di contatto tra madre e feto. Questa zona è rappresentata dalla placenta, un organo temporaneo che si forma nell'utero durante la gravidanza, ed è importante per la nutrizione, la respirazione, la produzione di ormoni, la tolleranza del feto e di conseguenza per il mantenimento della gravidanza. La placenta inizia a formarsi quando le cellule trofoblastiche, derivate dalla blastocisti impiantata, iniziano ad invadere l'endometrio, che durante la gravidanza viene chiamato decidua.

La placenta dunque è l'organo di connessione materno-fetale, e di conseguenza è formato da una parte di origine materna (endometrio o decidua), e da una parte di origine fetale (il corion), formata dalle cellule del trofoblasto provenienti dalle cellule esterne della blastocisti.

Il trofoblasto è composto da tre tipi cellulari diversi, il citotrofoblasto villosa, il

sinciziotrofoblasto ed il citotrofoblasto extravillioso. Il citotrofoblasto villosa è separato dai tessuti materni per interposizione del sinciziotrofoblasto che invece è in continuo contatto col sangue materno; questa interfaccia si instaura tra l'8<sup>a</sup>-9<sup>a</sup> settimana e persiste fino al termine della gravidanza. Il citotrofoblasto extravillioso è costituito da cellule attivamente proliferanti che invadano la decidua e che formeranno le membrane coriali, rimpiazzando in gran parte l'endotelio delle arterie spirali materne (trofoblasto endovascolare).

### **2.3 Molecole HLA di classe I espresse sulle cellule del trofoblasto**

L'MHC è una regione genetica, localizzata sul braccio corto del cromosoma 6, che codifica per due tipi di proteine di superficie estremamente polimorfiche (proteine MHC di classe I e di classe II). Le molecole di classe I sono espresse da tutti i tessuti e da tutte le cellule dell'organismo (esclusi i globuli rossi), mentre le molecole di classe II sono espresse dalle cellule APC (cellule dendritiche, monociti, macrofagi e linfociti B). Le molecole MHC di classe I sulle cellule APC sono presentate insieme ai peptidi alla cellula T CD8<sup>+</sup>, mentre le molecole MHC di classe II sono presentate insieme ai peptidi dalle APC ai linfociti T CD4<sup>+</sup>. Le molecole MHC di classe I si suddividono in due sottoclassi: la classe Ia include HLA-A, HLA-B e HLA-C, molecole dette "classiche" che sono altamente polimorfiche, e sono coinvolte nella presentazione degli antigeni da parte delle APC ai linfociti T citotossici CD8<sup>+</sup> e nei processi di rigetto di organi e tessuti in modo diretto. La classe Ib comprende HLA-E, HLA-F e HLA-G, molecole "non-classiche", monomorfe o oligomorfe con una ristretta espressione cellulare. La funzione più importante che svolgono le molecole non classiche è quella di legarsi ai recettori inibitori sui leucociti. Il trofoblasto villosa non esprime molecole HLA di classe I o II, mentre il trofoblasto extravillioso è caratterizzato dall'espressione di un solo tipo di antigeni HLA di classe I classici (HLA-C) e dall'espressione di molecole HLA di classe I non-classiche quali HLA-E e HLA-G (Moffet-King A, 2002; Hunt JS, e Orr HT, 1992; Ellis SA, *et al.*, 1986; King A, *et al.*, 2000; Claas FHJ, *et al.*, 1988). L'HLA-G e l'HLA-E espresse in maniera specifica dal citotrofoblasto extravillioso sono in grado di modulare le risposte immunitarie mediate rispettivamente dalle cellule T e le cellule NK a livello dell'utero.

L'espressione di molecole MHC di classe I non-classiche (HLA-G) da parte del trofoblasto è stata considerata per anni la causa dell'inibizione dell'attivazione dei leucociti dell'utero e la causa della tolleranza del feto, ma per la possibilità che interagisse con il Killing Inhibitory Receptors (KIR) presente sulle cellule NK (Hunt JS, *et al.*, 2005; Ishitani A, *et al.*, 2003). L'espressione delle molecole HLA-C altamente polimorfiche invece potrebbe innescare il rigetto del semiallotrapianto fetale mediato da linfociti T materni.

## **2.4 La presenza di cellule immunitarie all'interfaccia materno-fetale e il loro ruolo nel successo/ fallimento della gravidanza**

L'interfaccia materno-fetale rappresenta il luogo dove le cellule del trofoblasto e i leucociti deciduali interagiscono. La decidua (endometrio durante la gravidanza) contiene una porzione significativa di cellule del sistema immunitario (8 a 30% delle cellule totali presenti nell'endometrio) che varia durante il ciclo mestruale e durante le fasi precoci della gravidanza (Piccinni MP, 2002).

Nel primo trimestre di gestazione circa il 30-40% delle cellule deciduali è rappresentato da leucociti. Le tre popolazioni leucocitarie maggiormente rappresentate sono le cellule NK uterine (uNK 70%), macrofagi (20%) e linfociti T (10-20%), mentre si trovano pochi granulociti neutrofili e le cellule B sono praticamente assenti (Piccinni MP, 2002; Bulmer JN, *et al.*, 1991). Altre popolazioni cellulari meno rappresentate numericamente sono le cellule dendritiche deciduali (Gardner L, e Moffett A, 2003), le cellule NKT (Tsuda H, *et al.*, 2001) e i linfociti T reg (Heikkinen J, *et al.*, 2004).

I leucociti deciduali presenti giocano un ruolo importante nel riconoscimento degli alloantigeni fetali, nello sviluppo feto-placentare in cui sono coinvolte le risposte e nelle difese contro i patogeni extracellulari.

### **2.4.1 Cellule Natural Killer Uterine**

Le cellule NK rappresentano il 70% delle cellule stromali CD45<sup>+</sup> e quasi il 30% delle cellule stromali totali nella decidua durante le fasi iniziali della gravidanza (Bulmer

JN, *et al.*, 2010). Le cellule NK deciduali sono diverse per molti aspetti dalle cellule NK endometriali (Manaster I, *et al.*, 2008), e del sangue periferico. Le cellule NK del sangue periferico rappresentano circa il 10-15% dei linfociti totali e la maggior parte di esse ha un fenotipo CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, tipicamente citotossico. Al contrario, la maggior parte delle cellule NK deciduali ha un fenotipo “non-citotossico” CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>CD160<sup>-</sup> (Lee JY, *et al.*, 2011; King A, *et al.*, 1991). Per capire l'origine delle cellule NK deciduali è stato riportato che le cellule NK periferiche CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> possano essere reclutate a livello dell'utero dalle citochine endometriali e che poi il TGF- $\beta$  possa convertire queste cellule in cellule NK deciduali CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> (Kitaya K, *et al.*, 2007). Le cellule NK deciduali producono elevati livelli di fattori angiogenetici (come VEGF, PLGF, Angiopietina-2 e NKG5), fattori di crescita e citochine (come TNF- $\alpha$ , IL-10, GM-CSF, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, CSF-1, LIF e IFN- $\gamma$ ) e chemochine (come MIP1 $\alpha$  e MIP1 $\beta$ ), le quali hanno un ruolo importante nel rimodellamento delle arterie spirali, nella migrazione del trofoblasto e contribuiscono all'impianto dell'embrione, alla decidualizzazione dell'endometrio e alla formazione della placenta (Moffett-King A, 2002; El Costa H, *et al.*, 2008; Hanna J, *et al.*, 2006; Saito S, *et al.*, 2008).

Inoltre le cellule NK deciduali esprimono recettori inibitori tra i quali KIR2D, KIR2DL4 (Ig-like) e CD94/NKG2A (Solderstrom K, *et al.*, 1997; Verma S, *et al.*, 1997) che riconoscono le molecole MHC di classe I (Lainer LL, 1999). Questa interazione sembra bloccare la citotossicità delle cellule NK (Moreau P, *et al.*, 1998) e pertanto è stato suggerito il suo contributo nella tolleranza materno-fetale, mentre la perdita di questa interazione ha suggerito che l'aborto spontaneo potrebbe essere determinato dall'attività citotossica delle cellule NK. I recettori NKp46 espressi sulle cellule NK deciduali mediano la citotossicità, mentre i recettori NKp30 mediano la secrezione citochinica. In particolare è stato dimostrato che la citotossicità mediata dal recettore NKp46 risulta essere significativamente bloccata dal reclutamento del recettore inibitorio NKG2A che lega l'HLA-E presente sul trofoblasto (El Costa H, *et al.*, 2008). Nella gravidanza normale l'interazione tra HLA-E e NKG2A media un segnale inibitorio che previene la potenziale citotossicità delle cellule NK verso il feto.

Il recettore NKp30 stimola la produzione di citochine e chemochine (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e GM-CSF) da parte delle cellule NK deciduali che potrebbero essere importanti per la vascolarizzazione della placenta in particolare grazie alla

produzione di IFN- $\gamma$  (Ashkar AA, *et al.*, 2000), che potrebbe anche inibire l'infiammazione locale antagonizzando le cellule Th17 (Fu B, *et al.*, 2013).

#### **2.4.2 Macrofagi e cellule dendritiche uterini**

I macrofagi e le cellule dendritiche sono le principali cellule presentanti l'antigene presenti nell'endometrio e sembrano avere un ruolo importante nel mantenimento della gravidanza.

I macrofagi sono cellule fagocitiche mononucleate residenti nei tessuti e sono coinvolte sia nelle risposte dell'immunità innata che dell'immunità adattiva. Inoltre, intervengono nel mantenimento dell'omeostasi tissutale fagocitando i componenti delle cellule apoptotiche e secernendo importanti citochine, chemochine e fattori di crescita (Geissmann F, *et al.*, 2010). I macrofagi CD14<sup>+</sup> rappresentano il 20% dei leucociti deciduali totali (Bulmer JN, *et al.*, 1988) e la maggior parte di essi esprime la lectina di tipo C CD209 (Kämmerer U, *et al.*, 2003).

Nelle gravidanze normali i macrofagi deciduali sono localizzati prevalentemente nello stroma circostante le arterie spirali modificate ed in prossimità del trofoblasto extravillioso, dove potrebbero agire come APC e presentare antigeni del trofoblasto internalizzati durante la fagocitosi, e detriti cellulari prodotti durante l'impianto dell'embrione e indurre l'innescamento di una reazione infiammatoria potenzialmente in grado di danneggiare il feto (Bulmer JN, *et al.*, 1984; Kim YM, *et al.*, 2002; Reister F, *et al.*, 2001). Inoltre i macrofagi potrebbero avere un'attività immunosoppressiva sui linfociti T attraverso l'espressione dell'enzima idoleamina-2-3-diossigenasi (IDO) e la produzione di IL-10 (Mizuno M, *et al.*, 1994; Heikkinen J, *et al.*, 2003).

Le cellule dendritiche sono le più potenti APC in grado di attivare i linfociti T *naive*. Hanno una funzione "sentinella" per il sistema immunitario dando l'inizio alle risposte dei linfociti T antigeni specifici verso antigeni microbici e antigeni di organi trapiantati.

Le cellule dendritiche sono scarsamente presenti a livello della decidua. Nella decidua, le cellule dendritiche sono caratterizzate da un fenotipo CD45<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> e CD83<sup>+</sup>. Inoltre le cellule CD83<sup>+</sup> sono in contatto, associate, ai linfociti T CD3<sup>+</sup> nella decidua basalis (Kämmerer U, *et al.*, 2000). La funzione e la

differenziazione delle cellule dendritiche sono regolate dalle citochine e dalle chemochine che sono presenti nel microambiente locale (Plaks V, *et al.*, 2008).

Il ruolo principale delle cellule dendritiche deciduali è quello di catturare gli alloantigeni fetali e successivamente di migrare nei linfonodi, dove presentano i peptidi derivanti dalle molecole MHC di classe I paterne ai linfociti T CD4<sup>+</sup> materni specifici attivandoli. Le cellule T CD4<sup>+</sup> attivate proliferano e diventano cellule effettrici producenti citochine. Questo meccanismo viene definito come presentazione indiretta delle molecole MHC di classe I fetali ai linfociti T CD4<sup>+</sup> materni.

### **2.4.3 Ruolo dei linfociti T deciduali**

I linfociti T CD3<sup>+</sup> rappresentano il 10-40% dei leucociti nella mucosa uterina durante le fasi precoci della gravidanza. All'incirca il 30-45% di questa componente leucocitaria ci sono i linfociti T CD4<sup>+</sup> mentre nel 45-75% ci sono i linfociti CD8<sup>+</sup> (Bulmer JN, *et al.*, 1991; Bulmer JN, *et al.*, 2010). A sua volta tra le cellule T CD4<sup>+</sup> circa il 5% è rappresentato da linfociti T regolatori. Durante la presentazione del HLA-C paterne da parte delle APC materne i linfociti T CD4<sup>+</sup> effettrici rilasciano diverse citochine. In base al profilo citochinico prodotto i linfociti T CD4<sup>+</sup> si dividono principalmente in cellule Th1, Th2 e Th17. Definiremo il ruolo di queste 3 sottopopolazioni T CD4<sup>+</sup> nella Tolleranza/Rigetto del semiallotrapianto fetale.

#### **- Linfociti T regolatori (Treg) nella gravidanza**

L'embrione, poiché esprime molecole MHC di classe I paterne, può essere assimilato ad un semiallotrapianto e quindi rappresenta un potenziale bersaglio per il sistema immunitario materno e in particolare per i linfociti T CD4<sup>+</sup> responsabili della tolleranza e del rigetto degli allotrapianti. Le cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Treg) aumentano la sopravvivenza dei trapianti allogenici di organo (Kingsley CL, *et al.*, 2002). Le cellule T regolatorie FoxP3<sup>+</sup> inibiscono le cellule T effettrici (Somerset DA, *et al.*, 2004).

Il ruolo delle cellule Treg nella gravidanza normale e nell'aborto ricorrente “*sine causa*” è stato molto studiato. Nell'uomo, la di cellule Treg CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> nella decidua è diminuita da 20% a 6% nel caso di aborto spontaneo (Sasaki *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2009) e questo decremento è stato riportato anche nell'aborto spontaneo ricorrente “*sine causa*” (Yang H, *et al.*, 2008; Mei S, *et al.*, 2010; Wang WJ, *et al.*, 2010a; Lee JY, *et al.*, 2011; Wang WJ, *et al.*, 2011; Arruvito L, *et al.*, 2010). La percentuale di cellule Treg nella decidua basalis è diminuita nei casi di aborto spontaneo con un embrione normale e la frequenza delle cellule Treg lontane dal sito dell'impianto (decidua parietale) è simile a quella nella gravidanza normale (Inada K, *et al.*, 2013). Guerin (2011) ha riportato nel topo un accumulo delle cellule Treg CCR7<sup>+</sup> prima dell'impianto, mentre Mjösberg (2010) ha descritto una diminuzione del numero delle cellule di Treg CCR4<sup>+</sup> nella decidua rispetto al sangue periferico nella gravidanza normale. Inoltre, Kallikourdis (2007) ha dimostrato che l'alloantigene paterno potenzia l'accumulo delle cellule Treg CCR5<sup>+</sup> effettrici nell'utero di topi gravidi. Il CCR5 potrebbe essere un marcatore di cellule Treg attivate per un attività funzionale contro gli antigeni paterni. Shima (2015) ha riferito che le cellule Treg Ki67<sup>+</sup> specifiche per gli antigeni-paterni esprimono CCR5 sulla loro superficie. Questi risultati suggeriscono che le cellule T proliferanti CCR5<sup>+</sup> potrebbero indurre la tolleranza per gli antigeni paterni nell'uomo. Tuttavia, recentemente Inada (2013) ha riportato che la frequenza delle cellule Treg CCR5<sup>+</sup> non è modificata nell'aborto spontaneo. Inaspettatamente, questo studio ha mostrato che le frequenze delle cellule Treg CCR5<sup>+</sup> e delle cellule Treg Ki67<sup>+</sup> è simile in caso di gravidanza normale, aborto spontaneo con un embrione normale e aborto spontaneo con un embrione anormale. Inoltre, la frequenza di cellule Treg Ki67<sup>-</sup> non proliferanti nell'aborto spontaneo con un embrione normale è significativamente più bassa di quella della gravidanza normale. Questi ultimi risultati suggeriscono che le Treg deciduali, specifiche per gli antigeni paterni, potrebbe non essere responsabile del successo della gravidanza attraverso l'induzione della tolleranza al semi-allotrapianto fetale. In accordo con questi dati, nuovi studi nel topo sembrano che le cellule Treg siano attivate nei linfonodi uterini in risposta degli antigeni seminali e di sperma, e non in risposta agli antigeni dei spermatozoi, queste cellule migrano dopo verso l'utero dove essi preparano l'endometrio per l'impianto dell'embrione (Robertson SA, *et al.*, 2013). Presumibilmente, le cellule Treg, producendo IL-10 e TGF-β, in parte agiscono per attenuare l'infiammazione uterina, che è indotta dal

seme. Tale ruolo è ovviamente indipendente dall'esposizione degli antigeni della placenta/del trofoblasto.

### **- Linfociti CD4<sup>+</sup> Th1 e Th2 nella gravidanza**

La decidua durante la gravidanza è a stretto contatto con il trofoblasto e contiene diversi tipi cellulari come, macrofagi, cellule dendritiche e linfociti T. Tutti questi tipi cellulari sono potenzialmente in grado di promuovere il rigetto dell'allogravidanza fetale, che è mediato inizialmente dal riconoscimento degli antigeni MHC paterni (HLA-C) da parte delle APC materne, seguito dall'attivazione delle cellule T effettrici attraverso il rilascio di varie citochine. Sulla base delle citochine prodotte, i linfociti T CD4<sup>+</sup> si differenziano in sottopopolazioni (Th1, Th2, Th17 ecc..). Le cellule Th1 producono TNF- $\beta$  e INF- $\gamma$  e sono i principali effettori della difesa mediata da fagociti contro infezioni da parassiti intracellulari (Mossmann TR, *et al.*, 1989; Romagnani S, 1991). Invece le cellule Th2 producono IL-4, che insieme al IL-10 inibisce alcune funzioni dei macrofagi e insieme al IL-13 stimola la produzione di anticorpi quali le Ig-E e le Ig-G1, le cellule Th2 producono anche IL-5, la quale promuove la differenziazione dei granulociti eosinofili. Le cellule Th2 sono i principali effettori della difesa, indipendente da fagociti, contro i nematodi (Mosman TR, *et al.*, 1989).

Il rigetto dei tessuti trapiantati dipende principalmente da meccanismi effettori di tipo Th1 (Erdmann AA, *et al.*, 2004; Burns WR, *et al.*, 2005), mentre la produzione delle citochine di tipo Th2 inibendo le risposte Th1, è essenziale alla tolleranza agli allotrapianti (Nickerson P, *et al.*, 1994; Strom TB, *et al.*, 1996; Li XC, *et al.*, 1998). Questi meccanismi suggeriscono che le citochine di tipo Th1, favorendo il rigetto dell'allogravidanza fetale, possono essere dannose per la gravidanza, mentre quelle Th2, bloccando le risposte Th1, possono promuovere la tolleranza all'allogravidanza fetale e quindi favorire la sopravvivenza del feto.

Esperimenti nel topo hanno rivelato la presenza di IL-4, IL-5 ed IL-10, citochine di tipo Th2, all'interfaccia materno-fetale durante tutto il periodo gestazionale, mentre l'INF- $\gamma$  è stato evidenziato solo durante il primo periodo di gravidanza (Lin H, *et al.*, 1993; Wegmann TG, *et al.*, 1993). L'incrocio tra ceppi murini che portano all'aborto spontaneo (femmina CBA/J X maschio DBA/2) e l'incrocio di ceppi murini che

portano alla gravidanza normale (femmina CBA/J X maschio Balb/C), mostrano una maggiore produzione di TNF- $\alpha$  e di IFN- $\gamma$  nell'utero e quantità minori di IL-4 e IL-10 nell'incrocio CBA/J X DBA/2 rispetto al modello di gravidanza normale (CBA/J X Balb/C), dove invece sono prodotte quantità maggiori di IL-4 e IL-10. Inoltre, iniettando TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o IL-2 in topi CBA/J X Balb/C porta ad un aumento del tasso di aborto spontaneo, mentre l'iniezione di IL-10 in topi CBA/J X DBA/2 aiuta a ridurre il tasso di aborto spontaneo (Chaouat G, *et al.*, 1995).

Nell'uomo le condizioni patologiche possono dare informazioni sulla situazione fisiologica a livello dell'utero. Dagli studi sulla patogenesi dell'aborto ricorrente "*sine causa*", con la perdita di tre o più gravidanze consecutive nel primo trimestre di gravidanza senza cause attualmente conosciute, il ruolo di cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali effettrici è stato messo in evidenza. Vari approcci sono stati usati per sottolineare il ruolo dei linfociti Th1 e Th2 nell'aborto spontaneo e nel mantenimento della gravidanza, studiando le cellule T CD4<sup>+</sup> presenti nel sangue periferico prima e durante un aborto spontaneo in donne poliabortive "*sine causa*" (Hill JA, *et al.*, 1995; Raghupathy R, *et al.*, 2000). Ma le citochine agiscono generalmente localmente e la quantizzazione di citochine prodotte dalle cellule T all'interfaccia materno-fetale risulta dare informazioni più attendibili. L'approccio migliore sembra quindi essere quello di studiare le cellule T CD4<sup>+</sup> nella decidua.

Infatti uno studio ha dimostrato un deficit di produzione di IL-4 da parte di cloni di cellule T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, e un deficit nella produzione di IL-10 dai cloni di cellule T CD4<sup>+</sup> generati dalla decidua di donne poliabortive "*sine causa*" al momento di un aborto spontaneo rispetto a donne con gravidanza normale che si sottoponevano ad interruzione volontaria di gravidanza (Piccinni MP, *et al.*, 1998a). Quindi, all'interfaccia materno-fetale umana, il successo della gravidanza sembra essere associato alla produzione di citochine di tipo Th2 (Piccinni MP, *et al.*, 1998a, 1998b). Inoltre, questo studio ha messo in evidenza l'aumentata produzione del Leukemia Inhibitory Factor (LIF) (Stewart CL, *et al.*, 1992), essenziale per l'impianto dell'embrione, e del macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) (Pollard JW, *et al.*, 1987), importante per lo sviluppo dell'embrione, da parte dei cloni di cellule T CD4<sup>+</sup> generati dalla decidua di donne con gravidanza normale rispetto alla decidua di donne con poliabortività (Piccinni MP, *et al.*, 1998a; Piccinni MP, *et al.*, 2001).

L'elevata produzione di IL-4, IL-10, LIF e M-CSF all'interfaccia materno-fetale nelle donne con gravidanza normale non è stata confermata invece a livello del sangue

periferico, suggerendo che il deficit nella produzione di alcune citochine all'interfaccia materno-fetale non è una caratteristica intrinseca dei linfociti T helper CD4<sup>+</sup>, ma piuttosto ad una alterazione nella regolazione della produzione di citochine da parte dei linfociti T mediata dal microambiente.

Molecole espresse o prodotte dalle cellule deciduali stromali o dal trofoblasto possono essere considerate come dei fattori del microambiente uterine in grado di modulare il profilo citochinico dei linfociti T CD4<sup>+</sup> effettori della decidua.

La produzione di M-CSF e di LIF da parte delle cellule T CD4<sup>+</sup> è stimolata dalla IL-4 e dal progesterone (Piccinni MP, *et al.*, 2001).

Recentemente, l'HLA-G5, una forma solubile della molecola HLA-G, che appartiene alle molecole HLA I non classiche (Ib), rilasciato dal trofoblasto e dall'embrione (Ellis SA, *et al.*, 1986), è risultata responsabile della produzione di IL-4 dalle cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali nella gravidanza normale (Lombardelli L, *et al.*, 2013). Il recettore dell'HLA-G, ILT2, può essere espresso dai macrofagi, cellule dendritiche, cellule T della decidua ed è espresso anche dai monociti del sangue periferico (Li C, *et al.*, 2009). La produzione di IL-4 da parte delle cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali, indotta dal sHLA-G5, dipende dai livelli di espressione del recettore per l'HLA-G5 (ILT2) (Lombardelli L, *et al.*, 2013). Le cellule CD4<sup>+</sup> purificate dalla decidua e non stimolate in vitro producono spontaneamente IL-4 ma non IFN- $\gamma$ , mentre i macrofagi purificati dalla decidua e non stimolati in vitro non producono IL-12 nemmeno dopo stimolazione con LPS ma producono altre citochine come l'IL-6. La IL-4 prodotta spontaneamente dalle cellule CD4<sup>+</sup> sembra essere legata alla “down-regolazione” del recettore dell'HLA-G5, ILT2, sui macrofagi deciduali dopo la presentazione degli Ag del trofoblasto alle cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali, che al loro volta dopo attivazione cominciano ad esprimere il recettore dell'HLA-G, ILT2 (Lombardelli L, *et al.*, 2013). In effetti, la “down-regolazione” del recettore ILT2 sui macrofagi deciduali in confronto ai monociti del sangue periferico nelle donne gravide è stata dimostrata (Lombardelli L, *et al.*, 2013). Quindi la modulazione della secrezione di IL-4 da parte dell'HLA-G5 è correlata alla “down-regolazione” dell'espressione di ILT2 sui macrofagi deciduali e l'aumento dei livelli dello stesso recettore per HLA-G5 sulle cellule T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> deciduali. Questi risultati suggeriscono fortemente che l'HLA-G5, prodotto localmente dal trofoblasto, può essere responsabile, almeno in parte, della produzione di IL-4 da parte delle cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali, che sembra essenziale alla tolleranza all'allotrapianto fetale e dunque al successo della

gravidanza.

Inoltre, molecole espresse dal trofoblasto e non prodotte dal trofoblasto possono indurre la produzione di citochine che inducono la tolleranza al semi-allotrapianto fetale. La molecola CD86 espressa sul trofoblasto interagisce con il CD28 espresso sui linfociti T CD4<sup>+</sup> deciduali e stimola la produzione di IL-10 da parte di questi ultimi (Piccinni MP, *et al.*, manoscritto in preparazione).

Quindi possiamo dire che l'IL-4 (indotta dal progesterone, HLA-G5) e l'IL-10 (indotta dal CD86 espresso dal trofoblasto), sembrano essere importanti per la tolleranza agli allo-antigeni paterni espressi dal trofoblasto.

### **- Linfociti CD4<sup>+</sup> Th17 nella gravidanza**

Le cellule T helper CD4<sup>+</sup> Th17 che producono IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26 ed esprimono ROR- $\gamma$ C costituiscono una nuova linea di cellule T helper distinte dalle cellule Th1 e Th2. Il principale ruolo delle cellule Th17 è la protezione contro i batteri extracellulari mediante l'attivazione di cellule epiteliali, macrofagi, fibroblasti e cellule endoteliali, che producono citochine e chemochine responsabili del reclutamento dei granulociti, che contribuiscono all'infiammazione cronica del tessuto e all'eliminazione dei patogeni extracellulari. La presenza di IL-17, è stato riportato all'interfaccia materno-fetale durante la gravidanza murina (Ostojic, 2003). L'IL-17 è prodotta dal citotrofoblasto e sinciziotrofoblasto (Pongcharoen S, *et al.*, 2007) della placenta normale ma anche dalle cellule T helper CD4<sup>+</sup>. La IL-17 in gravidanza potrebbe stimolare l'invasione del trofoblasto, in effetti sembra aumentare l'invasione di una linea di carcinosarcoma umano (JEG-3) (Pongcharoen S, *et al.*, 2007; 2006).

Il ruolo delle cellule Th17 nella gravidanza potrebbe essere anche legato alla loro attività patogenetica durante le fasi precoci del rigetto dei trapianti (Chen H, *et al.*, 2009) ed essere coinvolte quindi nell'aborto spontaneo. Dei studi riportano il ruolo patogenetico delle cellule Th17 nell'aborto spontaneo. Questi studi riportano un numero delle cellule Th17 CCR6<sup>+</sup> aumentate nel sangue periferico e nella decidua di pazienti con aborti spontanei ricorrenti rispetto ai controlli in gravidanza normale, mentre le cellule Treg sono diminuite (Wang WJ, *et al.*, 2010a). Inoltre, l'espressione di IL-27 a livello della decidua di donne con aborto spontaneo ricorrente è

significativamente inferiore rispetto a quella della gravidanza normale. L'IL-27 è un regolatore chiave delle risposte delle cellule T, in particolare sopprime l'espressione di IL-17, intensificando l'espressione di IL-10 in maniera dose-dipendente non ha invece effetto sull'espressione del TGF- $\beta$ . Questo studio suggerisce che l'IL-27 potrebbe essere coinvolta nella regolazione dell'equilibrio Th17/Treg e nel mantenimento di un microambiente “tollerante” durante le prime fasi della gravidanza (Wang WJ, *et al.*, 2013). Un altro gruppo ha riportato un accumulo di cellule Th17 nella decidua in casi di aborto spontaneo (Nakashima A, *et al.*, 2010), in particolare osserva che il numero delle cellule IL-17<sup>+</sup> deciduali è aumentato solo nei casi di aborto “inevitabile” caratterizzato da sanguinamento genitale e crampi rispetto al numero di cellule IL-17<sup>+</sup> deciduali di gravidanza normale. Nel caso di aborti spontanei senza sanguinamento il numero di cellule Th17 non aumenta in confronto al numero di Th17 nella gravidanza normale. Questi ultimi risultati suggeriscono però che le cellule IL-17<sup>+</sup> potrebbero essere coinvolte nell'induzione dell'infiammazione nelle fasi finali dell'aborto e non essere la causa del rigetto del semi-allotrapianto fetale (Nakashima A, *et al.*, 2010). I lavori di questi due gruppi sembrano suggerire un effetto patogenetico delle cellule Th17 nell'aborto spontaneo che però non è chiaramente dimostrato.

## SCOPO DELLA TESI

L'embrione, poiché esprime molecole MHC di classe I paterne (HLA-C), può essere assimilato ad un semi-allotrapianto e quindi rappresenta un potenziale bersaglio per il sistema immunitario materno e in particolare per i linfociti T CD4<sup>+</sup> responsabili della tolleranza e del rigetto immunologico. Il sistema immunitario materno presente all'interfaccia materno-fetale, attraverso l'azione dei linfociti T CD4<sup>+</sup> deciduali, potrebbe rigettare l'embrione ed indurre un aborto spontaneo nelle prime settimane di gravidanza (Cf. paragrafo "Linfociti CD4<sup>+</sup> Th1 e Th2 nella gravidanza"). In effetti è stato dimostrato che le citochine di tipo Th1, che promuovono il rigetto degli allotrapianti, possono essere dannose per la gravidanza, mentre quelle Th2, che inibiscono le risposte Th1, possono promuovere la tolleranza all'allotrapianto fetale e dunque favorire lo sviluppo della gravidanza. I linfociti Th17, come le cellule Th1, sembrano avere un ruolo nel rigetto dei tessuti trapiantati (Chen H, *et al.*, 2009) e alcuni autori riportano il ruolo patogenetico durante l'aborto spontaneo ricorrente ((Wang WJ, *et al.*, 2010b; Nakashima A, *et al.*, 2010). In effetti, un gruppo cinese riporta che il numero delle cellule CD4<sup>+</sup> deciduali produttrici IL-17 è significativamente maggiore nelle donne poliabortive rispetto ai controlli con gravidanza normale (Wang WJ, *et al.*, 2010b), mentre un gruppo giapponese (Nakashima A, *et al.*, 2010) riporta che il numero di linfociti CD4<sup>+</sup> Th17 deciduali è aumentato solo in caso di aborto spontaneo detto "inevitabile", caratterizzato da sanguinamento vaginale e crampi, ma non in caso di aborto senza sanguinamento vaginale. Questo studio suggerisce quindi che le cellule Th17 potrebbero essere coinvolte nell'infiammazione che si instaura nelle fasi finali dell'aborto e non essere la causa del rigetto del semi-allotrapianto fetale (Nakashima A, *et al.*, 2010).

Il ruolo delle cellule Th17 nel rigetto dell'allotrapianto fetale e nell'aborto spontaneo rimane quindi ancora non molto chiaro. Questi due gruppi non hanno preso in considerazione il fatto che la caratteristica delle cellule CD4<sup>+</sup> Th17, è la "plasticità", e la potenzialità che le cellule Th17 diano origine a cellule Th17/Th1 quando nel microambiente è presente IL-12, mentre diano origine a cellule Th17/Th2 se nel microambiente è presente IL-4 (Cf. paragrafo 1.2.3 "Linfociti Th17"). Questi autori che hanno usato la citofluorimetria a flusso per definire il ruolo delle Th17 nell'aborto non hanno mai messo in evidenza le cellule CD4<sup>+</sup> in grado di produrre IL-17A, insieme ad altre citochine ed in particolare la IL-4 o il IFN- $\gamma$  e dunque non

hanno mai studiato il ruolo delle sottopopolazioni Th17/Th1 e Th17/Th2 nella gravidanza normale e nell'aborto spontaneo ricorrente o nell'aborto spontaneo occasionale.

Questi autori non hanno mai purificato, isolato o arricchito cellule T CD4<sup>+</sup> Th17 dalla decidua per misurare i livelli di citochine di tipo Th17 prodotti da queste cellule. Non hanno mai studiato la produzione e/o espressione di IL-17F ma solo di IL-17A, e nemmeno la produzione e/o espressione di IL-22 da parte delle cellule Th17 deciduali. Inoltre, questi autori non hanno mai studiato e definito il ruolo delle cellule Th17 al sito dell'impianto dell'embrione.

### **Gli obiettivi del nostro studio sono stati i seguenti:**

1. Definire il ruolo delle cellule Th17 nella gravidanza normale e nell'aborto spontaneo in donne poliabortive “*sine causa*” secondo i criteri convenzionali, in particolare per indagare se, come è stato riportato da Wang *et al* (2010b), queste cellule sono responsabili degli aborti spontanei ricorrenti,
2. Definire a quale sottopopolazione di tipo Th17 (cellule Th17/Th1 o Th17/Th2) appartengono le cellule Th17 deciduali e se uno di questi due profili di tipo Th17 è preferenzialmente associato con il fallimento di gravidanza o successo di gravidanza. In effetti abbiamo cercato di indagare sulla possibile associazione di produzione di IL-17A e IL-17F ad altre citochine di tipo Th1 o Th2, che possa conferire alle cellule Th17 un effetto benefico anziché deleterio sullo sviluppo della gravidanza.
3. Misurare i livelli di citochine di tipo Th17 prodotti dai linfociti T CD4<sup>+</sup> nella decidua di poliabortive o di gravidanza normale per vedere se le quantità di IL-17 prodotte nella gravidanza normale o nell'aborto ripetuto siano differenti.
4. Valutare la recettività della decidua all'embrione, tenteremo di vedere se le cellule Th17 e le sottopopolazioni Th17/Th1 e Th17/Th2, possano essere coinvolte non solo nel mantenimento della gravidanza o nell'aborto spontaneo, ma coinvolte anche nell'impianto dell'embrione, studiando queste cellule al sito dell'impianto dell'embrione e lontano dal sito dell'impianto dell'embrione nella tuba di Fallopio da donne con gravidanza extrauterina.

5. Trovare un fattore solubile presente nell'interfaccia materno-fetale, che possa essere responsabile almeno in parte per la differenziazione di cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali in cellule Th17/Th2.

Il progesterone ad elevate concentrazioni, paragonabili a quelle presenti all'interfaccia materno-fetale, induce risposte Th2 (produzione di IL-4 o di IL-5) (Piccinni MP, *et al.*, 1995). Recentemente è stato riportato che il progesterone inibisce la produzione di IL-17 e sopprime le risposte Th17 (Xu L, *et al.*, 2013). Il progesterone non può essere il fattore responsabile dello sviluppo di cellule Th17/Th2 ma solo delle cellule Th2. Molto recentemente, abbiamo dimostrato che l'HLA-G5 solubile induce un aumento della produzione di IL-4 da parte delle cellule T helper CD4<sup>+</sup> (Lombardelli L, *et al.*, 2013). Ci siamo chiesti se l'HLA-G5 potesse indurre anche la produzione di IL-17A e IL-17F da parte delle cellule T CD4<sup>+</sup>. Studieremo dunque il possibile ruolo di HLA-G5 sulla produzione di IL-4 e IL-17 da parte dei linfociti T CD4<sup>+</sup>, generando linee di cellule T specifiche per la streptochinasi (SK) in presenza o in assenza di HLA-G5 e derivando cloni T CD4<sup>+</sup> da queste linee cellulari, misurando il livello di IL-17A, IL-17F, IL-4 prodotti e i livelli di mRNA per IL-17A, IL-17F, IL-4 espressi. Indagheremo inoltre sul ruolo dell'HLA-G5 sulla differenziazione delle cellule T CD4<sup>+</sup> in Th17/Th2 o Th17/Th1.

## MATERIALI E METODI

### 1. Reagenti

La Fitoemoagglutinina (PHA) è stata fornita da Sigma (St. Louis, Missouri) e il forbolo 12-miristico 13-acetato (PMA) da Becton Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey). L'IL-12, l'IL-4 e i recettori solubili per l'IL-4 (sIL-4R) e per l'IL-17 (sIL-17R) sono stati forniti da R&D System (Minneapolis, MN, USA), mentre l'IL-2 ricombinante umana è stata fornita da Eurocetus (Milano, Italia).

Inoltre sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali coniugati a fluorocromi: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey) e anticorpi monoclonali di controllo isotipico, sia purificati che fluorocromo-cognugati (Southern Biotechnology).

L'HLA-G5 solubile purificato dal supernatante della linea linfoblastoide (221GS) transfetta con l'HLA-G5 e l'HLA-B7 solubile è stato gentilmente fornito da Philippe Le Bouteiller U563 INSERM -Tolosa (Francia).

Per le colture cellulari abbiamo utilizzato un terreno completo composto da RPMI 1640 (Seromed, Wien, Austria), L-glutamina (2mM), amminoacidi non essenziali (1%), sodio piruvato (1%), 2-mercaptoetanololo ( $2 \times 10^{-5}$  M) (Gibco, Langley, Oklaoma) e gentamicina (10 $\mu$ g/ml) (Sigma, St. Louis, Missouri). Il terreno completo è stato addizionato con siero fetale bovino al 10% (HyClone Laboratories, Logan, UT).

### 2. I Soggetti

Per questo studio sono state coinvolte 36 donne gravide (Tabella 1). 30 di queste pazienti gravide hanno accettato di partecipare allo studio presso il Centro Ospedaliero Universitario di Tolosa, (Francia) e altre 6 pazienti invece affette da gravidanza ectopica, hanno accettato di partecipare allo studio presso il Centro Ospedaliero di Rijeka (Croazia). Tutte hanno ricevuto informazioni verbali e scritte sullo scopo della ricerca, e tutte hanno firmato il consenso informato. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico locale del Centro Ospedaliero Universitario Purpan di Tolosa e della Facoltà di Medicina, Rijeka. Tutte le pazienti erano in ottima salute, non avevano una storia di atopica o allergia e non stavano prendendo alcun

farmaco. Ventisei tra queste pazienti con gravidanza normale e senza aborto spontaneo pregresso (Tabella 1) hanno chiesto l'interruzione di gravidanza. Campioni di sangue periferico e di decidua sono stati ottenuti al momento dell'aborto spontaneo (alla 8<sup>a</sup>-11<sup>a</sup> settimana di gravidanza con cariotipo normale del trofoblasto).

Quattro pazienti con almeno 7±3 aborti spontanei precedenti nel primo trimestre di gravidanza, dichiarati “*sine causa*” sulla base dei criteri convenzionali (cromosomi parentali normali, isterosalpingografia e isteroscopia, biopsia endometriale, analisi ormonale compreso il FSH, LH, estradiolo, testosterone, colture di cellule della cervice per la presenza di ureoplasma, micoplasma e clamidia, lupus anticoagulante, anticorpi anti-fosfolipidi, test di funzionalità tiroidea), sono state studiate al momento di un successivo aborto spontaneo non spiegabile. La mucosa tubarica al sito dell'impianto dell'embrione e lontano dal sito dell'impianto è stata ottenuta da 6 pazienti con gravidanza ectopica senza aborti spontanei pregressi dopo asportazione chirurgica della tuba di Fallopio.

L'età media e i valori dell'età gestazionale dei tre gruppi di pazienti (gravidanza normale, aborto spontaneo ricorrente e gravidanza ectopica) non erano statisticamente differenti (Tabella 1).

Tabella 1: dati clinici da pazienti (aborto spontaneo ricorrente, gravidanza ectopica e i controlli).

	Gravidanza Normale	Aborto Spontaneo Ricorrente	Gravidanza Ectopica
<i>n</i>	26	4	6
Età (anni)	28±2 (25-35)	29±0.9 (28-30)	32±3 (29-36)
No. di Ab- Spo*	0	7±3 (4-10)	0
Età gestazionale (settimane)	9±0.6 (8-13)	9±1 (8-11)	8±1 (6-9)

1. I dati sono espressi come media±ES (variazione)

2. \*Numero dei pazienti con aborto spontaneo nella storia passata, escludendo le cause dell'aborto discusse in questo studio

### **3. Purificazione delle cellule T CD4<sup>+</sup> del sangue periferico e della decidua ottenute da donne con gravidanza normale**

Campioni di decidua basale sono stati ottenuti da donne sane che si sono sottoposte ad interruzione volontaria della gravidanza (8-12 settimane di gestazione). Le cellule mononucleate deciduali sono state isolate dalla decidua basale mediante digestione con collagenasi e gradiente di centrifugazione come descritto in precedenza (El Costa H, *et al.*, 2008). Le cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali sono state purificate da cellule non aderenti utilizzando kit di isolamento MACS CD4 (selezione positiva, Milteney Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Le cellule CD4<sup>+</sup> deciduali erano pure al 98%. Le cellule del sangue periferico (SP) dalle stesse donne gravide sono state ottenute come descritto (Barakonyi A, *et al.*, 2002). Le cellule T CD4<sup>+</sup> del SP sono state purificate utilizzando kit di isolamento MACS CD4 (selezione positiva, Milteney Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), con una purezza superiore al 99%.

### **4. Citometria a flusso**

Le cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali e del sangue periferico purificate sono state incubate con i seguenti anticorpi monoclonali fluorocromo-coniugati: anti-CD3-PE-Cy7, anti-CD4-Pacific Blue, anti-CD161-APC (BD-Bioscences, Franklin Lakes, New Jersey) e l'altro anti-CCR3-FITC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), anti-IL-23R-PerCP, anti-CCR4-mouse PE, anti-CCR8-rat PE, anti-CCR6-PE, anti-CXCR3 mouse-PE (R&D System, Minneapolis, MN) oppure anti-CRTH2-rat PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) o il loro rispettivo isotipo di controllo IgG1-PE-Cy7, IgG1-Pacific Blue, IgG1-APC, IgG2a-FITC, IgG2b-PerCP, IgG1-PE, IgG2b-PE (BD-Bioscences, Franklin Lakes, New Jersey), IgG2b-mouse PE, IgG2b-rat PE (R&D System, Minneapolis, MN). Le cellule marcate sono state analizzate con un citofluorimetro a flusso LSRII (BD-Bioscences, Franklin Lakes, New Jersey) e i dati ottenuti sono stati analizzati con FACSDiva software version 6.2 (BD-Bioscences).

## **5. Generazione di cloni T CD4+, da biopsie deciduali di gravidanza normale e di aborto spontaneo ricorrente, e da biopsia tubarica da gravidanza ectopica.**

Campioni di decidua (separati dal villo) e di tuba di Fallopio, sono state lavate due volte in PBS (con pH =7,2) e poi sminuzzate in piccoli frammenti (2-3 mm di diametro). Sono state generate linee cellulari T a breve termine da colture di singoli frammenti posti in coltura per una settimana in piastra da 24 pozzetti (Costar, Cambridge, Massachusetts) in 2 ml di RPMI 1640 integrato con L-glutammina (2 mM), 2-mercaptoetanololo ( $2 \times 10^{-5}$  M), amminoacidi non essenziali (1%), sodio piruvato (1%), gentamicina (10 $\mu$ g/ml) (terreno completo) e 10% di siero fetale bovino (Hyclone Laboratori, Logan, Utah) e IL-2 ricombinante umana (rIL-2, 20U/ml) (Eurocitus, Milano, Italia).

Da queste linee T, generate in presenza di IL-2, i cloni di cellule T CD4<sup>+</sup> sono stati poi generati. Cloni T CD4<sup>+</sup> sono stati derivati da cellule mononucleate del sangue periferico ottenute dalle stesse pazienti, utilizzando un metodo descritto altrove (Piccinni MP, *et al.*, 1998a).

## **6. Induzione della produzione di citochine dai cloni di cellule T**

Per indurre la produzione di citochine,  $2 \times 10^6$  blasti di cellule T, ottenuti da ciascun clone di cellule T, sono stati messi in coltura in terreno completo addizionato con siero fetale bovino al 10% in piastre da 96 pozzetti con fondo a U in presenza di anticorpi anti-CD3 (100ng/ml; Ortho Pharmaceuticals, Raritan, New Jersey) e di PMA (forbolo 12- miristico 13-acetato, 20ng/ml) (Sigma, St. Louis, MO) per 36 ore a 37°C, 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo 36 ore, i supernatanti di coltura sono stati raccolti, filtrati e conservati in aliquote a -70°C.

## **7. Determinazione delle concentrazioni di citochine nei supernatanti con bead-based multiplex immunoassays**

La determinazione simultanea della concentrazione delle seguenti citochine: IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, IFN- $\gamma$  è stata realizzata mediante bead-based

multiplex immunoassay (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA) e IL-17F, IL-22 (Millipore, Billerica, Massachusetts) e l'apparecchio Bioplex 200 (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA) come descritto altrove (Piccinni MP, *et al.*, 2014). In breve, il supernatante è stato incubato con biglie coniugate ad anticorpi monoclonali diretti contro le citochine sopra elencate in una piastra da 96 pozzetti. Dopo un incubazione di 30 minuti, e tre lavaggi un ulteriore incubazione di 30 minuti con una soluzione di anticorpi anti-citochina biotinilati è stata eseguita. Dopo tre lavaggi, sono stati aggiunti ad ogni pozzetto streptavidina coniugata PE. Dopo un lavaggio finale, ciascun pozzetto è stato sospeso con assay buffer (tampone di dosaggio) e analizzato con il sistema Bioplex 200 per la determinazione dell'intensità di fluorescenza media (MFI) associata alle biglie. Le concentrazioni delle citochine (pg/ml) sono state calcolate con il software Start Station a partire dalle curve standard per le diverse citochine.

## **8. Produzione e espressione di mRNA per citochine nelle linee cellulari T specifiche per l'antigene in assenza o presenza di HLA-G5**

La proteina ricombinante HLA-G5 è stata purificata da supernatanti di colture cellulari trasfettate specifiche, come precedentemente descritto (Fournel S, *et al.*, 1999). Linee di cellule T specifiche per la Streptochinasi (SK) sono state generate da 5 donatori come descritto altrove (Lombardelli L, *et al.*, 2013). Brevemente,  $10^6$  PBMC in 2 ml di RPMI 1640, completate con 2mM L-glutamina,  $2 \times 10^{-5}$  M mercaptoetanolo e 2,5% di siero umano (terreno completo) sono state stimolate in piastra da 24 pozzetti a fondo piatto per 5 giorni con l'antigene SK (1000 U/ml) in assenza e in presenza di HLA-G5 (1 $\mu$ g/ml) e in presenza o assenza di IL-4 ricombinante umana (RD Sistem, 200 pg/ml, Minneapolis, Minnesota) e IL-12 (RD System, 5000 pg/ml) come controllo di linee T CD4+ vitali e modulabili da citochine o anche molecole. IL-2 umano (Eurocetus, Milan, Itali) a 20 U/ml è stato poi aggiunto e le colture per ulteriori 9 giorni. I Blasti T sono stati sospesi in terreno completo e testati per la loro specificità per l'antigene come segue:  $2 \times 10^4$  di blasti sono stati seminati in micropiastre e co-coltivate per 48h con  $5 \times 10^4$  di cellule mononucleate del sangue periferico autologhe irradiate (9000 rad) in presenza di terreno di coltura o con l'antigene SK (1000 U/ml). Dopo 16 ore di coltura è stato

aggiunto 0.5  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H-TdR}$  (Amersham), le colture sono state fermate e la radioattività (cpm) è stata misurata con un  $\beta$ beta-counter. Il fenotipo delle cellule T specifiche per SK è stato valutato mediante analisi con cito-fluorimetria a flusso. Le linee cellulari T specifiche per la SK derivate sono  $\text{CD4}^+$ . Per indurre la produzione di citochine da parte delle linee cellulari T,  $10^6$  blasti T generati da ogni linea di cellule T specifiche per SK in assenza o in presenza di HLA-G5 e in presenza di IL-4 e IL-12 sono stati stimolati in presenza di PMA (20 ng/ml, Sigma, St Louis, MO), più anticorpi anti-CD3 (100 ng/ml, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey). Dopo 36h, i supernatanti di coltura sono stati raccolti e conservati in aliquote a  $-80^\circ\text{C}$  fino all'utilizzo. Le concentrazioni di IL-4, IL-17A, IFN- $\gamma$ , IL-17F sono state quantificate mediante bead-based multiplex immunoassay. I valori di citochine con 5 SD superiori a quelli ottenuti nei supernatanti di controllo, ottenuti da cellule di feeder irradiate stimolate, sono stati considerati come valore cut-off della produzione di citochine.

## **9. Quantificazione del mRNA con real-time quantitativa RT-PCR di IL-4, IL-17A, IL-17F, IL-23R, IFN- $\gamma$ , ROR-C e GATA-3**

L'RNA totale è stato estratto da cellule T  $\text{CD4}^+$  di sangue periferico (SP), da cellule T  $\text{CD4}^+$  deciduali appena isolate, da biopsie di tuba di Fallopio e da linee di cellule T specifiche per la streptochinasi utilizzando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) ed è stato trattato con DNAsi I (Qiagen, Venlo, NL). L'RNA totale è stato retrotrascritto a cDNA usando il Kit TaqMan  $\text{\textcircled{R}}$  Reverse transcript reagents (Applied Biosystem, Warrington, United Kingdom). RT-PCR è stata effettuata utilizzando la metodologia TaqMan, come descritto (Lombardelli L, *et al.*, 2013). L'analisi quantitativa di mRNA per IL-4, IL-17A, IL-17F, IL-23R, IFN- $\gamma$ , ROR-C, GATA-3 e  $\beta$ -actina è stata effettuata (Applied Biosystem, Warrington, United Kingdom).  $\beta$ -actina è stata utilizzata per la normalizzazione.

## **10. Analisi statistiche**

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software SSP (SPSS, Inc, Evanston, IL). A causa della distribuzione non parametrica, tutti i confronti tra le

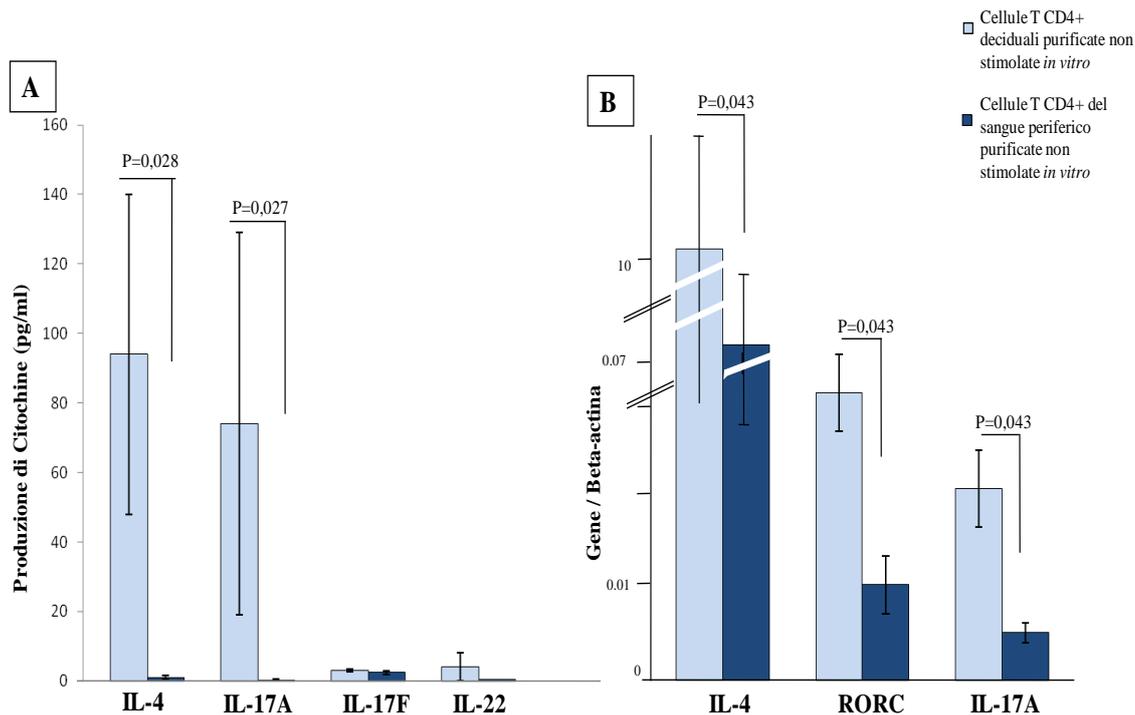
concentrazioni delle citochine, in condizioni normali e in condizioni di stimolazioni, sono state effettuate con test di Wilcoxon. Le percentuali delle popolazioni di cellule Th sono stati analizzati con il test di chi-quadro. E' stato considerato statisticamente significativo un valore con  $p < 0,05$ .

## RISULTATI

### **1. Produzione associata di IL-4 e IL-17A da parte dei linfociti T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> della decidua di donne con gravidanza normale**

Cellule T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> purificate dalla decidua e dal sangue periferico ottenuti da 9 pazienti con gravidanza normale, sono state coltivate in vitro in assenza di stimolazione per 24 ore e i livelli di IL-4, IL-17A, IL-17F e IL-22 sono stati misurati nel supernatante di coltura cellulare corrispondente (Fig.1).

Un aumento significativo nella produzione di IL-4 e IL-17A ( $p=0,028$  e  $p=0,027$ , rispettivamente) è stato osservato nei supernatanti di coltura delle cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali fresche purificate in assenza di stimolazione rispetto alle cellule T CD4<sup>+</sup> del sangue periferico delle stesse donne gravide (Fig.1A). Al contrario, non è stato rilevato nessun aumento significativo nella produzione di IL-17F e IL-22 nei stessi supernatanti di coltura di cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali rispetto a quelle del sangue periferico delle stesse donne gravide. Questi dati sono stati confermati analizzando anche l'espressione di mRNA per IL-4, IL-17A e ROR-C (fattore trascrizionale delle cellule Th17) espresse dalle cellule T CD4<sup>+</sup> appena isolate. Le cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali purificate non stimolate esprimono livelli maggiori di mRNA per IL-4, IL17A e ROR-C in confronto alle cellule T CD4<sup>+</sup> nel sangue periferico derivate dalle stesse 3 donne gravide (Fig.1B). Questi risultati mostrano una spontanea produzione associata di IL-4, citochina prototipica delle cellule Th2, e di IL-17A, citochina prototipica delle cellule Th17, da parte delle cellule T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> deciduali fresche nella gravidanza normale.

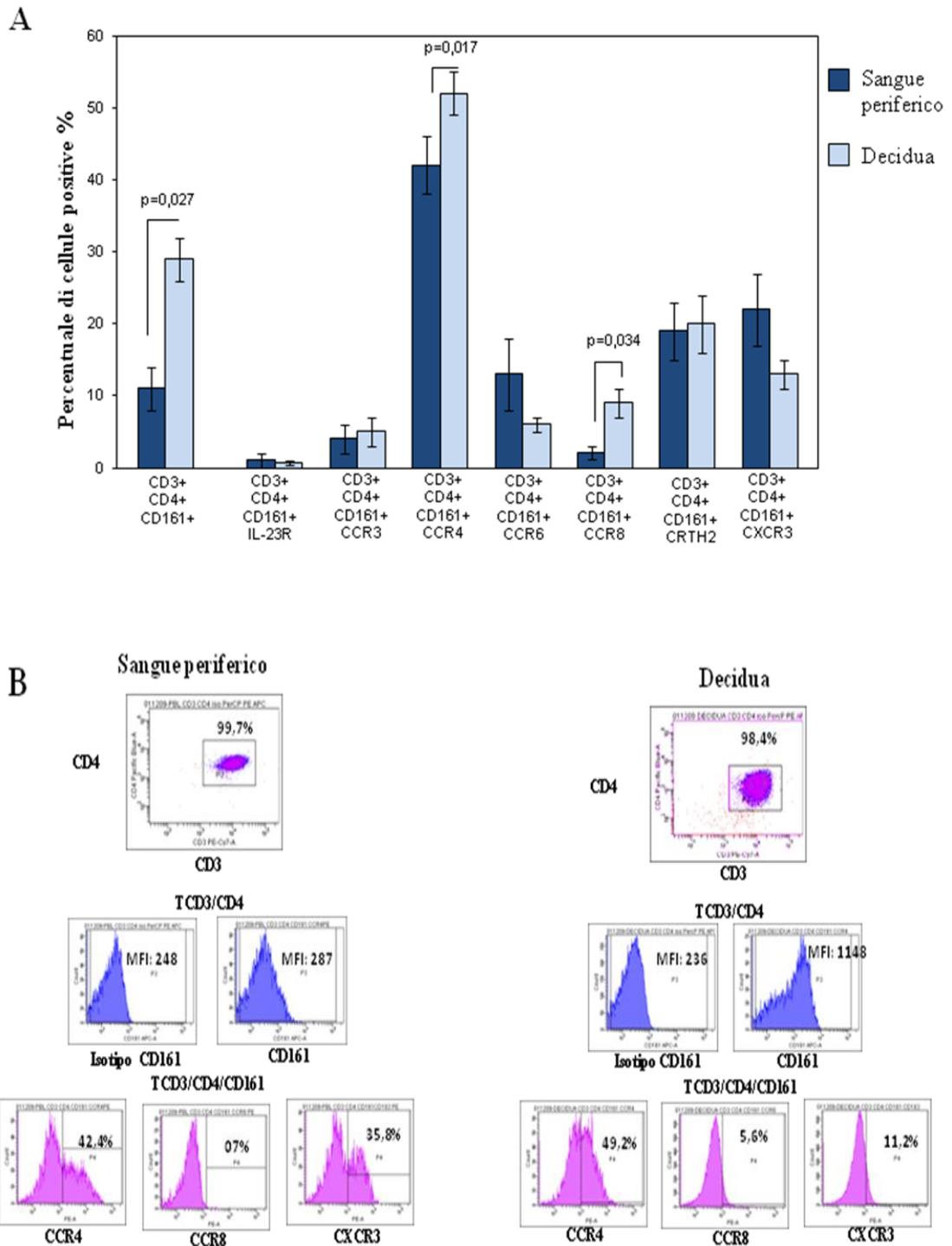


**Fig.1 (A)** Produzione di IL-4, IL-17A, IL-17F e IL-22 dalle cellule T CD4+ deciduali e del sangue periferico purificate non stimulate.  
**(B)** Espressione di mRNA per IL-4, RORC e IL-17A dalle cellule T CD4+ deciduali e del sangue periferico purificate non stimulate.

## 2. Espressione delle molecole di tipo Th2 e Th17 dalle cellule T CD3+ CD4+ deciduali nella gravidanza normale

Le cellule Th1 esprimono CXCR3, mentre le cellule Th2 esprimono CCR4, CCR8 e CRTH2 (Venet F, *et al.*, 2004; Pappas J, *et al.*, 2006; Zingoni A, *et al.*, 1998; Syrbe U, *et al.*, 1999). Dati recenti suggeriscono che le cellule Th17 esprimono CD161, IL-23 recettore (IL-23R), CCR6 e CCR4 (Klieinschek MA, *et al.*, 2009; Cosmi L, *et al.*, 2008).

Per caratterizzare fenotipicamente le cellule T CD4<sup>+</sup>, in grado di produrre IL-4 e IL-17A (citochine rispettivamente di tipo Th2 e Th17), derivate dalla decidua e dal sangue periferico di donne con gravidanza normale, sono stati studiati i marcatori di membrana espressi dalle cellule Th2, dalle cellule Th1 e dalle cellule Th17 senza stimolare le cellule *in vitro* mediante citofluorimetria a flusso (Fig.2).



**Fig 2 (A)** Caratterizzazione fenotipica dei marcatori di membrana espressi dalle cellule deciduali e di sangue periferico di donne con gravidanza normale e percentuali di cellule positive per i vari marcatori nei due compartimenti.  
**(B)** Analisi cito fluorimetrica dei marcatori di membrana espressi dalle cellule T CD4+ purificate dalla decidua e dal sangue periferico di una donna con gravidanza normale.

Abbiamo dimostrato che la percentuale di cellule T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> che esprimono CD161<sup>+</sup> (p=0,027), le cellule Th17, è significativamente più alta nella decidua rispetto al sangue periferico (Fig.2A). Inoltre, l'intensità di fluorescenza media (MFI) delle cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali per l'IL-17 è più alta rispetto a quella del sangue periferico (Fig.2B).

E' da notare soprattutto il fatto che i livelli di espressione di CD161 da parte delle cellule T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> deciduali sono più alti e associati ad alti livelli di espressione di CCR4 e CCR8 rispetto alle cellule del sangue periferico delle stesse donne (Fig.2B). Questi risultati indicano che le cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali esprimono contemporaneamente e spontaneamente sulla loro membrana dei marcatori che caratterizzano le cellule di tipo Th2 e Th17.

### **3. Aumento della produzione di IL-4, IL-17A, IL-17F e IL-22 da parte dei cloni di cellule T deciduali nella gravidanza normale**

172 e 55 cloni di cellule T CD4<sup>+</sup> sono stati generati rispettivamente da biopsie deciduali e dal sangue periferico ottenuti da 4 donne gravide che si sono sottoposte ad un interruzione volontaria della gravidanza. Le citochine IL-4, IL-17A, IL-17F, IL-22, e IFN- $\gamma$  sono state misurate nei supernatanti di cloni T CD4<sup>+</sup> mediante multiplex bead-based assay.

Nella gravidanza normale, i cloni T CD4<sup>+</sup> deciduali producono alti livelli di IL-4 (p=0,000004), una citochina di tipo Th2, IL-17A (p=0,015), IL-17F (p=0,023), IL-22 (p=0,006), tre citochine di tipo Th17, rispetto ai cloni di cellule T del sangue periferico (Fig.3). Al contrario, la produzione di IFN- $\gamma$  da parte dei cloni T era più bassa (p=0,0001) nella decidua rispetto al sangue periferico (Fig.3). Questi dati confermano la produzione associata di IL-4, IL-17A, IL-17F e IL-22 da parte delle cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali nella gravidanza normale in confronto alle stesse cellule nel sangue di donne gravide, ma anche la produzione maggiore di queste citochine nella decidua in confronto al sangue periferico.

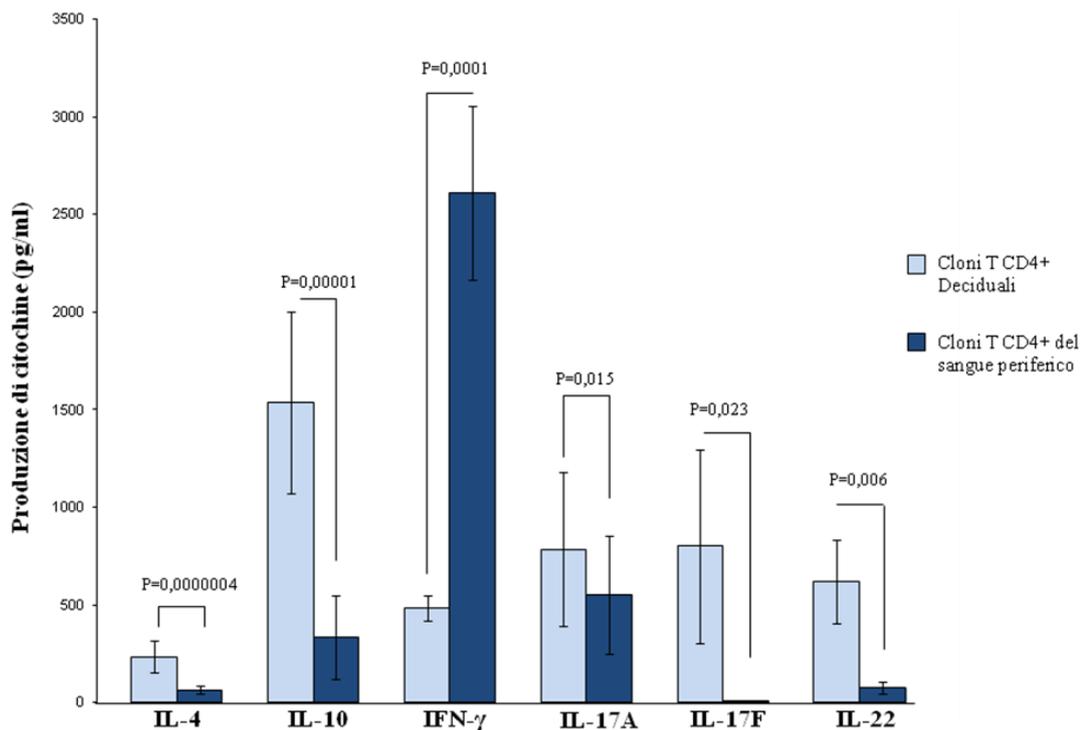


Fig.3 Produzione associata di IL-4, IL-17A, IL-17F e IL-22 da parte di cloni di linfociti T CD4+ deciduali nella gravidanza normale.

#### 4. Prevalenza di cellule CD4<sup>+</sup> Th17/Th2 nella decidua di gravidanza normale mentre le cellule Th17 e Th17/Th1 sono prevalenti nella decidua di aborto spontaneo ricorrente inspiegato

Abbiamo dimostrato una produzione associata di citochine di tipo Th2 e Th17 nella gravidanza normale. I nostri precedenti esperimenti non hanno dimostrato però se le citochine di tipo Th17 (IL-17A, IL-17F e IL-22), e le citochine di tipo Th2, l'IL-4, sono prodotte da due diverse sottopopolazioni di cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali oppure se la stessa cellula T CD4<sup>+</sup> produce simultaneamente citochine di tipo Th2 e Th17. In effetti, una parte delle cellule umane che producono IL-17A sono in grado di produrre anche IL-4 [queste cellule sono state chiamate Th17/Th2 (Cosmi L, *et al.*, 2010)] e un'altra parte di cellule Th17 producono anche IFN- $\gamma$  [queste cellule vengono chiamate Th17/Th1 (Annunziato F, *et al.*, 2007)]. Per studiare la possibilità che nella gravidanza normale la stessa sottopopolazione di cellule CD4<sup>+</sup> possa produrre sia IL-4 che IL-17, abbiamo analizzato non solo le percentuali di cellule Th0, Th1, Th2 e Th17 ma anche le percentuali di cellule Th17/Th1 (le quale

producono IL-17A, IL-17F, IL-22 e IFN- $\gamma$ ), di cellule Th17/Th2 (le quale producono IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-4), e di cellule Th17/Th0 (le quale producono IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-4 e IFN- $\gamma$ ).

Cloni di cellule T CD4<sup>+</sup> sono stati derivati dalla decidua di 4 donne con gravidanza normale, sottoposte ad interruzione volontaria di gravidanza, e dalla decidua di 4 donne poliabortive, già andate incontro in precedenza ad almeno tre aborti spontanei non spiegati mediante i criteri convenzionali, che abbiamo studiato al momento di un successivo aborto spontaneo (cariotipo normale del trofoblasto). Non abbiamo visto nessuna differenza significativa tra la percentuale di cloni di cellule T CD4<sup>+</sup> di Th1, Th0 e Th17/Th0 generate dalla decidua della gravidanza normale e da quelli generati dall'aborto spontaneo (Fig.4A). Nella gravidanza normale, abbiamo trovato che il 26% dei cloni di cellule T CD4<sup>+</sup> produce IL-17 (54/208 cloni T). Al contrario, nell'aborto ricorrente inspiegato, il 59% dei cloni di cellule T producono IL-17 (103/174 cloni T). Così, secondo quanto è stato riportato da Wang (2010b) e Nakashima (2010), sembra in effetti che la percentuale di tutte le cellule che producono IL-17, se non sono analizzate le sottopopolazioni di tipo Th17, è più elevata nel aborto ricorrente inspiegato rispetto alla gravidanza normale (p=0,000001). Abbiamo trovato che tutti i cloni di cellule T di tipo Th17, Th17/Th2 e Th17/Th1 producono IL-22. Analizzando in modo approfondito le sottopopolazione Th17, la percentuale di Th17 deciduali “pure” (i quali producono solo IL-17A, IL-17F e IL-22) (p=0,000001) e di cloni T deciduali Th17/Th1 (i quali producono IL-17A, IL-17F, IL-22, più IFN- $\gamma$ ) (p=0,00001) era significativamente più alta nell'aborto ricorrente inspiegato rispetto alla gravidanza normale (Fig.4A). E' interessante notare che nella gravidanza normale non sono presenti a livello deciduale né cellule Th17 pure né cellule Th17/Th1. Mentre, la percentuale di cloni T di tipo Th2 (p=0,00001) e Th17/Th2 (producono IL-17A, IL-17F, IL-22, più IL-4 ) (p=0,001) è significativamente maggiori nella decidua di gravidanza normale rispetto alla decidua di donne poliabortive “*sine causa*” (Fig.4A).

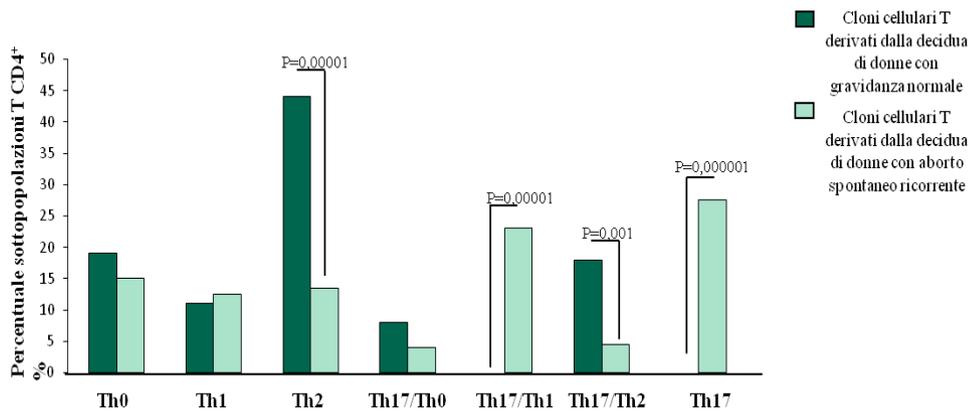


Fig. (4A) Distribuzione delle sottopopolazioni di linfociti T helper CD4<sup>+</sup> deciduali nella gravidanza normale e nell'aborto spontaneo ricorrente.

Misurando i livelli di IL-17A e IL-17F prodotti dalla totalità dei cloni T CD4<sup>+</sup> produttori IL-17 ottenuti da donne con gravidanza normale (54 cloni di cellule T) e dalla totalità dei cloni T CD4<sup>+</sup> produttori IL-17 ottenuti da donne poliabortive (103 cloni di cellule T), non abbiamo trovato un aumento significativo di IL-17A e IL-17F prodotte dai cloni T CD4<sup>+</sup> generati dalla decidua di donne poliabortive rispetto alla produzione di IL-17A e IL-17F da parte dei cloni T CD4<sup>+</sup> generati dalla decidua di donne con gravidanza normale (Fig.4B).

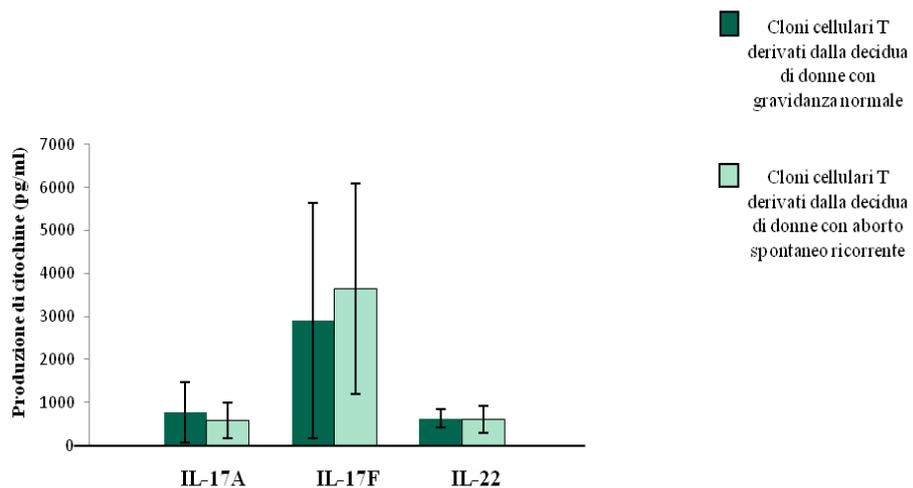


Fig. (4B) Produzione di IL-17A, IL-17F e IL-22 da parte della totalità dei cloni cellulari T CD4<sup>+</sup> produttori IL-17 ottenuti dalla decidua di gravidanza normale e dalla decidua di aborto spontaneo ricorrente.

Questi risultati indicano che gli aborti spontanei ricorrenti non sono necessariamente associati con i livelli aumentati di IL-17A e IL-17F prodotte da cellule T CD4<sup>+</sup> contrariamente a ciò che Wang (2010b) e Nakashima (2010) suggeriscono. Inoltre, abbiamo misurato i livelli di IL-17 prodotti dai cloni Th17/Th2 nella gravidanza normale (18% di cloni di cellule T) e nell'aborto ricorrente inspiegato (4,5% di cloni di cellule T) e abbiamo dimostrato che i livelli di IL-17A prodotti dalle cellule Th17/Th2 nella gravidanza normale è più elevata (9507±7000 pg/ml) rispetto ai livelli di IL-17A prodotti dalle cellule Th17/Th2 nell'aborto ricorrente inspiegato (137±80 pg/ml) (p=0,0001) (Dati non mostrati).

Questi risultati confermano ulteriormente che l'alta produzione di IL-17 non è associata con l'aborto spontaneo ricorrente.

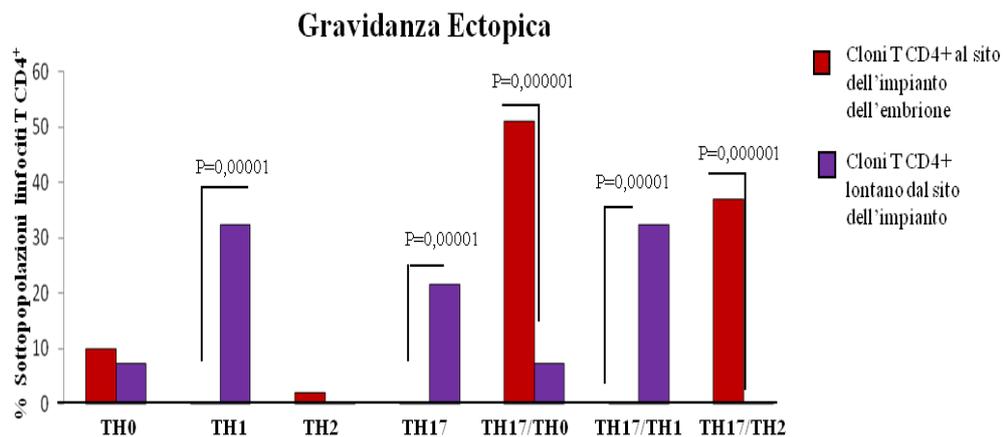
Abbiamo dimostrato che, IL-17A, IL-17F e IL-22, così come IL-4 sono prodotte dalla stessa sottopopolazione di cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali (le cellule Th17/Th2) nella gravidanza normale e non da due sottopopolazioni (Th2 e Th17) diversi di cellule T CD4<sup>+</sup>, in effetti le cellule Th2 sono presenti le cellule pure Th17 non sono presenti nella gravidanza normale (Fig.4A). La IL-17 prodotta dalle cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali non sembra essere associata in particolare con l'aborto spontaneo o con l'aborto ricorrente inspiegato, come è stato riportato (Wang WJ, *et al.*, 2010b; Nakashima A, *et al.*, 2010). La IL-17 prodotta dalle cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali, se associate con la produzione di IL-4, non è sempre deleteria per la gravidanza.

## **5. Le cellule T CD4<sup>+</sup> Th17/Th2 sono esclusivamente presenti al sito dell'impianto nella gravidanza ectopica**

Le cellule deciduali Th17/Th2 sembrano essere importanti per lo sviluppo della gravidanza normale. Ci siamo chiesti se queste cellule fossero presenti al sito dell'impianto dell'embrione e se potessero avere un ruolo importante per l'impianto dell'embrione. Per rispondere a questa domanda, abbiamo studiato i cloni T derivati dalla tuba di Fallopio di 3 donne affette da gravidanza ectopica. Abbiamo valutato non solo la percentuale di cloni Th0, Th1, Th2 e Th17, ma anche le percentuali di cloni Th17/Th1 (producendo IL-17A, IL-17F, IL-22 e IFN- $\gamma$ ) e di cloni Th17/Th2 (producendo IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-4) e di cloni Th17/Th0 (producendo IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-4 e IFN- $\gamma$ ) tra tutti i cloni T CD4<sup>+</sup> derivate dal sito

dell'impianto dell'embrione (N=133) e abbiamo comparato le percentuali di queste sottopopolazioni con quelle derivate dalla stessa tuba lontano dal sito dell'impianto dell'embrione (N=62).

Non ci sono differenze significative nella percentuale di cloni di cellule T CD4<sup>+</sup> Th2 e Th0 puri generati dalla tuba al sito dell'impianto e lontano dal sito dell'impianto (Fig.5A). Al sito dell'impianto la percentuale dei cloni di cellule T CD4<sup>+</sup> di tipo Th17/Th2 (p=0,000001) e di tipo Th17/Th0 (p=0,000001) è maggiore rispetto alle percentuali di queste cellule lontano dal sito dell'impianto. Al contrario, la percentuale di cloni Th1 (p=0,00001), Th17 puri (p=0,00001) e Th17/Th1 (p=00001) è maggiore lontano dal sito dell'impianto rispetto che al sito dell'impianto dell'embrione dove i cloni Th1, Th17 e Th17/Th1 non sono presenti (Fig.5A).

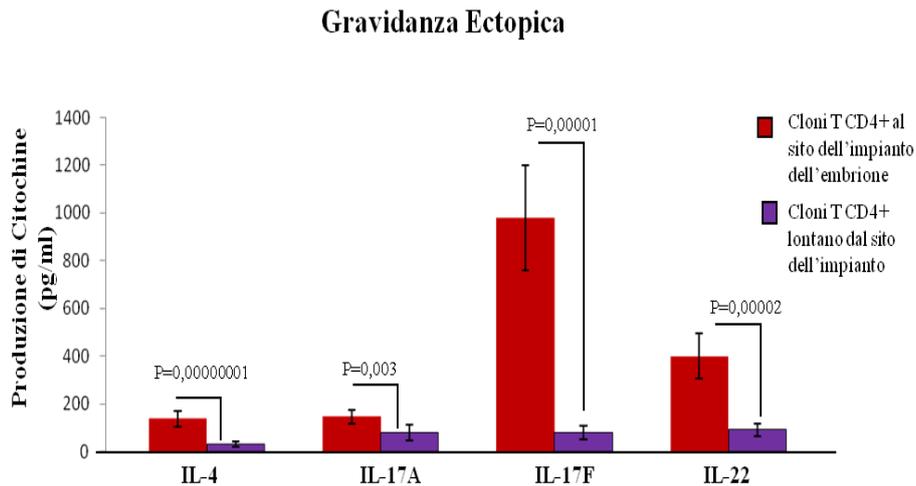


**Fig. (5A)** Percentuali delle sottopopolazioni di cloni T CD4<sup>+</sup> al sito dell'impianto dell'embrione e lontano dal sito dell'impianto di donne con gravidanza extrauterina.

Così, le cellule Th17/Th1 sono presenti solo lontano dal sito dell'impianto oppure, come visto prima, nella decidua di aborti spontanei ricorrenti. In altre parole, sembra che le cellule Th17/Th1 e le Th17 pure, insieme alle cellule Th1, si osservino nei siti dove non c'è nessun impianto dell'embrione o quando l'impianto fallisce. Al contrario, le Th17/Th2 sono prevalenti nella gravidanza normale e sono esclusivamente presente al sito dell'impianto dell'embrione.

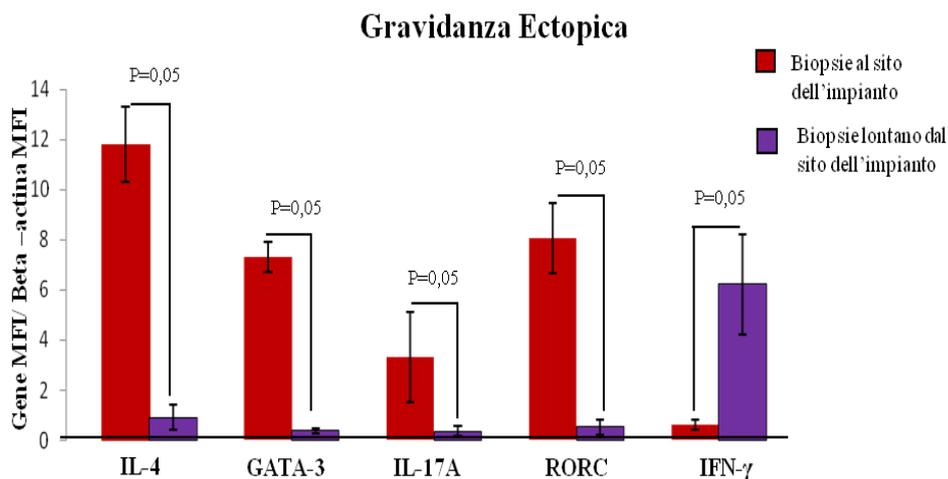
I livelli di IL-4 (p=0,00000001), IL-17A (p=0,003), IL-17F (p=0,00001) e IL-22

( $p=0,00002$ ), prodotte dalle cellule T CD4<sup>+</sup> sono maggiori al sito dell'impianto rispetto ai livelli di queste citochine lontano del sito dell'impianto (Fig.5B), indicando che al sito dell'impianto c'è un aumento di produzione di citochine di tipo Th2 e Th17.



**Fig. (5B)** Citochine prodotte da cloni cellulari T CD4<sup>+</sup> derivati dal sito dell'impianto dell'embrione e dalla tuba lontano dal sito dell'impianto in donne con gravidanza extrauterina.

Inoltre, abbiamo confermato questi risultati a livello di mRNA nelle biopsie della tuba di Fallopio prelevate al sito dell'impianto dell'embrione e lontano dal sito dell'impianto di 3 altre donne affette da gravidanza ectopica. Al sito dell'impianto, i livelli di mRNA per molecole di tipo Th2 (IL-4 e GATA-3) e per le molecole di tipo Th17 (IL-17A e ROR-C) sono aumentati rispetto ai livelli di mRNA per queste molecole lontano dal sito dell'impianto. Al contrario, lontano dal sito dell'impianto i livelli di mRNA per l'IFN- $\gamma$  è aumentato rispetto ai livelli di mRNA espressi al sito dell'impianto dell'embrione (Fig.5C).



**Fig. (5C)** Espressione di mRNA per IL-4, GATA-3, IL-17A, RORC e IFN- $\gamma$  in biopsie tubariche di donne con gravidanza extrauterina.

Questi risultati, suggeriscono che al sito dell'impianto si accumulino cellule CD4<sup>+</sup> Th17/Th2 che producono IL-4 e IL-17A e sembrano quindi confermare l'importanza di queste cellule per l'impianto dell'embrione, mentre dove l'impianto non avviene prevale l'IFN- $\gamma$ .

## **6. HLA-G5 media lo sviluppo delle cellule Th17/Th2 tramite l'aumento della produzione di IL-4 e IL-17A dalle cellule T helper CD4<sup>+</sup>**

Ci possiamo chiedere quale potrebbe essere il fattore presente nel microambiente uterino, in grado di indurre la differenziazione di Th17 in cellule Th17/Th2.

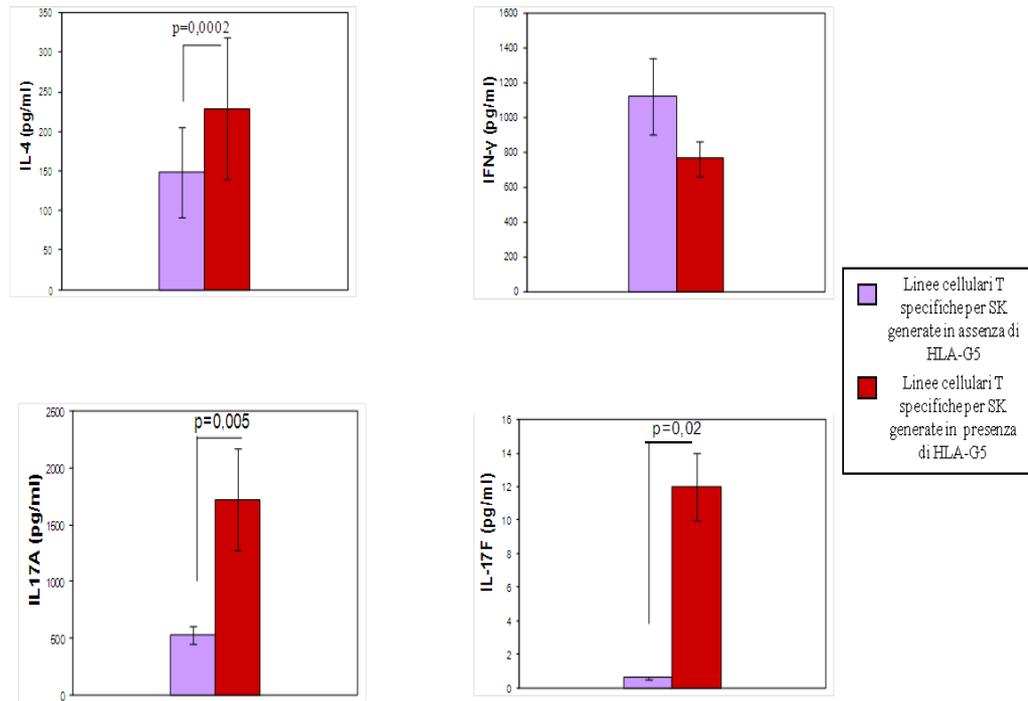
Anni fa, abbiamo riportato che il progesterone ad elevate concentrazioni, paragonabili a quelle presenti all'interfaccia materno-fetale, induce la produzione di IL-4 da parte delle cellule T CD4<sup>+</sup> (Piccinni MP, *et al.*, 1995). Recentemente è stato dimostrato che il progesterone inibisce la produzione di IL-17 e sopprime le risposte Th17 (Xu L, *et al.*, 2013). Così, il progesterone non può essere il fattore responsabile dello sviluppo di cellule Th17/Th2. Molto recentemente, abbiamo dimostrato che l'HLA-G5 solubile induce un aumento della produzione di IL-4 dalle cellule T helper CD4<sup>+</sup> (Lombardelli L, *et al.*, 2013). Ci siamo chiesti se l'HLA-G5 potrebbe indurre anche la produzione di IL-17A e IL-17F da parte delle cellule T CD4<sup>+</sup> e potrebbe

essere il fattore responsabile dello sviluppo delle cellule Th17/Th2 al sito dell'impianto nella gravidanza normale. Per studiare il possibile ruolo di HLA-G5 sulla produzione di IL-4 e IL-17 dalle cellule T specifiche per l'antigene, abbiamo generato da 5 donatori cloni cellulari T CD4<sup>+</sup> deciduali da linee di cellule T specifiche per la streptochinasi (SK) generate in presenza o in assenza di HLA-G5. Abbiamo usato, come controllo delle linee, le cellule mononucleate del sangue periferico degli stessi soggetti che sono stati stimolati con SK in presenza di IL-4, un potente induttore del differenziamento in Th2 (Maggi E, *et al.*, 1992) e l'IL-12, un potente induttore del differenziamento in Th1 (Manetti R, *et al.*, 1993), le quali indicano che le linee T specifiche per la SK sono modulate nelle nostre condizioni di coltura.

Abbiamo misurato le citochine presenti nei supernatanti delle linee di cellule T specifiche per SK (Fig.6). Abbiamo trovato un significativo aumento della secrezione di IL-4 ( $p=0,0001$ ) in risposta a IL-4 e un aumento significativo di IFN- $\gamma$  ( $p=0,006$ ) in risposta a IL-12 (dati non mostrati), che suggeriscono che le condizioni di coltura sono stati soddisfacenti per la modulazione del profilo delle citochine dalle linee di cellule T (controllo dell'esperimento).

Un aumento statisticamente significativo di IL-4 ( $p=0,0002$ ), IL-17A ( $p=0,005$ ) e IL-17F ( $p=0,028$ ) è stato osservato nelle linee di cellule T specifiche per SK generate in presenza di HLA-G5 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) (Fig.6A).

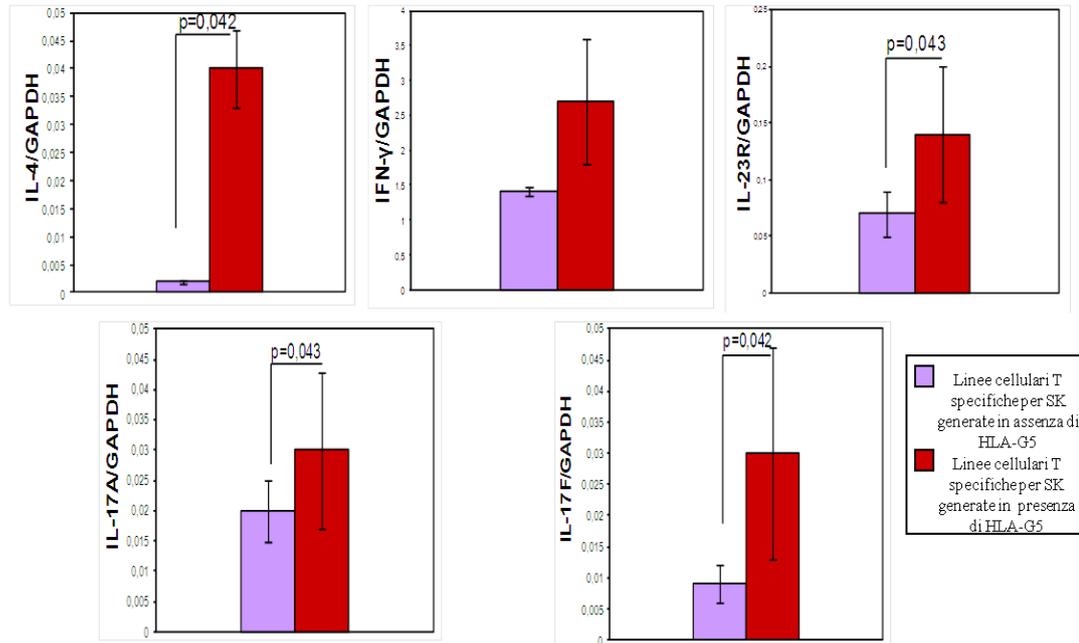
## Produzione di citochine



**Fig. (6A)** Produzione di IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-17F da parte di linee cellulari T specifiche per la streptokinasi generate in presenza o in assenza di HLA-G5.

Questi dati sono stati confermati anche a livello di mRNA. Abbiamo quindi analizzato i livelli di mRNA delle citochine nelle linee di cellule T specifiche per SK mediante RT-PCR (Fig.6B). Un aumento statisticamente significativo dell'espressione del mRNA per IL-4 ( $p=0,042$ ), IL-17A ( $p=0,043$ ), IL-17F ( $p=0,042$ ) e IL-23R (recettore espresso dalle cellule Th17) ( $p=0,043$ ), è stato osservato nelle linee di cellule T specifiche per SK generate in presenza di HLA-G5 rispetto alle linee T CD4<sup>+</sup> generate in assenza di HLA-G5 (Fig. 6B). Al contrario, non sono state osservate differenze significative dell'espressione del mRNA per l'IFN- $\gamma$  tra le linee di cellule T generate in presenza o in assenza di HLA-G5 (Fig.6B). Questi risultati hanno confermato i risultati ottenuti a livello di proteine.

### Espressione di mRNA per citochine



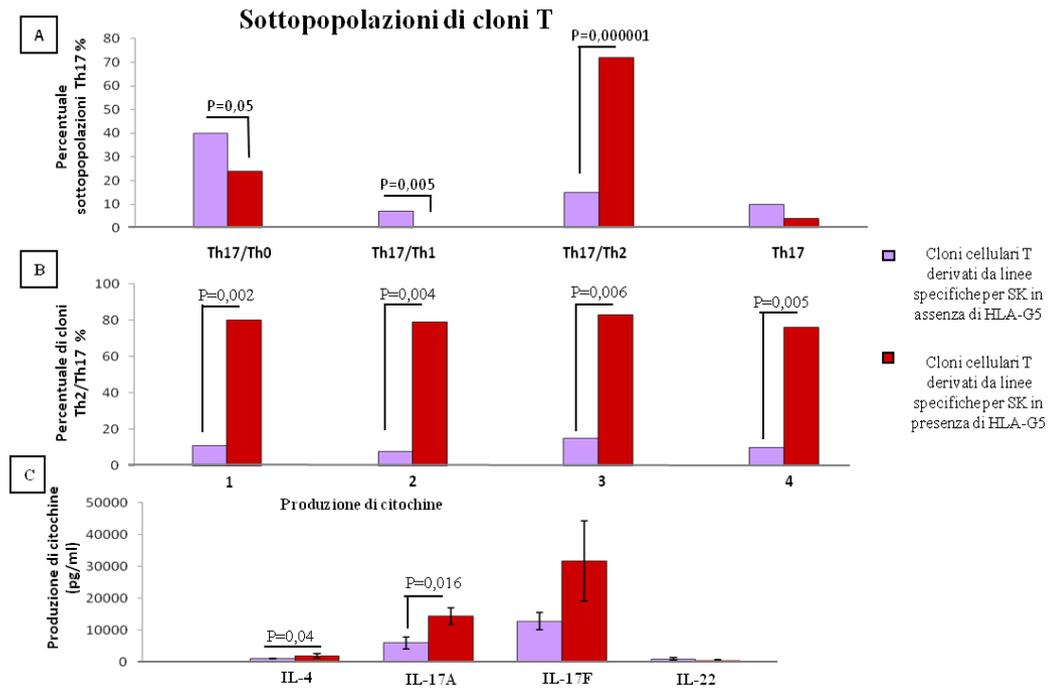
**Fig. (6B)** Espressione di mRNA per IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-23R, IL-17A e IL-17F da parte di linee cellulari T specifiche per la streptokinasi generate in presenza o in assenza di HLA-G5.

Abbiamo derivato cloni T CD4<sup>+</sup> specifici per SK da ogni linea cellulare ottenute da 4 soggetti (68 cloni di cellule T in assenza di HLA-G5 e 87 cloni di cellule T in presenza di HLA-G5) ed è stato analizzato la loro capacità di produrre IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-22, IL-17A e IL-17F (Fig.7A). Abbiamo analizzato la distribuzione delle diverse sottopopolazioni di cellule Th17/Th1 (producono 17A, IL-17F, IL-22 e IFN- $\gamma$ ) Th17/Th2 (producono 17A, IL-17F, IL-22 e IL-4) Th17/Th0 (producono 17A, IL-17F, IL-22, IL-4 e IFN- $\gamma$ ) e la percentuale di cloni Th17 puri derivati dalle linee T specifiche per SK e modulate in presenza o in assenza di HLA-G5 (Fig.7A,7B).

La percentuale dei cloni di cellule T CD4<sup>+</sup> Th17/Th2 è aumentata in presenza di HLA-G5 (p=0,000001) (Fig.7A). Questo aumento è stato osservato in tutti i cloni derivati dai 4 soggetti che abbiamo studiato (Fig.7B). Per contro, la percentuale di cloni di cellule T Th17/Th1 (p=0,005) e Th17/Th0 (p=0,05) è diminuito in presenza di HLA-G5, mentre non c'è nessuna differenza nella percentuale di cloni Th17 in assenza o in presenza di HLA-G5 (Fig.7A).

Siccome si evidenzia una piccola percentuale di cloni Th17/Th2 in assenza di HLA-G5 (Fig.7A), abbiamo analizzato i livelli di citochine di tipo Th2 e Th17 prodotte dai cloni di cellule Th17/Th2 in assenza o in presenza di HLA-G5. Abbiamo trovato un

aumento significativo di IL-4 ( $p=0,04$ ) e IL-17A ( $p=0,015$ ) nei cloni di cellule Th17/Th2 generati in presenza di HLA-G5 in confronto ai livelli di IL-4 e IL-17A in assenza di HLA-G5, mentre i livelli di IL-17F e IL-22 non sono stati significativamente modificati (Fig.7C).



**Fig. (7A)** Distribuzione dei cloni cellulari CD4+ Th17/Th0, Th17/Th1, Th17/Th2 e Th17 derivati da linee cellulari T specifiche per streptokinasi generate in presenza o in assenza di HLA-G5. **(7B)** Percentuale di cloni cellulari CD4+ Th17/Th2 derivati da linee cellulari T specifiche per la Streptokinasi (SK) generate in assenza di HLA-G5 ottenute da 4 donatori sensibilizzati alla SK. **(7C)** Produzione di IL-4, IL-17A, IL-17F e IL-22 da parte di cloni cellulari T CD4+ derivati da linee cellulari T specifiche per la SK generate in presenza o in assenza di HLA-G5.

L'HLA-G5 è in grado di indurre la produzione associata di citochine di tipo Th2 (IL-4) e di tipo Th17 (IL-17) da parte di cellule T specifiche per l'antigene, potrebbe quindi essere uno dei fattori del microambiente uterino responsabile dello sviluppo di cellule Th17/Th2 presente al sito dell'impianto dell'embrione e nella gravidanza normale.

## DISCUSSIONE

Anche se i nostri risultati sembrano confermare i risultati riportati da Wang *et al* (2010b) e Nakashima *et al* (2010), che suggeriscono che la percentuale di cellule T CD4<sup>+</sup>, che producono IL-17 nella decidua di aborto ricorrente, è maggiore rispetto a quella nella decidua di gravidanza normale, non abbiamo visto però un aumento significativo della produzione di IL-17 da parte dei cloni T CD4<sup>+</sup> generati dalla decidua di donne con una gravidanza normale rispetto alla produzione di IL-17 da parte dei cloni T CD4<sup>+</sup> generati dalla decidua di donne poliabortive. Nessuno di questi autori (Wang WJ, *et al.*, 2010, Nakashima A., *et al.*, 2010), ha misurato i livelli di IL-17 prodotti dalle cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali nella gravidanza normale e nell'aborto, nessuno di loro ha analizzato le sottopopolazioni Th17 in grado di produrre IL-4 o IFN- $\gamma$  rispettivamente, in associazione con l'IL-17 (Th2/Th17 e Th1/Th17). Inoltre, nessuno di questi autori ha studiato le cellule Th17 al sito dell'impianto dell'embrione. Nella presente tesi, abbiamo dimostrato che il numero di cloni T CD4<sup>+</sup> che producono IL-17 è maggiore nella decidua rispetto al sangue periferico di gravidanza normale, e soprattutto, abbiamo dimostrato un'associazione della produzione di IL-4 e IL-17 da parte di un gran numero di cloni T CD4<sup>+</sup> deciduali (18% dei cloni Th17/Th2) nella gravidanza normale rispetto all'aborto spontaneo ricorrente (4,5 % di cloni Th17/Th2).

In effetti, abbiamo visto che le cellule T CD4<sup>+</sup> fresche purificate ottenute da decidua di donne con gravidanza normale già attivate dal trofoblasto in vivo come abbiamo recentemente dimostrato (Lombardelli L, *et al.*, 2013), possono produrre spontaneamente e contemporaneamente IL-4 e IL-17 senza alcun ulteriore stimolazione in vitro. In particolare è stato dimostrato che questa produzione associata proviene dalla stessa cellula, che risulta quindi avere un fenotipo di tipo Th17/Th2. Le cellule CD4<sup>+</sup> Th17/Th2 deciduali sono caratterizzate dall'espressione contemporanea dei marcatori delle cellule Th17 (CD161, CCR4) e di marcatori delle cellule Th2 (CCR4, CCR8). L'associata produzione di IL-4 e IL-17 da parte di cellule Th17/Th2 è stato precedentemente osservata nei disturbi allergici noti per essere caratterizzati da una risposta immunitaria di tipo Th2 (Cosmi L, *et al.*, 2010). In questo studio sull'asma allergico la percentuale delle cellule Th17/Th2 nel sangue periferico di soggetti sani era molto bassa (0,04%) e non aumentava molto nel sangue periferico di pazienti allergici con asma cronica (1,3%). A nostra conoscenza,

il nostro studio ha dimostrato per la prima volta una condizione fisiologica, la gravidanza non patologica, in cui la percentuale delle cellule Th17/Th2 (18% di cloni Th17/Th2 derivati senza condizionamento citochinico *in vitro*) è così alta. Lo studio sull'asma allergico ha riportato che 0% di cloni Th17/Th2 sono stati derivati dalle cellule CD161<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> Th17 purificate dal sangue periferico coltivate in solo terreno di coltura, ma se le cellule Th17 CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> erano coltivate in presenza di IL-4 (induttore di risposte Th2), la percentuale delle cellule Th17/Th2 aumentava fino a 14% (Cosmi L, *et al.*, 2010).

Questi risultati suggeriscono che lo “switch” delle cellule Th17 verso cellule Th17/Th2, potrebbe essere dovuto dalle citochine del microambiente in particolare alla IL-4 che abbiamo dimostrato anni fa essere prodotta dalle cellule T CD4<sup>+</sup> della decidua in risposta ad alte concentrazioni di progesterone (Piccinni MP, *et al.*, 1995). I nostri risultati non confermano quelli riportati da Wang (2010, 2013) che affermano che le cellule Th17 promuovono l'aborto spontaneo ed essere deleterie per la gravidanza a causa della loro capacità ad indurre il rigetto degli alloantigeni paterni presenti sul trofoblasto (Chen H, *et al.*, 2009).

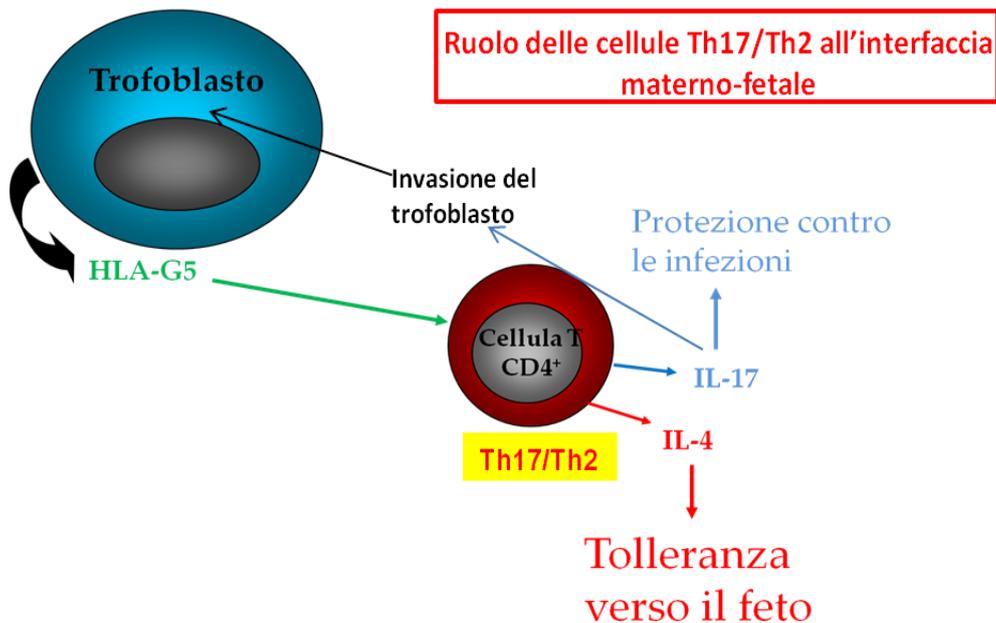
I nostri dati non hanno dimostrato un ruolo patogenico della IL-17 prodotta dalle cellule T CD4<sup>+</sup> per la gravidanza, ma piuttosto un ruolo benefico durante il primo trimestre della gravidanza umana delle cellule Th17 quando producono la IL-4.

Inoltre, abbiamo dimostrato che le cellule Th17/Th2 sono presenti esclusivamente nel sito dell'impianto dell'embrione, mentre sono assenti lontano da tale sito. Mentre, le cellule Th17/Th1 e le cellule Th17 prevalgono, non solo quando l'impianto dell'embrione non avviene (lontano dal sito d'impianto) ma anche quando l'impianto fallisce durante l'aborto spontaneo. Questi dati suggeriscono che l'accumulo di cellule Th17/Th2 al sito dell'impianto dell'embrione potrebbe intervenire nella regolazione e nel controllo dell'impianto dell'embrione favorendo la recettività dell'endometrio all'embrione stesso.

Infine, abbiamo dimostrato che l'HLA-G5 un fattore presente nel microambiente uterino prodotto dalle cellule del trofoblasto e dall'embrione (Le Bouteiller P, 2014), sia responsabile, almeno in parte, dello sviluppo delle cellule Th17/Th2 che sembrano essere cruciali per l'impianto dell'embrione, aumentando quelli di IL-4, IL-17A e IL-17F prodotti dalle cellule T CD4<sup>+</sup>.

Le risposte immunitarie contro le infezioni durante la gestazione, possono essere responsabili di un gran numero di casi di aborti spontanei. In effetti le infezioni dell'apparato genitale portano ad un incremento 5 volte più elevato di rischio di aborto spontaneo. Queste risposte immunitarie sembrano essere preferenzialmente dirette contro gli agenti patogeni microbici e extracellulari e coinvolgono la IL-23, la IL-10 e la IL-6, così come la risposta immunomediata di tipo Th17, mentre il fattore di necrosi tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la IL-1 $\beta$  e le risposte di tipo Th1 sono inibite nell'ambiente uterino, in entrambi i compartimenti fetale e amniotico (Witkin SS, *et al.*, 2011). In effetti le cellule Th17 hanno come ruolo principale, la protezione contro i batteri extracellulari. Le citochine di tipo Th17 mediano l'attivazione di cellule epiteliali, macrofagi, fibroblasti e cellule endoteliali, che a loro volta producono chemochine e citochine responsabili del reclutamento di granulociti neutrofili, in grado di eliminare i batteri e contribuiscono all'infiammazione cronica del tessuto. In effetti recentemente uno studio ha riportato (Nakashima A, *et al.*, 2010), che il numero delle cellule IL-17<sup>+</sup> correlava positivamente con il numero dei neutrofili nella decidua di donne gravide. Dunque la IL-17 potrebbe svolgere un ruolo importante nell'induzione di risposte immunitarie protettive mediate dai neutrofili granulociti contro batteri extracellulari.

Possiamo ipotizzare che la produzione di IL-4/IL-17 da parte delle cellule T CD4<sup>+</sup> deciduali al sito dell'impianto dell'embrione potrebbe essere benefico e utile per il mantenimento della gravidanza, perché: 1) la IL-4 induce una tolleranza al semi-allotrapianto fetale, 2) la IL-17 può promuovere una risposta adeguata necessaria per proteggere la madre contro i patogeni extracellulari dannosi per il mantenimento della gravidanza, 3) la IL-17 potrebbe favorire la proliferazione e l'invasione del citotrofoblasto extravillioso umano (Pongcharoen S, *et al.*, 2006; Wu HX, *et al.*, 2014), necessaria allo sviluppo della gravidanza (Moffett e Loke, 2006) (Fig.8)

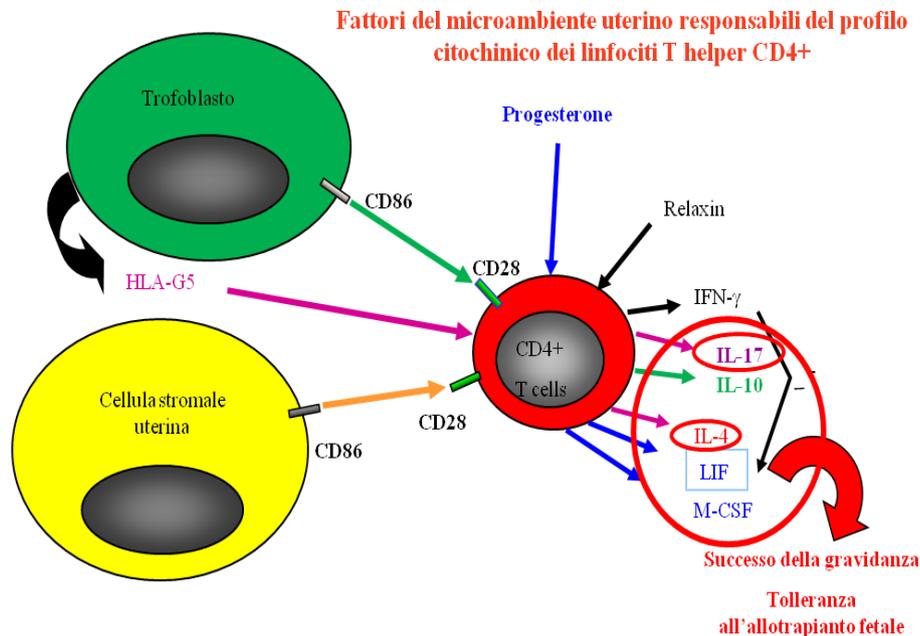


**Fig. 8** L'HLA-G5 prodotto dal trofoblato stimola la produzione combinata di IL-4 e IL-17A da parte dei linfociti T CD4<sup>+</sup> deciduali durante la gravidanza normale

## CONCLUSIONE:

Il profilo citochinico dei linfociti T deciduali sembra dipendere da fattori presenti nel microambiente uterino. Molecole espresse e/o prodotte dal trofoblato possono indurre la produzione di citochine responsabili della tolleranza al semi-allotrapianto fetale mediata da IL-4 e IL-10 da parte delle cellule T helper CD4<sup>+</sup> e dalle cellule Treg [Cf. "Linfociti T regolatori (Treg) nella gravidanza"]. In effetti, la molecola CD86 espressa sul trofoblato interagisce con il CD28 espresso sui linfociti T helper CD4<sup>+</sup> deciduali e stimola la produzione di IL-10 da parte di questi ultimi (manoscritto in preparazione). L'HLA-G5, prodotto dal trofoblato, induce la produzione di IL-4 e di IL-17 da parte delle cellule T helper CD4<sup>+</sup> deciduali. La produzione di IL-4 da parte delle cellule T helper potrebbe essere anche dovuta all'interazione CD86 presente sulle cellule stromali e CD28 presente sui linfociti T helper. Il progesterone induce la modulazione di IL-4 mentre inibisce la produzione di IL-17 da parte delle cellule T helper (Pongcharoen S, *et al.*, 2006). La relaxina, un ormone polipeptidico, promuove la produzione di IFN- $\gamma$  e inibisce la produzione di LIF, mentre la produzione di M-CSF e di LIF da parte delle cellule T helper CD4<sup>+</sup> è stimolata dal progesterone

(Piccinni MP, *et al.*, 2001). Il LIF è responsabile dell'impianto dell'embrione (Stewart, 1992), mentre l'MCSF induce la proliferazione del trofoblasto (Pollard, 1991) (Fig. 9).



• **Fig. 9** Molecole espresse e/o prodotte dal trofoblasto possono indurre la produzione di citochine responsabili della tolleranza al semi-allogranto fetale mediata da IL-4 e IL-10 da parte delle cellule T helper CD4<sup>+</sup> e dalle cellule Treg. La molecola CD86 espressa sul trofoblasto interagisce con il CD28 espresso sui linfociti T helper CD4<sup>+</sup> deciduali e stimola la produzione di IL-10 da parte di questi ultimi. L'HLA-G5, prodotto dal trofoblasto, induce la produzione di IL-4 e di IL-17 da parte delle cellule T helper CD4<sup>+</sup> deciduali. La produzione di IL-4 da parte delle cellule T helper potrebbe essere anche dovuta all'interazione CD86 presente sulle cellule stromali e CD28 presente sui linfociti T helper. Il progesterone induce la modulazione di IL-4 mentre inibisce la produzione di IL-17 da parte delle cellule T helper. La relaxina, un ormone polipeptidico, promuove la produzione di IFN-γ e inibisce la produzione di LIF, mentre la produzione di M-CSF e di LIF da parte delle cellule T helper CD4<sup>+</sup> è stimolata dal progesterone. Il LIF è responsabile dell'impianto dell'embrione, mentre l'MCSF induce la proliferazione del trofoblasto

La IL-17 inclusa in questo network di citochine, potrebbe essere benefica per la gravidanza quando è prodotta in associazione con la IL-4 stimolando l'invasione della decidua da parte del trofoblasto e proteggendo la madre dalle infezioni genitali in grado di aumentare il rischio di aborto spontaneo. In effetti i nostri dati recenti dimostrano che l'IL-4 stimola la produzione di IL-17A già a basse dosi (500 pg/ml), quindi probabilmente agisce più precocemente per indurre la produzione di IL-17A, mentre l'IL-17A stimola la produzione di IL-4 a dosi maggiori (4000 pg/ml) e quindi la sua azione è probabilmente più tardiva.

In seguito all'interazione con all'HLA-G5 le cellule T CD4<sup>+</sup> potrebbero quindi produrre prima l'IL-4 e successivamente, in risposta all'IL-4, produrre l'IL-17A che a sua volta induce poi la produzione di IL-4.

Concludendo possiamo dire che le citochine prodotte all'interfaccia materno fetale formano una complessa rete di regolazione in cui equilibrio è fondamentale per mantenere l'omeostasi tra il sistema immunitario materno e il feto. Le varie citochine possono essere benefiche o dannose per la gravidanza a seconda che vengano prodotte singolarmente o in associazione ad altre e a seconda della concentrazione della citochina. Fattori in grado di alterare questo delicato equilibrio possono portare al fallimento della gravidanza e ad aborto.

La IL-17 potrebbe essere essenziale per il successo della gravidanza in alcune fasi della gravidanza e non così importante o deleterio in altre fasi. La cronologia di azione della IL-17, da sola o in associazione con altre citochine dovrebbe essere studiata ulteriormente per chiarire i meccanismi con cui la gravidanza potrebbe o no essere influenzata da cellule Th17.

## BIBLIOGRAFIA

Abbas A, Lichtman A, Pillai S.

*Immunologia cellulare e molecolare. Settima edizione.*

Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Napolitani G.

*Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells.*

Nat. Immunol. 2007; 8:639-646.

Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL.

*Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17.*

J Biol Chem 2003; 278: 1910-1914.

Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Filì L, Ferri S, Frosali F, Giudici F, Romagnani P, Parronchi P, Tonelli F, Maggi E, Romagnani S.

*Phenotypic and functional features of human Th17 cells.*

J. Exp. Med. 2007; 204:1849-1861.

Arruvito L, Sotelo AI, Billordo A, Fainboim L.

*A physiological role for inducible FOXP3(+) Treg cells. Lessons from women with reproductive failure.*

Clin. Immunol. 2010; 136(3): 432-441.

Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA.

*Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy.*

J. Exp. Med. 2000; 192: 259-270.

Barakonyi A, Kovacs KT, Miko E, Szereday L, Varga P, Szekeres-Bartho J.

*Recognition of nonclassical HLA class I antigens by gamma delta T cells during pregnancy.*

J. Immunol. 2002; 168(6): 2683-2688.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK.  
*Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells.*

Nature 2006; 441: 235-238.

Bulmer JN, Johnson PM.

*Macrophage populations in the human placenta and amniochorion.*

Clin. Exp. Immunol. 1984; 57: 393-403.

Bulmer JN, Longfellow M, Ritson A.  
*Leukocytes and resident blood cells in endometrium.*  
Ann. N Y Acad. Sci. 1991; 622: 57-68.

Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D.  
*Granulated lymphocyte in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies.*  
Human. Reprod. 1991; 6: 791-798.

Bulmer JN, Morrison L, Smith JC.  
*Expression of class II MHC gene products by macrophages in human utero-placental tissue.*  
Immunology. 1988; 63: 707-714.

Bulmer JN, Williams PJ, Lash GE.  
*Immune cells in the placental bed.*  
The international Journal Of Developmental Biology. 2010; 54: 281-294.

Burns WR, Wang Y, Tang PC, Ranjbaran H, Iakimov A, Kim J, Cuffy M, Bai Y, Pober JS, Tellides G.  
*Recruitment of CXCR3+ and CCR5+ T cells and production of interferon-gamma-inducible chemokines in rejecting human arteries.*  
Am. J. Transplant. 2005; 5(6): 1226-1236.

Burns WR, Wang Y, Tang PC, Ranjbaran H, Iakimov A, Kim J, Cuffy M, *et al.*  
*Recruitment of CXCR3+ and CCR5+ T cells and production of interferon-gamma-inducible chemokines in rejecting human arteries.*  
Am. J. Transplant. 2005; 5: 1226-1236.

Chaouat G, Assal Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliott JF, Mosmann T, Wegmann TG.  
*IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau.*  
J. Immunol. 1995; 154(9): 4261-4268.

Chen H, Wang W, Xie H, Xu X, Wu J, Jiang Z, Zhang M, Zhou L, Zheng S.  
*A pathogenetic role of IL-17 at the early stage of corneal allograft rejection.*  
Transpl Immunol. 2009; 21:155-161.

Claas FHJ, Gijbels Y, Van Der Velden-De Munck J, Van Rood JJ.  
*Induction of B cell unresponsiveness to non-inherited maternal HLA antigens during fetal life.*  
Science 1988; 241(4874): 1815-1817.

Cosmi L, De Palma R, Santarlaschi V, Maggi L, Capone M, Frosali F, Rodolico G, Querci V, Abbate G, Angeli R, Berrino L, Fambrini M, Caproni M, Tonelli F, Lazzeri

- E, Parronchi P, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F.  
*Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor.*  
J. Exp. Med. 2008; 205:1903-1916.
- Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Cardilicchia E, Frosali F, Querci V, Angeli R, Matucci A, Fambrini M, Liotta F, Parronchi P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F.  
*Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4.*  
J Allergy Clin Immunol. 2010; 125(1): 222-230.
- El Costa H, Casemayou A, Aguerre-Girr M, Rabot M, Berrebi A, Parant O, Clouet-Delannoy M, Lombardelli L, Jabrane-Ferrat N, Rukavina D, Bensussan A, Piccinni MP, Le Bouteiller P, Tabiasco J.  
*Critical and differential roles of NKp46- and NKp30-activating receptors expressed by uterine NK cells in early pregnancy.*  
J Immunol. 2008; 181(5): 3009-3017.
- 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(4): 595-601.
- Erdmann AA, Jung U, Foley JE, Toda Y, Fowler DH.  
*Co-stimulated/Tc2 cells abrogate murine marrow graft rejection.*  
Biol. Blood Marrow Transplant. 2004; 10(9): 604-613.
- Finn R, Hill St. CA, Davis JC.  
*Feto-maternal bidirectional mixed lymphocyte reaction and survival of fetal allograft.*  
Lancet 1977; 2(8050): 1200-1202.
- Fournel S, Aguerre-Girr M, Campan A, Salauze L, Berrebi A, Lone YC, Lenfant F, Le Bouteiller P.  
*Soluble HLA-G: purification from eukaryotic transfected cells and detection by a specific ELISA.*  
Am. J. Reprod. Immunol. 1999; 42(1): 22-29.
- Fu B, Li X, Sun R, Tong X, Ling B, Tian Z, Wei H.  
*Natural killer cells promote immune tolerance by regulating inflammatory TH17 cells at the human maternal-fetal interface.*  
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2013; 110(3): 231-240.
- Gardner L, Moffett A.  
*Dendritic cells in the human decidua.*

Biol. Reprod. 2003; 69: 1438-1446.

Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K.  
*Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells.*  
Science. 2010; 327(5966): 656-661.

Graca L, Cobbolt SP. and Waldmann H.  
*Identification of regulatory T cells in tolerated allografts.*  
J. Exp. Med. 2002; 195: 1641-1646.

Guerin LR, Moldenhauer LM, Prins JR, Bromfield JJ, Hayball JD, Robertson SA.  
*Seminal fluid regulates accumulation of FOXP3+ regulatory T cells in the preimplantation mouse uterus through expanding the FOXP3+ cell pool and CCL19-mediated recruitment.*  
Biol. Reprod. 2011; 85(2): 397-408.

Haig D.  
*Genetic conflicts in human pregnancy.*  
The Quarterly Review of Biology 1993; 68(4): 495-532.

Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, Gazit R, Yutkin V, Benharroch D, Porgador A, Keshet E, Yagel S, Mandelboim O.  
*Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface.*  
Nat. Med. 2006; 12: 1065-1074.

Heikkinen J, Mottonen M, Alanen A, Lassila O.  
*Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua.*  
Clin. Exp. Immunol. 2004; 136: 373-378.

Heikkinen J, Mottonen M, Komi J, Alanen A, Lassila O.  
*Phenotypic characterization of human decidual macrophages.*  
Clin. Exp. Immunol. 2003; 131: 498-505.

Hill JA, Polgar K, Anderson DJ.  
*T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion.*  
J. Am. Med. Assoc. 1995; 273: 1933-1936.

Hunt JS, Orr HT.  
*HLA and maternal-fetal recognition.*  
FASEB Journal. 1992; 6(6): 2344-2348.

Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C.  
*HLA-G and immune tolerance in pregnancy.*  
FASEB J. 2005; 19: 681-693.

Inada K, Shima T, Nakashima A, Aoki K, Ito M, Saito S.

*Characterization of regulatory T cells in decidua of miscarriage cases with abnormal or normal fetal chromosomal content.*

J. Reprod. Immunol. 2013; 97(1): 104-111.

Ishitani A, Sageshima N, Lee N, Dorofeeva N, Hatake K, Marquardt H, Geraghty DE.

*Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition.*

J. Immunol. 2003; 171: 1376-1384.

Jin LP, Chen QY, Zhang T, Guo PF, Li DJ.

*The CD4+CD25 bright regulatory T cells and CTLA-4 expression in peripheral and decidual lymphocytes are down-regulated in human miscarriage.*

Clin. Immunol. 2009; 133(3): 402-410.

Kallikourdis M, Andersen KG, Welch KA, Betz AG.

*Alloantigen-enhanced accumulation of CCR5+ 'effector' regulatory T cells in the gravid uterus.*

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2007; 104(2): 594-599.

Kämmerer U, Eggert AO, Kapp M, McLellan AD, Geijtenbeek TB, Dietl J, van Kooyk Y, Kämpgen E.

*Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy.*

Am. J. Pathol. 2003; 162(3): 887-896.

Kämmerer U, Schoppet M, McLellan AD, Kapp M, Huppertz HI, Kämpgen E, Dietl J.

*Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells.*

Am. J. Pathol. 2000; 157(1): 159-169.

Kim YM, Chaiworapongsa T, Gomez R, Bujold E, Yoon BH, Rotmensch S, Thaler HT, Romero R.

*Failure of physiologic transformation of the spiral arteries in the placental bed in preterm premature rupture of membranes.*

Am. J. Obstet. Gynecol. 2002; 187(5): 1137-1142.

King A, Balendran N, Wooding P, Carter NP, Loke YW.

*CD3-leukocytes present in the human uterus during early placentation: phenotypic and morphologic characterization of the CD56++ population.*

Dev Immunol. 1991; 1(3): 169-190.

King A, Burrows TD, Hiby SE, et al.

*Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast.*

Placenta 2000; 21(4): 376-387.

Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ.

*CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses.*

J. Immunol. 2002; 168(3): 1080-1086.

Kitaya K, Yamaguchi T, Yasuo T, Okubo T, Honjo H.

*Post-ovulatory rise of endometrial CD16(-) natural killer cells: in situ proliferation of residual cells or selective recruitment from circulating peripheral blood?*

J. Reprod. Immunol. 2007; 76(1-2): 45-53.

Kleinschek MA, Boniface K, Sadekova S, Grein J, Murphy EE, Turner SP, Raskin L, Desai B, Faubion WA, de Waal Malefyt R, Pierce RH, McClanahan T, Kastelein RA.

*Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation.*

J. Exp. Med. 2009; 206(3): 525-534.

Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK.

*IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells.*

Nature 2007; 448: 484-487.

Lanier LL.

*Natural killer cells fertile with receptors for HLA-G?*

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1999; 96(10):5343-5345.

Le Bouteiller P.

*HLA-G in human early pregnancy: control of uterine immune cell activation and likely vascular remodeling.*

Biomed. J. 2014; 38(1): 32-38.

Lee JY, Lee M, Lee SK.

*Role of endometrial immune cells in implantation.*

Clin Exp Reprod Med 2011; 38(3): 119-125. Review.

Li C, Houser BL, Nicotra ML, Strominger JL.

*HLA-G homodimer-induced cytokine secretion through HLA-G receptors on human decidual macrophages and natural killer cells.*

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2009; 106(14): 5767-5772.

Li XC, Zand MS, Li Y, Zheng XX, Strom TB.

*On histocompatibility barriers, Th1 to Th2 immune deviation, and the nature of the allograft responses.*

J. Immunol. 1998; 161(5): 2241-2247.

- Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG.  
*Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface.*  
J. Immunol. 1993; 151(9): 4562-4573.
- Lombardelli L, Aguerre-Girr M, Logiodice F, Kullolli O, Casart Y, Polgar B, Berrebi A, Romagnani S, Maggi E, Le Bouteiller P, Piccinni MP.  
*HLA-G5 induces IL-4 secretion critical for successful pregnancy through differential expression of ILT2 receptor on decidual CD4<sup>+</sup> T cells and macrophages.*  
J Immunol. 2013;191(7):3651-3662.
- Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Ruggiu FS, De Carli M, Ricci M, Romagnani S.  
*Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones.*  
J Immunol. 1992; 148(7): 2142-2147.
- Manaster I, Mizrahi S, Goldman-Wohl D, Sela HY, Stern-Ginossar N, Lankry D, Gruda R, Hurwitz A, Bdolah Y, Haimov-Kochman R, Yagel S, Mandelboim O.  
*Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy.*  
J Immunol. 2008; 181(3): 1869-1876.
- Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S.  
*Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells.*  
J Exp. Med. 1993; 177(4): 1199-1204.
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT.  
*Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage.*  
Nature 2006; 441: 231-234.
- Mei S, Tan J, Chen H, Chen Y, Zhang J.  
*Changes of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells and FOXP3 expression in unexplained recurrent spontaneous abortion patients.*  
Fertil. Steril. 2010; 94(6): 2244-2247.
- Mizuno M, Aoki T, Kimbara T.  
*Functions of macrophages in human decidual tissue in early pregnancy.*  
Am. j. Reprod. Immunol. 1994; 31: 180-188.
- Mjösberg J, Berg G, Jenmalm MC, Ernerudh J.  
*FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua.*  
Biol. Reprod. 2010; 82(4): 698-705.

Moffett A, Loke C.

*Immunology of placentation in eutherian mammals.*

Nat. Rev. Immunol. 2006; 6(8): 584-594.

Moffett-King A.

*Natural killer cells and pregnancy.*

Nat. Rev. Immunol. 2002; 2: 656-663.

Moreau P, Paul P, Rouas-Freiss N, Kirszenbaum M, Dausset J, Carosella ED.

*Molecular and immunologic aspects of the nonclassical HLA class I antigen HLA-G: evidence for an important role in the maternal tolerance of the fetal allograft.*

Am. J. Reprod. Immunol. 1998; 40(3): 136-144.

Mosmann TR, Coffman RL.

*TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.*

Annu Rev Immunol. 1989; 7: 145-173.

Mosmann TR, Sad S.

*The expanding universe of T-cell subset: Th1, Th2 and more.*

Immunol Today 1996; 17: 138-146.

Nakashima A, Ito M, Shima T, Bac ND, Hidaka T, Saito S.

*Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases.*

Am J Reprod Immunol. 2010; 64(1): 4-11.

Nickerson P, Steurer W, Steiger J, Zheng X, Steele AW, Strom TB.

*Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in transplantation.*

Curr. Opin. Immunol. 1994; 6(5): 757-764.

Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C.

*Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells.*

Nature 2007; 448: 480-483.

Ostojic S, Dubanchet S, Chaouat G, Abdelkarim M, Truyens C, Capron F.  
*Demonstration of the presence of IL-16, IL-17 and IL-18 at the murine fetomaternal interface during murine pregnancy.*

Am. J. Reprod. Immunol. 2003; 49(2): 101-112.

Pappas J, Quan N, Ghildyal N.

*A single-step enrichment of Th2 lymphocytes using CCR4 microbeads.*

Immunol. Lett. 2006; 102(1): 110-114.

Piccinni MP, Bani D, Beloni L, Manuelli C, Mavilia C, Voconi F, Bigazzi M, Bani Sacchi T, Romagnani S, Maggi E.

*Relaxin favors the development of activated human T cells into Th1-like effectors.*  
Eur. J. Immunol. 1999. 29: 2241-2247.

Piccinni MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S.  
*Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions.*  
Nat. Med. 1998a; 4(9): 1020-1024.

Piccinni MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S.  
*The maintenance of pregnancy is associated with predominance of Th2 type-cytokines.*  
In: Colarcurci N, and Cardone A, eds, The Embryo from Gametogenesis to implantation (Giuseppe De Nicola, Naples). 1998b; pag. 177-180.

Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Livi C, Romagnani S, Maggi E.  
*Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cells clones.*  
J Immunol. 1995. 155: 128-133.

Piccinni MP, Lombardelli L, Logiodice F, Tesi D, Kullolli O, Biagiotti R, Giudizi M, Romagnani S, Maggi E, Ficarra G.  
*Potential pathogenetic role of Th17, Th0, and Th2 cells in erosive and reticular oral lichen planus.*  
Oral Dis. 2014; 20(2): 212-218.

Piccinni MP, Scaletti C, Vultaggio A, Maggi E, Romagnani S.  
*Defective production of LIF, M-CSF and Th2-type cytokines by T cells at fetomaternal interface is associated with pregnancy loss.*  
J. Reprod. Immunol. 2001; 52: 35-43.

Piccinni MP.  
*T-cell Cytokines in Pregnancy.*  
American Journal of Reproductive Immunology 2002; 47(5): 289-294.

Piccinni MP.  
*T cells in normal pregnancy and recurrent pregnancy loss.*  
Reprod. Bio. Med. Online 2006; 13(6): 840-844.

Plaks V, Birnberg T, Berkutzki T, Sela S, BenYashar A, Kalchenko V, Mor G, Keshet E, Dekel N, Neeman M, Jung S.  
*Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice.*  
J. Clin. Invest. 2008; 118(12): 3954-3965.

Pollard JW, Bartocci A, Arceci R, Orlofsky A, Ladner MB, Stanley ER.

*Apparent role of the macrophage growth factor, CSF-1, in placental development.*  
Nature. 1987; 330(6147): 484-486.

Pollard JW, Hunt JS, Wiktor-Jedrzejczak W, Stanley ER.  
*A pregnancy defect in the osteopetrotic (op/op) mouse demonstrates the requirement for CSF-1 in female fertility.*  
Dev Biol. 1991;148(1): 273-283.

Pongcharoen S, Niumsup P, Sanguansermisri D, Supalap K, Butkhamchot P.  
*The effect of interleukin-17 on the proliferation and invasion of JEG-3 human choriocarcinoma cells.*  
Am. J. Reprod. Immunol. 2006; 55(4): 291-300.

Pongcharoen S, Somran J, Sritippayawan S, Niumsup P, Chanchan P, Butkhamchot P, Tatiwat P, Kunngurn S, Searle RF.  
*Interleukin-17 expression in the human placenta.*  
Placenta. 2007; 28(1): 59-63.

Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M, Farhat R.  
*Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion.*  
Hum. Reprod. 2000; 15(3): 713-718.

Reister F, Frank HG, Kingdom JC, Heyl W, Kaufmann P, Rath W, Huppertz B.  
*Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women.*  
Lab. Invest. 2001; 81(8): 1143-1152.

Robertson SA, Prins JR, Sharkey DJ, Moldenhauer LM.  
*Seminal fluid and the generation of regulatory T cells for embryo implantation.*  
Am. J. Reprod. Immunol. 2013; 69(4): 315-330.

Romagnani S,  
*Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more.*  
Immunol Today 1991; 12: 256-257.

Saito S, Nakashima A, Myojo-Higuma S, Shiozaki A.  
*The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy.*  
J. Reprod. Immunol. 2008; 77(1): 14-22.

Santarlaschi V, Maggi L, Capone M, Frosali F, Querci V, De Palma R, *et al.*  
*TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells.*  
Eur J Immunol. 2009; 39(1): 207-215.

Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S.

*Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases.*

Mol. Hum. Reprod. 2004; 10 (5): 347-353.

Shima T, Inada K, Nakashima A, Ushijima A, Ito M, Yoshino O, Saito S.

*Paternal antigen-specific proliferating regulatory T cells are increased in uterine-draining lymph nodes just before implantation and in pregnant uterus just after implantation by seminal plasma-priming in allogeneic mouse pregnancy.*

J Reprod. Immunol. 2015;108: 72-82.

Solderstrom K, Corliss B, Lanier LL, Phillips JH.

*CD94/NKG2 is the predominant inhibitory receptor involved in the recognition of HLA-G by decidual and peripheral blood NK cells.*

J. Immunol. 1997; 159: 1072-1075.

Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT.

*Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset.*

Immunology. 2004; 112(1): 38-43.

Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, Abbondanzo SJ.

*Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor.*

Nature. 1992; 359(6390): 76-79.

Strom TB, Roy-Chaudury R, Manfro R *et al.*

*The Th1/Th2 paradigm and allograft response.*

Current Opinion in Immunology 1996; 8: 688-693.

Strom TB, Roy-Chaudhury P, Manfro R, Zheng XX, Nickerson PW, Wood K, Bushell A.

*The Th1/Th2 paradigm and the allograft response.*

Curr. Opin. Immunol. 1996; 8(5): 688-693.

Suthanthiran M, and Strom TB.

*Immunobiology and immunopharmacology of organ allograft rejection.*

J. Clin. Immunol. 1995; 15: 161-171.

Syrbe U, Siveke J, Hamann A.

*Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression?*

Springer Semin Immunopathol. 1999; 21(3): 263-285.

Tsuda H, Sakai M, Michimata T, Tanebe K, Hayakawa S, Saito S.

*Characterization of NKT cells in human peripheral blood and decidual lymphocytes.*

Am. J. Reprod. Immunol. 2001;45: 295-302.

Van Nieuwenhoven ALV, Heineman MJ, Faas MM.  
*The immunology of successful pregnancy.*  
Human Reproduction Update 2003; 9(4): 347-357.

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B.  
*TGF-beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells.*  
Immunity 2006; 24: 179-189.

Venet F, Lepape A, Debard AL, Bienvenu J, Bohé J, Monneret G.  
*The Th2 response as monitored by CRTH2 or CCR3 expression is severely decreased during septic shock*  
Clin. Immunol. 2004; 113(3): 278-284.

Verma S, King A, Loke YW.  
*Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine natural killer cells.*  
Eur. J. Immunol. 1997; 27: 979-983.

Waaga AM, Gasser M, Kist-van Holthe JE, Najafian N, Muller A, Vella JP, Womer KL, *et al.*  
*Regulatory functions of self-restricted MHC class II allopeptide-specific Th2 clones in vivo.*  
J. Clin. Invest. 2001. 107: 909–916.

Wang WJ, Hao CF, Lin QD.  
*Dysregulation of macrophage activation by decidual regulatory T cells in unexplained recurrent miscarriage patients.*  
Reprod. Immunol. 2011; 92(1-2): 97-102.

Wang WJ, Hao CF, Yi-Lin, Yin GJ, Bao SH, Qiu LH, Lin QD.  
*Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients.*  
J. Reprod. Immunol. 2010b; 84(2): 164-170.

Wang WJ, Hao CF, Qu QL, Wang X, Qiu LH, Lin QD.  
*The deregulation of regulatory T cells on interleukin-17-producing T helper cells in patients with unexplained early recurrent miscarriage.*  
Hum. Reprod. 2010a; 25(10): 2591-2596.

Wang WJ, Liu FJ, Qu HM, Hao CF, Qu QL, Xiong-Wang, Bao HC, Wang XR.  
*Regulation of the expression of Th17 cells and regulatory T cells by IL-27 in patients with unexplained early recurrent miscarriage.*  
J. Reprod. Immunol. 2013; 99(1-2): 39-45.

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR.

*Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?*

Immunol Today. 1993; 14(7): 353-356.

Williams Z.

*Inducing Tolerance to Pregnancy.*

N. Engl. J. Med. 2012; 367(12): 1159-1161.

Witkin SS, Linhares IM, Bongiovanni AM, Herway C, Skupski D.

*Unique alterations in infection-induced immune activation during pregnancy.*

BJOG. 2011; 118(2): 145-153.

Wu HX, Jin LP, Xu B, Liang SS, Li DJ.

*Decidual stromal cells recruit Th17 cells into decidua to promote proliferation and invasion of human trophoblast cells by secreting IL-17.*

Cell. Mol. Immunol. 2014; 11(3): 253-262.

Xu L, Dong B, Wang H, Zeng Z, Liu W, Chen N, Chen J, Yang J, Li D, Duan Y.

*Progesterone suppresses Th17 cell responses, and enhances the development of regulatory T cells, through thymic stromal lymphopoietin-dependent mechanisms in experimental gonococcal genital tract infection.*

Microbes Infect. 2013; 15(12): 796-805.

Yang H, Qiu L, Chen G, Ye Z, Lü C, Lin Q.

*Proportional change of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in decidua and peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous abortion patients.*

Fertil. Steril. 2008; 89(3): 656-661.

Yuan X, Paez-Cortez J, Schmitt-Knosalla I, Mfarrej B, Donnarumma M, Habicht A, et al.

*A novel role of CD4<sup>+</sup> Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy.*

J. Exp. Med. 2008; 205: 3133-3144.

Zingoni A, Soto H, Hedrick JA, Stoppacciaro A, Storlazzi CT, Sinigaglia F, D'Ambrosio D, O'Garra A, Robinson D, Rocchi M, Santoni A, Zlotnik A, Napolitano M.

*The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells.*

J. Immunol. 1998; 161(2): 547-551.