

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Facultad de CC. Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa Oficial de Postgrado de Biotecnología



ASPECTOS INMUNOGENÉTICOS DEL HLA-G EN EL ABORTO DE PRIMER TRIMESTRE.

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Virginia García-Láez Moreno para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas.

Dirigida por:

Dra. M^a José de los Santos Molina.

Prof. Vicente Serra Serra.

Prof. José Bellver Pradas.

Valencia, Julio 2012

Dra. María José de los Santos Molina, Doctora en Biología por la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Investigadora de la Fundación IVI. Directora del Laboratorio de Embriología Clínica IVI Valencia.

CERTIFICA

Que el trabajo de investigación titulado: “*Aspectos inmunogenéticos del HLA-G en el aborto de primer trimestre*” ha sido realizado íntegramente por Dña. Virginia García-Láez Moreno bajo mi supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia a Julio de 2012.

Fdo. María José de los Santos Molina.

Dr. Vicente Serra Serra, Catedrático del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA

Que el trabajo de investigación titulado: “*Aspectos inmunogenéticos del HLA-G en el aborto de primer trimestre*” ha sido realizado íntegramente por Dña. Virginia García-Láez Moreno bajo mi supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia a Julio de 2012.

Fdo. Vicente Serra Serra.

Dr. José Bellver Pradas, Ginecólogo especialista en reproducción humana, Profesor Asociado en el Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Investigador en la Fundación IVI. Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia.

CERTIFICA

Que el trabajo de investigación titulado: “*Aspectos inmunogenéticos del HLA-G en el aborto de primer trimestre*” ha sido realizado íntegramente por Dña. Virginia García-Láez Moreno bajo mi supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia a Julio de 2012.

Fdo. José Bellver Pradas.

Dedicada a:

Mi pareja y reciente marido por su paciencia.

Mi hermana por su comprensión.

Mis padres por su apoyo incondicional.

Y a todos los que me han animado a seguir adelante cuando pensaba en abandonar.

Agradecimientos.

Me gustaría dar las gracias a todas las personas que me han ayudado a sacar adelante este proyecto.

En especial agradeceré a las personas que me han dado su apoyo desde la distancia como es mi hermana, mi padre y mi madre. A mi Laurilla, que cuando me ha visto agobiada solo ha podido consolarme por teléfono haciéndome pensar que la distancia merecía la pena si conseguía algo importante en la vida. A mis padres, que desde siempre han creído en mí y me han educado para que fuera constante y para que consiguiera las metas que me propusiera con esfuerzo y valentía.

Agradecer el apoyo del hombre de mi vida, Paco, que ha tenido aguantar cada día el estrés que esto conlleva, y a pesar de ello conseguía sacarme una sonrisa con cualquier tontería. Que está conmigo vaya a donde vaya porque cree en mí y en que juntos podremos llegar a donde nos propongamos. Que consigue hacer que me olvide del trabajo para que no me convierta en “la loca de la tesis”. Que todo esto no lo hubiera conseguido sin él.

Agradecer al resto de mi familia y familia política que tan solo con sus visitas a Valencia me han dado un poquito de fuerza para continuar.

Agradecer a M^a José de los Santos que confiara en mí, que me diera esta oportunidad y que me ayudara a que esta tesis quedara perfecta. Que despertó mi vena investigadora y me arrojó un haz de luz cuando estaba un poco perdida.

Al doctor Vicente Serra por su rigurosidad y perfección.

Al doctor Pepe Bellver por su vista de águila, que no se le pasa ni una, y por su presión para que esto terminara cuanto antes.

Al doctor Jaime Ferro, que siempre me consigue todo lo que le pido y siempre con una sonrisa en la cara. Que gracias a sus espléndidas manos tengo el material de partida de esta tesis. Y gracias al resto de compañeros de quirófano, Gema, Paco, Paloma, Begoña, M^a Ángeles y Vicenta, que me guardaban las muestras incluso cuando no las pedía.

A Julio Martín, que a pesar de estar tan ocupado, ha sabido sacar un poquito

de tiempo para enseñarme y ayudarme a que todo tuviera sentido. Y gracias a su equipo, Ana, Vicente, Mila, Aylin, Pere y M^a Jesús, que siempre me han atendido con amabilidad y se han ofrecido para lo que hubiera que hacer.

A Sandra, que es la persona que mejor me entiende, con respecto a temas de trabajo, y que gracias a esas largas conversaciones que hemos tenido he sobrellevado mejor estos años.

A José M^a, que con su experiencia me ha ayudado tantísimo en la elaboración de esta tesis y que le debo demasiadas horas de dedicación.

A Noelia, Laura, María, Ana Belén y Amparo, que sin duda son amigas más que compañeras de trabajo. Y al resto de compañeros del laboratorio, Carmela, Sonia, la Gámiz y la Buendía, la Galán y la Xuqui, Tamara, Marcos, Escibá, Amparo Mercader y Mifsud, Pep, Tejera, Damiá, Jesús Zulategui, Irene y Javi, ya que cada uno de ellos me ha enseñado algo a lo largo de estos años. A las nuevas incorporaciones Diana, Belén y Lala. A las secres, Celia, Marlene, Paqui y Pili que se que me echan de menos ahora que no paso tanto tiempo allí con ellas. Y por último, a mis compis las “técnicas” del laboratorio: Begoña y la Campos, y a los técnicos del semen: Menchín, Ana, Nuria, Sergio, Rafa y Guillermo.

ABREVIATURAS

ACA: anticuerpos anticardiolipina.

AECA: anticuerpos anti células endoteliales.

AL: anticoagulante lúpico.

ANA: anticuerpos antinucleares.

APA: anticuerpos antifosfolípido.

ATA: anticuerpos antitiroideos.

ATF: factores de activación de la transcripción (*del inglés, activation transcription factor*).

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

CAM: complejo de ataque a membrana.

CAM: moléculas de adhesión celular (*del inglés, cell adhesion molecule*).

CPA: célula presentadora de antígenos.

CTL: linfocitos citotóxicos.

CXCL12: ligando 12 para quimioquina C-X-C (*del inglés, chemokine (C-X-C motif) ligand 12*).

DC: célula dendrítica (*del inglés, dendritic cell*).

DE: desequilibrio de enlace (*del inglés, linkage disequilibrium: LD*).

DT: desviación típica.

ELISA: inmuno análisis por absorción ligada a enzimas (*del inglés, Enzyme-linked Immunosorbent Assay*).

FAD: factor acelerador del decaimiento.

HLA: antígeno leucocitario humano (*del inglés, human leukocyte antigen*).

hCG: gonadotropina coriónica humana.

hPL: lactógeno placentario humano (*del inglés, human placental lactogen*).

HRM: melting de alta resolución (*del inglés, High Resolution Melting*).

IDO: indolamina 2,3 dioxigenasa.

IL: interleuquina.

IFN: interferón.

IMC: índice de masa corporal.

ISRE: elemento de la respuesta estimulada por interferón (*del inglés, Interferon-Stimulated Response Element*).

IVE: interrupción voluntaria del embarazo.

LGL: linfocitos granulares grandes (*sinónimo de natural killer*).

LIF: factor inhibidor de la leucemia.

MACIF: factor inhibidor del complejo de ataque a membrana (*del inglés, membrane attack complex inhibitory factor*).

MMP: metaloproteinasas de matriz (*del inglés, matrix metallo proteinases*).

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad (*del inglés, mayor histocompatibility complex*).

MIP-1: proteína inflamatoria de macrófagos (*del inglés, macrophage inflammatory protein-1*).

NK: células asesinas naturales (*del inglés, natural killer*).

OCT: temperatura óptima de corte (*del inglés, optimal cutting temperature*).

Pb: Pares de bases.

PBMC: células mononucleares de sangre periférica.

PCM: proteína cofactor de membrana.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*del inglés, polymerase chain reaction*).

RFLP: Polimorfismos de longitud de fragmento de restricción (*del inglés, Restriction Fragment Length Polymorphisms*).

RNV: recién nacido vivo.

SAF: síndrome antifosfolípido.

SNP: polimorfismo de único nucleótido (*del inglés, single nucleotide polymorphism*).

ST: sincitiotrofoblasto.

TRA: técnicas de reproducción asistida.

TEV: trofoblasto extraveloso.

TV: trofoblasto veloso.

Th: linfocito cooperador (*del inglés, T helper*).

Tc: linfocito citotóxico.

TCR: receptor de las células T (*del inglés, T-Cells receptor*).

TGF- β : factor de crecimiento transformante - beta.

TNF- α : factor de necrosis tumoral - alfa (*del inglés, tumor necrosis factor-alpha*).

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial (*del inglés, vascular endothelial growth factor*).

1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Establecimiento de la gestación.....	12
1.2. Causas principales de los abortos espontáneos.....	17
1.2.1. Anomalías cromosómicas y monogénicas.....	18
1.2.2. Anomalías anatómicas.....	19
1.2.3. Infecciones microbianas.....	19
1.2.4. Trastornos endocrinos u hormonales.....	19
1.2.5. Factor seminal severo.....	19
1.2.6. Trombofilias adquiridas (Síndrome antifosfolípido) y heredadas.....	20
1.2.7. Factores ambientales y de estilo de vida.....	21
1.2.8. Factores inmunológicos.....	21
1.3. Gestaciones espontáneas versus gestaciones de técnicas de reproducción asistida.....	22
1.4. Características de la decidua materna.....	23
1.5. Complejo principal de histocompatibilidad.....	26
1.5.1. HLA-G: Molécula no clásica del MHC tipo Ib.....	30
1.5.1.1. Secuencia y estructura del gen HLA-G.....	32
1.5.1.2. Polimorfismos del HLA-G y su efecto a nivel funcional.....	32
1.5.1.3. Transcripción del HLA-G.....	47
1.5.1.4. Fraccionamiento alternativo del ARNm e isoformas solubles del HLA-G.....	48
A- Isoformas unidas a membrana.	
B- Isoformas solubles del HLA-G.	
1.5.1.5. Expresión del HLA-G.....	51
1.5.1.6. Funciones del HLA-G.....	56

1.5.1.7. Importancia del HLA-G en el embarazo.....	66
1.5.2. HLA-E: Molécula no clásica del MHC tipo Ib.....	70
1.5.2.1. Secuencia y estructura genética del HLA-E.....	71
1.5.2.2. Polimorfismos del HLA-E.....	71
1.5.2.3. Transcripción del HLA-E.....	73
1.5.2.4. Expresión del HLA-E.....	73
1.5.2.5. Funciones del HLA-E.....	75
1.6. Mecanismos inmunológicos implicados en el mantenimiento del embarazo y la naturaleza antigénica de la placenta.....	77
1.6.1. Cambio en la producción de citoquinas en la interfase fetomaterna.....	82
1.6.2. Inhibición de la citotoxicidad de las células NK. Balance entre células NK citotóxicas y NK productoras de citoquinas y factores de crecimiento en la interfase fetomaterna.....	83
1.6.3. Tolerancia inducida por las células dendríticas.....	86
1.6.4. Generación de linfocitos T reguladores.	87
1.6.5. Catabolismo del triptófano.....	88
1.6.6. Equilibrio angiogénico.....	88
1.6.7. Expresión selectiva de proteínas reguladoras del complemento.....	89
1.6.8. Expresión de LIF en el endometrio y su receptor en el embrión.....	89
1.6.9. Otras moléculas inmunosupresoras.....	90
1.6.10. Disminución de la producción de anticuerpos autoinmunes maternos.....	90
1.6.11. Aumento de la producción de aloanticuerpos maternos..	90

1.6.12. Expresión selectiva del complejo principal de histocompatibilidad en las diferentes poblaciones trofoblásticas.....	91
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	95
3. OBJETIVOS.....	97
3.1. Objetivo específico 1.....	98
3.2. Objetivo específico 2.....	98
3.3. Objetivo específico 3.....	99
3.4. Objetivo específico 4.....	99
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	101
4.1. Lugar de ejecución.....	103
4.2. Obtención de las muestras: histeroembrioscopias-legrado en gestaciones detenidas espontáneamente.....	103
4.3. Identificación de pacientes susceptibles para el estudio.....	104
4.4. Recogida, distribución y almacenamiento de muestras.....	106
4.5. Diseño y variables del estudio.....	107
4.6. Determinación del cariotipo.....	108
4.7. Análisis genético.....	108
4.7.1. Extracción de ADN.....	109
4.7.2. Análisis de la integridad de la región del HLA-G.....	109
4.7.3. Análisis de polimorfismos.....	111
4.7.3.1. Análisis del polimorfismo -725C>G en el promotor.....	111
4.7.3.2. Análisis de polimorfismos en el exón 2.....	113

4.7.3.3. Análisis de polimorfismos en el exón 3.....	114
4.7.3.4. Análisis del polimorfismo INDEL 14pb en el exón 8.....	115
4.8. Detección de HLA-G soluble en cultivos trofoblásticos y líquidos amnióticos. Enzimoimmunoanálisis (ELISA).....	117
4.9. Detección de HLA-G en secciones de trofoblasto. Inmunohistoquímica.....	119
4.10. Análisis estadístico.....	122
5. RESULTADOS.....	125
5.1. Análisis de la población estudiada.....	126
5.2. Resultados cromosómicos de las histeroembrioscopias.....	130
5.3. Respuesta a los objetivos específicos.....	134
5.3.1. Resultados del análisis de polimorfismos.....	134
5.3.1.1. Análisis de la integridad de la región del HLA-G.....	134
5.3.1.2. Análisis del polimorfismo -725C>G en el promotor.....	136
5.3.1.3. Análisis de polimorfismos en el exón 2.....	137
5.3.1.4. Análisis de polimorfismos en el exón 3.....	139
5.3.1.5. Análisis del polimorfismo INDEL 14pb en el exón 8.....	141
5.3.1.6. Determinación de haplotipos.....	142
5.3.2. Resultados de la detección de HLA-G soluble en cultivos trofoblásticos y líquidos amnióticos. Enzimoimmunoanálisis (ELISA).....	146
5.3.3. Resultados de la detección de HLA-G en secciones de trofoblasto. Inmunohistoquímica.....	147
5.3.4. Asociación entre los polimorfismos analizados y la expresión proteica del HLA-G	151

5.3.4.1. Relación proteica del HLA-G con el polimorfismo -725C>G en el promotor.....	151
5.3.4.2. Relación proteica del HLA-G con los polimorfismos del exón 2.....	151
5.3.4.3. Relación proteica del HLA-G con los polimorfismos del exón 3.....	152
5.3.4.4. Relación proteica del HLA-G con el polimorfismo INDEL 14pb.....	155
5.3.4.5. Relación proteica de la expresión de HLA-G con los haplotipos genéticos encontrados en el HLA-G.....	156
6. DISCUSIÓN.....	159
6.1. Polimorfismos del gen HLA-G y su distribución entre las gestaciones con cariotipo normal y anormal.....	164
6.2. Haplotipos generados.....	168
6.3. Expresión de HLA-G y HLA-E.....	169
6.4. Asociación entre los polimorfismos estudiados, y sus correspondientes haplotipos, y la expresión proteica de HLA-G.....	174
7. CONCLUSIONES.....	179
8. BIBLIOGRAFÍA.....	181

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Establecimiento de la gestación.

De los estudios realizados en 1988 se estimó que únicamente en un 30% de los casos el embrión humano lograba implantar con éxito en el útero materno (Wilcox et al., 1988) y aunque algunos tratamientos de reproducción asistida han logrado superar con creces este dato estimado, lo cierto es que se trata de un proceso que requiere un diálogo y aceptación entre dos individuos con diferente dotación inmunológica y genética.

El embrión en fase de blastocisto debe llegar y contactar con un endometrio en estado receptivo durante un periodo de tiempo conocido como “ventana de implantación” (Rubio et al., 2003; van Mourik et al., 2009), la cual permitirá al embrión aposicionarse en el epitelio endometrial, adherirse y finalmente invadir el ambiente materno.

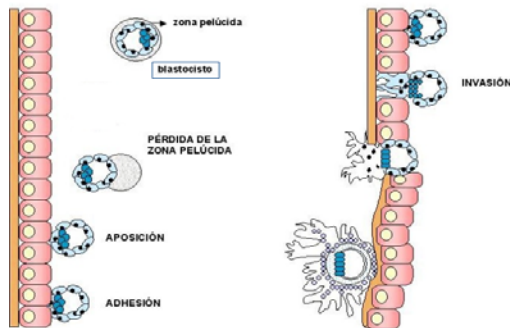


Figura 1: Fases de la implantación embrionaria.

Tras la aposición del blastocisto, que con mayor frecuencia ocurre en la cara posterior del tercio superior del útero, sigue la fase de adhesión, donde las microvellosidades del epitelio endometrial entran en contacto directo con las del trofoectodermo del blastocisto o futuro trofoblasto facilitando que en la invasión ocurra la penetración del trofoblasto embrionario en el estroma del endometrio materno por medio de pinópodos. Durante la invasión, el blastocisto queda cubierto por el endometrio el día 12 de embarazo, y los vasos uterinos serán invadidos, incluso reemplazados, por células embrionarias (Norwitz et al., 2001).

Es bien conocido que, durante el proceso de implantación, es fundamental el diálogo embrión-endometrio donde intervendrá un amplio repertorio de mediadores químicos uterinos y embrionarios como pueden ser citoquinas o quimioquinas, factores de crecimiento, hormonas (progesterona, estradiol y prostaglandinas) y moléculas de

adhesión celular (CAM) como las integrinas y proteasas (Dimitriadis et al., 2005; Guzeloglu-Kayisli et al., 2009).

Una vez que el blastocisto ha implantado en el útero materno comienza el proceso de placentación hemocorial y deberá defender su identidad inmunológica mediante diferentes estrategias como puede ser la diferenciación del citotrofoblasto progenitor en distintos tipos celulares.

a) Sincitiotrofoblasto (ST).

El sincitiotrofoblasto es una masa citoplasmática multinucleada embrionaria que recubre al citotrofoblasto vellositario de manera que es la primera capa celular que encuentra la decidua materna en el momento de la implantación. El sincitiotrofoblasto está en contacto directo con la sangre materna por lo que está expuesto a los leucocitos y posibles patógenos presentes en ella. Del mismo modo, la respuesta inmune materna debe adaptarse a la presencia de las células del sincitiotrofoblasto (Aplin, 1991).

Inicialmente, las células del sincitiotrofoblasto no son mitóticamente competentes protegiendo así a la madre del quimerismo al entrar en contacto con ellas. El sincitiotrofoblasto se forma a partir de la diferenciación y fusión de un tipo de células del citotrofoblasto vellositario llamadas progenitoras, las cuales permiten la expansión del área de revestimiento del sincitio conforme avanza la gestación, así como el reemplazamiento del material que ha sido embebido en la circulación materna (Laskarin et al., 2007; Solier et al., 2002; Tarrade et al., 2001; Vince et al., 1990).

El tejido sincitiotrofooblástico es un tejido transcripcionalmente activo, además de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) y de glicoproteínas/hormonas como la gonadotropina coriónica humana (hCG), que resulta esencial para el mantenimiento del cuerpo lúteo, lactógeno placentario humano (hPL), factores de crecimiento como VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial). El sincitiotrofoblasto produce también estradiol y progesterona encargadas de soportar las primeras 6-8 semanas de embarazo (Ellery et al., 2009).

b) Citotrofoblasto vellositario o vellosidades citotrofooblásticas (TV).

Es una monocapa de células mononucleares presente en la parte más interna del trofoblasto y que más adelante será llamada capa de Langhans.

Está involucrado en el intercambio de gases y nutrientes entre la madre y el feto. Las células del citotrofoblasto vellositario muestran un índice de mitosis del 1,5-2,9% durante la semana sexta a la novena de embarazo pero realizan unas divisiones celulares asimétricas ya que unas células se destinarán al mantenimiento del tejido y otras se destinarán a la diferenciación celular (Laskarin et al., 2007). En realidad son

células madre derivadas del trofoectodermo que rodea al blastocisto capaces de diferenciarse en distintos tejidos como son el sincitiotrofoblasto, capa por la cual estará recubierto, y el citotrofoblasto extravelositario, el cual veremos a continuación.

c) Citotrofoblasto extravelositario (TEV).

Las células del trofoblasto extravelositario tienen características intermedias entre el citotrofoblasto y el sincitiotrofoblasto (McMaster et al., 1995). El citotrofoblasto extravelositario se forma cuando las células del citotrofoblasto velositario atraviesan el sincitiotrofoblasto y entran en contacto con la matriz extracelular decidual, la cual estimula la diferenciación celular del citotrofoblasto velositario (Aplin, 2010). Las células del citotrofoblasto comienzan a proliferar y expandirse a través del sincitiotrofoblasto en forma de columnas de varias capas de células no polarizadas hasta llegar a la decidua materna, anclarse a la lámina basal y contactar con las arterias uterinas maternas donde reemplazarán a las células endoteliales allí presentes. Las células de la porción más distal de la columna de citotrofoblasto extravelositario se diferencian del resto para adoptar un fenotipo más invasivo (Copeman et al., 2000) y están implicadas en el proceso de implantación. En contraste con la invasión tumoral, es una invasión regulada con precisión y limitada espacialmente al endometrio, al primer tercio del miometrio y a las arterias espirales y limitada temporalmente a la gestación inicial (Pijnenborg et al., 1980).

La capacidad invasiva del trofoblasto en la decidua materna puede verse influenciada por varios mecanismos:

1) Señales microambientales autocrinas producidas por el trofoblasto y paracrinas producidas por el útero y otras células inmunitarias. Por ejemplo, existe en el citotrofoblasto con fenotipo invasor, en las células deciduales y en las células *Natural Killer* uterinas (células NK) del primer trimestre del embarazo una secreción de enzimas proteolíticas como las metaloproteinasas de matriz (MMP) capaces de digerir la matriz extracelular del endometrio (Cohen et al., 2010; Naruse et al., 2009). Muchas hormonas, citoquinas y factores de crecimiento de origen materno y fetal pueden controlar la capacidad invasiva del trofoblasto por estimulación, estabilización o inhibición de las MMP (Bischof et al., 2001; Cohen and Bischof, 2007). Además, las MMP pueden ser reguladas a nivel transcripcional mediante los elementos *cis* de la región del promotor y a través del contacto entre células o entre las células y la matriz extracelular (Cohen et al., 2006).

2) Genes reguladores del crecimiento presentes en las células deciduales que controlan la invasión mediante muerte celular programada o apoptosis.

Pero, por otro lado, una deficiente invasión del trofoblasto o incompleta conversión de las arterias espirales puede causar patologías como la preeclampsia, restricción del crecimiento fetal o incluso pérdida del embarazo (Gerretsen et al., 1981; Khong et al., 1987; Shokry et al., 2009), mientras que una ilimitada invasión está asociada con molas hidatidiformes y coriocarcinomas. Incluso se ha observado una deficiente fusión y diferenciación del citotrofoblasto en los embarazos con trisomía 21 provocada por una señalización anormal de la hCG, hormona importante en este proceso (Pidoux et al., 2007).

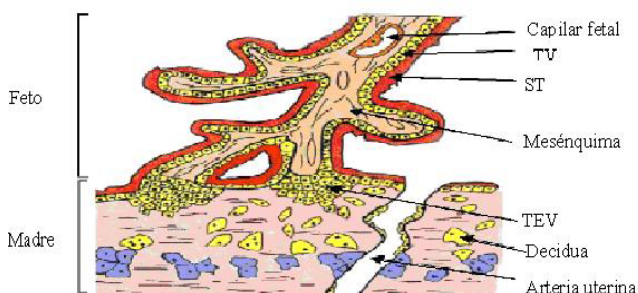


Figura 2: Tipos de citotrofoblasto e invasión en la decidua materna en la semana 8-10 del embarazo.

Abreviaturas: TV: trofoblasto vellositario; ST: sincitiotrofoblasto; TEV: trofoblasto extravellositario.

Las funciones que realiza el citotrofoblasto son de anclaje de la placenta, modulación de angiogénesis y remodelación de las arterias espirales uterinas (Knofler, 2010) aumentando el flujo sanguíneo a la placenta para favorecer el transporte de oxígeno y nutrientes al feto. Además, el trofoblasto tiene una función fagocítica intensa de células maternas y materiales de desecho de la interfase feto-materna mediante la secreción de catepsinas, serinas y MMP, como hemos comentado anteriormente, moléculas implicadas también en la invasión del trofoblasto. Esta función está estrechamente relacionada con la implantación embrionaria y desarrollo placentario. La fagocitosis por parte del trofoblasto le ayuda a su invasión en la decidua, promoviendo la remodelación tisular y su propia nutrición. A lo largo de su desarrollo el trofoblasto pasa de una nutrición histotrófica a una hemotrófica produciendo grandes cambios en la circulación arterial materna (Bevilacqua et al., 2010). Además, la función de fagocitosis del trofoblasto puede ser un mecanismo de defensa del organismo al

1. INTRODUCCIÓN

evitar una respuesta inmune ya que se ha visto fagocitosis de células tumorales atípicas, microorganismos, bacterias, e incluso anticuerpos (Frauli and Ludwig, 1987; Wang et al., 1983).

Por otro lado, el ambiente intrauterino ejerce una importante influencia sobre el desarrollo placentario. El crecimiento del trofoblasto debe ser autónomo y debe ocurrir bajo unas condiciones estables. En las vellosidades trofoblásticas existen receptores para algunos factores de crecimiento, citoquinas, hormonas, moléculas angiogénicas, incluso factores de transcripción que regulan su diferenciación e invasión en las primeras etapas del embarazo y actúan sobre muchas rutas metabólicas y caminos de señalización (Burton et al., 2007). Por ejemplo, se ha visto, al menos en estudios *in vitro* en ratón, que la exposición con IFN- γ (interferón- γ) incrementa 6 veces la actividad fagocítica del trofoblasto (Albieri et al., 2005).

1.2. Causas principales de los abortos espontáneos.

Aproximadamente, un 80-85% de los embarazos espontáneos diagnosticados llegan a término, pero son muchas las parejas que experimentan una pérdida del embarazo (15-20%) (de la Rochebrochard and Thonneau, 2002; Friebe and Arck, 2008). Sin embargo, cuando nos referimos a embarazos no diagnosticados, las tasas de aborto pueden aumentar hasta un 50%, lo que nos indica que desde el punto de vista estadístico es tan frecuente el aborto como el concebir con éxito. Además, hemos de tener en cuenta que el porcentaje de riesgo de aborto aumenta aún más con la edad (Nybo Andersen et al., 2000) y con el número de abortos anteriores (Regan et al., 1989).

Con respecto a las causas que producen la pérdida gestacional, en principio, sería un error no discriminar entre causas de aborto esporádico y aborto habitual, ya que existen causas de aborto esporádico, como las infecciones genitales puntuales, que muy difícilmente pueden ser causas de aborto recurrente y, sin embargo, son incluidas en los protocolos diagnósticos de muchos centros. Pero, por otro lado, las causas de aborto recurrente lo son del espontáneo y resulta complicado establecer diferencias entre un primer o segundo aborto aislado o un aborto inicial que se convertirá en aborto recurrente. A diferencia de los abortos recurrentes, las pacientes con una o dos pérdidas gestacionales no son estudiadas más a fondo ya que el consenso médico convencional evita la realización de estudios completos en estos casos, ya que su probabilidad de gestación evolutiva en un nuevo embarazo será muy elevada sin realizar ningún intento de tratamiento, especialmente en las pacientes jóvenes.

Tampoco existe consenso a la hora de definir aborto habitual o recurrente, de manera que la mayoría de los autores define el aborto de repetición como la pérdida de tres o más gestaciones consecutivas antes de la semana 20, independientemente de que sean seguidos o no, siendo el peso fetal en ese momento igual o inferior a 500g. Esta definición afectaría al 1-2% de todas las parejas en edad fértil (Lee and Silver, 2000).

Todo lo mencionado a continuación se aplica a abortos precoces, que son los que ocurren hasta las 12 semanas de gestación, y suponen un 99% del total de abortos. Los abortos tardíos, que suponen un 1% del total y ocurren entre las 13 y 23 semanas de gestación, quedan fuera de los objetivos de esta tesis.

Las principales etiologías propuestas para los abortos espontáneos en principio esporádicos y para los abortos recurrentes son las siguientes:

1.2.1. Anomalías cromosómicas y monogénicas.

Algunas anomalías monogénicas como la deficiencia de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (Toncheva and Tzoneva, 1985) o alteraciones en la inactivación del cromosoma X han sido asociadas a una mayor tasa de aborto espontáneo recurrente (Beever et al., 2003; Lanasa et al., 2001).

Pero las causas demostradas en la actualidad serían realmente las cromosómicas. Las cromosomopatías embrionarias “de novo” en los embriones pueden ocurrir en un 50-60% de los abortos espontáneos, sobre todo los que ocurren más precozmente, siendo las más frecuentes las trisomías autosómicas (Boue et al., 1975; Kalousek et al., 1993; Lauritsen, 1975) y siendo ésta también una causa de los abortos recurrentes. También se han encontrado anomalías cromosómicas asociadas a los gametos de los progenitores en un 3-10% de los casos de aborto (Carp et al., 2004; De Braekeleer and Dao, 1990).

Existe controversia en cuanto a la creencia de la aneuploidía recurrente como origen del aborto recurrente. Hassold mostró que el cariotipo de un segundo aborto sucesivo era anormal en cerca del 70% de los casos en los que se encontró una aneuploidía en el primer aborto, y sólo en un 20% de los casos si el primer aborto era cromosómicamente normal (Hassold, 1980). Sin embargo, esta observación podía deberse más a la edad materna que a cualquier otro factor. Más recientemente, otros dos grupos volvieron a mostrar que el siguiente aborto en mujeres con aborto habitual era cromosómicamente anormal en por lo menos el 48% de los casos, sugiriendo la posibilidad de una aneuploidía recurrente a pesar de la normalidad de los cariotipos paternos (Daniely et al., 1998; Stern et al., 1996). En un estudio de nuestro grupo se observó que, en 14 parejas con antecedentes de aborto de repetición, la proporción de embriones anormales en dos ciclos consecutivos de fecundación *in vitro* era similar (Rubio et al., 2003). Estos datos sugieren la recurrencia de tasas similares de cromosomopatías en las mujeres que sufren aborto habitual. Sin embargo, otros autores cuestionan la aneuploidía recurrente como origen del aborto de repetición (Ogasawara et al., 2000; Sullivan et al., 2004).

1.2.2. Anomalías anatómicas.

Las anomalías anatómicas como las malformaciones uterinas o los miomas pueden ser causas probables pero no demostradas de aborto espontáneo recurrente en primer y segundo trimestre del embarazo (Homer et al., 2000; Li et al., 2002b). Por ejemplo, el útero septo es el más frecuente y el que peor pronóstico tiene en lo que se refiere a la reproducción. Está dudosamente relacionado con abortos recurrentes precoces por posibles defectos en la vascularización en el septo (Fedele et al., 1989) y de forma más consistente con abortos tardíos debidos a incompetencia cervical y a un reducido volumen intracavitario (Propst and Hill, 2000). Sin embargo, no existe ningún estudio hasta el momento que haya demostrado que al corregir un problema uterino determinado, las pacientes intervenidas aborten menos que las no operadas (Rai and Regan, 2006).

1.2.3. Infecciones microbianas.

La presencia de infecciones o una flora bacteriana anormal en el tracto genital externo, vagina y cérvix pueden ser causa de aborto espontáneo (Martin et al., 1982). Pacientes no inmunizadas frente a Toxoplasma o Rubéola y que contraen dicha infección pueden sufrir un aborto espontáneo esporádico, pero casi de forma imposible podrá ser la causa de aborto recurrente ya que la primoinfección genera inmunidad a largo plazo que suele proteger a la mujer durante el resto de su edad fértil.

1.2.4. Trastornos endocrinos u hormonales.

Existe una débil y no del todo demostrada asociación entre el aborto y, por extensión, el aborto de repetición, y los desordenes endocrinos u hormonales como el síndrome de ovarios poliquísticos, diabetes mellitus o mujeres con problemas de tiroides (especialmente hipotiroidismo), hipersecreción de LH, disminución de la progesterona o con defectos en la fase lútea del ciclo (Coulam and Stern, 1994; Kalter, 1987; Tulppala et al., 1993).

1.2.5. Factor seminal severo.

La mayor presencia de anomalías cromosómicas o menor cantidad de espermatozoides de morfología normal en varones cuya pareja sufre aborto de repetición ha sido propuesta en algunos estudios como una posible etiología (Carranza-Lira and Celis-Rico, 2011; Collodel et al., 2009). Se propone como hipótesis una mayor velocidad de los espermatozoides con aneuploidias, por lo cual consiguen llegar al óvulo con mayor probabilidad, crear una fecundación anómala y ser

responsables de la pérdida de la gestación de forma recurrente (Giorlandino et al., 1998). Sin embargo, la asociación entre anomalías espermáticas y el aborto recurrente no ha podido ser confirmada en otros trabajos, en especial en ausencia de patología seminal severa (Bronet et al., 2012). Pese a la relación inicialmente establecida entre microdeleciones del cromosoma Y (Dewan et al., 2006) y fragmentación aumentada del ADN espermático (Carrell et al., 2003) con el aborto de repetición, recientes estudios (Bellver et al., 2010; Wettasinghe et al., 2010) han mostrado que los varones de parejas con aborto de repetición idiopático y patología seminal ausente o no severa, no presentan mayor prevalencia de microdeleciones Y, y que, aunque muestran un incremento significativo de los índices de oxidación y fragmentación del ADN espermático, similar al de varones con oligozoospermia severa, dichos índices se solapan tanto con los de varones fértiles que no presentan ningún valor predictivo sobre la ocurrencia de aborto de repetición. Es decir, que si bien puede estar algo más elevada la oxidación y la fragmentación del ADN espermático, estos valores no predicen de forma adecuada qué varones sufrirán o no aborto de repetición, no presentando su evaluación por tanto ninguna utilidad diagnóstica.

1.2.6. Trombofilias adquiridas (Síndrome Antifosfolípido: SAF) y trombofilias heredadas.

Las trombofilias representan un grupo de patologías que se caracterizan por un desequilibrio entre los sistemas de coagulación y fibrinólisis, a favor del primero. Pueden ser adquiridas, como el SAF o algunos casos de resistencia a la proteína C activada (APCR), o congénitas, como los déficits de proteína C o S y de antitrombina III, o mutaciones puntuales de genes implicados en la cascada de coagulación (Adelberg and Kuller, 2002). En principio, todas ellas podrían producir complicaciones gestacionales, como aborto de repetición, por su efecto trombogénico.

Con respecto al SAF, es la única causa no genética que ha demostrado invariablemente, a través de ensayos clínicos prospectivos aleatorizados, revisiones sistemáticas y metaanálisis, ser origen del aborto de repetición, pues su tratamiento etiológico reduce drásticamente la probabilidad de un nuevo aborto (Rai and Regan, 2006). Se considera responsable de un 10-15% de los casos (Branch et al., 1997; Kutteh, 1996). Los anticuerpos anticoagulante lúpico y anticardiolipina IgG son los más importantes ya que son los que tienen mayor poder trombogénico y abortivo.

El SAF parece actuar de dos maneras distintas en la génesis del aborto:

a) Su efecto trombogénico arterial y venoso sólo parece ser responsable de los abortos más tardíos, originados a partir de las 8-10 semanas, momento en que las

conexiones vasculares placentarias ya están formadas y son susceptibles de trombosis.

b) Antes de este tiempo, es posible que en su mecanismo de actuación intervenga un desequilibrio en la producción hormonal y una deficiente invasión trofoblástica endovascular (Chamley, 2002; Levine et al., 2002), debida a la unión de los anticuerpos antifosfolípido a los fosfolípidos de membrana del trofoblasto o a las células endoteliales de los vasos deciduales o trofoblásticos (Sebire et al., 2002).

Este doble mecanismo del SAF (alteración de la implantación embrionaria y posterior efecto trombotico en los vasos útero-placentarios) explicaría también el problema de insuficiencia placentaria originada por el síndrome, responsable de los distintos trastornos asociados a la gestación (preeclampsia, desprendimiento de placenta, retraso de crecimiento intrauterino, muerte fetal intraútero, parto prematuro), y justificaría la vasculopatía de los vasos deciduales presente en los estudios anatomopatológicos realizados tras los abortos (Heilmann et al., 2003).

1.2.7. Factores ambientales y de estilo de vida.

El estrés, tabaco, alcohol, radiaciones, factores psicológicos y un IMC superior a 30 pueden estar relacionados con los abortos espontáneos y recurrentes (Harlap and Shiono, 1980; Sugiura-Ogasawara et al., 2002), aunque no han sido claramente relacionados con los últimos.

1.2.8. Factores inmunológicos.

Por último, los abortos espontáneos pueden ser producidos por factores inmunológicos, tanto aloinmunes como autoinmunes. Si bien, un proceso autoinmunitario hace referencia a una reacción inmunitaria contra «lo propio», un proceso aloinmune define una reacción inmunitaria contra «lo no propio».

Hoy en día, un embarazo satisfactorio sigue siendo un enigma inmunológico ya que los antígenos fetales deben de pasar desapercibidos por el sistema inmunitario materno. De este modo, los trastornos aloinmunes que son causa de aborto vendrían originados por el rechazo, por parte de la madre, de los antígenos de origen paterno expresados por el feto, fundamentalmente a nivel endometrial, en la interfase maternofetal. Para que esto no suceda, en condiciones fisiológicas se desarrollan una serie de mecanismos de “tolerancia inmunitaria”. Un desajuste en el engranaje del sistema inmunitario o en la relación inmune feto-materna puede generar patologías como son el aborto de repetición, hipertensión inducida por el embarazo (PIH) (Sheffer-Mimouni et al., 2002) o la amenaza de parto pre-término. Incluso las

patologías placentarias como el retardo del crecimiento fetal o pre-eclampsia, están relacionadas con la respuesta inmune materna, la cual es aún más acusada en embarazos conseguidos con donación ovocitaria (Gundogan et al., 2009).

Los principales factores inmunológicos propuestos como causa de aborto recurrente serán ampliados con más detalle en la sección 1.6. Incluso hoy día, sigue siendo una incógnita la contribución real de los factores inmunológicos en la etiología del aborto esporádico. En gran medida, ello se debe a que seguimos sin conocer con exactitud cuáles son los complejos mecanismos inmunológicos que contribuyen al éxito del embarazo normal.

A pesar de todos estos factores que podrían producir la pérdida de la gestación, un 30-50% de los abortos, según estudios, quedan sin un diagnóstico etiológico (Li et al., 2002a). Por ello, hoy día, muchas investigaciones, como el presente estudio, se dirigen a relacionar los factores inmunológicos como posible origen de los abortos espontáneos (Christiansen, 2006).

1.3. Gestaciones espontáneas versus gestaciones de técnicas de reproducción asistida.

Algunos autores concluyen que las técnicas de reproducción asistida (TRA) no suponen un aumento del riesgo de aborto ya que observan que la tasa de aborto espontáneo en los embarazos conseguidos mediante reproducción asistida está alrededor del 15%, mientras que el riesgo de aborto espontáneo tras gestación espontánea es de 11-19% (Pezeshki et al., 2000; Schieve et al., 2003; Steer et al., 1989).

Sin embargo, otros autores muestran en sus datos alta incidencia de abortos espontáneos en los embarazos conseguidos mediante TRA, entre un rango de 18-30%, dependiendo de diferentes factores como puede ser el factor masculino (Breart and de Mouzon, 1995; Ezra and Schenker, 1995; Gray and Wu, 2000; Liu et al., 1988; Saunders and Lancaster, 1989; Seppala, 1985; Steril, 1995; Wang et al., 2004). Estas cifras aumentan hasta un 39,3% si nos centramos en pacientes de TRA mayores de 43 años (Schieve et al., 2003).

Por otro lado, algunos autores han evidenciado un ligero aumento pero significativo del riesgo de aborto al someter a las pacientes a altas dosis comparado con bajas dosis de hormonas durante la estimulación (Raziel et al., 2002; Wang et al., 2004) pero no ha sido del todo bien demostrado.

La inexactitud en la definición de gestación y de aborto puede crear estas discrepancias entre unos y otros autores. Además, el aumento de las tasas de aborto, en mayor o menor porcentaje, en las pacientes sometidas a TRA puede estar asociado a las características de la población que se somete a un ciclo de reproducción asistida. El aumento del riesgo de aborto en las pacientes de TRA puede estar originado por una patología de base, es decir, por factores de predisposición asociados al uso de las TRA más que por el propio tratamiento recibido. Por ejemplo, las pacientes que acuden a TRA suelen ser de mayor edad, nulíparas o con una historia de abortos anteriores, y estos factores están asociados con mayor riesgo de pérdida del embarazo (Nybo Andersen et al., 2000). Una mujer infértil que acude a una clínica de reproducción asistida puede tener alteraciones uterinas o tubáricas, disfunción del cuerpo lúteo, ovarios poliquísticos o endometriosis, los cuales son factores que podrían aumentar el riesgo de aborto y que deben ser considerados. Por último, el número de abortos procedentes de gestaciones espontáneas es difícil de medir y puede ser infraestimado en relación a lo que ocurre con las TRA.

1.4. Características de la decidua materna.

Consideramos a la decidua un lugar con gran importancia en el mantenimiento del embarazo ya que es el tejido materno que tapiza al útero gestante interaccionando con las células fetales y formando parte de la interfase maternofetal. Y, por lo tanto, es importante saber las células que la componen.

El sincitiotrofoblasto fetal entra en contacto con ella y la circulación sanguínea materna exponiéndose a los leucocitos presentes en ella, como son las células NK, macrófagos y linfocitos T, así como las células dendríticas (DC). El número de leucocitos totales en la decidua va cambiando en los distintos estadios del ciclo y a lo largo del embarazo, con lo cual su función en el ciclo menstrual y a lo largo de la gestación es, seguramente, diferente. De este modo en la fase secretora del ciclo menstrual, momento en el que debe producirse la implantación del blastocisto, los leucocitos de la decidua constituyen un 15-20% de las células deciduales, llegando a componer en el primer trimestre del embarazo el 50% de las células deciduales (Whitelaw and Croy, 1996). Este incremento en el porcentaje celular es uno de los mayores indicios de que estas células, a pesar de su alto potencial citotóxico, juegan un importante papel en el establecimiento de la unidad feto-placentaria y en el mantenimiento inmunológico del embarazo. Los leucocitos deciduales, bajo condiciones normales, deberán de ser inmunosuprimidos a favor de la tolerancia materno-fetal. De la misma manera, esta acumulación de linfocitos en la decidua

1. INTRODUCCIÓN

materna ejerce su función citotóxica en los casos de detención del embarazo. Aún queda por aclarar si este aumento es producido por reclutamiento desde otros sitios o por proliferación *in situ* en respuesta a la influencia hormonal directa o indirecta o en respuesta a factores solubles producidos localmente. Por último, hacia el final del embarazo disminuye el número de células del sistema inmunitario presentes en la decidua.

Las células NK uterinas constituyen un 45% de las células totales de la decidua y un 70-80% de las células inmunitarias deciduales en el primer trimestre del embarazo. Se encuentran localizadas principalmente en los sitios donde se produce la implantación, en contacto íntimo con el TEV y en las paredes de las arterias espirales uterinas. Un 90% de las NK uterinas son de una subpoblación concreta denominada NK CD56⁺, CD16⁻ y CD3⁻ (bright) o linfocitos granulares grandes, las cuales suelen tener bajos niveles de citotoxicidad pero son grandes secretoras de citoquinas y factores de crecimiento angiogénicos favorecedoras del embarazo. La baja citotoxicidad de estas células no es realmente una función sino que es una cualidad por la que estas células pueden estar presentes en grandes cantidades en la interfase feto-materna. El 10% restante de las células NK uterinas son del fenotipo NKCD56⁻, CD16⁺ (dim), las cuales son más citotóxicas y tienen menor actividad secretora (Bulmer and Sunderland, 1984; Ritson and Bulmer, 1987; Starkey et al., 1988). Se presupone que su papel principal lo realizan en el primer trimestre del embarazo, ya que a partir de aquí la población de estas células decrece de manera acusada (Vince et al., 1990).

Un 8% de las células deciduales son linfocitos T, lo cual indica que se produce una respuesta inmunitaria específica celular en este tejido. Se mantienen constantes a lo largo del embarazo. Además, el tipo celular predominante en la decidua, en una ratio 3:1, son los linfocitos T CD3⁺ CD8⁺ con función citotóxica y destrucción de células infectadas (Bulmer et al., 1991), pero también hay presencia de linfocitos Th CD3⁺ CD4⁺, y de estos un pequeño porcentaje presenta el fenotipo de linfocitos T reguladores CD3⁺ CD25⁺ FOXP3⁺. Ocurre al contrario que en sangre periférica donde predominan los linfocitos Th CD3⁺ CD4⁺. La citotoxicidad de linfocitos T CD8⁺ contra los antígenos fetales será inhibida por la interacción con las moléculas del HLA clase I expresadas en el TEV. No está muy claro aún si los linfocitos en la decidua materna son sólo protectores frente a posibles antígenos externos o tienen un papel en el mantenimiento del embarazo y regulación de la invasión del trofoblasto mediante la secreción de citoquinas (Scaife et al., 2006). De hecho, se ha visto una mayor proporción de linfocitos deciduales activados en la decidua de abortos espontáneos

1. INTRODUCCIÓN

comparado con IVEs, los cuales serían los encargados de la apoptosis de las células del trofoblasto, al menos *in vitro* (Kokawa et al., 1998; Olivares et al., 2002; Raghupathy et al., 2000).

Por último, un 18% de las células presentes en el endometrio decidualizado humano durante el embarazo son monocitos o mejor dicho macrófagos deciduales (MD) y un pequeño porcentaje (1%) son células dendríticas (DC), manteniéndose constantes a lo largo del embarazo (Loke et al., 1995). Éstas son células de la primera línea defensiva celular innata y su principal función es la presentación de antígenos (CPA), expresando en su superficie moléculas del MHC II. Otra de sus funciones como células fagocíticas es ingerir los detritus celulares producidos durante la implantación y la secreción de citoquinas. Están bajo un estricto control por la influencia de factores solubles presentes en la decidua y por interacciones celulares, ya que tienen un importante papel en la inducción de la tolerancia fetal, como por ejemplo la producción de moléculas solubles que previenen la activación de los linfocitos T maternos frente a aloantígenos fetales (Heikkinen et al., 2003). Además, se ha visto una disminución en la proporción de DC-SIGN+ inmaduras en la decidua de los casos de AR comparado con embarazos terminados con éxito, lo cual nos lleva a la hipótesis de la migración de dichas células hacia los nódulos linfáticos locales para su maduración y llevar a cabo el aborto (Tirado-Gonzalez et al., 2010). Estos factores confieren a los MD y DC unas características de tolerancia antigénica que los diferencian de sus homólogos periféricos (Laskarin et al., 2007).

Existe una ausencia relativa de la actividad inmunitaria específica adaptativa en la decidua, concretamente ausencia de linfocitos B y células plasmáticas, así como un bajo número de linfocitos T, por lo que los MD pueden jugar un importante papel en la defensa innata frente a posibles infecciones.

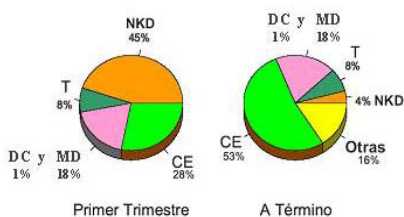


Figura 3. Poblaciones celulares en la decidua.

Abreviaturas: NKD: NK deciduales; CE: Células endometriales;
MD: Macrófagos deciduales; T: Linfocitos T; DC: Células dendríticas.
(JM. De los Santos 2010)

1.5. Complejo principal de histocompatibilidad.

El MHC (complejo principal de histocompatibilidad) es un conjunto de genes que codifican glicoproteínas altamente polimórficas, que son elementos básicos del sistema inmunitario y que se expresan en la superficie celular de los órganos y tejidos del individuo, incluso en la sangre. Los virus y ciertos tejidos como el cartílago, el hueso y el cerebro no expresan en su superficie estas moléculas del MHC.

Su función es modular la respuesta inmune defendiendo al organismo del ataque de agentes extraños.

En el humano se denominan antígenos HLA (del inglés, *Human Leukocyte Antigens*) y están codificadas por genes ubicados en la porción distal de la banda 6p21.3, en el brazo corto del cromosoma 6, y supone aproximadamente un 0.1% del genoma humano. Por el contrario, los genes que codifican para la cadena β -2-microglobulina, cadena ligera unida a la molécula del HLA, están en el cromosoma 15.

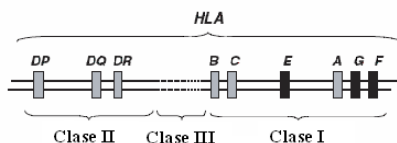


Figura 4: Organización génica del MHC.

Una de las características más relevantes del MHC es que son genes altamente polimórficos de manera que existen diversos alelos para cada gen con una presencia importante en la población.

Los genes del MHC están en desequilibrio de enlace (DE), es decir, alelos de diferentes genes se hallan en un mismo cromosoma con una frecuencia superior a la esperada en una combinación al azar. Debido a la cercanía de los diferentes locis tienden a heredarse en bloque y la recombinación intra-sistema HLA es poco frecuente. A esta combinación de determinantes genéticos se le denomina haplotipo. Ya que el cromosoma 6 es un autosoma, todos los individuos tienen dos haplotipos HLA (uno para cada cromosoma).

Sus genes tienen una expresión codominante, es decir, en las células de un individuo existen dos alelos de cada HLA y ambos se manifiestan en el fenotipo.

Con respecto a las características bioquímicas y estructurales de las moléculas del MHC observamos que los genes de tipo I y II codifican dos grupos de proteínas

estructuralmente diferentes pero homólogas y análogas. Todas poseen 4 tipos de segmentos. Un segmento de unión al péptido o hendidura extracelular, dominios extracelulares tipo Inmunoglobulina (Ig), un segmento transmembrana por el que se ancla a la célula y una porción citoplasmática carboxi-terminal. Los dominios extracelulares tipo Ig del MHC I son distintos a los del MHC II.

Existen varios tipos de MHC:

1) MHC tipo I: Son glicoproteínas presentes en la superficie de casi todas las células nucleadas del organismo. Extracelularmente son heterodímeros constituidos por dos cadenas polipeptídicas asociadas sin enlaces covalentes: una cadena α o cadena pesada constituida por tres dominios extracelulares (dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) y la cadena ligera β -2-microglobulina (Bjorkman and Parham, 1990). Intracelularmente están formadas por un segmento transmembrana y otro citoplasmático.

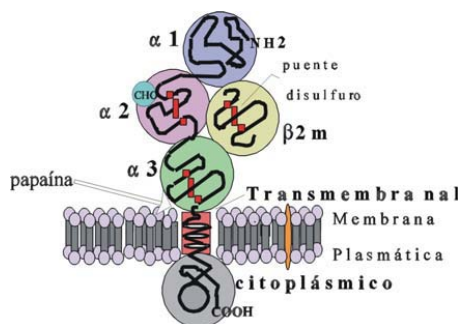


Figura 5: Estructura proteica de las moléculas del MHC tipo I.

Dentro de las moléculas del MHC tipo I se pueden diferenciar dos grupos:

1.1) MHC tipo Ia o clásico: HLA-A, HLA-B y HLA-C.

1.2) MHC tipo Ib o no clásico: HLA-G, HLA-E y HLA-F.

Centrándonos en la molécula de interés en este estudio, el HLA-G, cada dominio que la compone realiza o participa en una función diferente, por ejemplo:

● La hendidura formada por los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ se encarga de la unión del péptido a presentar. Esta hendidura de presentación consiste en una plataforma de ocho láminas β antiparalelas en la que se apoyan dos α -hélices paralelas.

● Además, los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ también se encargan de la interacción con el receptor TCR (receptor de las células T) de los linfocitos T. El TCR es un receptor celular unido a membrana asociado a una vía de señalización intracelular que posee

1. INTRODUCCIÓN

como ligando a péptidos pequeños asociados con moléculas del MHC en la membrana plasmática de macrófagos y otras APC.

● Sin embargo, en la unión del HLA-G al co-receptor CD8 del TCR están implicados los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ pero principalmente interviene el dominio $\alpha 3$, concretamente las posiciones 214 y 228.

● Con respecto a las células NK, la unión a los receptores inhibidores KIR2DL4 de las células NK es realizada por el dominio $\alpha 1$ (Yan and Fan, 2005), pero la unión a receptores inhibidores tipo ILT2 de las células NK es realizada por el dominio $\alpha 3$ (Shiroishi et al., 2003). También se ha observado la unión del receptor CD94/NKG2A de las células NK al HLA-G, aunque no está definido a través de que dominio ocurre esta interacción. Lo que si está claro es que el principal ligando de este tipo de receptor de las células NK es el HLA-E.

● La unión al receptor ILT2 de los linfocitos T y B, y al ILT4 de los monocitos/macrófagos y DC también es realizada por el dominio $\alpha 3$.

● Por último, los tres dominios participan en la asociación de la β -2-microglobulina pero principalmente va unida al dominio $\alpha 3$. Esta molécula es necesaria para la expresión superficial del MHC clase I y por lo tanto, de la misma forma, en el mantenimiento y estabilización de la conformación de la molécula del HLA-G.

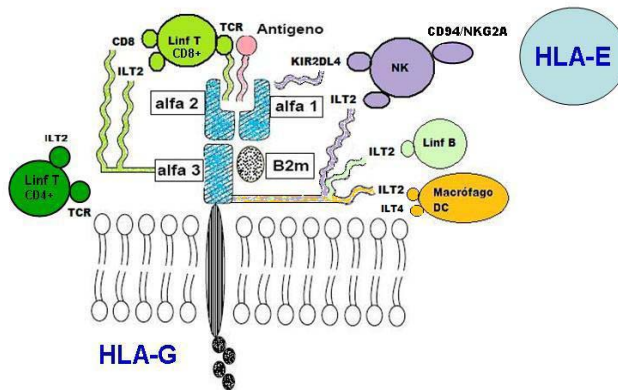


Figura 6: Interacción del HLA-G con los receptores de los distintos tipos celulares.

La función del MHC tipo I es presentar antígenos endógenos o de origen citoplasmático a los linfocitos Tc CD8⁺. En una situación normal las moléculas del MHC clase I se unen a péptidos derivados de moléculas propias, y en el caso de

1. INTRODUCCIÓN

infección por un parásito intracelular (virus, ciertas bacterias y protozoos) se unen a péptidos derivados de proteínas del patógeno. En ambos casos los péptidos derivan de procesamiento citosólico del antígeno endógeno en el proteosoma. Estos antígenos serán péptidos de pequeño tamaño, no más de 13 aminoácidos. Péptidos de mayor tamaño no pueden unirse debido a que los extremos de la hendidura se cierran. Otra de las funciones realizadas por las moléculas del MHC-I, y de gran relevancia, es la de inhibir la actividad citotóxica de las células NK.

2) MHC tipo II: Son glicoproteínas expresadas en la superficie de determinadas células relacionadas con la respuesta inmune, como las células presentadoras de antígenos (CPA), linfocitos B, macrófagos, células de Langerhans de la epidermis, endotelio vascular, algunas células epiteliales, neutrófilos y linfocitos T después de activarse. Así mismo, están ausentes en el trofoblasto fetal, las plaquetas, glóbulos rojos, linfocitos T en reposo y fibroblastos.

Están constituidas por 4 dominios extracelulares ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) ($\beta 1$ y $\beta 2$). A diferencia de las MHC-I, los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ forman la región de unión al péptido. El dominio $\alpha 1$ es abierto mientras que los dominios $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$ se pliegan mediante un puente disulfuro. También contienen un segmento transmembrana y otro citoplasmático.

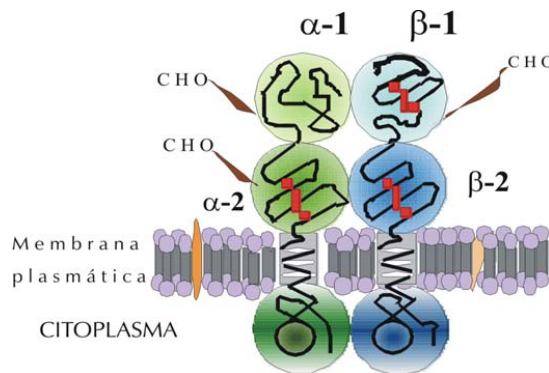


Figura 7: Estructura proteica de la molécula del MHC tipo II.

Las moléculas del MHC de tipo II son: HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP.

Su función es presentar a los linfocitos Th $CD4^+$ antígenos de origen exógeno, que previamente han sido introducidos en la célula presentadora por endocitosis o

fagocitosis, y que son sometidos a procesamiento endocítico. Estos antígenos serán péptidos de mayor tamaño, de unos 12-30 aminoácidos.

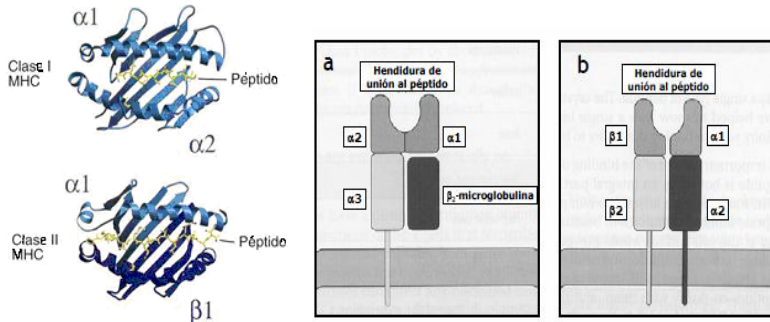


Figura 8: Comparación de la estructura molecular del MHC tipo I y II.

3) MHC tipo III: Corresponden a genes contenidos dentro de la región genética del MHC, pero cuyos productos no son estrictamente antígenos HLA. No tienen función ni estructura similar a la de los genes del MHC I y II. Originalmente se definieron como genes que codifican algunos componentes del complemento (C2, C4B y A, Bf) y algunas citoquinas estructuralmente relacionadas, como el factor de necrosis tumoral (TNF).

Igualmente hay moléculas pertenecientes al grupo del MHC-I que no están codificadas en la región genética del MHC, como son las moléculas CD1.

1.5.1. HLA-G: Molécula no clásica del MHC tipo Ib.

La molécula del HLA-G, la molécula que nos ocupa en este trabajo, fue descrita por primera vez por Geraghty DE en 1987 (Geraghty et al., 1987). El papel del antígeno HLA-G no está claro hoy en día y existe aún controversia en cuanto a su importancia en el mantenimiento del embarazo. Sin embargo, el hecho de que dicha proteína tenga una expresión tisular restringida, principalmente expresada en el citotrofoblasto, junto con la existencia de una disminución del resto de moléculas clásicas del MHC en este tejido, ha abierto un amplio abanico de teorías sobre su papel en el embarazo pudiendo tener una función crítica en el control de las reacciones de rechazo, contribuyendo, por tanto, a la supresión de la respuesta inmunitaria, y a la presencia de un estado de tolerancia del feto semiallogénico por el sistema inmunitario materno facilitando así el mantenimiento del embarazo (Carosella et al., 1999). Concretamente, algunas de las funciones que realiza son la inhibición de

las células NK deciduales, modulación de la secreción de citoquinas o la regulación y estabilización de la expresión superficial del HLA-E, las cuales serán explicadas de forma más detallada posteriormente.

La teoría que gira alrededor del papel protector del HLA-G en el embarazo se basa en determinadas características moleculares que se detallan a continuación:

- 1) Su limitado polimorfismo con respecto al resto de moléculas del HLA.
- 2) Un codón stop en el segundo codón del exón 6 que codifica una proteína con un segmento citoplasmático acortado en 19 aminoácidos menos que el resto de los HLA clásicos, de manera que la mayor parte del exón 6 así como el séptimo y el octavo exón no se traducen a proteínas, situación que podría suponer un cambio en la estructura intracelular del HLA-G que se asociaría con una disminución en la eficiencia de presentación del antígeno, lo cual se considera un beneficio para las células del trofoblasto fetal, ya que de esta forma se previene su destrucción (van der Ven et al., 1998).
- 3) La pérdida de un motivo estructural de endocitosis (“mofit”) en esta región citoplasmática proporciona al HLA-G una reducida señal de endocitosis, lo cual conlleva a una mayor vida media en la superficie celular de las células en las que se expresa (Davis et al., 1997; Park et al., 2001).
- 4) Una región reguladora en el extremo 5' y unos mecanismos reguladores de la transcripción diferente a los de los demás HLA clase I, lo cual puede explicar su diferente expresión celular y tisular.
- 5) Un fraccionamiento alternativo del transcrito primario ARNm (“splicing”) que genera 7 isoformas diferentes, unidas a membrana o en forma soluble. El significado funcional del fraccionamiento alternativo radica en que determinadas isoformas pueden suplir la función de otras que pudieran faltar debido a polimorfismos que afectan a la síntesis o expresión de la proteína completa.
- 6) La presencia de una cisteína en el codón 42 la cual le permite la formación de dímeros mediante un puente disulfuro intermolecular de Cys42-Cys42. Este dímero es capaz de unirse a la molécula CD8 y a los receptores inhibidores ILT2 y ILT4 de las células inmunitarias (Shiroishi et al., 2006).

Además, la molécula del HLA-G tiene otra característica particular y es que tiene un patrón de distribución tisular y celular inusual, atípico y diferente al del resto de sus homólogos HLA-A, HLA-B y HLA-C.

1.5.1.1. Secuencia y estructura del gen del HLA-G.

El gen del HLA-G está situado en el cromosoma 6, entre el locus del HLA-F y HLA-A.

La secuencia del HLA-G tiene gran homología a la de los genes clásicos del MHC (HLA-A, HLA-B y HLA-C) (75%-80% de similitud aminoacídica) (Messer et al., 1992), a excepción de la región 3' la cual genera un tallo citoplasmático acortado en el HLA-G que le proporciona una reducida endocitosis espontánea y alargamiento de su vida media en la superficie celular de las células en las que se expresa (Davis et al., 1997; Park et al., 2001).

La estructura de los genes HLA-G está compuesta por una región 5' donde se encuentra el promotor, ocho exones, siete intrones (porciones del gen que no codifican proteína) y una región 3' no traducida. El exón 1 codifica el péptido líder, los exones 2, 3 y 4 codifican los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ respectivamente, el exón 5 la región transmembrana y los exones 6, 7 y 8 la región intracitoplasmática de la molécula del HLA-G (Geraghty et al., 1987).

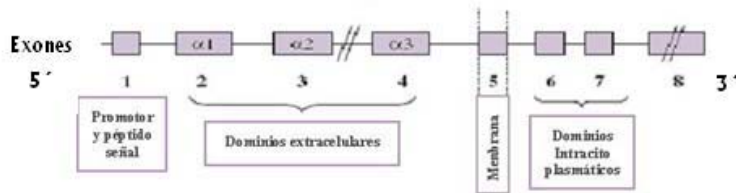


Figura 9: Región genómica del HLA-G.

1.5.1.2. Polimorfismos del HLA-G y su efecto a nivel funcional.

En la región genética del HLA-G pueden ocurrir variaciones a nivel genético producidas por sustituciones de bases o SNP (del inglés, *single nucleotide polymorphism*) que pueden dar lugar a cambios en el tipo de aminoácido que constituye la proteína HLA-G o incluso pueden ocurrir deleciones que provoquen un corrimiento en la pauta de lectura aminoacídica.

El loci del HLA-G es más polimórfico de lo que se pensaba hace tiempo (Alizadeh et al., 1993; Morales et al., 1993) aunque no tanto como sus compañeros del HLA clase Ia o HLA clase II. Actualmente se han definido 46 alelos en el locus del HLA-G, 2 de ellos alelos nulos (HLA-G*0105N y HLA-G*0113N) basados en una variación de la secuencia y 15 alelos a nivel de proteína (<http://ebi.ac.uk.imgt/hla>).

Están en aumento las investigaciones sobre las variaciones en la secuencia del HLA-G debido al convencimiento de un papel importante de éste en el embarazo. Hasta hoy día, se han detectado cerca de 72 SNP desde el exón 1 al intrón 6. La

presencia de variaciones puntuales en el gen HLA-G puede implicar alteraciones en la secreción de la proteína.

Una única deleción o un cambio de base en el gen del HLA-G podrían estar relacionados con la pérdida temprana del embarazo. Por ejemplo, la deleción de una C en el codón 130 que genera el alelo HLA-G*0105N (Pfeiffer et al., 2001) o el cambio de base del codón 110 que genera el alelo HLA-G*0104 (Aldrich et al., 2001) están asociados significativamente con el riesgo de aborto. Sin embargo, el polimorfismo más estudiado y relacionado con los abortos recurrentes es el de INDEL 14pb en el exón 8. Es el caso del alelo HLA-G*0106, asociado con el polimorfismo INDEL 14pb, que tiene una mayor frecuencia en placentas pre-eclámpsicas frente a las control (21.2% vs 6.6%) y también mayor frecuencia, aunque no significativa, en placentas procedentes de abortos recurrentes frente a los controles (Moreau et al., 2008). Otros autores también han asociado el polimorfismo en la región 3' del HLA-G en sangre periférica con el riesgo de aborto recurrente, aunque unos lo asocian con la inserción en homocigosis (+14/+14pb) (Hviid et al., 2002; Hviid et al., 2004a; Yan et al., 2006b; Zhu et al., 2010), otros lo asocian con la inserción/deleción en heterocigosis (-14/+14 pb) aunque de forma no significativa, y otros los homocigotos para la deleción (-14/-14 pb) (Ober et al., 2003).

Pero, incluso hoy día, existen resultados contradictorios entre los diferentes estudios genéticos del HLA-G con respecto a este tema, ya que hay autores que no encuentran asociación entre determinados genotipos y el aborto recurrente (Aruna et al., 2010b; Karhukorpi et al., 1997; Penzes et al., 1999; Yamashita et al., 1999; Yan et al., 2006a). Probablemente las diferencias entre estos grupos se deban al limitado tamaño muestral.

Sin embargo, a pesar de que un único cambio pueda o no pueda afectar a las funciones del HLA-G, la mayoría de los SNP están localizados fuera de la parte de la molécula que tiene relevancia funcional o se dan en la tercera base que compone el codón, de manera que no repercutiría en un cambio de aminoácido. En general, es en el exón 2 y 3, que codifican el dominio $\alpha 1$ y $\alpha 2$, donde se presentan polimorfismos con más frecuencia, mientras que el exón 4, dominio $\alpha 3$, es más conservado (Arnett and Parham, 1995; van der Ven et al., 1998). En concreto, hay determinadas regiones del HLA-G que deben estar más conservadas genéticamente debido a su importancia funcional, como es el caso de algunas posiciones aminoacídicas del exón 2 (residuos 76-79) que constituyen el dominio $\alpha 1$ y recordemos que sirven como ligando para los receptores inhibitorios KIR2DL4 de las células NK (Yan and Fan, 2005), o la zona de unión a la molécula CD8 de los linfocitos T formada por determinadas posiciones del

exón 4, correspondiente con el dominio $\alpha 3$. Sin embargo, como veremos a continuación, también se ha detectado la presencia de sustituciones en zonas con importancia funcional. Otras regiones son más tolerantes a la presencia de polimorfismos como es la zona de unión y presentación del antígeno formada por parte del exón 2 y del exón 3, que constituyen el dominio $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y que forman una hendidura para albergar al péptido. De hecho, el polimorfismo en el codón 167 confiere al HLA-G un mayor espectro de antígenos presentados (van der Ven et al., 1998).

Las asociaciones no aleatorias entre los polimorfismos en locus diferentes o dentro del mismo locus se miden por el grado de desequilibrio de enlace (DE). Es sabido que existe un elevado DE dentro de la región del HLA-G, así como, existe un elevado DE del HLA-G con otros locus (Ober et al., 1996). De manera que algunos autores piensan que es casi imposible la asociación de un determinado SNP con el aborto de repetición pero, sin embargo, sí creen posible la asociación de un determinado haplotipo del HLA-G con los abortos espontáneos de repetición (Berger et al., 2010) y por esto, varios investigadores (Ober et al., 2003; Sipak-Szmigiel et al., 2007) estudian algunos polimorfismos en conjunto, como es el caso de la región 5' con 14 pb INDEL en la región 3'.

A continuación mostramos los polimorfismos más importantes, hoy en día descritos, localizados a lo largo de la secuencia genética del HLA-G.

Polimorfismos en la región del promotor (Región 5' URR):

Como hemos mencionado anteriormente, la región promotora del HLA-G es única entre el resto de los HLA. Actualmente se han encontrado cerca de 30 polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) en la región del promotor "upstream", en el extremo 5' URR (Tan et al., 2005). Esta región está localizada 1.5 Kb antes del inicio de la transcripción del HLA-G, es decir, está formada por 1500 pb y no por 500 pb como el resto de los promotores.

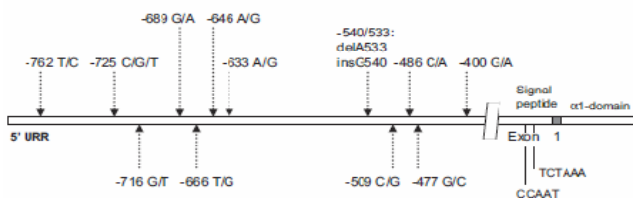


Figura 10: Polimorfismos en la región 5' URR y exón 1.

1. INTRODUCCIÓN

La región promotora del HLA-G contiene múltiples elementos regulatorios *cis*, por lo tanto los polimorfismos en esta región pueden afectar a la unión de factores nucleares o factores de transcripción a la región regulatoria y al sitio de inicio de la transcripción (Berger et al., 2010), viéndose afectada la eficiencia de la regulación transcripcional del HLA-G (Moreau et al., 1998a; Moreau et al., 1997) y probablemente viéndose afectados los niveles de expresión del HLA-G soluble (Hviid et al., 2004b; Hviid et al., 1999).

Algunas mutaciones SNP como la producida en la posición -1155 G>A afecta a la unión del factor de transcripción Foxd3 (Berger et al., 2010) o las mutaciones en -1179 A>G o -1306 G>A afectan al TSRE (trophoblast-specific response elements). Otras mutaciones en la región -487 a -475 afectan a los HSE (heat shock protein elements)(Ober et al., 2003; Solier et al., 2001) como el SNP en la posición -477 asociado con los niveles de IL-10 producidos por los PBMC. También es importante la mutación -201G>A que está localizada en el elemento NF-kB2 (región intensificadora A) dentro del CRE (cyclicAMP-response element) (Solier et al., 2001) y que no se sabe con exactitud si puede afectar a la regulación de la expresión del HLA-G (Hviid et al., 1999).

A continuación mostramos una figura donde la presencia de determinados polimorfismos puede interferir en la unión de elementos regulatorios a la región del promotor.

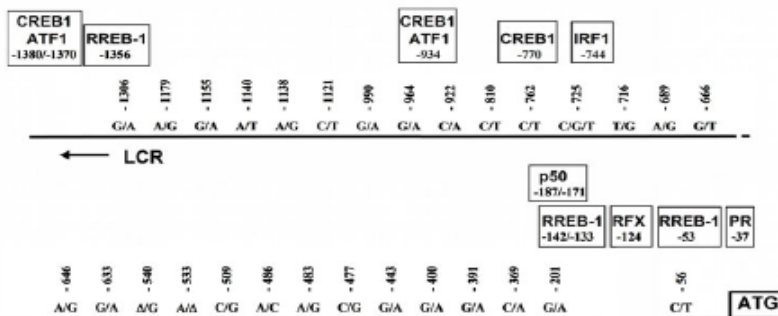


Figura 11: Interacción de los elementos reguladores en la región de control del locus del HLA-G (LCR).

Concretamente, es de especial interés, el polimorfismo SNP en la posición -725 consistente un cambio de una citosina por una guanina y es denominado polimorfismo -725C>G. Dicho polimorfismo está localizado 19 bp “downstream” del ISRE (sitio de unión al IRF (del inglés, *interferon regulatory factor*)) donde se une el

factor de transcripción IRF-1 y a 10 bp del GAS (sitio activado donde se une el IFN- γ) (Lefebvre et al., 2001; Lefebvre et al., 1999). Cuando se analiza el ADN de sangre periférica se observa que en los individuos que tienen la presencia de una G en esta posición se produce la creación de un dinucleótido CpG en las posiciones -725 y -726 y la posición -726C se metila por error. La hipótesis es que los cambios en el estado de metilación de este dinucleótido CpG pueden alterar la conformación del ADN, afectar a la unión de factores de transcripción como IRF-1 y, por lo tanto, podría ocurrir una regulación negativa de la transcripción del HLA-G, que hipotéticamente redundaría en menores niveles de proteína (Moreau et al., 2003; Ober et al., 2003). Sin embargo, el único estudio que realmente evalúa el impacto de este polimorfismo en la transcripción y expresión del HLA-G se llevó a cabo más adelante mediante ensayos *in vitro* expresando esta mutación en la línea celular de corocarcinoma trofoblástico JEG-3. Este estudio concluyó que, al contrario de lo esperado según las hipótesis anteriores de regulación negativa de la transcripción, se da un aumento significativo de la tasa de transcripción en presencia del polimorfismo -725 C>G y, como consecuencia, un incremento de la expresión del HLA-Gs comparado con los alelos con presencia de C ó T. De manera que, el mecanismo por el que se aumenta la expresión de HLA-Gs no está relacionado con el estado de metilación (Ober et al., 2006). La única limitación encontrada en dicho estudio fue la utilización de líneas celulares que pueden no mimetizar las mismas condiciones que las células del trofoblasto, por lo que no pueden asegurar que en presencia del alelo -725G pudiera darse una disminución de la transcripción en las células del trofoblasto.

A través de otros estudios realizados en sangre periférica hay autores que encuentran que el polimorfismo -725C>G presente en ambos padres es un factor de riesgo para los abortos recurrentes espontáneos, a pesar de que no es la principal causa de la pérdida gestacional por sí misma (Ober et al., 2003). Como este alelo -725G está asociado con elevadas tasas de transcripción y expresión de HLA-Gs (Ober et al., 2006), la teoría manejada es que los elevados niveles de HLA-Gs podrían ser igualmente perjudiciales en determinadas poblaciones, especialmente en las que conviven con alta carga de patógenos y comprometiéndose el funcionamiento del sistema inmunitario.

Sin embargo, otros autores encuentran que la presencia del polimorfismo en la posición -725G en muestras de sangre periférica de mujeres embarazadas en primer trimestre no aumenta el riesgo de que se produzca el aborto de forma recurrente (Sipak-Szmigiel et al., 2008). Encuentran frecuencias similares del polimorfismo

-725C>G, presente en homocigosis o heterocigosis, entre mujeres con abortos recurrentes y mujeres fértiles (20.7% vs 25.9%).

Finalmente, se deduce que tanto una expresión deficitaria como una sobreexpresión de HLA-G pueden ser perjudiciales en el embarazo.

Es bien reconocido que existe un fuerte DE en la zona del promotor del gen del HLA-G. Debido a esto, es posible realizar una asociación entre un determinado haplotipo del HLA-G (que contiene múltiples SNP) y los abortos de repetición, de manera que la concentración de variaciones polimórficas en el promotor puede incrementar el riesgo de pérdida del embarazo, quizás por alteración de la unión de factores de transcripción que conllevan a cambios en la expresión de la proteína (Berger et al., 2010). Por último, también existe un fuerte DE entre los polimorfismos que ocurren en el promotor 5'URR con las variantes de la región 3' UTR, las cuales están asociadas con cambios en la estabilidad del ARNm (Rousseau et al., 2003), por lo que todas las variaciones en el nivel de HLA-G no podrían ser atribuidas a la región del promotor por sí sola.

Polimorfismos en el exón 1.

El exón 1 codifica para el péptido líder (secuencia de aminoácidos implicada en el traslado de la proteína), el cual tendrá una gran importancia en la expresión superficial y estabilidad del HLA-E.

En el exón 1 existen algunas sustituciones sinónimas y otras no sinónimas, pero si la base cambiada da lugar a cambios en el tipo de aminoácido que constituye el péptido líder del HLA-G (residuos 3-11) podría afectar a su expresión superficial o implicar fallos en la expresión del HLA-E (Hviid et al., 1999).

Polimorfismos en el exón 2.

El exón 2 codifica para el dominio α 1 de la molécula del HLA-G.

Se ha detectado un elevado número de mutaciones en el exón 2 como en los codones 13, 16, 27, 31, 35, 37, 54, 57, 62, 65 y 69.

Algunas mutaciones en el exón 2 están muy conservadas evolutivamente y no representan un cambio de gran importancia funcional. Es el caso del codón 31, donde el cambio de treonina por serina es neutro y, en principio, no se ve afectada la polaridad de la molécula. Este codón es responsable, junto con otros codones, de formar la hendidura de presentación de antígenos. Esta hendidura exhibe un mayor grado de variación en la secuencia de nucleótidos que el resto de regiones, aunque

1. INTRODUCCIÓN

algunas posiciones de esta región deben mantenerse conservadas (van der Ven et al., 1998). El polimorfismo en el codón 31 define el alelo HLA-G*0103.

Sin embargo, otras variaciones en el exón 2, dominio $\alpha 1$, podrían tener repercusión en la funcionalidad de la proteína del HLA-G. Por ejemplo, los residuos 76-80 de este dominio interactúan con los receptores inhibidores de las células NK deciduales; concretamente serán las posiciones metionina del residuo 76 y glutamina del residuo 79 del HLA-G las que estén envueltas en el reconocimiento de los receptores inhibitorios KIR2DL4 de las células NK (Yan and Fan, 2005), llevando a cabo la función de inmunosupresión del HLA-G. Debido a ello, se piensa que esta zona concreta del exón 2 evolucionó hasta ser una región constante y sin polimorfismos.

Recordemos que en este dominio $\alpha 1$ también existe una zona de unión al receptor TCR y a la molécula CD8 de los linfocitos Tc. Con respecto a esta función, existen algunas sustituciones de aminoácidos que pueden ser más toleradas como las del codón 62 y 65 y permitir la interacción con el TCR. Sin embargo otras posiciones como el tetrapéptido motivo estructural RFDS en los residuos 35-38 deben estar más conservadas.

El polimorfismo del codón 57 ha sido uno de los codones más estudiados dentro del exón 2 (Ellis et al., 1990; Morales et al., 1993; Yamashita et al., 1996). Consiste en un cambio de CCG por CCA, la cual es una mutación silente de prolina por prolina, pero al estar presente en el límite entre un intrón y exón puede ser importante en la regulación del fraccionamiento del ARNm del HLA-G (Matte et al., 2002). El polimorfismo en el codón 57 suele ir en combinación con el polimorfismo del codón 93 del exón 3 (Lajoie et al., 2008).

Uno de los polimorfismos con consecuencias más graves encontrados en el exón 2, es el polimorfismo del codón 54, consistente en un cambio del codón CAG por TAG que es un codón stop prematuro, generando un alelo nulo denominado HLA-G*0113N y una proteína truncada o no completa y presumiblemente no funcional. No se produce ninguna isoforma, ni soluble ni unida a membrana. Únicamente ha sido encontrado en un individuo con dicho polimorfismo, por lo que se piensa que la selección natural actúa en contra de la generación de este tipo de mutación y de los alelos nulos (Mendes-Junior et al., 2010).

Existen muy pocos estudios sobre la asociación de polimorfismos en el exón 2 con los abortos recurrentes, pero en principio parece no haber ninguna relación, al menos con respecto a los polimorfismos de los codones estudiados en sangre periférica de mujeres que han sufrido abortos de repetición frente a sus controles (Suryanarayana et al., 2008).

Polimorfismos exón 3.

La mayoría de las mutaciones puntuales de la molécula del HLA-G que se han descrito en la población sana están localizadas en el exón 3, que codifica para el dominio $\alpha 2$. A pesar de la elevada cantidad de variaciones encontradas en el exón 3 del HLA-G hemos de mencionar algunos codones específicos que nos han parecido más interesantes puesto que pueden tener mayor importancia en la transcripción, así como en la conformación de la molécula y en la expresión superficial de la proteína. Estos son el codón 93, codón 101, codón 107, codón 110, codón 130 y codón 164.

1) En el codón 93 la sustitución de la 3ª base (CAC por CAT) origina una sustitución sinónima de histidina por histidina. Debido al fuerte DE que existe dentro de la región genética del HLA-G, hay autores que estudian algunos polimorfismos en conjunto como es el caso del codón 93 con las 14 pb INDEL estudiado en placentas (O'Brien et al., 2001). El alelo HLA-G*010101 con una CAC en el codón 93, es decir, ausencia de polimorfismo, junto con la delección de 14 pb en el exón 8 puede causar altos niveles de los transcritos y de la expresión proteica del HLA-G. Mientras, el alelo HLA-G*010102 con el polimorfismo CAT en codón 93 e inserción de 14 pb en el exón 8 puede causar bajos niveles de los transcritos de HLA-G, baja expresión de la proteína y variaciones del fraccionamiento alternativo sobre el transcrito en las placentas con preeclampsia. Sin embargo, este efecto se atribuye en mayor medida al polimorfismo de las 14 pb más que al codón 93 (Larsen and Hviid, 2009).

2) Las cisteínas codificadas por los codones 101 y 164 forman un puente disulfuro que está muy conservado en los genes del MHC tipo I (Heinrichs and Orr, 1990). Es importante analizar la presencia de estas variaciones ya que pueden alterar la estructura terciaria y conformación de la proteína y, sobre todo, podrían repercutir en la región por donde se une el péptido presentado.

En el codón 101 puede ocurrir un cambio de una cisteína por un triptófano (TGC por TTC) o cambio de cisteína por serina (TGC por AGC) o cisteína por tiroxina (TGC por TGG); y en el codón 164 se produce un cambio de cisteína por triptófano (TGC por TGG). Se piensa que estas mutaciones afectarían a la formación del puente disulfuro comentado anteriormente (van der Ven et al., 1998).

Ambas sustituciones han sido encontradas únicamente en heterocigosis.

3) En el codón 107 pueden ocurrir varias sustituciones. Una de ellas es el cambio del codón GGA por CGA o AGA, ocurriendo un cambio de glicina por arginina y un cambio de polaridad, lo cual puede afectar al motivo estructural SDGR formado por las posiciones 105-108, afectar a las interacciones moleculares con otras células y causar un efecto indirecto sobre la unión del HLA-G al receptor TCR-CD8 de los

1. INTRODUCCIÓN

linfocitos Tc (Krensky and Clayberger, 1996; van der Ven et al., 1998). Tal vez, la más importante es la sustitución no sinónima y sin sentido de GGA por TGA en la que una glicina pasaría a ser sustituida por un codón stop dando lugar a una proteína truncada que puede llegar a ser inactiva o no funcional (Morales et al., 1993; van der Ven and Ober, 1994). Pero, hasta hoy día, esta sustitución ha sido encontrada solo en heterocigosis.

4) En el codón 110 ocurre un cambio en la primera base del codón, CTC por ATC, que provoca sustitución del aminoácido leucina por isoleucina. El polimorfismo de este residuo está muy conservado y no se ve afectado directamente el dominio $\alpha 2$, no se afecta la estructura tridimensional o la polaridad de la molécula ya que el cambio de leucina por isoleucina es hidrofóbico. Dicho polimorfismo, tampoco afecta a funciones de la proteína como las interacciones con el sitio de unión del péptido o con los receptores de los linfocitos Tc. El polimorfismo del codón 110 suele ir en combinación con dos polimorfismos silentes en el codón 57 (exón 2) y codón 104 (exón 3) (Lajoie et al., 2008). El polimorfismo en el codón 110 origina el alelo HLA-G*0104. Este alelo está clasificado por Rebmann como un alelo altamente secretor de HLA-G soluble en suero materno (Rebmann et al., 1999). Sin embargo, está relacionado por Aldrich con un incremento del riesgo de sufrir un aborto (Aldrich et al., 2001), por lo que este grupo sugiere que tal vez, aunque se aumente la presencia de HLA-Gs, este cambio aminoacídico sí provoque una disminución de la eficiencia de la interacción con las células inmunitarias maternas.

5) En el codón 130 ocurre una deleción de una citosina en la posición 1597 (deleción 1597C) que origina el alelo nulo HLA-G*0105N (Aldrich et al., 2002; Aldrich et al., 2001; Hviid et al., 1997; Le Discorde et al., 2005; Moreau et al., 2002; Ober et al., 1998; Ober et al., 1996; Suarez et al., 1997). La presencia de este polimorfismo es bastante frecuente en algunas poblaciones y ausente en otras.

Esta deleción origina un corrimiento en del sitio de lectura provocando que los aminoácidos a partir de la segunda mitad del exón 3 puedan ser diferentes (CTG por TGC). La deleción del alelo *HLA-G*0105N* puede generar un codón stop en el codón 189 (GTG por TGA), en el exón 4, de manera que se crean isoformas incompletas o una proteína truncada y no hay secreción de la isoforma completa del HLA-G1 o de la isoforma soluble HLA-G5.

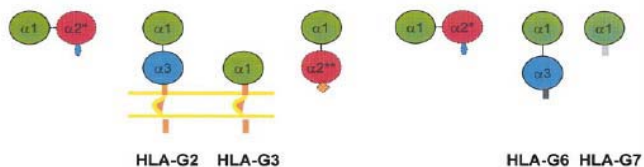
En el caso de la isoforma HLA-G4, que no contiene el exón 4, dominio $\alpha 3$, puede originarse el codón stop en el codón 297 (GTA por TAG), en el exón 5, por lo que se bloquearía también su traducción (Castro et al., 2000; Le Discorde et al., 2005;

1. INTRODUCCIÓN

van der Ven et al., 2000). En este caso se genera una proteína HLA-G4 con presencia de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y parecida a la que se generaría en el caso de HLA-G1 y HLA-G5 con dicha mutación.

Estas isoformas afectadas por la delección no están completas pero tienen los dominios $\alpha 1$ y mitad del dominio $\alpha 2$ por lo que son capaces de realizar determinadas funciones. De manera que esta delección no afecta al reconocimiento de los receptores KIR2DL4 expresados en las células NK, función realizada por el dominio $\alpha 1$ y codificada por el exón 2, por lo que no se ve afectada la función de inhibición de estas células a través de este receptor inhibitor, ni afecta al péptido líder del HLA-G, función realizada por el exón 1, por lo que no se ve afectada la expresión superficial del HLA-E (Sala et al., 2004).

En cambio, se sabe que la delección 1597C no afecta a otras isoformas unidas a membrana como la HLA-G2 y HLA-G3 ni a las isoformas solubles HLA-G6 y G7 ya que, por fraccionamiento alternativo, no tienen el exón 3, dominio $\alpha 2$, y no se ven afectadas por la delección ni por el corrimiento de aminoácidos (Ober et al., 1998). Se cree que estas isoformas truncadas son funcionales y pueden reemplazar en determinados aspectos a las isoformas completas del HLA-G. Pueden proteger del ataque de las células NK y CTL por interacción del dominio $\alpha 3$ con el receptor inhibitor ILT2 o por interacción del dominio $\alpha 1$ (presente en todas ellas) con el receptor inhibitor KIR2DL4 de las células NK. También pueden inducir la expresión superficial del HLA-E porque pueden sintetizar el péptido líder y realizar otras funciones para contribuir a la supervivencia fetal (Le Discorde et al., 2005; Menier et al., 2000; Moreau et al., 2002; Sala et al., 2004).



*Figura 12: Isoformas presentes en los individuos homocigotos para HLA-G*0105N.*

El polimorfismo del codón 130 suele ir en combinación con 2 polimorfismos silentes en el codón 57 (exón 2) y codón 93 (exón 3).

Existe controversia con respecto a la asociación de esta mutación y la consecuente falta de HLA-G soluble con la pérdida del embarazo. Hay autores (Castro et al., 2000; Ober et al., 1998; van der Ven et al., 2000) que encuentran RNV homocigotos para este alelo nulo y que evolucionan como embarazos normales y a término, por lo que concluyen que el HLA-G no es un factor determinante para el mantenimiento del embarazo. Debido a esto y a la alta incidencia de este polimorfismo en determinadas poblaciones, se piensa que la ausencia de expresión de HLA-G1es seleccionada positivamente, resultando beneficiosa para el embarazo en poblaciones con alta carga de patógenos ya que no se suprime la acción citolítica o citotóxica de las NK y linfocitos T, lo que se traduce en una respuesta más robusta a los patógenos intrauterinos (Aldrich et al., 2002). Incluso se piensa que esta mutación implica otras ventajas que compensan una proteína no funcional o que este alelo nulo afecta a partes de la molécula no funcionales (van der Ven et al., 1998). En consonancia con estas observaciones, otros estudios no encuentran diferencias significativas en la frecuencia de este alelo nulo en sangre periférica entre mujeres con abortos recurrentes espontáneos y mujeres fértiles usadas como control (0,7% vs 1,4%) (Yan et al., 2006a).

Sin embargo, otros autores encuentran que el alelo HLA-G*0105N producido por este polimorfismo está asociado con la disminución de HLA-Gs1 y G5 en suero, es decir, es un alelo bajo secretor de HLA-G (Rebmann et al., 1999; Rebmann et al., 2001), y a su vez está relacionado con el aumento del riesgo de aborto recurrente (Aldrich et al., 2001; Pfeiffer et al., 2001). Pfeiffer encontró que un 70% de las parejas que sufrían abortos recurrentes contenían los alelos bajos secretores HLA-G*0105N y HLA-G*01013.

Polimorfismos en el exón 4:

El exón 4 codifica para el dominio $\alpha 3$, el cual es estructuralmente diferente del dominio $\alpha 3$ del resto de las moléculas HLA clase I (Clements et al., 2005). Esta región no presenta muchos polimorfismos, es más bien constante debido a las funciones que realiza. Una de ellas es la interacción con la β -2-microglobulina, la cual es importante para el mantenimiento de la conformación nativa de la molécula (van der Ven et al., 1998). El dominio $\alpha 3$ también interacciona con los receptores inhibitorios LIR-1/ILT2 de las células NK, macrófagos y linfocitos T y B y con los receptores LIR2/ILT4 que son selectivamente expresados en monocitos/macrófagos y DC (Kamishikiryo and Maenaka, 2009; Ponte et al., 1999; Shiroishi et al., 2003). Por último, se encarga de la unión del HLA-G al coreceptor CD8 de los linfocitos Tc. Los sitios más importantes de

unión al coreceptor CD8 están en “clusters” o agregados (agregado1: residuos del 223-229; agregado 2: residuos 233-235; agregado 3: residuos 245-247). A pesar de ser una zona muy funcional y que debería estar muy conservada, se han detectado cambios de bases que afectan al reconocimiento y unión del HLA-G al CD8 de los linfocitos Tc, incluso generando dos nuevos alelos, como es el caso del codón 258, donde ocurre el cambio de una treonina por una metionina que genera el alelo HLA-G*0106; o el polimorfismo en el codón 219, descubierto recientemente, que consiste en el cambio de arginina por triptófano y que genera el alelo HLA-G*0108 (Moscoso et al., 2007).

Polimorfismos del exón 8 (Región 3' UTR).

La región 3' UTR contiene varios elementos reguladores, incluyendo señales de poliadenilación y regiones ricas en AU, que regulan la expresión temporal y espacial del ARNm (Alvarez et al., 2009; Kuersten and Goodwin, 2003). Los transcritos primarios deben ser procesados de manera que se les unan una serie de proteínas antes de ser exportados al citoplasma.

Hasta hoy día han sido detectados 8 posibles polimorfismos en la región 3' UTR del HLA-G. No existe un consenso en la literatura con respecto a la posición de las variaciones en esta región, por lo que dependiendo de la secuencia escogida, el polimorfismo es descrito en una posición u otra, por ejemplo la mutación del SNP +3777 es nombrada por otros autores como +3010. La mayoría de los polimorfismos descritos en esta región tienen que ver con la estabilidad de los transcritos del HLA-G. Pueden afectar a la unión de determinadas proteínas al ARNm afectando al metabolismo, estabilidad, procesamiento, localización subcelular, exportación nuclear, poliadenilación, control translacional, patrón de fraccionamiento del transcrito y finalmente afectando a los niveles del ARNm (Grzybowska et al., 2001).

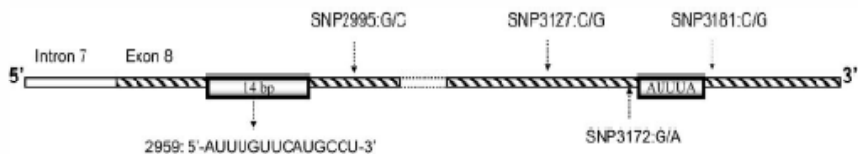


Figura 13: Polimorfismos en la región 3' UTR.

Existen polimorfismos como el SNP +3142C/G que provoca la unión de microARNs al ARNm del HLA-G y puede influenciar la expresión de HLA-G al menos

en líneas celulares JEG-3. El alelo +3142G puede incrementar la afinidad de esta región por los microARN disminuyendo la disponibilidad de ARN debido a su degradación y disminuyendo los niveles de HLA-G (Tan et al., 2007). O el polimorfismo investigado *in vitro*, en células transfectadas SP/02, en la posición +3172G/A, cercano al pentámero AUUUA, que puede disminuir la estabilidad del ARNm (Grzybowska et al., 2001; Yie et al., 2008). Otras mutaciones como +3794C/A o +3802C/T pueden estar envueltas en la generación de diferentes perfiles de expresión del ARNm (Hiby et al., 1999). El polimorfismo +3187 también está relacionado con la disminución de la estabilidad y mayor degradación del ARNm y asociado con el riesgo de preeclampsia por disminución de los niveles de HLA-G (Yie et al., 2008). Incluso hay polimorfismos como T1570C y C1594A que están asociados con la pérdida de la gestación, pero sólo cuando se categoriza la población en función del polimorfismo 14 pb INDEL, ya que ambas regiones están en desequilibrio de enlace (DE) (Suryanarayana et al., 2008). También se ha visto que existe un elevado DE entre el polimorfismo 14pb INDEL y los alelos +3142G y +3187A (Castelli et al., 2010).

Sin embargo, el polimorfismo más estudiado y con más implicaciones funcionales es la inserción/delección de 14 pares de bases (INDEL14 pb) (5'ATTTGTTTCATGCCT 3') en el extremo 3' URT del exón 8 (Humphrey et al., 1995), detectado por primera vez en 1993 (Harrison et al., 1993). Los estudios sobre HLA-G en primates contienen la inserción de las 14 pb, por esto se piensa que el polimorfismo verdadero es la delección más que la inserción (Castro et al., 2000). Incluso un grupo sugiere que dos polimorfismos en las posiciones +3742 y +3743 del exón 8 pueden ser considerados como los precursores de la aparición de la delección de las 14pb en el gen del HLA-G (Aikhionbare et al., 2006). Esta variante génica, al igual que la ocurrida en el promotor, se ha asociado con diferentes situaciones relacionadas con la estabilidad (O'Brien et al., 2001; Rousseau et al., 2003) y los niveles de los ARNm (Hiby et al., 1999; Hviid et al., 2003), situación que, a su vez, podría repercutir tanto en los niveles de la proteína como en sus funciones. Aún no ha sido elucidado el mecanismo por el cual esto se produce. Concretamente, la inserción de 14 pb crea transcritos menos estables y un menor nivel de ARNm de HLA-G soluble y unido a membrana en poblaciones celulares de trofoblasto (Hviid et al., 2003; O'Brien et al., 2001). Así, por ejemplo, se ha observado que este polimorfismo puede alterar los patrones de fraccionamiento alternativo del ARNm. Por otro lado, algunos alelos del HLA-G que sufren la inserción de las 14 pb están expuestos a un fraccionamiento alternativo adicional que provoca una delección en las primeras 92 pb del exón 8 (Fujii et al., 1994; Hiby et al., 1999; O'Brien et al., 2001). Estudios en líneas celulares JEG-3

1. INTRODUCCIÓN

y M8 confirman que las isoformas con delección de 92 pb tienen un ARNm más resistente a la degradación y son más estables que las formas completas de ese ARNm (Rousseau et al., 2003). Estos datos sugieren que esta región puede estar involucrada en mecanismos que controlan la regulación postranscripcional de la molécula de HLA-G.

Además, la inserción de 14 pb va siempre acompañada de los polimorfismos +3142G y +3187A, ambos previamente asociados con bajos niveles de ARNm (Castelli et al., 2009), por lo que esta escasa producción de ARNm puede ser consecuencia de estos polimorfismos asociados con la inserción de 14pb.

Por otro lado, los polimorfismos en la región 3' UTR' pueden influenciar los niveles de expresión de HLA-Gs en suero. Concretamente, la inserción homocigota +/-14 pb puede afectar a la regulación transcripcional del HLA-G, es decir, una disminución de la cantidad y estabilidad del ARNm lo que acabaría provocando una disminución significativa en los niveles de HLA-Gs plasmáticos en comparación con los genotipos heterocigotos u homocigotos para delección (Chen et al., 2008; Hviid et al., 2004c; Rizzo et al., 2005a). Por otro lado, se ha detectado que los mayores niveles de HLA-Gs5 plasmáticos ocurren en los heterocigotos (+/-14pb) comparado con los homocigotos para la delección o la inserción (Gonzalez et al., 2010). Además, las delecciones en el extremo 3' de 14 pb son asignadas a los alelos HLA-G*010101, G*0102 y G*010401 y serán altos secretores de HLA-Gs en plasma. Las inserciones de 14 pb son asignadas a los alelos HLA-G*01012, HLA-G*01013, HLA-G*0103, HLA-G*0105N y HLA-G*0106 y, por lo tanto, serán alelos bajos secretores de HLA-Gs en plasma (Rebmann et al., 2001). Los bajos niveles de HLA-Gs en el suero de mujeres embarazadas están relacionados con complicaciones del embarazo como preeclampsia, retardo del crecimiento intrauterino y aborto recurrente (Alegre et al., 2007; Athanassakis et al., 1999; Pfeiffer et al., 2000).

Sin embargo, con respecto a los niveles de expresión del HLA-G en las placentas a término de mujeres embarazadas, hay autores que no encuentran ninguna asociación entre los niveles de HLA-G en placenta y los diferentes genotipos del polimorfismo 14 pb INDEL (Hviid et al., 2004b).

Existen datos contradictorios sobre la variante de este polimorfismo que está relacionada con los abortos de repetición, de manera que unos encuentran que la inserción +/-14 pb en homocigosis está en mayor proporción en mujeres con abortos recurrentes, situación coherente con la disminución de los niveles de HLA-Gs por ser alelo bajo secretor (Hviid et al., 2002; Hviid et al., 2004a; Yan et al., 2006b; Zhu et al., 2010). Otros piensan, aunque sus datos no son significativos estadísticamente, que es

1. INTRODUCCIÓN

la inserción/delección en heterocigosis $-/+$ 14 pb la que está relacionada con los abortos recurrentes, ya que el efecto dominante del alelo bajo secretor (inserción 14pb) disminuiría la expresión de HLA-Gs (Moreau et al., 2008; Tripathi et al., 2004; Xue et al., 2007). Y, por último, Ober en 2003 encontró que son los homocigotos para la delección $-/-$ 14 pb los que tienen mayor riesgo de aborto (Ober et al., 2003). Además, hay autores que encuentran un aumento, en ocasiones no significativo, del genotipo heterocigoto ($-/+$ 14pb) en las mujeres fértiles control frente al grupo abortos recurrentes (Aruna et al., 2010a; Berger et al., 2010; Hviid et al., 2002) sugiriendo que los niveles intermedios de HLA-G son los favorecedores del mantenimiento del embarazo. Por último, existe un fuerte DE entre el polimorfismo INDEL 14pb y el alelo HLA-DR3 (Hviid and Christiansen, 2005), un alelo de clase II que es significativamente más común entre mujeres con abortos recurrentes que en las controles (Kruse et al., 2004).

Al contrario de lo mencionado anteriormente, otros investigadores no encuentran asociación entre este polimorfismo y los datos de fertilidad (Mendes-Junior et al., 2007) ni asociación significativa con el riesgo de aborto recurrente (Berger et al., 2010; Sipak-Szmigiel et al., 2007). Concretamente Sipak-Szmigiel encuentra frecuencias similares entre mujeres con abortos recurrentes y mujeres fértiles en cada genotipo: $-/-$ 14pb (46.5% vs 34.5%), $+/-$ 14pb (37,9% vs 48,2%) y $+/+$ 14 pb (15,5% vs 17,2%) (Sipak-Szmigiel et al., 2007).

Sin embargo, el único autor que estudia la frecuencia del polimorfismo 14 pb INDEL del HLA-G en diferentes tipos de placenta (villis) normales y patológicas hace una asociación significativa entre el alelo HLA-G*0106 relacionado con el polimorfismo en heterocigosis $+/-$ 14 pb con las placentas preeclámpsicas. Incluso encuentra una mayor frecuencia de este alelo, aunque no significativa, en las placentas procedentes de abortos (Moreau et al., 2008).

Además, los polimorfismos de 14 pb están relacionados con otras enfermedades como por ejemplo la artritis (Rizzo et al., 2005b; Rizzo et al., 2006; Veit et al., 2008) viéndose afectados los niveles de HLA-G soluble en este grupo de pacientes, el lupus eritematoso sistémico (Rizzo et al., 2008), cardiomiopatías (Lin et al., 2007), pemphigus vulgaris (Gazit et al., 2004) y la preeclampsia (Hyylenius et al., 2004). Incluso los polimorfismos de 14 pb han sido muy estudiados en casos de trasplantes donde los genotipos homocigotos para la inserción de 14 pb (asociados con bajos niveles de HLA-Gs) tienen más probabilidad de rechazo que los genotipos homocigotos para la delección asociados con el éxito del trasplante.

1.5.1.3. Transcripción del HLA-G.

Una de las propiedades de las moléculas del MHC es que su transcripción (proceso mediante el cual las moléculas de ADN se copian a ARN mensajero) está inducida por determinadas citoquinas producidas durante una inflamación o una respuesta inmunitaria, sobre todo por los interferones (IFN- α , IFN- β e IFN- γ) (Grabowska et al., 1990). Ha sido demostrado, al menos *in vitro*, que los IFNs y la IL-10 inducen la expresión de HLA-G en otros tipos celulares (Lefebvre et al., 2001). Los interferones activan a los factores de transcripción que se unen a secuencias reguladoras de los promotores de los genes MHC e incrementan la tasa de transcripción.

De la misma forma que la expresión de HLA-G está restringida a tejidos específicos en situaciones no patológicas, a diferencia de la expresión del resto de las moléculas del MHC de clase I, este gen presenta además diferencias génicas con respecto a sus homólogos como, por ejemplo, la diferente reorganización de los elementos *cis* encontrados en la región promotora 5' del gen. Esto implica una diferente regulación transcripcional y transactivación del HLA-G y que no sea regulado por los mismos elementos *cis* que el resto de moléculas del MHC. Por lo tanto, ocurre una activación restringida a determinados tejidos relacionada con su función especializada en fenómenos de tolerancia (Holling et al., 2009; Moreau et al., 2009; Rousseau et al., 2000; Solier et al., 2001; Yang et al., 1996; Yang et al., 1995).

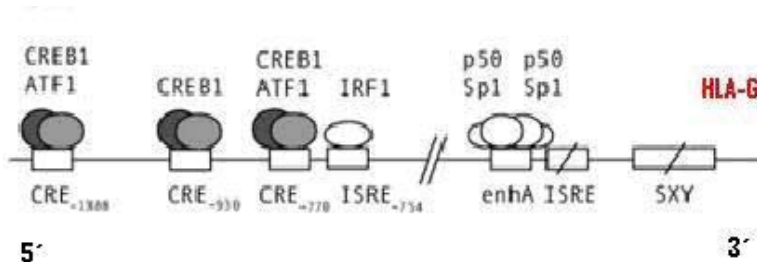


Figura 14: Región promotora del HLA-G.

Abreviaturas: CREB o CBP (proteínas de unión al elemento respuesta a cAMP); ATF (factores de activación de la transcripción); CRE (elementos de respuesta a cAMP); “*enhancer*” A (región intensificadora A); ISRE (del inglés, *Interferon-Stimulated Response Element*); IRF1 (factor regulador de interferón).

Una vez realizada la transcripción del gen del HLA-G, obtenemos el ARN mensajero, el cual ha sido encontrado en gran variedad de tejidos adultos y

embrionarios (Carosella et al., 1996), pero principalmente en tejido placental de primer trimestre. Sin embargo, esta proteína tiene una expresión más restringida y se encuentra básicamente en el TEV (McMaster et al., 1995). A pesar de que algunas moléculas como las tapasinas o la β -2-microglobulina intervienen en la expresión superficial de la proteína en un determinado tejido, se piensa que existe un mecanismo post-transcripcional crítico que restringe su expresión a nivel de proteína en determinados tejidos (Copeman et al., 2000).

Los transcritos de las diferentes isoformas del HLA-G han sido encontrados en el TEV y TV (Copeman et al., 2000; Chumbley et al., 1993; Hunt et al., 1991; Hviid et al., 1998; Solier et al., 2002; Yelavarthi et al., 1991) y en el sincitiotrofoblasto (Fan et al., 1999; Lata et al., 1992) de placentas del primer trimestre de embarazo y placentas a término (Hiby et al., 1999), siendo encontrados con mucha más frecuencia que la proteína, con lo cual se entiende que la expresión proteica del HLA-G es un mecanismo post-transcripcional.

No obstante, varios estudios han hallado asociaciones entre los polimorfismos del HLA-G y los niveles de ARNm (Hviid et al., 2003; O'Brien et al., 2001). Concretamente la inserción de 14 pb crea transcritos menos estables, y un menor nivel de ARNm de HLA-G soluble y unido a membrana en poblaciones celulares de trofoblasto, situación que, a su vez, podría repercutir en los niveles de la proteína y sus funciones.

No hay evidencias de que el HLA-G sea un gen improntado, porque hay heterocigotos que expresan el alelo materno y el paterno, de manera que su expresión es co-dominante en la placenta humana del primer trimestre del embarazo y en placentas a término (Hashimoto et al., 1997; Hiby et al., 1999; Hviid et al., 1998; Lenfant et al., 1998).

1.5.1.4. Fraccionamiento alternativo del ARNm “splicing” e isoformas solubles del HLA-G.

En la actualidad se conocen 7 variantes del HLA-G resultantes de la fragmentación de su ARNm, denominado “splicing”. Son 7 ARNm alternativos del HLA-G que generan 7 isoformas diferentes (Fujii et al., 1994; Ishitani and Geraghty, 1992; Kirszenbaum et al., 1994). Éstas incluyen formas de transmembrana HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 y HLA-G4 y formas solubles como HLA-G5, HLA-G6 y la recientemente descubierta HLA-G7 (Paul et al., 2000).

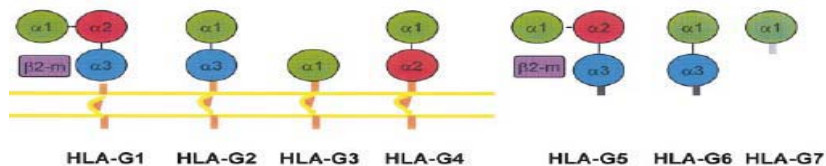


Figura 15: Isoformas del HLA-G generadas por fraccionamiento alternativo tanto unidas a la membrana celular como solubles.

A) Isoformas unidas a membrana.

Varias líneas de investigación evidencian que la función primaria de la isoforma completa y unida a membrana HLA-G1 es servir como ligando inhibidor de las células inmunocompetentes, así como modular la secreción de citoquinas en distintos tipos celulares contribuyendo al establecimiento de la tolerancia periférica y local frente a un embarazo. Es la principal molécula implicada en el establecimiento de la tolerancia feto-materna, pero otras isoformas deben ser tomadas en consideración.

Existe controversia en cuanto a si las isoformas truncadas del HLA-G (HLA-G2, G3 y G4) pueden llegar a expresarse en la superficie celular del citotrofoblasto, aunque en menor proporción, y considerarse isoformas unidas a membrana. Además, existen autores que piensan que estas isoformas pueden llegar a ser funcionales e intentan compensar la ausencia de la proteína HLA-G de conformación entera (Menier et al., 2000; Riteau et al., 2001). Por el contrario, otros autores piensan que estas isoformas truncadas permanecen intracelulares de manera que las cadenas pesadas quedan retenidas en el retículo endoplasmático y nunca podrían realizar las mismas funciones que las isoformas completas (Bainbridge et al., 2000; Mallet et al., 2000; Ulbrecht et al., 2004). Es difícil elucidar el patrón de expresión de estas isoformas en un determinado tejido, ya que no existen anticuerpos específicos que distingan entre éstas y la isoforma completa, pero se pueden reconocer por la diferencia de peso molecular. En cualquier caso, a través del uso de líneas celulares transfectadas con cada una de las isoformas truncadas y estudios de citotoxicidad se cree que, al menos *in vitro*, son capaces de inhibir la citotoxicidad de las células NK (Rouas-Freiss et al., 1997b), aunque teniendo en cuenta que si las isoformas no contienen, por ejemplo, el dominio $\alpha 3$, que concretamente es el caso de las isoformas HLA-G3 y HLA-G4, no podrán inhibir a las células NK mediante la interacción con el receptor ILT2, pero sí inhibirlas mediante la interacción del dominio $\alpha 1$ con el receptor KIR2DL4. Además, no podrán inhibir a los CTL mediante la interacción con la molécula CD8 o mediante la interacción con el receptor inhibidor ILT2.

Quizás estas isoformas truncadas tengan mayor relevancia funcional en situaciones en las que la expresión de HLA-G1 está impedida como es el caso de las células deficientes de β 2-microglobulina, ya que estas isoformas truncadas no requieren la asociación con esta cadena para su expresión en la superficie celular (Riteau et al., 2001) o en individuos homocigotos para el alelo nulo HLA-G*0105N donde presumiblemente se altera la presencia y función de algunas isoformas (Arnaiz-Villena et al., 2001).

B) Isoformas solubles del HLA-G.

Las isoformas solubles del HLA-G son HLA-G1shed o HLA-G5, HLA-G2 shed o HLA-G6, HLA-G4 y HLA-G7. A las isoformas solubles HLA-G1 y HLA-G2 se les llama isoformas escindidas proteolíticamente (del inglés, *shed*) y sólo contienen los dominios extracelulares. Las isoformas solubles se expresan en TEV, TV y ST (Chu et al., 1998; Ishitani et al., 2003), así como en líquido amniótico y suero de mujeres embarazadas (Hunt et al., 2000; Rebmann et al., 1999) y en otra gran variedad de tejidos.

Los estudios in vitro sugieren que las isoformas solubles son capaces de desencadenar respuestas inmunes al igual que la proteína completa como la inmunomodulación o inmunosupresión mediante la inhibición de la citotoxicidad de las células NK y linfocitos T CD8⁺, inducción de la apoptosis o la regulación de los linfocitos Th CD4⁺ (Contini et al., 2003; Marchal-Bras-Goncalves et al., 2001; Park et al., 2004). Incluso se puede utilizar su producción por el embrión como marcador de una buena calidad embrionaria (Fuzzi et al., 2002; Noci et al., 2005; Sher et al., 2004; Yie et al., 2005a).

Las isoformas solubles se pueden formar por dos mecanismos diferentes:

1. Fraccionamiento alternativo cuando hay un fallo en el ARNm maduro debido a un codón stop por detrás del intrón 4 (HLA-G5 y HLA-G6) o por detrás del intrón 2 (HLA-G7) y la proteína se desprende de la membrana celular (Fujii et al., 1994). Se les llama isoformas proteínas activamente secretadas.
2. Acción de las MMP que cortan las proteínas en la superficie celular y se convierten en solubles a nivel post-transcripcional, como es el caso de las isoformas HLA-G1 shed y HLA-G2 shed (Demaria et al., 1994; Dong et al., 2003; Park et al., 2004). En el TEV, sobre todo en el que tiene un fenotipo más invasivo, se ha encontrado mucha actividad de las MMP (Bischof et al., 1991; Bischof et al., 1995b). Además, las MMP pueden disociar la cadena de β -2-microglobulina y dejar isoformas solubles con tan solo las cadenas pesadas que tendrán patrones similares de expresión y estabilidad a las isoformas que forman el complejo (Dong et al., 2003).

Gracias a la disponibilidad de anticuerpos monoclonales que se unen al intrón 4, como 16G1 y 5A6G7, se pueden distinguir las isoformas solubles activamente secretadas (HLA-G5 y G6), de las isoformas shed (HLA-G1s y G2s) e investigar aún más sobre su expresión en determinados tejidos y las funciones que realiza (Blaschitz et al., 2005). Estos anticuerpos pueden unirse solamente a las isoformas HLA-G5 y HLA-G6 ya que, debido a un codón stop en ellas, no se sintetiza proteína por detrás del intrón 4.

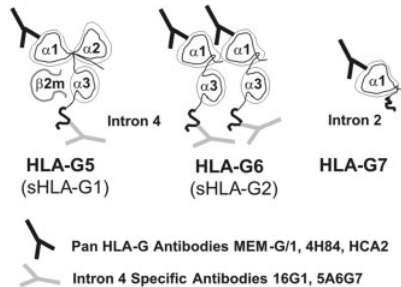


Figura 16: Unión de distintos tipos de anticuerpos a distintas regiones del HLA-G.

El por qué las células generan isoformas solubles del HLA-G por dos mecanismos diferentes puede ser un mecanismo de control y estar relacionado con la posibilidad de mutaciones en los genes del HLA-G que regulan el fraccionamiento alternativo. Actualmente se está investigando sobre si las isoformas cortadas por MMP y las activamente secretadas tienen funciones diferentes o presentan diferentes repertorios de antígenos.

1.5.1.5. Expresión del HLA-G.

El HLA-G se puede expresar intracelular o extracelularmente, unida a la membrana celular (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 y HLA-G4) o en forma soluble (HLA-G5, HLA-G6 y HLA-G7).

A) Embriones.

Los niveles más altos de expresión del HLA-G se encuentran en células trofoblásticas pero también se ha visto expresión en estadios mucho más precoces durante el desarrollo embrionario. Así por ejemplo, algunos autores encuentran HLA-G soluble en los medios de cultivo de blastocistos humanos muy tempranamente y cuya secreción se relaciona con la capacidad de implantación (Fuzzi et al., 2002; Jurisicova et al., 1996; Noci et al., 2005; Yie et al., 2005a). Sin embargo, otros autores no

encuentran la proteína HLA-G soluble en los medios de cultivo de embriones sugiriendo que no es imprescindible para conseguir la implantación y el embarazo (Menezo et al., 2006; Menicucci et al., 1999; Sageshima et al., 2007; Sargent, 2005; Van Lierop et al., 2002). Quizás esta diferencia es fruto de artefactos de los materiales de medida del HLA-Gs.

B) Placenta.

Dentro del contexto del embarazo el HLA-G tiene una expresión tisular restringida de manera que se expresa principalmente en la placenta, concretamente en la porción más distal e invasiva del TEV, que es la zona por donde el embrión invade la decidua materna y por donde entra en contacto con la sangre y células defensivas maternas (Ishitani et al., 2003; Lodererova et al., 2003; McMaster et al., 1995; Morales et al., 2003).

Concretamente, las células del sincitiotrofoblasto no expresan la molécula del HLA-G, al menos en la forma unida a membrana (Ishitani et al., 2003; Lodererova et al., 2003). Sin embargo se ha observado expresión de HLA-G soluble (Chu et al., 1998; Ishitani et al., 2003; Morales et al., 2003) y HLA-E (Ishitani et al., 2003); de esta manera es capaz de evadir el ataque de las células NK maternas presentes en la decidua. En las células del sincitotrofoblasto no se expresan otras moléculas del HLA clase I o clase II (Le Bouteiller et al., 1999; Vince and Johnson, 1995).

En el citotrofoblasto vellositario no hay expresión del antígeno de histocompatibilidad HLA-G, al menos en su forma unida a membrana (Ishitani et al., 2003), pero sí se ha encontrado expresión de HLA-G soluble, al menos en forma de ARNm (Morales et al., 2003; Solier et al., 2002). Tampoco se expresan en él otras moléculas del HLA de clase I o clase II (Le Bouteiller et al., 1999; Mallet et al., 2000; Vince and Johnson, 1995).

Esta distribución tisular tan específica ha llevado a plantear la hipótesis de que el HLA-G desempeña un importante papel en la tolerancia del feto por el sistema inmunitario materno.

En las células del citotrofoblasto extravellositario, y con más intensidad en las células más invasoras, es donde se expresan las moléculas del HLA-G, HLA-E, HLA-F y bajos niveles del HLA-C, tanto *in vivo* (Ishitani et al., 2003) como en cultivos *in vitro* (Tarrade et al., 2001). También se expresan otras moléculas como las hormonas hCG y hPL, integrinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y MMP (Damsky et al., 1992).

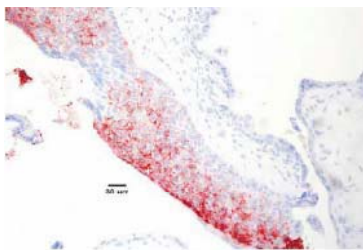


Figura 17: Gradiente de expresión del HLA-G en una sección placentaria. La coloración rojiza representa la expresión de HLA-G en el TEV observándose un aumento en la expresión y, por lo tanto, en la coloración en la porción más distal e invasiva de TEV. (Bhalla, A. et al 2006)

C) Células sanguíneas y suero.

El HLA-G soluble es secretado por células sanguíneas periféricas adultas como PBMC (del inglés, *peripheral blood mononuclear cells*), linfocitos B, linfocitos T activados y especialmente en los monocitos CD14⁺ de sangre periférica de individuos sanos (Rebmann et al., 2003). Además, se han encontrado células del citotrofoblasto fetal liberadas al espacio intervillósario placentar y circulando en el sistema sanguíneo que también son grandes productoras de HLA-Gs (Beer et al., 1994; Hunt and Langat, 2009). También se ha encontrado expresión de HLA-G soluble en los macrófagos placentarios activados (Chu et al., 1998). Sin embargo, la molécula de HLA-G no es expresada en los glóbulos rojos.

Esta secreción de HLA-Gs en las células sanguíneas y células del trofoblasto refleja un incremento de sus niveles en el suero (Rebmann et al., 1999). Se ha detectado HLA-Gs en el suero tanto de hombres como de mujeres, pero existen discrepancias en este aspecto, de manera que según algunos autores los niveles de HLA-Gs son mayores en mujeres que en hombres (Rudstein-Svetlicky et al., 2007) y mayores en las mujeres embarazadas que en las no embarazadas (Alegre et al., 2007; Hunt et al., 2000). Sin embargo, otros opinan que el HLA-Gs está en los mismos niveles entre hombres y mujeres y entre mujeres embarazadas y no embarazadas (Gonzalez et al., 2010; Hviid et al., 2004c; Puppo et al., 1999; Rebmann et al., 1999). Según estos últimos, la presencia de HLA-G soluble en suero es predominantemente de origen materno producido por monocitos activados y no por el TEV que entra en contacto con la circulación sanguínea materna.

Centrándonos en el grupo de mujeres embarazadas, encontramos que algunos autores no detectan HLA-Gs en el suero de las mujeres no embarazadas y encuentran

que sus niveles van aumentando conforme avanza la gestación. Por lo tanto, proponen utilizar el nivel de HLA-Gs en suero durante el embarazo, al igual que el HLA-Gs en los cultivos de embriones, como indicador de un embarazo satisfactorio (Yie et al., 2004). Continuando con el dilema, otros autores dicen que el HLA-Gs está presente en todos los estadios de la gestación, pero que la concentración de HLA-Gs en el tercer mes de la gestación es mucho mayor que en el segundo y que va decreciendo a partir del sexto mes (Hunt et al., 2000), o que la concentración de HLA-Gs en el tercer mes de la gestación es menor que en el segundo (Gonzalez et al., 2010) y disminuye en el noveno mes. Es decir, que las concentraciones de HLA-Gs en el suero van variando a lo largo de la gestación y la concentración de un mes no podrá predecir los niveles de otros meses. Y por último, otros autores encuentran que el HLA-Gs en el suero materno durante el embarazo no cambia de niveles (Hviid et al., 2004c; Puppo et al., 1999).

Con respecto al riesgo de sufrir un aborto tenemos que las mujeres con bajos niveles de HLA-Gs en suero en una fase pre-ovulatoria, no estando embarazadas, tienen más riesgo de sufrir un aborto (Pfeiffer et al., 2000). Por otro lado, los niveles de HLA-G5 soluble en suero son similares entre mujeres embarazadas que sufren un aborto de primer trimestre y las que consiguen un recién nacido vivo (RNV) (Gonzalez et al., 2010).

Las diferencias entre distintos estudios podrían deberse al anticuerpo utilizado para la detección, a la isoforma del HLA-G medida, a reactivos usados que pueden diluir la concentración o al momento del embarazo en el que se realizó la medición del HLA-Gs (Rizzo et al., 2009). Además, normalmente existe un efecto de dilución del plasma de manera que las concentraciones de HLA-G encontradas a nivel local en la placenta podrían ser mucho mayores y las concentraciones del plasma no reflejarían las condiciones de la placenta que es donde realmente se desarrolla el embrión (Hviid, 2006).

Por último, las diferencias entre las mediciones de HLA-Gs en suero o plasma pueden ser debidas al genotipo que posea el individuo, ya que existen determinados genotipos y/o alelos que están asociados con los niveles de HLA-Gs en suero. Por ejemplo, no hay detección de HLA-G5 soluble en el suero de homocigotos con la inserción de +14 pb en el exón 8 (Hviid et al., 2004c; Rizzo et al., 2005a) o se detectan mayores niveles de HLA-Gs5 en suero en los heterocigotos (+/-14pb) comparado con los homocigotos para la delección (-/-14pb) (Gonzalez et al., 2010). Además, debemos mencionar que existen alelos altos secretores o bajos secretores de HLA-G1 soluble en el suero; por ejemplo, el HLA-G*010103, HLA-G*010102, HLA-G*0106 y el alelo

HLA-G*0105N están asociados con la disminución de los niveles del HLA-G1 en plasma y otros alelos como HLA-G*0104 están asociados con un incremento de la producción del HLA-G1 soluble en plasma (Rebmann et al., 1999; Rebmann et al., 2001).

D) Transplantes, tumores, virus y enfermedades inflamatorias.

El HLA-G también se expresa después de la realización de un transplante. Por ejemplo, se ha visto su expresión en las células cardíacas tras un transplante de corazón para evitar el rechazo del sistema inmunitario, e incluso hacen que aumente la concentración de HLA-G soluble en el suero (Lila et al., 2002).

Más recientemente se ha observado la expresión de HLA-G bajo situaciones patológicas como podrían ser las células tumorales. El objetivo de dicha expresión sería evadir la vigilancia del sistema inmune, evitando su destrucción por las células inmunitarias, ya que el HLA-G se encarga de la inhibición de dichas células (Rouas-Freiss et al., 2003). Incluso se ha visto aumentada su expresión en adenocarcinomas endometriales (Barrier et al., 2006). Además, determinadas células, como las células dendríticas y los macrófagos, expresan HLA-G en situaciones tumorales y enfermedades inflamatorias (Le Friec et al., 2004).

También se expresa en presencia de enfermedades inflamatorias o autoinmunes. Por ejemplo, se ha detectado expresión de HLA-G en células de la piel con psoriasis o con dermatitis (Carosella et al., 2001).

El HLA-G también se expresa bajo cierto tipo de procesos infecciosos virales, tal y como ha sido visto en las células neuronales tras una infección viral neurotrófica (Lafon, 2005). La expresión de HLA-G en las células infectadas por virus es un mecanismo que impide el reconocimiento y ataque de las células NK debido a sus propiedades inmunosupresoras.

Por último, el HLA-G se expresa en los monocitos/macrófagos y DC en condiciones patológicas particulares como durante procesos tumorales, transplantes, infecciones virales y enfermedades inflamatorias (Le Friec et al., 2004; Pangault et al., 2002). Esto podría tener consecuencias negativas en su función como células inmunitarias efectoras, es decir, podría alterar su función de presentación de antígenos a los linfocitos T, suprimiéndolos, generando linfocitos T reguladores y favoreciendo la progresión de la enfermedad tumoral o inflamatoria.

E) Otros tejidos.

También se expresa HLA-G en su forma soluble en el líquido amniótico de mujeres embarazadas (Hunt et al., 2000), córnea y en las células epiteliales del timo (Crisa et al., 1997; Le Discorde et al., 2003; Rebmann et al., 2003).

Se piensa que la expresión del HLA-G en el TEV es autónoma e independiente del desarrollo embrionario y que no está determinada por factores ambientales presentes en la decidua, puesto que el HLA-G se expresa normalmente en casos de embarazos ectópicos donde el trofoblasto está fuera de su ambiente normal y no está bajo la capa de células deciduales (Rabreau et al., 2000).

Resulta interesante que el HLA-G se exprese en su justa medida para el éxito de la gestación, de manera que las alteraciones en la expresión del HLA-G están asociadas con algunas complicaciones de la misma. Por ejemplo, los altos niveles de expresión de HLA-G pueden ser perjudiciales al crear susceptibilidad a infecciones intrauterinas de patógenos debido al estado hiperaletargado de las células NK y linfocitos Tc. De la misma forma, un déficit en los niveles de expresión de HLA-G en el trofoblasto puede tener consecuencias negativas ya que provocarían la aparición de abortos recurrentes (Peng et al., 2008) o pre-eclampsia (Colbern et al., 1994) debido a la falta de modulación negativa de ambos tipos celulares. Tanto es así que, por ejemplo, existen determinadas poblaciones con alta carga de patógenos, como los africanos, donde una mutación que disminuya los niveles de HLA-G ha sido seleccionada positivamente a lo largo de la evolución. Recordando que la expresión del HLA-G es codominante quizás una mutación en heterocigosis que produjera unos niveles de expresión de HLA-G intermedios supondría una ventaja ya que sería el nivel de HLA-G más adecuado al permitir al mismo tiempo la tolerancia fetal y la defensa frente a patógenos intrauterinos (Aldrich et al., 2002; Ober et al., 2006).

1.5.1.6. Funciones del HLA-G.

A pesar de la controversia existente con respecto a la influencia del HLA-G en la inducción de la tolerancia feto-materna, esta molécula sigue estando en el punto de mira por las funciones que teóricamente realiza en el mantenimiento del embarazo.

Como veremos a continuación, el HLA-G puede realizar determinadas funciones mediante una actuación directa sobre las células inmunitarias y realizar otras funciones de forma indirecta.

A) Acciones directas de la molécula del HLA-G.

A.1) Inhibición de la citotoxicidad de las células NK.

El posible papel protector del HLA-G en el embarazo puede radicar en una de sus principales funciones, como es la unión de la molécula del HLA-G a varios tipos de receptores inhibidores específicos presentes en las células NK deciduales o linfocitos granulares grandes (LGL), con lo cual queda inhibida o, al menos, reducida su actividad citolítica así como la secreción de citoquinas o actividad citotóxica (Kapasi et al., 2000; Lopez-Botet and Bellon, 1999; Moreau et al., 1998b; Riteau et al., 2001; Rouas-Freiss et al., 1997a; Roussev et al., 2007; Yokoyama, 1997). El HLA-G también es capaz de inhibir la proliferación de las células NK mediante su unión a los receptores inhibidores de tipo ILT2 presentes en ellas (Caumartin et al., 2007). Está bien establecido que las isoformas completas del HLA-G unidas a la membrana de las células del TEV realizan la función de resistencia a la lisis producida por las células NK uterinas pero el HLA-G soluble es también capaz de realizar dicha función, al menos *in vitro*, (Fang et al., 2003; Marchal-Bras-Goncalves et al., 2001; Poehlmann et al., 2006) y, lo que es muy importante, es un mecanismo dependiente de la concentración de HLA-G.

A pesar de la restringida expresión del HLA-G en el TEV, se ha detectado la presencia de HLA-Gs en el suero y estas isoformas solubles también son capaces de producir la inhibición de la actividad citotóxica de las células NK de sangre periférica al interaccionar con los receptores inhibidores presentes en ellas, a pesar de que los receptores inhibidores que se presentan en las células NK periféricas no son los mismos que los que se presentan en las células NK deciduales. Por ejemplo, los receptores inhibidores de tipo p49 (KIR2DL4) son indetectables en las células NK periféricas y sin embargo están presentes en todas las células NK aisladas de la placenta (Ponte et al., 1999).

La importancia biológica de la interacción HLA-G/NK estriba en que las células NK son las más abundantes en la decidua materna del primer trimestre del embarazo (Loke and King, 1997), de manera que las células semialogénicas del citotrofoblasto fetal que expresen el HLA-G estarán en un estado de protección frente a la lisis mediada por las células NK maternas presentes en la interfase feto-materna (Rouas-Freiss et al., 1997a).

El mecanismo de inhibición de la citotoxicidad de las NK deciduales ocurre mediante la interacción del HLA-G con los receptores inhibitorios expresados en ellas. La mayoría de las células NK deciduales aisladas de la decidua co-expresan diferentes tipos de receptores inhibidores específicos para el HLA-G y la consecuente

la inhibición de la citotoxicidad. A continuación se muestran los distintos receptores inhibidores presentes en las células NK que interaccionan con la molécula del HLA-G.

1) El HLA-G es capaz de unirse con gran afinidad a los receptores inhibitorios ILT2/LIR1/LILR1 (Immunoglobulin-Like Transcripts) presentes en las células NK mediante el dominio $\alpha 3$ (Chapman et al., 1999; Navarro et al., 1999; Shiroishi et al., 2003). La interacción ocurre entre el bucle o "loop" Tyr38 y Tyr76 del ILT2 y el residuo 195Phe del dominio $\alpha 3$. Estos receptores son análogos en estructura a los KIR, receptores inhibitorios de tipo inmunoglobulina.

2) El HLA-G también reconoce a los receptores inhibitorios KIR, concretamente a los receptores KIR2DL4 o p49 presentes en las células NK, mediante el dominio $\alpha 1$ (Cantoni et al., 1998; Ponte et al., 1999; Yan and Fan, 2005). Este receptor es únicamente expresado en las células NK decíduales y no en las NK de sangre periférica. Este receptor no puede ser reconocido por otras moléculas del MHC tipo I, incluyendo al HLA-E (Rajagopalan and Long, 1999). Coopera con otros receptores para regular negativamente la citotoxicidad de las células NK al unirse a las moléculas del HLA-G expresadas en las células trofoblásticas fetales.

Sin embargo, otro tipo de receptores KIRs no reconocen al HLA-G pero en cambio son específicos para otros HLA. Por ejemplo, mediante experiencias *in vitro* se sabe que los receptores KIR2DL1 (CD158a) se unen a determinados haplotipos del HLA-C como el HLA-Cw2 y KIR2DL2 (CD158b) y los receptores KIR2DL3 se unen a haplotipos como el HLA-Cw3 y también pueden prevenir el ataque de las células NK a las células del trofoblasto (Hiby et al., 2008; Moretta et al., 1993; Ntrivalas et al., 2005).

3) Por último, mediante experimentos con células transfectadas se ha visto que el HLA-G también es capaz de unirse a los receptores CD94/NKG2A para inhibir la citotoxicidad de las células NK (Pende et al., 1997; Perez-Villar et al., 1997; Soderstrom et al., 1997), a pesar de que este tipo de receptor tenga como ligando primario a la molécula del HLA-E (Borrego et al., 1998; Lee et al., 1998a). Lo que no está claro es a través de qué dominio extracelular del HLA-G se produce la unión con este tipo de receptor de las NK (Lanier, 1998). La falta de líneas celulares deficientes de HLA-E hace difícil saber si el HLA-G actúa de forma directa sobre los receptores CD94/NKG2A de las NK (O'Callaghan and Bell, 1998).

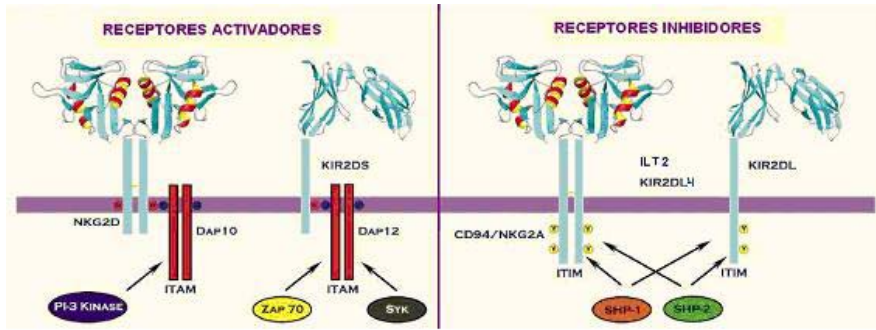


Figura 19: Mecanismo de inhibición y activación de las células NK.

A.2) Apoptosis de las células NK.

Estudios *in vitro* muestran que el HLA-Gen su forma soluble es capaz de inhibir el ataque de las células NK deciduals sobre las células del trofoblasto mediante un mecanismo de apoptosis. Afectaría únicamente a las células NK que expresen fuertemente la molécula CD8⁺ y es un fenómeno directamente relacionado con el nivel de expresión del CD8 y HLA-Gs (Lindaman et al., 2006; Spaggiari et al., 2002a). También puede darse la apoptosis de las NK de sangre periférica por acción del HLA-Gs. El mecanismo de inducción de la apoptosis es diferente al mecanismo de inhibición de la citotoxicidad. La apoptosis de las células NK solo podría ser realizada por las isoformas solubles del HLA-G que contengan el dominio $\alpha 3$.

Para explicar este fenómeno de apoptosis es necesario recordar que la función y la propia molécula CD8 de las células NK son diferentes a la presente en los linfocitos T. En las células NK es un homodímero inestable en la superficie celular que sólo se expresa en algunas de ellas y que no es necesario para la actividad citolítica de éstas (Loke et al., 1995). La apoptosis se lleva a cabo mediante la interacción del dominio $\alpha 3$ del HLA-G, residuos 214 y 228, con la molécula CD8 expresada en la superficie de la célula NK, enviando una señal intracelular apoptótica y la actuación del sistema Fas-FasL (Puppo et al., 2002; Spaggiari et al., 2002b).

Curiosamente, la apoptosis es un mecanismo regulado negativamente por la unión del HLA-Gs a determinados receptores inhibitorios presentes en las células NK. La unión del HLA-Gs a receptores inhibidores como los KIR o el complejo CD94/NKG2A es, en principio, una manera de inhibir las funciones citolíticas y citotóxicas de las células NK pero a su vez, sorprendentemente, actúan como un

mecanismo de supervivencia de las células NK. Esto se debe a un efecto antiapoptótico, es decir, estos receptores ejercen un efecto inhibitorio de la señal apoptótica y de la secreción de FasL llevada a cabo por la unión del HLA-Gs al CD8 (Spaggiari et al., 2002a). A pesar de que las señales inhibitorias dominan sobre las señales activadoras en las células NK, el HLA-Gs es capaz de inducir la apoptosis de las NK aunque exista la expresión de receptores inhibidores en su superficie. Una posible explicación a este hecho es que la molécula CD8 y los receptores inhibidores están en lugares distintos en la membrana celular y unen al HLA-G por dominios diferentes de manera que la unión del HLA-G a CD8 produciría un cambio conformacional que no permitiría la unión a los receptores inhibidores, y viceversa (Spaggiari et al., 2002a).

A.3) Inhibición y apoptosis de los linfocitos Tc CD8⁺ (CTL).

Durante el embarazo, la formación de CTL anti antígenos paternos puede resultar desastrosa para la supervivencia fetal. Tanto las células fetales presentes en la decidua como las encontradas en la circulación sanguínea pueden ser reconocidas y atacadas por estos CTL. Esto no ocurre gracias a la expresión del HLA-G en la superficie de las células trofoblásticas fetales.

Otra de las funciones del HLA-G es la inmunosupresión o regulación de la respuesta inmune antígeno-específica mediante la prevención o supresión de la acción citolítica y citotóxica de los linfocitos Tc CD8⁺ efectores generados contra los antígenos paternos fetales (Gansuud et al., 2000; Le Gal et al., 1999; Riteau et al., 2001). También regula la producción de citoquinas (Kapasi et al., 2000). Los linfocitos Tc expresan receptores inhibitorios de tipo ILT2/LIR1, pero no expresan CD94/NKG2A o KIR2DL, que interaccionan con el dominio $\alpha 3$ de las moléculas del HLA clase I para prevenir su activación e inhibir su citotoxicidad (Kapasi et al., 2000), aunque hay autores que piensan que la inmunosupresión de los CTL es llevada a cabo a través de la molécula CD8 expresada en su superficie (Contini et al., 2003). La capacidad del HLA-G de suprimir la acción de los CTL es dependiente de su concentración (Kapasi et al., 2000). Esta función es realizada tanto por las isoformas unidas a membrana (Kapasi et al., 2000) como las isoformas solubles (Contini et al., 2003) del HLA-G siempre y cuando contengan el dominio implicado en dicha función.

Además, el HLA-Gs es capaz de inhibir la proliferación de los CTL mediante la inhibición de la progresión del ciclo celular (Bahri et al., 2006).

Incluso se ha visto que las isoformas del HLA-G solubles que contienen el dominio $\alpha 3$ son capaces de eliminar a estos CTL mediante la inducción de la apoptosis

1. INTRODUCCIÓN

(Contini et al., 2003; Fang et al., 2003; Fournel et al., 2000; Puppo et al., 2000; Puppo et al., 2002). El mecanismo de reducción de la actividad citotóxica es independiente del de inducir la apoptosis. La apoptosis de los linfocitos T CD8⁺ ha sido reportada *in vitro* mediante las isoformas solubles del HLA-G. No está aún claro si la apoptosis de los linfocitos T es llevada a cabo únicamente mediante la interacción del dominio $\alpha 3$ del HLA-G con la molécula coestimuladora CD8 presente en los linfocitos T (Contini et al., 2005; Contini et al., 2003; Spaggiari et al., 2002a) o si se necesita además la interacción del dominio $\alpha 1$ y/o $\alpha 2$ del HLA-G con el complejo CD3/TCR de los linfocitos T (Dal Porto et al., 1993). Lo que sí está claro es que las células NK no contienen el complejo CD3/TCR y pueden sufrir la apoptosis por unión del HLA-Gs a la molécula CD8 (Spaggiari et al., 2002a). La molécula CD8 en los linfocitos T es un heterodímero que es, a la misma vez, coestimuladora de la interacción HLA-TCR del linfocito T e inductora de la apoptosis. Tras la unión del HLA-Gs y el CD8 se produce el aumento de la concentración de calcio intracelular y la secreción de la molécula FasL y el funcionamiento del sistema Fas-FasL y se produce la muerte celular.

Además, el HLA-G expresado en la superficie de una célula infectada o un microorganismo, es capaz de presentar un péptido endógeno o antígeno intracelular a los linfocitos Tc CD8⁺, aunque esta no es su función principal. Esta función es realizada mediante los dominios extracelulares $\alpha 1$ y $\alpha 2$ que forman una hendidura que alberga al antígeno consistente en una plataforma de ocho láminas β antiparalelas en las que se apoyan dos α hélices paralelas. El HLA-G presenta un repertorio limitado de péptidos en comparación con el resto de moléculas del HLA. La conformación que alberga al péptido es similar entre ellos pero el HLA-G acoge al péptido más profundamente. Los polimorfismos en esta región pueden aumentar el repertorio de péptidos presentados pero no influyen su función biológica (Clements et al., 2007).

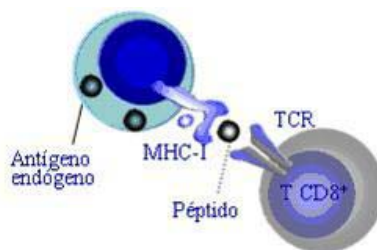


Figura 20: Presentación de péptidos endógenos a los linfocitos Tc CD8⁺ por las moléculas del MHC I.

A.4) Alteración del patrón de expresión de citoquinas en los distintos tipos celulares.

Otra importante función de las isoformas solubles y unidas a membrana del HLA-G es el control de la activación y función de las células inmunocompetentes. Nos referimos a la alteración o modulación del patrón de expresión de citoquinas en distintos tipos celulares tanto de sangre periférica como células mononucleares deciduales. Por ejemplo, se ha visto como el HLA-G interacciona con las células NK para alterar su patrón de producción de citoquinas (Loke and King, 2000; Rajagopalan et al., 2006; Rieger et al., 2002; van der Meer et al., 2007; van der Meer et al., 2004). Concretamente el HLA-G se une a los receptores KIR2DL4 presentes en las células NK para incrementar la producción de IFN- γ (Rajagopalan et al., 2001; van der Meer et al., 2004) y factores pro-angiogénicos (Rajagopalan et al., 2006). El HLA-G también altera el patrón de secreción de citoquinas en las células mononucleares uterinas y sanguíneas (Kanai et al., 2001b), los linfocitos Tc CD8⁺ (Kapasi et al., 2000) y los monocitos/macrófagos deciduales y de sangre periférica (Shakhawat et al., 2010). Dicha función se llevará a cabo mediante la unión del correspondiente dominio del HLA-G con el correspondiente receptor expresado en cada célula. Por ejemplo, los receptores ILT2 y ILT4 interaccionan con el dominio α 3 o los receptores KIR que interaccionan con el dominio α 1. El HLA-G modula la secreción de citoquinas para el control de la invasión del TEV, remodelación de la vascularización materna y mantenimiento de un ambiente de inmunosupresión local para promover un embarazo satisfactorio. A su vez, otras citoquinas pueden alterar el patrón de secreción de citoquinas de las células inmunitarias maternas.

Como mencionamos anteriormente, el HLA-G y HLA-E pueden alterar la producción de citoquinas de una manera no consistente con el paradigma Th1/Th2 propuesto hace tiempo (Wegmann et al., 1993), donde para que ocurra un embarazo satisfactorio debe ocurrir un cambio en el patrón de citoquinas desde las Th1 hacia las Th2. Las citoquinas Th1 también son necesarias para un embarazo satisfactorio (Ashkar et al., 2000).

A.5) Regulación de la angiogénesis y remodelación vascular.

Tras la realización de estudios *in vitro* e *in vivo* ha podido observarse que las moléculas de HLA-G solubles regulan la angiogénesis mediante la interacción con la molécula CD160 expresada en las células endoteliales activadas (Fons et al., 2006; Le Bouteiller et al., 1999). Las células del trofoblasto embrionario van reemplazando a las células vasculares de las arterias espirales maternas produciendo a su vez las

moléculas de HLA-Gs. Éstas producen la inhibición de la proliferación de las células endoteliales vía apoptótica e impiden su migración y la formación de tubos capilares contribuyendo así a la inhibición de la angiogénesis de las arteriolas uterinas (Red-Horse et al., 2006). Dicha remodelación vascular de las arterias espirales uterinas permitirá la satisfactoria implantación del embrión.

El papel anti-angiogénico del HLA-Gs sobre las células endoteliales probablemente está equilibrado mediante la inducción de la liberación de factores pro-angiogénicos producidos por las células NK para una placentación adecuada (Bulmer and Lash, 2005). Las células NK liberan citoquinas como la IL-8 y factores de crecimiento angiogénico como VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) o PIGF (factor de crecimiento placentario) que son factores activadores de la angiogénesis que inducen el crecimiento vascular en la decidua (Ashkar and Croy, 2001; Ashkar et al., 2000; De Oliveira et al., 2010; Hanna et al., 2006). Además, las células NK producen IFN- γ con propiedades antigénicas para controlar la excesiva invasión del TEV.

A.6) Alteración de la maduración de las células presentadoras de antígenos (CPA), modulación de la actividad y proliferación de linfocitos Th CD4⁺ y generación de linfocitos T reguladores.

Las CPA, como son los macrófagos CD14⁺ y DC, están presentes en la decidua materna en el momento del embarazo y son células inmunocompetentes capaces de presentar antígenos fetales a los linfocitos T CD4⁺ para que se active la respuesta inmune contra ellos.

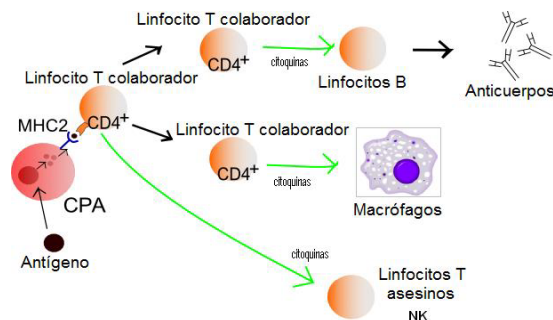


Figura 21: Presentación de antígenos a los linfocitos T CD4⁺.

Sin embargo, esto no ocurre gracias a que el HLA-G expresado en las células del TEV es capaz de promover la inhibición o alteración de la maduración de las DC

mieloides mediante su interacción con los receptores inhibitorios ILT2 y ILT4 presentes en ellas. El HLA-G induce la creación de DC tolerogénicas mediante la disrupción de la vía de presentación de antígenos por las moléculas del MHC II, es decir, se da una menor expresión de moléculas MHC tipo II y moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en su superficie por lo que disminuye su capacidad de presentar antígenos a los linfocitos T CD4⁺. De esta manera se produce la inhibición de la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ (Ristich et al., 2005).

Además, se han realizado estudios con CPA transfectadas con HLA-G sobre una reacción mixta de linfocitos (MLR) (LeMaout et al., 2004) y se ha visto que el HLA-G es capaz de la inmunosupresión de los linfocitos T CD4⁺. En las DC HLA-G modificadas disminuye la expresión de moléculas MHC tipo II y moléculas coestimuladoras ya que tienen afectados determinados genes que afectan a los procesos de presentación del complejo antígeno/MHC II a los linfocitos T CD4⁺. De manera que cuando una DC HLA-G modificada interacciona con un linfocito T CD4⁺ se inducen varios mecanismos tolerogénicos como son la inhibición de la proliferación de los linfocitos T CD4⁺, llevar a los linfocitos T CD4⁺ a un estado de anérgia o inmunosupresión, e incluso se produce una falta de responsividad a los antígenos específicos a largo plazo. Además, se ha podido ver que el HLA-G es capaz de causar la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ hacia linfocitos T supresores o reguladores (linfocitos T CD4⁺ CD25⁺ CTLA4* o linfocitos T CD8⁺ CD28-) que migrarán hasta infiltrarse en la interfase feto-materna y ejercerán su efecto beneficioso sobre el embarazo. Por otro lado, disminuye la capacidad de los linfocitos T CD4⁺ de producir IL-12 o IFN- γ y aumenta la producción de IL-10. Resumiendo, el HLA-G se une a los linfocitos T CD4⁺ para inhibir la aloreactividad o la respuesta aloproliferativa (Bainbridge et al., 2000; Le Friec et al., 2003; LeMaout et al., 2007; LeMaout et al., 2004; Lila et al., 2001; Ristich et al., 2005; Riteau et al., 1999). Incluso los propios linfocitos T CD4⁺, después de una activación alogénica, son capaces de producir HLA-Gs5 para suprimir la respuesta alogénica proliferativa de otros linfocitos T CD4⁺ (Lila et al., 2001).

A.7) Regulación al alza de los receptores inhibidores ILT2, ILT4 y KIR2DL4 presentes en las CPA, NK y células T.

El HLA-G, tanto unido a membrana como en forma soluble, es capaz de provocar cambios fenotípicos y cambios en la señalización transcripcional de las células inmunitarias, por sí mismo, incluso en ausencia de activación, es decir, sin coestimulación antigénica. El HLA-G es capaz de aumentar la transcripción y la

expresión superficial de los receptores inhibidores ILT2 y ILT4 en las CPA, los receptores inhibidores KIR2DL4 y ILT2 en las células NK y los receptores ILT2 en los linfocitos T CD4⁺, aunque este mecanismo no está aún bien establecido (LeMaoult et al., 2005). Esto puede suponer una ventaja para los tejidos que expresan HLA-G y que son un potencial objetivo para las células NK y linfocitos T citotóxicos, y escapar así del ataque del sistema inmunitario.

B) Acciones indirectas de la molécula del HLA-G.

B.1) Regulación y estabilización de la expresión superficial del HLA-E para la inhibición de la citotoxicidad de las células NK.

La expresión del HLA-G interviene en la regulación y estabilización de la expresión superficial del HLA-E y de otras moléculas del MHC no clásicas mediante un nonapéptido denominando péptido líder (Braud et al., 1997; King et al., 2000a; Lee et al., 1998a). Mecanismo explicado con más detalle en el punto 1.5.2.4. sobre la expresión del HLA-E.

Como el complejo HLA-E/nonapéptido inhibe la actividad citolítica y citotóxica de las células NK (Sala et al., 2004), de forma indirecta, el HLA-G también realiza la inmunosupresión de las células NK, aunque algunos autores piensan que la expresión del HLA-G no es suficiente para asegurar la co-expresión del HLA-E (Bhalla et al., 2006).

1.5.1.7. Importancia del HLA-G en el embarazo

Existe controversia en cuanto al patrón de expresión del HLA-G en las células trofoblásticas y por lo tanto controversia en cuanto a la importancia del HLA-G en el mantenimiento del embarazo.

Argumentos en contra de la importancia del HLA-G:

● La expresión proteica del HLA-G, así como del HLA-E, en las células de trofoblasto de primer trimestre es la misma en mujeres con embarazos normales pero que se han sometido voluntariamente a la interrupción del embarazo (IVE) y en mujeres con abortos espontáneos recurrentes. Además, al analizar el cariotipo de las muestras embrionarias, no trofoblásticas, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de HLA-G entre las mujeres con abortos recurrentes cromosómicamente normales y las IVE (Bhalla et al., 2006). La expresión proteica de HLA-G también es similar en las células del trofoblasto entre abortos idiopáticos cromosómicamente

1. INTRODUCCIÓN

normales o debidos a anomalías cromosómicas, concretamente la trisomía del cromosoma 16 (Patel et al., 2003).

● Las concentraciones de HLA-Gs plasmáticos de mujeres embarazadas no influyen en la probabilidad de sufrir un aborto en el primer trimestre del embarazo. Los niveles de HLA-Gs5 detectados en el plasma son similares entre mujeres embarazadas que sufren un aborto y las que consiguen un RNV (Gonzalez et al., 2010).

● Se han encontrado varios individuos, mayoritariamente mujeres nacidas vivas homocigotas para el polimorfismo del1597C del HLA-G en el dominio $\alpha 3$ (alelo nulo HLA-G*0105N) (Castro et al., 2000; Ober et al., 1998), produciéndose en este caso isoformas incompletas o proteínas truncadas y eliminando la expresión de la isoforma completa HLA-G1 o la soluble HLA-G5 o HLA-G4.

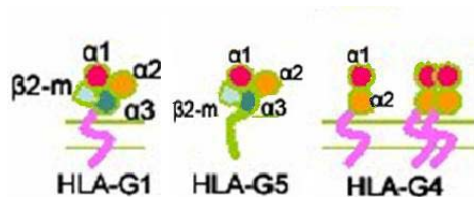


Figura 22: Isoformas del HLA-G truncadas por el polimorfismo HLA-G*0105N.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, dichas mujeres con el polimorfismo en homocigosis pueden tener las proteínas HLA-G1, HLA-G5 y HLA-G4 retenidas, inestables o no funcionales en su trofoblasto y, sin embargo, constituir embarazos normales durante su desarrollo fetal. A su vez, estas mujeres pueden tener embarazos con RNV, aunque esto carece de importancia puesto que sus maridos pudieron aportar el alelo del HLA-G sin este polimorfismo y producir la cantidad adecuada de HLA-G para el mantenimiento del embarazo.

El dominio $\alpha 3$ afectado con este polimorfismo es el encargado de la interacción con los receptores inhibidores ILT2 y la molécula CD8 de los linfocitos T CD8⁺ y de la interacción con los receptores inhibidores ILT2 y ILT4 de células NK, linfocitos B, macrófagos y DC. Debido a esto, las isoformas afectadas por la mutación, así como las isoformas HLA-G3 y HLA-G7 que originalmente no contienen dicho dominio debido al fraccionamiento alternativo, no podrían realizar estas funciones pero sí otras donde no esté implicado este dominio. Por ejemplo, sí que conseguirían realizar la función de inhibición de los receptores KIR2DL4 de las células NK llevada a cabo mediante el dominio $\alpha 1$ del HLA-G (Yan and Fan, 2005). Por todo esto, continúa aún el debate sobre la importancia del HLA-G.

● Según algunos autores, no existe asociación entre determinados polimorfismos y los niveles de expresión de la proteína HLA-G, al menos en las placentas a término (Hviid et al., 2004b). Concretamente, no se encuentran alterados los niveles de expresión del HLA-G con respecto a la presencia de los distintos genotipos generados por el polimorfismo INDEL 14 pb en el extremo 3' UTR en placentas a término (+/+ 14 pb, +/- 14 pb y -/- 14 pb).

Por lo tanto, estos autores sugieren que la molécula del HLA-G no sería el principal determinante del mantenimiento o fracaso de la gestación.

Argumentos a favor de la importancia del HLA-G:

● Otros autores encuentran que existe una disminución en la intensidad de expresión del HLA-G en la interfase feto-materna obtenida después de un aborto espontáneo en comparación con mujeres con embarazos normales y a término (Emmer et al., 2002). También se ha visto una disminución de proteína HLA-G en placentas a término de embarazos con pre-eclampsia en comparación con embarazos normales (Hara et al., 1996; Lim et al., 1997). Esto se correspondería con los datos proporcionados por otro autor sobre la disminución de los niveles de ARNm del HLA-G (de todas las isoformas) en la placenta de mujeres con abortos de repetición comparado con las mujeres con embarazos normales y a término (Abbas et al., 2006).

● La realización de determinados estudios de inmunohistoquímica, donde no se encontraron diferencias en la expresión de HLA-G, obtuvieron la muestra a analizar a través de legrado aspirativo por lo que al determinar el cariotipo es probable que hubiera contaminación materna y se obtuvieran falsos cariotipos normales.

● La selección natural actúa en contra de los polimorfismos que generan un codón stop prematuro y generan alelos nulos con una proteína truncada o no completa y presumiblemente no funcional (Mendes-Junior et al., 2010). Es el caso del codón 54 del exón 2 (HLA-G*0113N), de reciente descubrimiento y encontrado en un solo individuo de una cohorte de 100 donde dicha mutación originó un codón stop a principios del exón 2 y se creó una proteína truncada y probablemente no funcional (Lajoie et al., 2008).

● Puede ocurrir con respecto a determinados polimorfismos que, a pesar de la delección de una base y de producirse un corrimiento en la lectura de aminoácidos del HLA-G, no se afecte su transcrito primario (ARNm) o su fraccionamiento alternativo y no se bloquee la transcripción del ARNm. Un ejemplo de esto es el alelo nulo HLA-G*0105N donde no se producen algunas de las isoformas del HLA-G. En este caso se pueden producir otras isoformas unidas a membrana como la HLA-G2 y HLA-G3 o las

isoformas solubles HLA-G6 y HLA-G7, ya que debido al fraccionamiento alternativo ninguna de ellas contiene el exón donde se produce la mutación, el exón 3, correspondiente al dominio α_2 , y no se ve afectada su estructura primaria ni su conformación terciaria original (Ober et al., 1998).

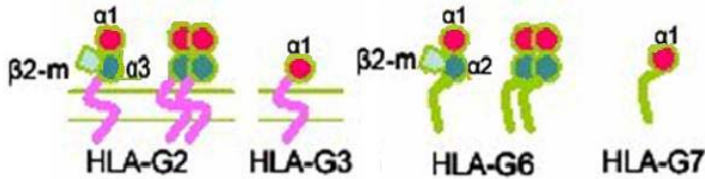


Figura 23: Isoformas del HLA-G producidas en presencia del polimorfismo HLA-G*0105N.

Dichas isoformas reemplazan o compensan las funciones de las isoformas del HLA-G no generadas. Por ejemplo, estas isoformas son capaces de proteger del ataque de las células NK y CTL porque, al menos HLA-G2 y HLA-G6, contienen tanto el exón 2 como el exón 4, correspondientes al dominio α_1 y α_3 , que es por donde el HLA-G interacciona con los distintos receptores inhibidores de las células NK y linfocitos T. También son capaces de inducir la expresión superficial del HLA-E porque contienen el péptido líder, así como la realización de otras funciones para contribuir a la supervivencia fetal (Le Discorde et al., 2005; Menier et al., 2000; Moreau et al., 2002).

Incluso la molécula del HLA-E compensaría la ausencia de HLA-G1 y llevaría a cabo la función de inhibir a las células NK mediante su interacción con el receptor CD94/NKG2A.

Además, se ha visto que incluso las isoformas generadas por el propio alelo nulo HLA-G*0105N son capaces de realizar funciones como la de inducir la expresión superficial del HLA-E porque contienen el péptido líder necesario para ello y de esta manera también son capaces de promover, de una manera indirecta, el reconocimiento de los receptores CD94/NKG2A de las células NK y su inhibición, al menos en un modelo celular de trofoblasto como son las líneas celulares de coriocarcinoma trofoblástico JAR (Sala et al., 2004).

● Se ha descrito asociación entre la presencia de polimorfismos en las regiones 3' y 5' del locus HLA-G y los abortos recurrentes espontáneos (así como con la preeclampsia), ya que determinados cambios en la secuencia genética podrían afectar

al perfil de expresión genética de los transcritos con fraccionamiento alternativo o a la estabilidad y niveles de expresión del ARNm (Hviid et al., 2003), los cuales podrían tener una significancia funcional en los niveles de expresión de la proteína HLA-G (Rebmann et al., 2001). Otros polimorfismos en otras regiones codificantes que generan determinados alelos como el HLA-G*0105N o HLA-G*01013 (Pfeiffer et al., 2001) o HLA-G*01041 (Aldrich et al., 2001) han sido también relacionados con los abortos recurrentes.

● De la misma forma, otros estudios han encontrado que menores niveles de HLA-Gs en el suero materno están relacionados con complicaciones del embarazo como pre-eclampsia y aborto recurrente. De manera que en las mujeres con pre-eclampsia (Goldman-Wohl et al., 2000; Hara et al., 1996; Yie et al., 2004; Yie et al., 2005b) y en mujeres con abortos (Alegre et al., 2007; Athanassakis et al., 1999; Pfeiffer et al., 2000) existe menor nivel o indetectable HLA-Gs en plasma en el primer trimestre del embarazo comparado con mujeres con embarazo intacto usadas como controles. Otros estudios, relacionan el nivel de HLA-Gs en suero/plasma con los genotipos y polimorfismos en el gen del HLA-G. Esto podría explicar las diferencias de concentraciones de HLA-Gs séricas entre individuos.

1.5.2. HLA-E. Molécula no clásica del MHC tipo Ib.

Los patrones de expresión del antígeno HLA-E junto con el elevado grado de conservación de su secuencia durante la evolución predicen una evidente implicación en la respuesta inmune.

La estructura tridimensional de la molécula HLA-E (O'Callaghan and Bell, 1998) es casi idéntica a la de otros HLA clase Ia. Está formado por un heterodímero consistente en una cadena pesada extracelular que se une no covalentemente a la cadena ligera β -2-microglobulina (Bjorkman and Parham, 1990). La cadena pesada está constituida por tres dominios extracelulares (dominios α 1, α 2 y α 3). Intracelularmente, la molécula del HLA-E está formada por un segmento transmembrana y otro citoplasmático.

La región de unión al péptido está formada por una hendidura entre el dominio α 1 y α 2 y tiene una naturaleza hidrofóbica en consonancia con su capacidad de unir un tipo de péptidos hidrofóbicos como son los péptidos líder de otras moléculas del HLA. Además, el HLA-E conserva los sitios de interacción con la β -2-microglobulina y con la molécula accesoria CD8 de los linfocitos T citotóxicos.

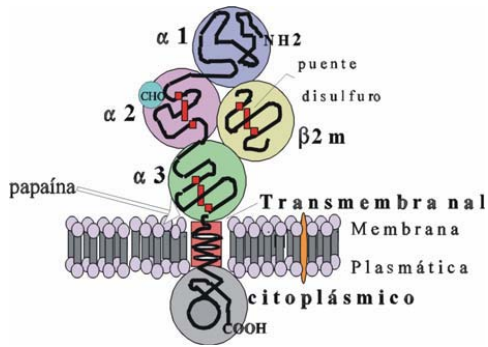


Figura 24: Estructura de la molécula MHC tipo I

1.5.2.1. Secuencia y estructura genética del HLA-E.

El gen del HLA-E está en el cromosoma 6, entre el locus del HLA-C y HLA-A. Está compuesto por 8 exones, donde el exón 1 codifica para el péptido líder, el exón 2, 3 y 4 codifican para los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, respectivamente, el exón 5 codifica para la región intracitoplasmática y el exón 6, 7 y 8 codifican el tallo citoplasmático.

Existen diferencias entre el gen del antígeno HLA-E y los genes del MHC clásicos y del HLA-G, que pasamos a enumerar a continuación:

1) Diferencias en la porción N-terminal de la secuencia señal que el HLA-E requiera nonapéptidos de unión con determinados aminoácidos en determinadas posiciones.

2) Deleción de 5 nucleótidos en el exón 7 que resulta en un codón de terminación que hace que la proteína sea un aminoácido más corto que la mayoría de las cadenas HLA-B y cuatro aminoácidos más corto que la mayoría de las cadenas HLA-A.

Además, el gen del HLA-E es el único de los genes del MHC tipo I que escapa de la metilación de las islas GpC en el extremo 5' (Boucraut et al., 1993).

1.5.2.2. Polimorfismos del HLA-E.

Es un gen muy conservado a lo largo de la evolución, es decir, presenta un bajo polimorfismo o un limitado grado de variación alélica y solo codifica tres proteínas diferentes, explicando la baja diversidad de péptidos que presenta y la necesidad de péptidos líderes de otras MHC clase I muy conservados (Pyo et al., 2006). Actualmente se han definido 10 alelos en el locus del HLA-E (<http://ebi.ac.uk.imgt/hla>).

Hasta hoy día, solo se han encontrado 9 SNP en el HLA-E, algunos sin producirse sustitución de aminoácido pero la mayoría son de tipo no sinónimas. Los

1. INTRODUCCIÓN

codones afectados son el codón 12 del exón 1, los codones 66, 77 y 82-83 del exón 2, los codones 107, 131 y 157 del exón 3 y codón 292 del exón 5. Estas sustituciones originan los 10 alelos del HLA-E que se conocen actualmente, aunque dos de ellos (HLA-E*0101 y HLA-E*0103) aparecen con mayor frecuencia en la población (Grimsley et al., 2002).

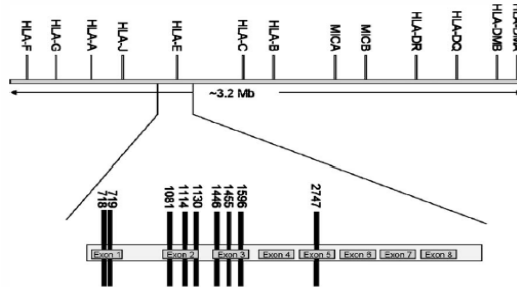


Figura 25: Polimorfismos del HLA-E.

Los polimorfismos en el promotor del HLA-E pueden alterar los niveles de expresión del HLA-E y cinco de las funciones del HLA-E pueden verse afectadas cualitativamente por cambios cuantitativos del HLA-E en los niveles de superficie (Lee et al., 1998a), por ejemplo la no inhibición de los receptores CD94/NKG2 de las células NK (Llano et al., 1998).

El alelo HLA-E*0101, también llamado HLA-E^G, consiste sólo en un cambio de G por A (GGG por AGG), una sustitución no sinónima de glicina por arginina en la posición 1446, en el codón 107, en el exón 3, en el dominio $\alpha 2$, de manera que una sola sustitución puede crear un alelo diferente. Los alelos HLA-E*010301 y HLA-E*010302, también llamados HLA-E^R, (Gomez-Casado et al., 1997) contienen el aminoácido glicina en el codón 107, dominio $\alpha 2$, y además ocurre un cambio sinónimo de asparagina por asparagina (AAT por AAC) en el codón 77, exón 2, dominio $\alpha 1$. El alelo HLA-E*0102 se origina por un cambio en el codón 82-83 (CGC-GGC por CGG-CGC) y ocurre un cambio de glicina por arginina en la posición 83, además de por una sustitución no sinónima de glicina por arginina en el codón 107, en el exón 3. El alelo HLA-E*0104 se origina por un cambio en la posición 1596, en el codón 157 de AGA por GGA, arginina por glicina (Gomez-Casado et al., 1997; Grimsley et al., 2002; Ohya et al., 1990).

Los polimorfismos del HLA-E en las células del TEV tienen la misma frecuencia en mujeres con embarazos normales y con abortos recurrentes (Kanai et al., 2001a;

Pfeiffer et al., 2001; Steffensen et al., 1998), sugiriendo que los polimorfismos en el HLA-E “per se” no influyen en la pérdida del embarazo. Sin embargo el estudio de Tripathi en 2006 en sangre periférica observa que el HLA-E*0101 en homocigosis estaba aumentado en pacientes con abortos recurrentes frente a las control, y que este alelo era el más frecuente entre todas las mujeres estudiadas (Tripathi et al., 2006).

A pesar del bajo polimorfismo, cada alelo del HLA-E tiene diferente patrón de expresión, diferentes propiedades biológicas, diferentes funciones y diferente interacción con el péptido líder.

1.5.2.3. Transcripción del HLA-E.

Al igual que ocurre con el HLA-G, los transcritos del HLA-E (ARNm) han sido encontrados en más variedad de tejidos que la proteína (Wei and Orr, 1990).

Altos niveles del transcrito HLA-E han sido vistos en la placenta, piel, amniocorion (Houlihan et al., 1992; Houlihan et al., 1995), en linfocitos T activados e inmaduros, en linfocitos B maduros (Koller et al., 1988), hígado y timo fetal, epitelio y endotelio uterino y en células estromales largas de la decidua.

1.5.2.4. Expresión del HLA-E.

Al principio se pensaba que las moléculas del HLA-E sólo se expresaban intracelularmente, que se quedaban retenidas en el retículo endoplasmático y que no tenían función extracelular, pero después se observó que estas moléculas también se expresan en pequeñas cantidades en la superficie celular (Koller et al., 1988; Ulbrecht et al., 1992). La expresión en la superficie celular de las moléculas del HLA-E está tisularmente restringida, al igual que la del HLA-G, pero a su vez presenta diferencias muy interesantes con respecto al resto de moléculas del MHC, ya que su expresión está regulada por su unión a un grupo restringido de péptidos, denominado péptido líder, procedente de los residuos 3-11 de la cadena líder de otras moléculas del MHC tipo I como el HLA-A, B y C, especialmente procedente de un nonapéptido procedente del HLA-G (Lee et al., 1998a), pero nunca del HLA-F. La presencia de este péptido líder es necesaria para que el HLA-E salga del retículo endoplasmático hacia la superficie celular, en nuestro caso a la superficie de las células del trofoblasto. Este nonapéptido también es necesario para las interacciones del HLA-E con los receptores de las células NK y realización de la función de inmunosupresión. Al igual que su homólogo en ratón (Qa1), la unión del HLA-E al péptido líder se realiza mediante un mecanismo dependiente del transportador TAP (del inglés, *Transporter associated with*

1. INTRODUCCIÓN

Antigen Processing). El péptido líder se libera en el citosol de la célula y pasa al lumen del retículo endoplasmático transportado por las tapasinas (TAP). Una vez allí se ensambla con las cadenas pesadas del HLA-E y con la cadena ligera β -2-microglobulina y así ocurre la expresión del HLA-E en la superficie celular. Además, el HLA-E es incapaz de unir su propio péptido líder (Aldrich et al., 1994; Braud et al., 1998b).

No solo los péptidos derivados de otras moléculas del HLA se pueden unir al HLA-E; existen otro tipo de péptidos que pueden unirse perfectamente al HLA-E y hacer que se exprese superficialmente. Por ejemplo, los péptidos derivados de virus como la proteína UL40 del citomegalovirus humano (HCMV), que contiene un péptido que es idéntico al péptido líder derivado de los alelos del HLA-C. Otro ejemplo son los péptidos derivados de micobacterias o la proteína Heat Shock (Hps60) (Tomasec et al., 2000). De manera que estos péptidos favorecen la expresión de HLA-E en superficie, la interacción con CD94/NKG2A y en definitiva la inhibición de la citotoxicidad de las células NK. De esta manera algunos virus podrían evadir la respuesta inmune antiviral de las células NK.

El péptido líder de unión al HLA-E debe exhibir un limitado polimorfismo, de manera que debe contener obligatoriamente una metionina en la posición 2 (residuo 4) del nonapéptido y una leucina en la posición 7 carboxiterminal (residuo 9), y además no contener una treonina en la posición 2 (residuo 4) del péptido líder (Braud et al., 1997; O'Callaghan and Bell, 1998). Otros aminoácidos en otras posiciones del péptido líder podrán ser mejor toleradas. La secuencia amioacídica del péptido líder y la especificidad de unión al HLA-E serán muy importantes para estabilizar su expresión superficial y para su unión a los receptores CD94/NKG2 de las células NK y así poder realizar sus funciones de activación/inhibición de la citotoxicidad de estas células o presentación de antígenos (Borrego et al., 1998; Brooks et al., 1999; Miller et al., 2003). Sobre todo las posiciones 6 y 8 del péptido líder tienen un efecto directo en la afinidad de la interacción con los receptores CD94-NKG2 (Brooks et al., 1999; Sullivan et al., 2007).

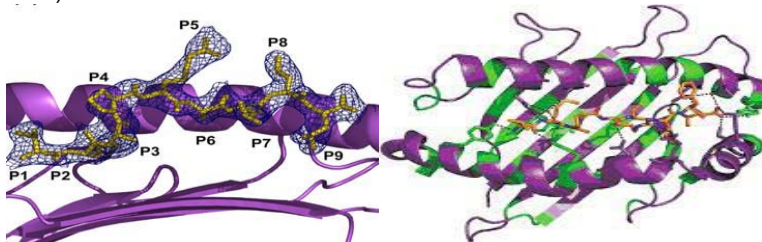


Figura 26: Complejo HLA-E y péptido líder.

Está totalmente aceptado que el HLA-E es expresado en las células del TEV (Blaschitz et al., 2001; Boucraut et al., 1993; King et al., 2000a). Además, aunque en menor cantidad y muy débilmente, también se ha encontrado su expresión en el TV y en el ST donde se une al péptido líder del HLA-G soluble presente en ellos (Ishitani et al., 2003). Se expresa desde el primer trimestre y va aumentando su expresión conforme avanza el embarazo.

Normalmente las células que expresan HLA-G también expresan HLA-E (Ishitani et al., 2003), pero el hecho de que algunas células, particularmente las células del TEV, no co-expresen HLA-E junto con HLA-G sugiere que la expresión de HLA-G no es suficiente asegurar la expresión de HLA-E. Y también ocurre al contrario, ya que existen células como las del sincitiotrofoblasto que expresan HLA-E y en teoría no expresan HLA-G (Bhalla et al., 2006).

Por último, tras análisis inmunohistoquímico, se ha observado que el patrón de expresión de las moléculas del HLA-E, así como del HLA-G, en las células del TEV es la misma en mujeres control con embarazos normales y en las mujeres que sufren abortos recurrentes (Bhalla et al., 2006). Pero, de la misma forma las muestras a analizar fueron obtenidas a través de legrado aspirativo convencional por lo que al determinar el cariotipo es probable que hubiera contaminación materna y se obtuvieran falsos cariotipos normales.

1.5.2.5. Funciones del HLA-E.

El HLA-E presente en la interfase feto-materna es una molécula que se cree que juega un papel importante en la respuesta inmune innata y adaptativa para el mantenimiento del embarazo. La molécula del HLA-E contiene receptores para las células inmunitarias de ambos sistemas. A continuación enumeramos las funciones que es capaz de realizar.

A) Inhibición de la citotoxicidad de las células NK uterinas.

Tras el uso de líneas celulares transfectadas que selectivamente expresan en su superficie el HLA-E y mediante estudios de citotoxicidad de las células NK llevados a cabo *in vitro*, se ha descubierto que la principal función del HLA-E es producir la inhibición de la citotoxicidad o actividad lítica de las células NK uterinas (Carretero et al., 1998; Lee et al., 1998b) a través de su interacción con los receptores inhibidores

CD94/NKG2A y B expresados en la superficie de las células NK. Para llevar a cabo esta función es totalmente necesaria la unión a un péptido líder procedente de otras moléculas del HLA clase I y la unión a las moléculas TAP (Lee et al., 1998a). Determinadas posiciones del péptido líder serán de especial interés en la interacción con los receptores CD94/NKG2A (Petrie et al., 2008). De esta manera, el HLA-G participa de manera indirecta en la inhibición de las células NK por aumentar la expresión de HLA-E en la membrana celular. Sin embargo, el HLA-E no puede unirse a los receptores inhibidores tipo KIR o ILT presentes en las células NK (Braud et al., 1998a; Lee et al., 1998b). Siempre se ha pensado que el HLA-E es la única molécula del HLA que se une a estos receptores, pero actualmente se está investigando si otras moléculas del HLA (como el HLA-G) pueden unirse a este tipo de receptores, aunque lo que sí está claro es que el HLA-E es su ligando primario e interacciona con ellos con gran afinidad (Borrego et al., 1998; Braud et al., 1998a; Lee et al., 1998b). Se piensa que la interacción entre el receptor CD94/NKG2A y el HLA-E se realiza mediante cargas, es decir, una región ácida del CD94 interacciona con una región básica del dominio $\alpha 1$ del HLA-E y una región ácida del dominio $\alpha 2$ del HLA-E interacciona con una región básica del receptor NKG2A (Sullivan et al., 2008).

Sin embargo, el HLA-E no es capaz de reconocer a los receptores inhibitorios KIR2DL de las NK, los cuales solo serán activados por la molécula del HLA-G (Rajagopalan and Long, 1999). Este mecanismo permite que las células NK con un solo receptor monitoricen la integridad de la vía de procesamiento antigénico de numerosas variantes alélicas HLA de clase I clásicas.

La unión específica del HLA-E a este tipo de receptores CD94/NKG2A para la inhibición de la actividad citotóxica de las células NK permitirá la supervivencia fetal, ya que las células del citotrofoblasto fetal que expresen HLA-E, o HLA-G, no se verán atacadas por las células NK presentes abundantemente en la decidua de primer trimestre.

B) Inducción de la citotoxicidad de las células NK.

Otra posible función del HLA-E, que necesita más investigación, es su unión al receptor activador CD94/NKG2C y E (Braud et al., 1998a; Sullivan et al., 2008) presente en las células NK. Aunque su implicación funcional no está clara se cree que el objetivo es inducir la actividad citolítica y producción de citoquinas en las células NK para lisar a los posibles antígenos (Houchins et al., 1997; Kaiser et al., 2005; Llano et

al., 1998; Vales-Gomez et al., 2000). La unión del HLA-E, mediante los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, a los receptores inhibidores CD94/NKG2A y activadores CD94/NKG2C comparte varios residuos aminoacídicos, pero algunos de ellos son diferentes (Wada et al., 2004). Esto soporta la idea de que la unión del HLA-E al receptor activador CD94/NKG2C es más débil que la unión al receptor inhibidor CD94/NKG2A (Llano et al., 1998; Vales-Gomez et al., 1999) asegurándose la dominancia de las señales inhibitorias durante el embarazo. Sin embargo, el HLA-G no es capaz de realizar esta función de regulación positiva de las células NK.

C) Inhibición de los linfocitos T citotóxicos (CTL).

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) expresan receptores inhibidores en su superficie de tipo KIR2DL, los cuales pueden interactuar con las moléculas del MHC tipo I para prevenir su activación.

D) Presentación de antígenos y activación de los linfocitos Tc CD8⁺.

Es bien reconocido que el HLA-E tiene un papel en la respuesta inmune innata mediante la regulación de las células NK, pero recientemente se cree que también puede jugar un importante papel en la respuesta inmune adaptativa frente a patógenos invasores. Una vez en la superficie celular el HLA-E podrá presentar antígenos a los linfocitos Tc CD8⁺ de la misma forma que el resto de moléculas del MHC (Sullivan et al., 2008). El HLA-E es capaz de unirse al receptor TCR-CD8 de los linfocitos Tc CD8⁺ (CTL), inducir su citotoxicidad y la lisis del antígeno (Pietra et al., 2001; Romagnani et al., 2002; Salerno-Goncalves et al., 2004).

1.6. Mecanismos inmunológicos implicados en el mantenimiento del embarazo y la naturaleza antigénica de la placenta.

La inmunología juega un papel muy importante en varios procesos reproductivos como la ovulación, la menstruación y el embarazo.

La inmunología del embarazo es una ciencia que nace de la inmunología de los trasplantes, ya que el feto es comparado por algunos científicos a un trasplante

semialogénico que cumple con las reglas de aceptación o rechazo del mismo. Tanto el feto como la placenta son considerados aloinjertos ya que introducen ADN y ARN paterno y, por lo tanto, diferente a la madre, y la expresión de sus genes da lugar a proteínas foráneas reconocibles por el sistema inmunitario materno. Por lo tanto, es interesante profundizar en los fenómenos inmunológicos que intervienen en el mantenimiento del embarazo y la tolerancia materna a los antígenos fetales y placentarios.

Más interesante si cabe es el caso de los embarazos conseguidos mediante donación de ovocitos o embriones donde el genoma fetal es completamente alogénico a la madre y existe un elevado grado de disparidad antigénica. Al considerarse un injerto completo, causa una atípica reacción inmunológica donde los cambios locales y sistémicos del sistema inmunitario son más acusados que en embarazos propios, procedentes tanto de reproducción asistida como espontáneos, como es el caso de mayor hiperactivación de los linfocitos T colaboradores y aumento en la producción intracelular de citoquinas (Chernyshov et al., 2008). Son gestaciones interesantes de estudiar ya que, a pesar de lo mencionado anteriormente y la mayor incidencia de complicaciones perinatales como la hipertensión inducida por el embarazo (PIH) (Wiggins and Main, 2005), sangrados vaginales en el primer trimestre del embarazo (Abdalla et al., 1998), hemorragias post-parto (Sheffer-Mimouni et al., 2002) o alteraciones placentarias como puede ser un incremento de la infiltración de células NK CD56⁺ y linfocitos Th CD4⁺ en la placenta basal (Gundogan et al., 2009), el embarazo sigue adelante y nos permiten tener un mayor conocimiento de las relaciones inmunitarias entre madre y feto (van der Hoorn et al., 2010).

La aceptación materna del feto es uno de los fenómenos más intrigantes de la naturaleza ya que el útero es un tejido inmunocompetente que debe ser capaz de regular el efecto inmunogénico del tejido fetal sobre la madre. A su vez, sigue manteniendo la homeostasis perfecta de su sistema inmunitario y debe estar preparado para hacer frente a posibles infecciones y otras lesiones (Taglauer et al., 2010).

Billingham y Medawar en 1953 (Billingham et al., 1953; Medawar, 1953) fueron los primeros en proponer el concepto de feto semialogénico y postularon algunos mecanismos por los que el feto habitualmente no es rechazado por el sistema inmunitario materno:

- La separación anatómica entre el feto y la madre y la consideración de la placenta como una barrera inmunológica.

- La inmadurez antigénica del feto que no puede estimular la respuesta inmune materna.
- La consideración del útero o de la interfase feto-materna como un lugar privilegiado inmunológicamente, donde durante el embarazo ocurre una inmunosupresión materna de las células T y una tolerancia fetal.

Todavía no hemos entendido completamente los mecanismos que inducen la tolerancia inmunológica fetal, pero después de casi 60 años siguen basándose en gran parte en las ideas expresadas en estas hipótesis.

A pesar de esto, con el paso del tiempo se vió que existen muchos otros tipos de mecanismos implicados en la protección fetal y además que algunos de estos conceptos no eran del todo ciertos, de manera que evidencias experimentales indican que:

- En primer lugar, la presencia de células fetales en la circulación materna muestra que la placenta no es una barrera inmunológica perfecta sino que es un tejido de tolerancia activa que permite que dos individuos antigénicamente diferentes se toleren el uno al otro durante un largo periodo de tiempo (van Wijk et al., 2001; Williams et al., 2009). Los antígenos fetales son liberados al espacio intersticial decidual y entran en el sistema sanguíneo materno. Es sabido que al final del embarazo el ADN fetal, procedente del citotrofoblasto o del embrión, constituye un 6% del ADN del plasma materno (Flori et al., 2004) e incluso es capaz de permanecer en él durante 27 años. Esos antígenos pasan desapercibidos para el sistema inmunitario materno por los mismos mecanismos que los antígenos locales deciduales.
- En segundo lugar, las células fetales tienen inmunogenicidad y los aloantígenos fetales presentados por las células fetales o por las células del trofoblasto sí son reconocidos por el sistema inmunitario materno, lo cual es esencial para la inducción de los mecanismos inmunoreguladores (Hoskin and Murgita, 1989). La detección de anticuerpos anti-HLA paternos en el suero de mujeres embarazadas, constituye una fuerte evidencia del reconocimiento por parte de la madre del feto como un semi-injerto (Beer et al., 1985). Incluso es sabido que los linfocitos T antígeno-específicos llegan a proliferar en respuesta a la presentación de los antígenos fetales pero después pronto serán suprimidos.
- Por último, se demuestra a través de los embarazos ectópicos que el útero no es el único sitio inmunoprivilegiado, aunque si adaptado evolutivamente a la consecución de una gestación a término. Por otro lado, las células T son el menor componente de los linfocitos en la decidua materna por lo que la

1. INTRODUCCIÓN

inmunosupresión de estas células en el útero no tendría sentido si no se suprimen las que están en mayor proporción y con mayor implicación.

Durante el inicio de la gestación el citotrofoblasto va a invadir la decidua materna e incluso entra en contacto con su sistema sanguíneo, por lo tanto está en estrecho contacto con las células inmunocompetentes maternas presentes en ellos. El sistema inmunitario materno debería de reconocer como extrañas las células trofoblásticas a lo largo de su camino invasivo, sin embargo, el citotrofoblasto y el feto son capaces de escapar del ataque del sistema inmunitario.

Pero, ¿Qué mecanismos se ponen en marcha en la regulación de la respuesta inmunitaria materna, para la tolerancia feto-materna y el consiguiente mantenimiento del embarazo?. A continuación, resumimos algunos mecanismos candidatos a explicar este fenómeno (ver Tabla 1), aunque el éxito del embarazo es el resultado de la integración de una amplia variedad de ellos y a su vez, sólo algunos de ellos parecen realmente cruciales para el establecimiento y mantenimiento del embarazo.


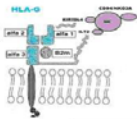



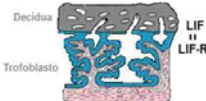
MECANISMOS INMUNOLÓGICOS IMPLICADOS EN EL MANTENIMIENTO DEL EMBARAZO	
Cambio en la producción de citoquinas	Th1 < Th2 
Inhibición de la citotoxicidad de las NK a través de sus receptores inhibidores	
Balance entre los distintos fenotipos de células NK	<p>↑ CD56+CD16- ⇨ Productoras de citoquinas</p> <p>↓ CD56-CD16+ ⇨ Actividad citotóxica</p>
Tolerancia inducida por las DC	
Generación de linfocitos T reguladores	<p>DCreg</p> <p>Treg</p> <p>IL-10, TGFβ, HO-1 y LIF</p>
Catabolismo del triptófano	
Equilibrio angiogénico	Equilibrio entre la coagulación, fibrinólisis y remodelación vascular.
Expresión selectiva de proteínas reguladoras del complemento	
Expresión de LIF	
Moléculas inmunosupresoras	Factores inhibidores de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias: fetoproteína, fetuina, espermina, macroglobulina-alfa2, uromodulina.
Disminución de Ac Autoinmunes	↓ APA, ACA, AL, ANA, AECA ↓ Ac Antifosfolípido
Aumento de Alo-Ac maternos	↑ Ab2, APCA, MLR-Bf
Expresión selectiva del MHC en el TF	<p>HLA-G, HLA-E, HLA-F, HLA-C</p> <p>Trofoblasto</p>

Tabla 1: Mecanismos inmunológicos implicados en la tolerancia materno-fetal y en el mantenimiento del embarazo.

1.6.1. Cambio en la producción de citoquinas en la interfase fetomaterna.

Las células del citotrofoblasto fetal y las propias células inmunitarias maternas tienen en su superficie receptores para determinadas citoquinas y responden ante ellas. Esto convierte a las citoquinas en moléculas muy importantes en el mantenimiento del embarazo. Durante el embarazo, en los tejidos feto-placentarios, así como en sangre periférica, debe de producirse una modulación del sistema inmunitario de la madre caracterizado por la dominancia de una respuesta humoral (Th2) mediante diferentes mecanismos, como pueden ser: síntesis de citoquinas Th2 por determinadas células, regulación hormonal (via progesterona), apoptosis de los linfocitos Th1 o unión del HLA-G a determinados receptores celulares y alteración del patrón de producción de citoquinas.

Durante muchos años estuvo bien establecido que el embarazo era un fenómeno Th2 necesario para la implantación, crecimiento e invasión del trofoblasto (Wegmann et al., 1993) y que la tolerancia materna a los antígenos fetales se explicaba por el predominio de citoquinas Th2. De manera que debía ocurrir un aumento de la producción de citoquinas Th2 como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13 promoviendo respuestas humorales y antiinflamatorias y supresión de la actividad de las células NK que, por lo tanto, serían efectos beneficiosos sobre el desarrollo del feto (Raghupathy, 1997; Raghupathy et al., 2000; Romagnani, 2000). De hecho, tiene más importancia el balance total Th1/Th2 que una citoquina en concreto. Además, debería ocurrir una supresión de la producción de citoquinas de tipo Th1 como IL-2, IFN- γ y TNF- α que generan respuestas inmunitarias inflamatorias y citotóxicas y que tienen un efecto embriotóxico sobre el trofoblasto, teniendo en general un efecto negativo sobre el embarazo, como podría ser el aborto recurrente espontáneo (Raghupathy, 1997) o la pre-eclampsia (Saito and Sakai, 2003).

Sin embargo, en los últimos tiempos, se está poniendo en debate la teoría sobre la relación de citoquinas Th1/Th2, ya que continuamente se estaba simplificando la situación real y se describían casos de aborto de repetición con un perfil Th2 dominante (Chaouat et al., 2003). Además, esta paradigma no es suficiente por sí solo para explicar los mecanismos por los que el feto no es rechazado por el sistema inmunitario materno.

El descubrimiento de nuevas citoquinas como IL-12, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17 y IL-18 no encajan en el paradigma clásico Th1/Th2 (Chaouat, 2007). Por ejemplo, la IL-18, catalogada en principio como citoquina Th1, puede actuar como Th1 o Th2 y está en mayor proporción en embarazos a término comparada con abortos de repetición

(Ostojic et al., 2003). Algunas citoquinas Th1, como el IFN- γ , tienen un papel beneficioso en el mantenimiento del embarazo actuando sobre las células NK para la producción de factores de crecimiento angiogénicos como el VEGF que facilitan la remodelación vascular en las arterias espirales uterinas. Además, el IFN- γ , como factor anti-angiogénico, controla la excesiva invasión del trofoblasto (Lash et al., 2006). También induce la síntesis de citoquinas Th2 en el embrión e incrementa la expresión del HLA-G.

Además, se cree que un aumento excesivo de citoquinas Th2 podría tener un efecto perjudicial produciéndose un crecimiento incontrolado del trofoblasto, una excesiva invasión en la decidua y un consecuente aborto.

1.6.2. Inhibición de la citotoxicidad de las células NK. Balance entre células NK citotóxicas y NK productoras de citoquinas y factores de crecimiento en la interfase fetomaterna.

Los cambios en fenotipo (activación o inhibición) y número de las células NK sugieren que estas células están reguladas hormonalmente, así como por moléculas del HLA y citoquinas.

Inhibición de la citotoxicidad de las células NK. Estas células NK expresan simultáneamente en la superficie celular receptores inhibidores y activadores, cuyo balance será el encargado de regular su actividad citotóxica o secretora de citoquinas sobre otras células. La activación de los linfocitos NK está bajo un estricto control negativo llevado a cabo por sus receptores inhibidores. La activación sólo será posible si el receptor inhibidor no ha sido activado, ya que las señales inhibitorias dominan sobre las activadoras. Por consiguiente, el mecanismo de activación de las células NK ocurre cuando la célula diana a eliminar es incapaz de ocupar este receptor inhibidor con la unión de las moléculas del HLA. A pesar de que, como veremos a continuación, las células NK predominantes en la decidua no tienen principalmente una función citotóxica, el rechazo fetal es modulado, en parte, por la expresión de moléculas del MHC tipo Ib como es el HLA-G y HLA-E (Ishitani et al., 2003) o moléculas del MHC tipo Ia como el HLA-C (Hutter et al., 1996) en las células del trofoblasto extravellocitario fetal, que tienen un efecto inmunosupresivo general de las células NK. Estas moléculas del MHC se unen a los receptores inhibitorios presentes en la superficie de dichas células controlando su actividad citotóxica sobre los antígenos fetales. Además, las moléculas del HLA-G soluble serán capaces de inducir la apoptosis de las células NK (Spaggiari et al., 2002a).

Los mecanismos envueltos en la regulación de la citotoxicidad de las NK no están basados únicamente en la interacción del HLA con el receptor inhibitorio, existen otros mecanismos no inhibitorios envueltos en la regulación de las funciones de las NK deciduales. Por ejemplo, simplemente la no presencia de la molécula CD16 (potente inductor de la citotoxicidad de las NK mediante anticuerpos) en las células NK deciduales supondría la disminución de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC). De manera que posiblemente CD16 y otros receptores activadores como NKp46 (Pessino et al., 1998; Sivori et al., 1997) o NKp44 (Vitale et al., 1998) tienen la habilidad de aumentar la citotoxicidad natural de las NK.

Por otro lado, la inhibición excesiva de las células NK por determinados alelos del HLA, concretamente determinados alelos del HLA-C, también podría repercutir en la pérdida del embarazo o en el desarrollo de pre-eclampsia ya que la ausencia de respuesta inmunológica de la madre y la pobre invasión del trofoblasto parece ser negativa (Hiby et al., 2008; Moffett and Hiby, 2007), concluyendo que para una satisfactoria placentación debe ocurrir una respuesta inmune modulada y un correcto balance entre la inhibición y activación de las células NK en respuesta al trofoblasto fetal.

Balance entre células NK citotóxicas y NK productoras de citoquinas y factores de crecimiento en la interfase fetomaterna. El aumento del número de células NK en el sitio donde debe de implantar el embrión no es casual, es decir, en los últimos años se está evidenciando un efecto positivo de la presencia de este tipo celular en la decidua materna ya que producirían una variedad de moléculas que modulan la invasión del trofoblasto y la remodelación de las arterias espirales (Hanna et al., 2006). La activación de las células NK para la producción de estas sustancias se lleva a cabo mediante la interacción del HLA-E con los receptores activadores CD94/KNG2C de las células NK. Además, si el número de células NK deciduales disminuye puede causar una disminución de la capacidad citotóxica de las células NK deciduales para luchar contra otros patógenos.

Como explicación a este elevado número de células NK en el sitio de implantación de un tejido semialogénico debemos mencionar la existencia de distintas subpoblaciones de células NK que difieren en su fenotipo, en su localización en el individuo, en las citoquinas y quimioquinas que producen, en los antígenos de diferenciación y en la actividad citotóxica (Lukassen et al., 2004).

De manera que, durante las fases tempranas del embarazo debe ocurrir en la mucosa uterina un aumento de la población de células NK CD56⁺ (brigth) CD16⁻, llegando a constituir un 90% de las células NK deciduales. Éstas son principalmente

1. INTRODUCCIÓN

productoras de citoquinas, especialmente de IFN- γ , y tienen menor actividad citotóxica que las células NK CD56⁻ (dim)(Kopcow et al., 2005) pero aún así exhiben actividad citotóxica contra la línea celular citotrofoblástica K562 (King et al., 1989). Las citoquinas secretadas por estas células son LIF, TGF- β , CSF-1, IL-3, IL-8 y IL-10, aunque también segregan IFN- γ , TNF- α y IL-2 (Saito et al., 1993). En estos momentos, las células NKu con dicho fenotipo, mediante la secreción de determinadas citoquinas, como LIF, TGF- β , el factor anti-angiogénico IFN- γ y factores de crecimiento angiogénicos como VEGF, intervienen en los procesos de decidualización y revascularización/remodelación de las arterias uterinas y tienen un papel importante en la diferenciación, crecimiento y grado de invasión del trofoblasto fetal en la decidua (Hanna et al., 2006; Higuma-Myojo et al., 2005; King and Loke, 1991; Kusumi et al., 2006; Parham, 2004). Además, tienen propiedades inmunomoduladoras (Cooper et al., 2001) y luchan contra posibles patógenos produciendo factores solubles protectores o citoquinas supresivas como la IL-10. Pero las NK CD56⁺, aunque en menor proporción, también son capaces de segregar citoquinas y lisozimas con la habilidad de matar a una posible célula objetivo y lo que ocurre es que debido al microambiente del tejido decidual durante el embarazo y la interacción con otras células allí presentes se disminuye esta función “citotóxica” de las células NK CD56⁺ y se favorece la función “cooperadora”. Por todo esto, es cada vez más necesario la reevaluación del concepto de la existencia de una relación hostil entre las células NK y el trofoblasto invasivo, ya que incluso se sugiere que son las propias células del trofoblasto las que inducen el reclutamiento de células NK CD56⁺ hacia la decidua en el embarazo normal (Hanna et al., 2003).

Por el contrario, en el endometrio materno también debe ocurrir una supresión o una disminución de la población de células NK CD56⁻ (dim) CD16⁺ citotóxicas y citolíticas y productoras de granzimas y perforinas (Loke et al., 1995; Quenby et al., 1999; Vince and Johnson, 2000) que sí tendrían un efecto perjudicial sobre el embarazo al encontrarse en grandes cantidades.

El número absoluto de células NK, así como de linfocitos T, no refleja diferencias en su actividad y, por lo tanto, en su función. De manera que para entender mejor el papel de estas células durante la gestación hay que analizar su estado de activación, midiendo los marcadores de activación en su superficie celular.

Cualquier alteración en la población de células NK de sangre periférica o deciduales podría ser responsable de determinadas patologías así como de la pérdida del embarazo. Por ejemplo, se cree que la mayor activación de las células NK CD56⁺

bright deciduales es protectora frente a la pre-eclampsia ya que producen factores de crecimiento y quimioquinas que favorecen la invasión del adecuada del trofoblasto y la remodelación vascular (Hanna and Mandelboim, 2007). Con respecto a la pérdida gestacional, es sabido que en las mujeres con abortos de repetición, comparado con un embarazo normal y a término, ocurre un aumento del número (Clifford et al., 1999; Tuckerman et al., 2007) y actividad de las células NK, es decir, se ha visto un aumento de los marcadores de activación (CD69) tanto en las células NK de sangre periférica (Dosiou and Giudice, 2005; Ntrivalas et al., 2005; Ntrivalas et al., 2001) como en las deciduales (Chao et al., 1995). En los casos de aborto de repetición también se ha observado falta de funcionalidad o una disminución del número de receptores inhibitorios CD94/NKG2A y B (Ntrivalas et al., 2001; Ponte et al., 1999) y KIR2DL (Chao et al., 1999; Varla-Leftherioti et al., 2003) en la superficie de las células NK, por lo que no podrían ser inhibidas por el HLA-G o HLA-E expresado en las células del trofoblasto, las cuales se verían atacadas por la citotoxicidad mediada por las células NK. Además, se ha observado que en las células NK deciduales de mujeres que han sufrido un aborto no existen los cambios morfológicos adecuados para que se lleve a cabo la apoptosis y siguen activadas (Emmer et al., 2002; Gendron and Baines, 1988; Kwak et al., 1999; Vassiliadou and Bulmer, 1996).

1.6.3. Tolerancia inducida por las células dendríticas.

Durante el embarazo debe de haber una tolerancia materna a los antígenos fetales mediado por las DC. Este mecanismo ocurre gracias a que las DC permanecen en un estado inmaduro al encontrar a dicho antígeno y a que se establecen una serie de señales adecuadas entre las DC y los linfocitos T para que no ocurra la presentación del antígeno y activación del sistema inmunitario materno (Blois et al., 2007; Bonifaz et al., 2002), de manera que se produce anergia o apoptosis de los linfocitos T citotóxicos y conversión de los linfocitos Th en linfocitos Th2 o reguladores (Adams et al., 2007; Aluvihare et al., 2004). Las DC también se relacionan con el establecimiento de un perfil Th2 en la decidua (Miyazaki et al., 2003) y con la regulación de la actividad de las NK deciduales ya que se las ha visto íntimamente asociadas en la decidua de primer trimestre (Kammerer et al., 2003).

De hecho, en la decidua de primer trimestre existe una predominancia de DC con marcadores propios de inmadurez (SIGN⁺ CD209⁺) (Gardner and Moffett, 2003; Kammerer et al., 2003; Rieger et al., 2004) que además se sitúan cerca del sitio de implantación (Brebudra et al., 2006). Además, en la placenta a término disminuye por completo la presencia de DC maduras CD83⁺. En los casos de aborto recurrente se ha

observado una sobreabundancia de DC, maduras e inmaduras, en la decidua materna (Askelund et al., 2004).

1.6.4. Generación de linfocitos T reguladores.

La existencia de linfocitos T reguladores especializados durante el embarazo supone un paso adelante hacia la comprensión de cómo el sistema inmunitario materno evita el rechazo del feto. Estas células son una subpoblación especializada de linfocitos T CD4⁺ o linfocitos T CD8⁺ CD28⁻ con expresión constitutiva del marcador CD25 y suponen un 14% del total de los linfocitos T. Actúan suprimiendo o regulando la activación del sistema inmunitario y creando un estado de privilegio en determinados tejidos, manteniendo así la homeostasis de este sistema y favoreciendo el desarrollo y mantenimiento de la tolerancia materna hacia aloantígenos fetales.

Los linfocitos T reguladores actúan de una manera antígeno-específica, es decir, durante el embarazo necesitan ser activados por los antígenos paternos fetales liberados para así generarse, aumentar en número y ejercer su función reguladora y protectora. Por lo tanto, una pobre respuesta a los antígenos paternos puede desembocar en aborto (Zenclussen et al., 2005). A no ser que existan unas condiciones inflamatorias, se generan en el timo de forma natural o se generan de forma inducida en los nódulos linfáticos o en el sistema sanguíneo periférico al encontrarse con una DC presentadora de los antígenos fetales que se encuentra en un estado inmaduro, migrando hasta infiltrarse en la interfase feto-materna durante el embarazo (Tilburgs et al., 2008), constituyendo un 10-15% de los linfocitos T CD4⁺ presentes en la decidua (Heikkinen et al., 2004) y ejerciendo su función inmunoprotectora hacia el feto.

Se ha visto un aumento de este tipo de células reguladoras T CD25⁺ CD4⁺ en la decidua y en sangre periférica durante el embarazo temprano con un pico durante el segundo trimestre y un declive postparto. En las mujeres embarazadas ocurre un incremento de dichas células comparado con estos tejidos en una mujer no embarazada. De la misma manera, se ha visto que una disminución en número o la inhibición de la actividad de las células T reguladoras en la decidua o en el sistema sanguíneo periférico puede llevar a problemas durante el embarazo (Qiu and Lin, 2004; Saito et al., 2005; Somerset et al., 2004; Yang et al., 2008) y al desarrollo de preeclampsia (Sasaki et al., 2007).

Estas células T reguladoras no son capaces de disminuir significativamente la producción de citoquinas Th1 en las células inmunitarias por lo que no cambian la ratio Th1/Th2 (Zenclussen, 2006). Por lo tanto, la función de tolerancia debe ser ejercida

mediante rutas alternativas. Una de sus funciones es la de prevenir la infiltración de linfocitos Th1 en la interfase feto-materna, pero el verdadero efecto beneficioso que tienen los linfocitos T reguladores sobre el mantenimiento del embarazo podría deberse más bien a la inducción de la producción de moléculas protectoras como TGF- β , HO-1 (heme-oxigenasa) o LIF (factor inhibidor de la leucemia) (Waldmann et al., 2004). Una de las funciones del TGF- β es inhibir la diferenciación de los linfocitos Th1 y su respuesta (Gorelik et al., 2002). También se ha observado que las células T reguladoras deciduales aumentan la expresión de laIDO (indolamina 2,3 dioxigenasa) en las DC deciduales y periféricas, así como en los monocitos por inducción de IFN- γ , lo cual es beneficioso para el mantenimiento del embarazo ya que evita el ataque del feto mediado por los linfocitos T (Miwa et al., 2005). Otra de sus funciones sería la de inhibir la producción de inmunoglobulinas en los linfocitos B y la actividad citotóxica de las células NK. Poseen, por lo tanto, una marcada actividad supresiva.

Una pregunta importante en el campo de la inmunología es como la actividad inmunosupresora de las células T reguladoras es modulada durante el curso de una respuesta inmune ya establecida. Mientras que la función inmunosupresora de los linfocitos T reguladores previene el desarrollo de enfermedades autoinmunes, esta función no sería deseable durante la respuesta inmune frente a la infección con un microorganismo. Actuales hipótesis sugieren que cuando se enfrenta una infección por un microorganismo la actividad de los linfocitos T reguladores podría estar regulada negativamente, ya sea directa o indirectamente, por otras células para facilitar la eliminación de la infección.

1.6.5. Catabolismo del triptófano.

Otra forma de inmunosupresión es la inhibición de la proliferación de los linfocitos T mediante el metabolismo del triptófano y la síntesis de una enzima citosólica que cataboliza el triptófano, laIDO. En el caso particular de la gestación, se ha planteado que esta enzima crea un microambiente favorable para el mantenimiento de la tolerancia feto-materna disminuyendo el triptófano disponible para la proliferación de los linfocitos T, en la interfase materno fetal, impidiendo que completen el ciclo celular protegiendo así a la placenta de su ataque, ya que estos los linfocitos T serían mediadores del rechazo del aloinjerto fetal (Honig et al., 2004; Kudo et al., 2004).

1.6.6. Equilibrio angiogénico.

Durante el embarazo debe ocurrir un equilibrio en el proceso de la angiogénesis, es decir equilibrio entre la coagulación, fibrinólisis y remodelación

vascular para evitar una acumulación de fibrina en las vesículas placentarias y deciduales y en el espacio intraveloso, lo cual provocaría un infarto en la placenta e insuficiencia uteroplacentaria (Arias et al., 1998; Buchholz and Thaler, 2003).

1.6.7. Expresión selectiva de proteínas reguladoras o inhibidoras del complemento.

La activación del sistema del complemento, durante una respuesta inmune, es importante para controlar una infección. El reconocimiento de antígenos paternos podría inducir la activación de la cascada del complemento resultando en la lisis de las células trofoblásticas. Por esto, todas las poblaciones celulares del trofoblasto expresan altos niveles de unas proteínas reguladoras encargadas de inhibir la actividad del sistema del complemento sobre ellas (Holmes et al., 1992; Hsi et al., 1991), como son:

- * CD46 o PCM (proteína cofactor de membrana) que es cofactor de proteólisis de C3b (y en menor medida de C4b).

- * CD55 o FAD (factor acelerador del decaimiento) que acelera la disociación de las convertasas de C3

- * CD59 o MACIF (del inglés, membrane attack complex inhibitory factor) que bloquea la unión de C8 a C9 actuando como inhibidor del complejo de ataque a membrana (CAM).

1.6.8. Expresión de LIF (factor inhibidor de la leucemia) en el endometrio y su receptor en el embrión.

Está bien establecido en ratones que para que ocurra la implantación es requerida en el endometrio materno la síntesis y segregación de la glicoproteína LIF, mientras que el blastocisto y sus derivados (TV, TEV y ST) expresan en su superficie el receptor de LIF (LIF-R). También se ha visto la expresión de LIF en linfocitos Th2 y células NK deciduales. LIF actúa como una citoquina pleiotrópica que controla la angiogénesis, media en la interacción entre los leucocitos maternos y la invasión del trofoblasto y es regulador del crecimiento excesivo y diferenciación del citotrofoblasto hacia sincitiotrofoblasto y trofoblasto con fenotipo invasor debido a que reduce la expresión de metaloproteinasas por parte del trofoblasto e incrementa la deposición de fibronectina fetal en la matriz extracelular (Bischof et al., 1995a; Kojima et al., 1995; Sharkey et al., 1999).

Se ha visto una producción deficiente de LIF por parte de linfocitos T deciduales en mujeres con aborto de repetición de causa desconocida (Piccinni et al.,

1998). Por otro lado, la IL-4 producida por linfocitos Th2 induce el desarrollo de linfocitos T productores de LIF (Piccinni, 2006). Por lo tanto, el hecho que el LIF esté tan involucrado en varios procesos del fenómeno implantatorio (Kondera-Anasz et al., 2004) hace que esté directamente relacionado como responsable de determinadas causas de infertilidad.

1.6.9. Otras moléculas inmunosupresoras.

También es importante para el mantenimiento del embarazo la secreción de factores inhibidores de la expresión de citoquinas proinflamatorias las cuales pueden dañar la placenta y provocar una respuesta inmune contra el feto, como son: la fetoproteína, la fetuina, la espermina, la macroglobulina-alfa 2 y la uromodulina (Wang et al., 1997; Zhang et al., 1997).

1.6.10. Disminución de la producción de anticuerpos autoinmunes maternos.

Durante el desarrollo del embarazo debe producirse una disminución en la liberación de anticuerpos autoinmunes como los APA (anticuerpos antifosfolípido), los ACA (anticuerpos anticardiolipina) o el anticoagulante lúpico (AL). También debe ocurrir una disminución de los anticuerpos ATA (anticuerpos antitiroideos), los ANA (anticuerpos antinucleares) o los AECA (anticuerpos anti células endoteliales) (Lin, 1993). La presencia de anticuerpos antifosfolípido está asociada al síndrome antifosfolípido (Beydoun and Saftlas), que es una trombofilia adquirida y causa demostrada de los abortos de repetición, ya que su tratamiento etiológico reduce drásticamente la probabilidad de un nuevo aborto (Rai and Regan, 2006). Estos anticuerpos se unen a los fosfolípidos de las membranas de las células del trofoblasto o a las células endoteliales de los vasos deciduales o trofoblásticos. Una vez allí comprometerían la adherencia del citotrofoblasto fetal a la decidua, producirían una deficiente invasión trofoblástica endovascular y disminuirían el crecimiento fetal (Sebire et al., 2002; Yamada et al., 2003).

1.6.11. Aumento de la producción de aloanticuerpos maternos.

Un proceso aloinmune define una reacción inmunitaria contra "lo no propio". En un embarazo sin complicaciones, cuando el sistema inmunitario de la madre reconoce a los antígenos HLA paternos producidos por el feto como extraños empieza a producir en la interfase feto-materna aloanticuerpos bloqueantes como pueden ser los Ab2 (anti-idiotipo o anti-antígenos HLA paternos), APCA (anticuerpo anti paternal

citotóxico), MLR-Bf (factor de bloqueo de la reacción mixta linfocítica). La hipótesis es que estos anticuerpos pueden unirse a los antígenos paternos y cubrir los receptores de los linfocitos T y B maternos, inhibiéndolos y evitando que reconozcan a los antígenos paternos trofoblásticos como extraños y que se produzca la respuesta inmune materna hacia el feto, pero sigue siendo una hipótesis muy especulativa. Estos anticuerpos protectores están regulados por los HLA solubles. La ausencia o la expresión reducida de los anticuerpos aloinmunes puede ocasionar el reconocimiento de los antígenos fetales por los leucocitos maternos y causar aborto (Eblen et al., 2000; Ito et al., 1999; Pandey and Agrawal, 2004).

1.6.12. Expresión selectiva del complejo principal de histocompatibilidad en las diferentes poblaciones trofoblásticas.

Tras hacer una breve revisión de los mecanismos inmunológicos que deben ocurrir en el sistema inmunitario materno para que se lleve a cabo la tolerancia feto-materna debemos examinar qué propiedades inmunológicas tiene el embrión para su propia supervivencia.

Está ampliamente aceptado que para el mantenimiento del embarazo debe existir una expresión selectiva de las moléculas de histocompatibilidad en las distintas poblaciones del citotrofoblasto fetal. Para que los antígenos paternos fetales no sean reconocidos como extraños y atacados por el sistema inmunitario de la madre en las células del citotrofoblasto o sincitiotrofoblasto fetal no se expresan las moléculas MHC tipo II (HLA-DP, HLA-DR y HLA-DQ) (Murphy et al., 2004) o MCH tipo Ia (HLA-A y HLA-B), aunque sí se ha observado una débil expresión superficial del HLA-C (King et al., 1996; King et al., 2000b; Proll et al., 1999). A pesar de que las formas del HLA-C unidas a la β -2-microglobulina o las cadenas pesadas libres estén en menor proporción en superficie, es probable que exista una mayor cantidad intracelularmente. Estas moléculas son un obstáculo para un embarazo satisfactorio ya que pueden ser reconocidas directamente por los linfocitos T sin el requerimiento de un procesamiento proteolítico y sin la presentación del antígeno por las células presentadoras de antígenos.

También es conocido que otro tipo de moléculas como las MHC tipo Ib (HLA-G, HLA-E y HLA-F) y HLA-C se expresan en las células TEV (Ishitani et al., 2003) y que tienen importantes funciones en el sistema inmune, como son la unión a los receptores inhibitorios de determinadas células inmunitarias maternas, evitando así el rechazo fetal. Con respecto al citotrofoblasto vellositario y sincitiotrofoblasto, no se

1. INTRODUCCIÓN

expresa en estas poblaciones celulares el HLA-G en su forma completa pero sí en su forma soluble (Morales et al., 2003).

	Trofoblasto Extravilosario	Trofoblasto Vilositario	Sincitio-trofoblasto	Feto	Madre
Sí expresión	HLA-G, E, F y C	HLA-Gs5	HLA-Gs5 HLA-E	HLA-A, B y C	MHC-Ia y II
No expresión	MHC-I (A y B) MHC-II	HLA-G, E, F MHC-I y II	HLA-G MHC-I y II	HLA-G, E y F	HLA-G, E y F

Tabla 2: Expresión del MHC en las diferentes poblaciones de citotrofoblasto, en el feto y en la madre.

El HLA-G parece ser una molécula muy importante en la modulación del sistema inmunitario materno durante el embarazo y en la aceptación materna del feto semialogénico mediante los mecanismos de inmunosupresión (Carosella et al., 1999; King et al., 2000a; Ober et al., 1998).

La alteración en la expresión de los antígenos del MHC de clase I como puede ser la disminución de la expresión del HLA-G en las células del citotrofoblasto fetal o una variación alélica en gen del HLA-G, especialmente en el exón 3, dominio $\alpha 2$, se ha postulado estar relacionada con los abortos de repetición (Aldrich et al., 2001; Emmer et al., 2002).

Las moléculas HLA-A, HLA-B, HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ, las más polimórficas, no se expresan en el TEV y no deben de inducir respuesta inmune materna, pero sabemos que la madre es capaz de reconocer a los HLA paternos presentes en las células fetales y de hecho produce anticuerpos frente a ellos durante el embarazo.

Por otro lado, existe una asociación entre las parejas que comparten los antígenos de histocompatibilidad HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR y HLA-DQ y los abortos recurrentes espontáneos (Beydoun and Saftlas, 2005; Christiansen et al., 1997) a pesar de que la identidad absoluta del MHC no es incompatible con la gestación. Esto es debido a que la tolerancia materna y la inducción de los mecanismos inmunoregulatorios se inicia por estimulación inmunológica fetal producida por los antígenos paternos fetales presentes en la circulación materna (Hoskin and Murgita, 1989). La compatibilidad alélica entre los progenitores sería perjudicial ya que se daría una estimulación antigénica inadecuada. De hecho, en los

1. INTRODUCCIÓN

casos de embarazos de donación ovocitaria, donde hay una mayor diferencia entre los alelos del MHC del feto y los de la madre, se da una hiperactivación de las células Th1 y Th2 inducida por el feto alogénico. Concretamente, se ha observado un incremento del porcentaje de IFN- γ (implicado en la formación de arterias espirales uterinas) y IL-4 en sangre periférica en comparación a embarazos espontáneos (Chernyshov et al., 2008). Además, cuanto más parecidos sean los triplete de aminoácidos que componen el HLA entre la madre y el feto menor será la producción de aloanticuerpos maternos favorecedores del mantenimiento del embarazo (Dankers et al., 2004). A pesar de que estos hallazgos se han descrito en sangre periférica, seguramente este efecto es más pronunciado en la interfase feto-materna. Incluso se ha podido comprobar que la diversidad de HLA y receptores tipo KIR de las células NK también interviene de alguna manera en la elección de pareja en humanos. Se intentaría conseguir un hijo que tuviera una gran diversidad de dichos componentes, ya que las moléculas del HLA actúan de receptores de antígeno y mediante la presentación de antígenos favorecen la respuesta inmunitaria. Aunque esto no está totalmente probado, ocurriría una mejor defensa frente a una infección y de alguna forma podría estimular a las células inmunitarias de la madre (fundamentalmente NK) para que secreten citoquinas que atraen el trofoblasto o favorecen la vascularización.

Por último, se ha visto que existen determinadas combinaciones entre los alelos HLA expresados en el trofoblasto y el tipo de receptores KIR de las células NK maternas que desembocan en una excesiva inhibición de las células NK y la falta de apropiadas citoquinas para inducir la invasión del trofoblasto en el útero. Al menos esto se ha observado con respecto a determinados haplotipos del HLA que son más polimórficos, como el HLA-C (Hiby et al., 2008; Moffett and Hiby, 2007). Este efecto es negativo para el embarazo incluso puede determinar el desarrollo de pre-eclampsia.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La gran mayoría de los trabajos revisados en la documentación de este proyecto de tesis doctoral para intentar esclarecer el papel de las moléculas del HLA-G y HLA-E en el mantenimiento del embarazo, están basados en estudios genéticos sobre sangre periférica de los progenitores. Unos pocos utilizan tejido placentario a término, pero son muy escasos los estudios que se han realizado sobre el propio tejido embrionario en el primer trimestre del embarazo. Además, ninguno se ha llevado a cabo sobre tejido trofoblástico con alto grado de pureza y prácticamente nula contaminación materna conseguido mediante la técnica de histeroembrioscopia-legrado. Por último, en ningún estudio, se ha realizado de forma fiable la determinación del cariotipo, ni comparado muestras trofoblásticas de cariotipos normales y anormales.

Este trabajo se centra precisamente en el estudio de las variantes génicas del HLA-G, asociadas al aborto espontáneo de primer trimestre, y en la expresión a nivel proteico del HLA-G y HLA-E mediante inmunohistoquímica y ELISA, con la peculiaridad de realizarlo sobre el propio tejido embrionario.

La hipótesis general es que el HLA-G podría estar implicado en la detención espontánea del embarazo al presentar polimorfismos genéticos asociados tanto con la expresión anómala de ARNm del HLA-G, como con una expresión anómala a nivel proteico.

3. OBJETIVOS

El objetivo general del presente proyecto de tesis doctoral es investigar las moléculas del HLA-G y HLA-E desde el punto de vista inmunogenético en las detenciones espontáneas del embarazo en el primer trimestre de la gestación, con cariotipo embrionario normal, donde se desconoce la causa de éste. Utilizamos como grupo de referencia las detenciones espontáneas del embarazo donde se obtiene un cariotipo embrionario anormal, suponiendo que en estos casos la causa del aborto es la anomalía cromosómica.

Para ello analizamos las variaciones genéticas del HLA-G en el trofoblasto embrionario de abortos cromosómicamente normales en comparación con el trofoblasto de abortos de cariotipo anormal y su asociación con la expresión de HLA-G. También, determinamos *in vitro* e *in vivo* la presencia o ausencia de las moléculas del HLA-G y HLA-E para ver la posible influencia de un cambio genético sobre la producción de proteína.

Los cuatro objetivos específicos son los siguientes:

3.1. Objetivo específico 1.

Determinar la distribución de determinados polimorfismos del gen del HLA-G, así como su presencia o ausencia en el trofoblasto de pacientes con abortos espontáneos de primer trimestre con cariotipo normal y compararla con muestras de trofoblasto embrionario con cariotipo anormal. Agrupación de los diferentes polimorfismos en haplotipos, distribución en nuestra población de estudio y comparación con muestras con cariotipo anormal.

3.2. Objetivo específico 2.

Determinar de forma cuantitativa la presencia de las moléculas solubles de HLA-G en el líquido amniótico embrionario y en los sobrenadantes de los medios de cultivo de trofoblasto procedentes de gestaciones detenidas con cariotipo normal y compararlo con las muestras de trofoblasto embrionario con cariotipo anormal.

3.3. Objetivo específico 3.

Determinar el patrón e intensidad de expresión de los antígenos de histocompatibilidad HLA-G y HLA-E en las muestras de trofoblasto de gestaciones detenidas con cariotipo normal y compararlo con las muestras de trofoblasto con cariotipo anormal.

Determinar si la expresión de HLA-G puede influenciar la expresión de HLA-E.

3.4. Objetivo específico 4.

Determinar la relación entre los polimorfismos analizados en la región genética del HLA-G (asociados previamente a la alteración de la expresión de HLA-G), así como los haplotipos generados mediante dichos polimorfismos, y la expresión proteica de esta molécula en la superficie celular de las vellosidades coriónicas, para intentar evaluar la influencia que un determinado polimorfismo o un haplotipo puede tener sobre la secreción proteica.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Lugar de ejecución.

Instituto Universitario IVI (Instituto Valenciano de Infertilidad) de Valencia.

IVI Murcia.

Fundación IVI Valencia.

El proyecto está financiado por el CDTI (Centro para el Desarrollo

Tecnológico Industrial) con identificación IDI-20070039.

4.2. Obtención de muestras: histeroembrioscopias-legrado en gestaciones detenidas espontáneamente.

Para la realización de esta tesis hemos considerado que la técnica de histeroembrioscopia-legrado, desarrollada por el Dr. Jaime Ferro en la clínica IVI de Valencia, era la más adecuada para la obtención de una biopsia selectiva de trofoblasto con un alto grado de pureza. Al eliminar la contaminación por células maternas, podemos afirmar con alta probabilidad que el cariotipo embrionario obtenido es fiable. La contaminación materna suele ocurrir en gran parte de los legrados convencionales, tal y como ha sido publicado en muchos estudios. De hecho, en cerca de un 50% de las muestras obtenidas tras legrado convencional no se obtiene un cariotipo fiable por problemas de toma, cultivo o contaminación (Robberecht et al., 2009). La histeroembrioscopia no sólo asegura una biopsia dirigida bajo visión directa, sino que, además, la imagen detallada que nos proporciona, da mucha información sobre otros tejidos fetales (vesícula vitelina, amnios, corion, decidua) y permite la detección de posibles malformaciones tempranas en el desarrollo del feto que podrían justificar por qué se produjo la detención espontánea del embarazo (Ferro et al., 2003). Por ejemplo, una espina bífida por déficit de folatos que descartaría un origen cromosómico.

Quizá el gran punto de controversia sobre la necesidad de la realización de un cariotipo embrionario/fetal en los abortos habituales, y sobre la pureza del mismo, es la creencia o no en la aneuploidía recurrente como origen del aborto de repetición.



Figura 27: Imagen real de una histeroembrioscopia previa a la realización de un legrado en la semana 8 de gestación. En ella podemos observar un embrión correspondiente a 6 semanas de desarrollo, con un evidente retraso en el desarrollo fetal. Además, podemos observar el amnios, el cordón alantoideo que une al embrión con la vesícula vitelina y el trofoblasto al fondo de la imagen. A la derecha de la imagen vemos las vesículas trofoblásticas propias de una mola embrionada o enfermedad trofoblástica gestacional. (Proporcionada por Dr.Ferro)

4.3. Identificación de pacientes susceptibles para el estudio.

La población total de estudio de este trabajo está formada por 90 mujeres con gestaciones detenidas entre las semanas 6 y 11, contando a partir de la fecha de última regla. Sin embargo, de acuerdo con la imagen embrionaria observada a través de la histeroembrioscopia, en algunos casos existía un retraso en el desarrollo fetal, de manera que, podríamos concretar que los fetos estaban detenidos en su desarrollo entre la semana 4 y 9,5 de gestación, según la clasificación de la Carnegie Collection Embryology (Bethesda, Washington DC).

Para la realización de este estudio fueron descartadas posibles causas responsables de la pérdida de la gestación, como pueden ser anomalías cromosómicas fetales, en el caso de los embriones con cariotipo normal utilizados como muestras de referencia, anomalías genéticas en los progenitores o SAF. Por lo tanto, no fue necesario excluir a ninguna de las pacientes inicialmente incluidas en nuestro proyecto. Además, a algunas de las pacientes consideradas abortadoras de repetición por presentar 3 o más abortos se les realizó la batería de aborto de

repetición, no resultando ninguna alterada. En dicha batería se solicitó en sangre materna homocisteína plasmática, antitrombina III, anticoagulante lúpico, APCR (resistencia a la proteína C activada), proteína S y C, mutación del gen G20210A de la protombina, y los anticuerpos anticardiolipina IgG e IgM. Además, se estudió el útero de las pacientes y se realizó el cariotipo de los dos progenitores.

De entre nuestra población total de estudio, un 16,7% (15/90) de las pacientes fueron consideradas abortadoras de repetición, definiendo aborto de repetición como la pérdida del embarazo de forma espontánea 3 veces consecutivas antes de la semana 20 de gestación. El resto, un 83,3% (75/90) fueron abortos espontáneos aislados.

Se analizaron cromosómicamente un total de 99 muestras de trofoblasto embrionario/fetal procedentes de 90 pacientes sometidas a histeroembrioscopia- legrado, debido a que 9 de ellas presentaban dos sacos gestacionales y fue posible la obtención de muestra de ambos sacos.

Sin embargo, para la realización de las técnicas de análisis del HLA-G solo se utilizaron algunos de estos 99 trofoblastos:

a) Para la realización de los estudios genéticos se utilizaron un total de 55 pacientes y 57 muestras de trofoblasto embrionario/fetal, ya que 2 de ellas contenían dos sacos gestacionales y se pudo obtener muestra de ambos. Utilizamos 30 trofoblastos con cariotipo anormal (52,6%) y 27 con cariotipo normal (47,4%).

b) Para la detección de HLA-G soluble en el sobrenadante de medios de cultivo de trofoblasto embrionario/fetal de 72 horas, mediante ELISA, se utilizaron un total de 24 muestras, donde 15 muestras procedían de cariotipos anormales (62,5%) y 9 de cariotipos normales (37,5%).

Para la detección de HLA-G soluble en líquido amniótico, mediante ELISA, en se utilizaron un total de 13 muestras de líquido amniótico, donde 9 muestras procedían de cariotipos anormales (69,2%) y 4 de cariotipos normales (30,8%).

c) Para la detección de HLA-G, mediante inmunohistoquímica, se utilizaron un total de 24 pacientes y 27 muestras de trofoblasto embrionario/fetal, ya que 3 de ellas contenían dos sacos gestacionales y se pudo obtener muestra de ambos. La elección de las muestras para esta técnica se realizó aleatoriamente e intentando situar un número similar de

pacientes en cada grupo, 13 muestras de cariotipo anormal (48,2%) y 14 de cariotipo normal (51,8%). A nuestro parecer, consideramos que éste era un número suficientemente representativo para la determinación de la expresión de HLA-G, ya que en otros estudios se usó un número similar de muestras procedentes de distintos tipos de abortos (Bhalla et al., 2006; Emmer et al., 2002; Honig et al., 2005; Hviid et al., 2004b; Menier et al., 2003; Patel et al., 2003; Rabreau et al., 2000).



Figura 28: Distribución de muestras para los distintos estudios.

4.4. Recogida, distribución y almacenamiento de muestras.

Con la realización de la histeroembrioscopia se obtuvieron varias muestras de trofoblasto que se dividieron en tres partes para su posterior análisis.

La primera alícuota de trofoblasto se depositó en suero salino y se remitió inmediatamente al laboratorio de citogenética para su cultivo y estudio del cariotipo completo de las mismas. Esta misma alícuota sirvió, tras el cultivo celular, para la realización del ELISA.

La segunda alícuota de vellosidades trofoblásticas se congeló en suero salino a -80°C y posteriormente fue destinada a la extracción del ADN y análisis genético.

La tercera alícuota de las muestras de trofoblasto fue incluida en OCT (temperatura óptima de corte, del inglés, *Optimal Cutting Temperature*) y almacenada en nitrógeno líquido para la realización de inmunohistoquímica.

Además, con la realización de la histeroembrioscopia se obtuvo una muestra de decidua materna que se congeló en suero salino a -80°C y posteriormente fue destinada a la extracción del ADN y análisis genético para determinar la heterocigosidad de las muestras de trofoblasto y asegurar la no contaminación materna.

Por último, en 13 casos, se consigue obtener muestra de líquido amniótico que se congeló a -80°C y posteriormente fue destinada a la determinación de HLA-Gs mediante ELISA.

4.5. Diseño y variables del estudio.

Estudio experimental prospectivo.

Las variables manejadas durante los experimentos fueron las siguientes:

- * El análisis de la integridad genética de la región del HLA, analizando la heterocigosidad de la muestra de trofoblasto embrionario mediante su comparación con la muestra de decidua materna, y confirmando la no contaminación materna en la recogida de las muestras.
- * Presencia o ausencia de determinados polimorfismos en la región del promotor y en los exones 2, 3 y 8 del HLA-G en las muestras de ADN de trofoblasto embrionario de cariotipo normal, respecto a un grupo de referencia formado por muestras de ADN de trofoblasto embrionario de cariotipo anormal.
- * Los valores relativos de la proteína HLA-G en forma soluble en los sobrenadantes de medios de cultivo de trofoblasto embrionario de cariotipo normal, respecto a un grupo de referencia formado por muestras de trofoblasto de cariotipo anormal.
- * Los valores relativos de la proteína HLA-G en forma soluble en el líquido amniótico procedente de fetos con cariotipo normal, respecto a un grupo de referencia formado por muestras de líquido amniótico procedentes de fetos de cariotipo anormal.
- * La intensidad y patrón de expresión de la proteína HLA-G unida a membrana en las muestras de trofoblasto embrionario de cariotipo normal, respecto a un grupo de referencia formado por muestras de trofoblasto de cariotipo anormal.
- * La intensidad y patrón de expresión de la proteína HLA-E unida a membrana en las muestras de trofoblasto embrionario de cariotipo normal, respecto a un grupo de referencia formado por muestras de trofoblasto de cariotipo anormal.

4.6. Determinación del cariotipo.

Las muestras de vellosidades coriónicas procedentes de los restos abortivos de la histeroembrioscopia-legrado fueron almacenadas en suero salino estéril y examinadas microscópicamente para excluir contaminación materna. El tejido biopsiado fue incubado en el medio Ham's F-10 enriquecido con suero bovino fetal al 20% y con un 2% de ultroser (Gibco) a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. El progreso del cultivo celular se comprobó cada dos días hasta la obtención de una monocapa con el adecuado crecimiento celular. En este momento los cultivos fueron divididos mediante tripsinización con 0,5 % tripsina – EDTA (Gibco-Invitrogen, Nueva York, Estados Unidos).

Una fracción de las células de citotrofoblasto tripsinizadas fue destinada a un frasco de cultivo para el análisis citogenético. Cuando se observó un número suficiente de mitosis se realizó sobre estas células un pre-tratamiento con colchicinadurante 1 hora. Posteriormente se les añadió una solución hipotónica 0.05M de ClK y el fijador Carnoy (ácido acético y metanol en proporción 1:4). El fijador Carnoy se elaboró con metanol (Merck, nº catálogo 1.06009.1011) y acético (Merck, nº cat 1.00063.1000). Se extendió una alícuota de la fracción celular sobre un portaobjetos limpio y a continuación se realizó el bandeo cromosómico GTG. Un mínimo de 20 metafases fueron contadas y al menos 5 de ellas fueron analizadas completamente mediante el programa Cytovision v 4.0 (Genetix Group plc, Berkshire, UK).

La otra fracción de las células trofoblásticas tripsinizadas se mantuvo en cultivo para la determinación del HLA-G soluble mediante ELISA.

4.7. Análisis genético.

Para la determinación del objetivo específico número 1 se utilizaron diversas técnicas de análisis genético, que veremos a continuación.

Utilizando la tecnología más puntera en el campo de la biotecnología, se pretendió investigar qué mutaciones puntuales ocurren en la secuencia genética del HLA-G de trofoblastos fetales y las implicaciones que éstas tienen sobre la producción de proteica de HLA-G y, por consiguiente, su implicación sobre las pérdidas gestacionales de origen desconocido.

4.7.1. Extracción de ADN con solventes orgánicos.

La extracción de ADN de las muestras de trofoblasto y decidua se llevó a cabo con solventes orgánicos mediante el kit ADN Isolation (Gentra System. Puregene TM, Minneapolis, EEUU).

En primer lugar realizamos una ruptura mecánica del tejido y seguidamente utilizamos 300 µl del tampón de lisis celular para disgregar el tejido. Añadimos 1.3 µl de proteinasa k (Life Technologies, Paisle, UK) y 100 µl de la solución de precipitación proteica para que las proteínas precipiten. Tras la centrifugación y recogida del sobrenadante procedimos a añadir 300 µl de isopropanol. Tras la centrifugación y eliminación del sobrenadante procedimos a añadir 300 µl de etanol al 70%. Por último, tras la centrifugación y eliminación del sobrenadante resuspendimos el ADN en 50 µl de solución de hidratación del ADN.

Se cuantificó y se obtuvo la calidad del ADN por absorbancia a una longitud de onda de 260 nm en el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EEUU).

4.7.2. Análisis de la integridad de la región del HLA-G.

Hemos llevado a cabo estudios para verificar el estatus de heteroparentalidad de las muestras de ADN genómico de citotrofoblasto embrionario/fetal, para asegurar que no existe contaminación materna en las muestras de citotrofoblasto y comprobar la integridad de la región completa del HLA. Este es un proceso muy importante desde el punto de vista de validación de la sensibilidad de los ensayos de genotipado y secuenciación posteriores.

Los estudios se han basado en el análisis PCR múltiple de distintas combinaciones de marcadores polimórficos tipo microsatélites CA (citosina-adenina) localizados a lo largo de toda la región HLA, en el cromosoma 6. Los microsatélites son unas repeticiones en el ADN de 1-4 pb flanqueadas por secciones de ADN muy conservadas en el genoma de una especie, secuencias muy útiles como marcadores moleculares. Los 4 pares de cebadores o *primers* utilizados en este análisis se ubican en las regiones genómicas conservadas que rodean el microsatélite propiamente dicho.

Marcadores	Posición (Mb)	Fluorocromo	Primer	Tamaño del fragment
MOG3	29.73	6FAM - Azul	GAAATGTGAGAATAAAGGAGACT GATAAAGGGGAAGTACTACTACATGTAT	~120 pares de bases
HLA-G	29.93	----	-----	----
D6S273	31.79	VIC - Verde	GCAACTTTTCTGTCAATCCA ACCAAAGTCAAATTTTCGG	~130 pares de bases
TAP1-CA	32.92	PET - Rojo	TCATACATCTGCTTTGATCTCCC GGACAATATTTTGCTCCTGAGG	~210 pares de bases
D6S1560	33.66	VIC - Verde	CTCCAGTCCCCACTGC CCCAAGGCCACATAGC	~240 pares de bases

Tabla 3: Marcadores polimórficos según su posición cromosómica cercana a la del gen del HLA-G.

Partimos de ADN bicatenario procedente de trofoblasto y para la confirmación de su heteroparentalidad y no contaminación utilizamos ADN de decidua materna.

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en una mezcla de PCR con 1,8 µl de cebadores específicos a 0.3 mM marcándose el cebador que va en el sentido de la cadena 5'----3' o cebador *forward* con fluorescencia de diferente color, 2,5 µl de tampón de Roche, 1,25 µl de DMSO al 5% y 2,5 µl de mezcla de desoxiribonucleótidos (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), utilizando Amplitaq Gold (Roche, Basilea Suiza) como ADN polimerasa. Rellenamos hasta los 24 µl con agua MiliQ. Añadimos 1 µl de ADN de trofoblasto o decidua materna a cada reacción. Las condiciones de la PCR constaron de un primer paso de 8 minutos de activación de la enzima a 94°C, 38 ciclos de amplificación con una temperatura de annealing de 54.5°C, y un paso final de 10 minutos de extensión a 72°C.

Posteriormente, se realizó el análisis de los fragmentos generados por PCR mediante el sistema PE ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, California, Estados Unidos) que se fundamenta en la electroforesis capilar. Cada reacción de análisis llevó una mezcla de 0,3 µl de un marcador de tamaño molecular o *ladder* LIZ 3130 y 14 µl de formamida encargada de desplegar el ADN de cadena sencilla y permitir que la velocidad de migración dependa únicamente del tamaño y no de la estructura formada tras el plegamiento. Tras la desnaturalización de las muestras se procedió a su análisis electroforético y visualización de los resultados mediante el programa GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems, California, Estados Unidos).

4.7.3. Análisis de polimorfismos.

4.7.3.1. Análisis del polimorfismo -725C>G en el promotor.

Debido a que la región del promotor, en el extremo 5' URR del HLA-G, está localizada cerca del inicio de la transcripción y contiene regiones importantes en la regulación del HLA-G, una variación en esta zona puede afectar la eficiencia de la regulación transcripcional del HLA-G (Moreau et al., 1998a; Moreau et al., 1997) y probablemente afectar los niveles de expresión del HLA-G (Hviid et al., 1999).

Concretamente nos ha parecido interesante detectar una mutación, en las muestras de trofoblasto embrionario, la cual se ha visto relacionada con errores de metilación (Moreau et al., 2003; Ober et al., 2003), con aumentos en la tasa de transcripción del HLA-Gs en líneas celulares JEG-3 (Ober et al., 2006) y con los abortos de repetición (Ober et al., 2003). Se trata de la mutación SNP en la posición -725 del promotor (-725C>G), cercana a puntos clave en la regulación transcripcional y consistente en un cambio de una citosina por una guanina.

Se realizó una PCR para amplificar el fragmento genómico de interés. Cada reacción de PCR se llevó a cabo con 2,5 µl de cebadores específicos a 8 µM diseñados utilizando el programa primer3 software (<http://primer3.sourceforge.net/>) sobre la secuencia obtenida del gen y marcándose el el cebador reverso con un fluoróforo. Además, añadimos 2,5 µl de tampón de Roche 10x, 2,5 µl de mezcla de desoxiribonucleótidos (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 0,4 µl de AmpliTaq Gold ADN polimerasa (Roche, Basilea Suiza) y agua MiliQ hasta rellenar los 24 µl. Añadimos 1 µl de muestra de ADN de trofoblasto embrionario. Las condiciones de la PCR constaron de un primer paso de 3 minutos de activación de la enzima a 95°C, después 35 ciclos

de amplificación que incluyen 30 segundos a 95°C, 30 segundos a la t^a de annealing de primer (52°C) y 30 segundos a 70°C; y un paso final de extensión de 10 minutos a 72°C.

Los cebadores utilizados para el análisis de la región del promotor son:

Promotor en el sentido de la cadena o *Forward*, Upstream:

5' GAAAGTGAAACTTAAGAGCTTTGTGAGGC 3'. Formado por 29 pb

Generándose un desajuste o *mismatch* al final del cebador (T por G) para que la enzima pueda cortar.

Promotor antisentido o *Reverse*, Downstream:

5' TTGGTAACCCCTGAATGATCAG 3' VIC. Formado por 22 pb

El tamaño del fragmento generado es de 117pb

Estos cebadores fueron utilizados por otros autores en sus investigaciones (Sipak-Szmigiel et al., 2007).

Después se llevó a cabo la técnica de RFLP (polimorfismos de longitud de fragmento de restricción, del inglés, *restriction fragment length polymorphism*) mediante la incubación de 7µl del producto de PCR a 37°C y durante 2 horas en presencia de 1µl de la enzima de restricción *StuI* a 10 U/µl y la mezcla de NEBuffer 10x, BSA y agua.

El producto de PCR es digerido cuando está presente una C, es decir, cuando no está presente el polimorfismo. De esta manera se genera un producto de 90 pb más otro de 27 pb (no observado en las imágenes obtenidas de los fragmentos generados) cuando el individuo contiene el genotipo CC. En el caso de ser un individuo con genotipo CG se generan 3 fragmentos diferentes, por un lado de 90 pb más el de 27 pb pertenecientes al alelo C y otro de 117 pb perteneciente al alelo G. En el caso del genotipo GG debería haber un único fragmento de 117 pb.

Tras la desnaturalización de las muestras, se realizó el análisis electroforético de los fragmentos generados mediante el sistema automático AB 3130 (Applied Biosystems, California, Estados Unidos). Cada reacción de análisis lleva una mezcla de 0,3 µl de un marcador de tamaño molecular o *ladder* LIZ 3130, 14 µl de formamida y 2 µl del producto de PCR. La visualización de los resultados se llevó a cabo mediante el programa GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems, California, Estados Unidos).

4.7.3.2. Análisis de polimorfismos en el exón 2, dominio $\alpha 1$.

Debido a las funciones que realiza el dominio $\alpha 1$, como la presentación del péptido o interacción con los linfocitos Tc y células NK, debería de mantener dichas regiones constantes y sin polimorfismos. A pesar de esto, han sido descritos algunos polimorfismos en este dominio menor o mayormente conservados a lo largo de la evolución. Nosotros hemos querido comprobar la frecuencia de aparición de determinadas alteraciones de nucleótidos en el exón 2 del gen del HLA-G en nuestra población de estudio, es decir, en las muestras de trofoblasto embrionario con cariotipo normal y anormal.

Utilizamos la aproximación de la técnica de HRM (melting de alta resolución, del inglés, *High Resolution Melting*) mediante el Ligth Cycler 480 Genotyping (Roche, Basilea, Suiza). Esta técnica consiste en la agrupación de muestras que tienen un perfil de melting similar. No nos proporciona una secuencia genética específica pero sí consigue detectar variaciones, incluso de tipo SNP, entre dos muestras diferentes mediante el análisis de su curva de melting. Para poder monitorizar la evolución de este proceso de alta resolución utilizamos un colorante fluorescente (Resoligth) (Roche, Basilea Suiza) que se intercala al ADN en heteroduplex y que se deshibrida al ocurrir la desnaturalización de las cadenas.

Se realizó una PCR para amplificar un fragmento genómico de interés correspondiente con la parte final del exón 2. Cada reacción de PCR se llevó a cabo con 2,5 μ l de cebadores específicos a 8 μ M, 2,5 μ l de tampón de Roche 10x, 2,5 μ l de mezcla de desoxiribonucleótidos (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 0.4 μ l de AmpliTaq Gold ADN polimerasa de Roche, 1,25 μ l de Resoligth y agua MiliQ hasta rellenar los 24 μ l. Se añadió 1 μ l de ADN de trofoblasto embrionario. Las condiciones de la PCR constaron de un primer paso de 10 minutos de desnaturalización y activación de la enzima a 95°C, después se realizaron 40 ciclos de amplificación de PCR que incluyeron 10 segundos a 95°C, 10 segundos a la temperatura de annealing del cebador (54°C) y 10 segundos a 72°C. Después se realizó un 1 ciclo con bajada y subida de la temperatura hasta los 95°C para obtener la curva de melting de la muestra; y por último 1 ciclo de enfriamiento durante 10 segundos a 40°C.

Los cebadores utilizados para el análisis una determinada región del exón 2, dominio $\alpha 1$, son:

Cebador en el sentido de la cadena o *Forward*, Upstream:

5' AGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGG 3'. Formado por 24 pb

Cebador antisentido o *Reverse*, Downstream:

5' GTTCATTCTGTCAGTCTGTGCGTG 3'. Formado por 24 pb

El tamaño del fragmento generado es de 102 pb.

Mediante la utilización de estos cebadores podemos detectar variaciones de nucleótidos en la parte final del exón 2 y concretamente los aminoácidos correspondientes a esta región donde han sido publicados los polimorfismos más importantes que se encuentran en los codones 54 y 57 (Lajoie et al., 2008; Matte et al., 2002; Mendes-Junior et al., 2010; Yamashita et al., 1996).

Tras obtener los datos en bruto se realizó la normalización de la fluorescencia y de la temperatura y se seleccionó la curva base que vamos a utilizar como referencia, de manera que podamos comparar sobre ella los diferentes tipos de curva que puedan distinguirse correspondientes a los diferentes tipos de polimorfismos que puedan ocurrir.

4.7.3.3. Análisis de polimorfismos en el exón 3, dominio $\alpha 2$.

La mayoría de las mutaciones puntuales que se han descrito en la población sana están localizadas en el exón 3, que codifica para el dominio $\alpha 2$ (van der Ven et al., 1998). En esta investigación hemos querido comprobar la frecuencia de aparición de posibles sustituciones que puedan ocurrir en el exón 3 del gen del HLA-G en las muestras de trofoblasto embrionario procedentes de abortos espontáneos, utilizando para ello secuenciación de la región de interés.

Se realizó una PCR en el termociclador Veriti 380 well thermal cycler (Applied Biosystems, California, Estados Unidos) para amplificar el fragmento genómico de interés. Cada reacción de PCR se llevó a cabo con 1 μ l de cebadores específicos a 5 μ M diseñados utilizando el programa primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) sobre la secuencia obtenida del gen, 0,75 μ l de tampón HotStart 10x, 0,12 μ l de mezcla de desoxiribonucleótidos (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) a 10 μ M, 0,6 μ l de Q solution, 0,05 μ l de HotStart DNA polymerase (Qiagen, Venlo, Holanda) y agua MiliQ hasta rellenar los 7 μ l. Se añadió 1,5 μ l de muestra de ADN genómico de trofoblasto embrionario. Las condiciones de la PCR constaron de un primer paso de 15 minutos de activación de la enzima a 95°C, después 30 ciclos de amplificación que incluyeron 20 segundos a

95°C, 20 segundos a la temperatura de annealing de primer (62°C) y 20 segundos a 72°C; y un paso final de extensión de 7 minutos a 72°C°.

Los cebadores utilizados para el análisis del exón 3, dominio $\alpha 2$, son:

Cebador en el sentido de la cadena o *Forward*, Upstream:

5' GGCGCCTTTACCAAAATCC 3'. Formado por 19 pb

Cebador antisentido o *Reverse*, Downstream:

5' GCACAAGGAGAGGAGGAAAATG 3'. Formado por 22 pb

El tamaño del fragmento generado es de 438 pb

Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit NucleoMag fast PCR purification kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) para eliminar restos de sales, desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs) y cebadores que interfieran en la posterior reacción de secuenciación.

Para la reacción de secuenciación utilizamos 2,5 μ l de los productos de PCR purificados que se amplifican utilizando el kit BigDye® Terminator v3.1 Sequencing (Applied Biosystems, California, Estados Unidos). Las secuenciaciones se realizaron en las dos direcciones, utilizando 1 μ l de los mismos cebadores que en la anterior PCR, 0,75 μ l de tampón BD v3.1 5x, 0,6 μ l de BigDye, 0,12 μ l de DMSO y agua MiliQ hasta rellenar los 7 μ l.

Las reacciones de secuenciación se purificaron mediante el sistema de purificación magnética GeneMag sequence (Chemicell, Berlin, Alemania) para eliminar restos de sales, cebadores y terminadores (ddNTPs).

Los productos de la reacción de secuenciación fueron cargados en un secuenciador 3700 DNA analyzer (Applied Biosystems, California, Estados Unidos). Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante un programa de alineamiento y comparación de secuencias (SeqScape software version 2.6) frente a la secuencia de referencia del gen, obtenida de la siguiente dirección web http://ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?q=ENSG00000204632.

4.7.3.4. Análisis del polimorfismo INDEL 14pb en el exón 8.

Los polimorfismos en la región 3' URT del HLA-G pueden afectar al metabolismo, estabilidad, procesamiento, localización subcelular, exportación nuclear, poliadenilación, unión de microRNAs, control translacional, divisiones y niveles del

ARNm y algunos de ellos están asociados con la pérdida de la gestación (Grzybowska et al., 2001). Pero el polimorfismo más estudiado y con más implicaciones funcionales es el de 14pb INDEL (Humphrey et al., 1995). Por esto hemos decidido detectar este polimorfismo en nuestra población de estudio, correspondiente a muestras de trofoblasto embrionario procedentes de gestaciones detenidas.

Se realizó una PCR para amplificar el fragmento genómico de interés. Cada reacción de PCR se llevó a cabo con 2,5 µl de cebadores específicos a 8 µM marcándose el cebador en el sentido de la cadena 5'----3' o cebador *forward* con un fluoróforo, 2,5 µl de tampón de Roche 10x, 2,5 µl de mezcla de desoxiribonucleótidos (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 0,4 µl de AmpliTaq Gold ADN polimerasa de Roche, y agua MiliQ hasta rellenar los 24 µl. Se añadió 1 µl de muestra de ADN de trofoblasto embrionario. Las condiciones de la PCR constaron de un primer paso de 3 minutos de activación de la enzima a 95°C, después 35 ciclos de amplificación que incluyeron 30 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura de annealing de primer (60°C) y 30 segundos a 70°C; y un paso final de extensión de 10 minutos a 72°C.

Los cebadores para el análisis del exón 8 son:

Cebador en el sentido de la cadena o *Forward*, Upstream: GE14HLAG.

5'GTGATGGGCTGTTTAAAGTGCACC 3'. 6-FAM. Formado por 25pb.

Cebador antisentido o *Reverse*, Downstream: RHG14.

5'GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA 3'. Formado por 23 pb.

Estos cebadores han sido utilizados por otros autores en sus investigaciones (Chen et al., 2008; Hviid et al., 2002; Moreau et al., 2008; Tripathi et al., 2004; Vianna et al., 2007; Yan et al., 2006b).

Tras la desnaturalización de las muestras, se realizó un análisis electroforético de los fragmentos generados por PCR mediante el sistema automático ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, California, Estados Unidos) que se fundamenta en la electroforesis capilar. Cada reacción de análisis llevó una mezcla de 0,3 µl de un marcador de tamaño molecular o *ladder* LIZ 3130, 14 µl de formamida y 1 µl del producto de PCR diluido 1/20. Posteriormente, se procedió al análisis y visualización de los resultados mediante el programa GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems, California, Estados Unidos).

El programa de análisis de fragmentos nos muestra la presencia de un genotipo homocigoto para la delección de las 14 pb en los casos donde se encuentre un solo pico de 211 pb o un genotipo heterocigótico en el caso de la presencia de 2 picos que representan a un fragmento de 211 pb y otro de 227 pb. Por último, un genotipo homocigoto para la inserción de 14 pb se correspondería con un único pico de 227 pb.

4.8. Detección de HLA-G soluble en cultivos trofoblásticos y líquidos amnióticos. Enzimoimmunoanálisis (ELISA).

Para la determinación del objetivo específico número 2 la técnica empleada fue ELISA.

Los sobrenadantes de los medios de cultivo de trofoblasto y los líquidos amnióticos fueron procesados para la realización de la técnica ELISA con el fin de conseguir una cuantificación del HLA-G soluble presente en ellos.

4.8.1. Preparación de las muestras:

El tejido biopsiado fue incubado en el medio Ham's F-10 enriquecido con suero bovino fetal al 20% y con un 2% de ultroser (Gibco, Life Technologies, Paisle, UK). El cultivo fue incubado a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. El progreso del cultivo celular se observó cada dos días hasta la obtención de una monocapa con suficiente crecimiento celular. En este momento los cultivos fueron divididos mediante tripsinización con 0,5 % tripsina - EDTA.

Tras mantener en cultivo durante 72 h con 3 ml de medio de cultivo Amniomed Plus (Euroclone, Milano, Italia), su sobrenadante se congeló a -80°C hasta que fue destinado a la valoración de HLA-G soluble y las células trofoblásticas se diluyeron al 50% con azul trypan para realizar el conteo de las células vivas totales y poder ajustar la concentración de HLA-G por célula. Los sobrenadantes del cultivo trofoblástico fueron concentrados a un tercio de su volumen inicial en el concentrador Vacufuge™ concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

Se analizaron 24 muestras de cultivo trofoblástico, elegidas de forma aleatoria, de las cuales 9 procedían de embriones con cariotipo normal y 15 de embriones con cariotipo anormal.

Además, a través de la técnica de histeroembrioscopia-legrado, en muy pocos casos (13/90), fue posible la obtención de muestra de líquido amniótico. Esta fue

congelada inmediatamente a -80°C hasta la realización del ELISA. Justo antes de su determinación en el ELISA fueron diluidas a 1/3.

Se analizaron 13 muestras de líquido amniótico, de las cuales 4 procedían de embriones con cariotipo normal y 9 de cariotipo anormal.

4.8.2. Protocolo de ELISA:

El kit de ELISA utilizado fue RD194070100R (Exbio/Biovendor, Brno, Republica Checa) de 96 pocillos para la detección de las moléculas solubles HLA-G1 *shed* HLA-G1 cortada proteolíticamente y HLA-G5 activamente secretada. Este kit ha sido seleccionado como el mejor método de detección para la cuantificación del HLA-G soluble (Rebmann et al., 2005). Es el más usado, el que ofrece más confianza, el que tiene un límite de detección o sensibilidad más bajo (1 ng/ml) y el más disponible a nivel comercial.

El anticuerpo primario anti-antígeno ratón monoclonal MEM-G/09 está unido a la superficie de cada pocillo de la placa. De manera que, se añadió sobre cada pocillo un volumen apropiado de las soluciones estándar para la realización de la curva patrón, el blanco y las muestras problema formadas por los sobrenadantes de los medios de cultivo de células de trofoblasto y líquidos amnióticos. Se mantuvieron toda la noche a 4°C . Después se realizó una serie de lavados que eliminan el material no retenido.

Posteriormente se añadió una solución con un segundo anticuerpo de ratón anti-humano β -2-microglobulina conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora, el cual se une al complejo anticuerpo-HLA-G presente en la superficie del pocillo. El exceso de anticuerpo se eliminó mediante lavados. Seguidamente se añadió el sustrato de la HRP que es la 3,5,3',5'-tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno que produce un compuesto coloreado proporcional a la cantidad de HLA-G soluble presente en la muestra o curva patrón. La reacción debe pararse mediante la adición de una solución ácida hasta que el color se transforme de azul a amarillo.

Inmediatamente utilizamos el espectrofotómetro para medir la absorbancia del producto mediante un lector ajustado a 450 nm. La absorbancia es proporcional a la concentración de HLA-Gs y se determina mediante interpolación con la curva patrón. Obtenemos la concentración en Unidades Internacionales / ml y aplicamos el factor de conversión: 2 IU/ml=1 ng/ml.

Los resultados obtenidos sobre la concentración de HLA-Gs fueron divididos entre 3 en el caso de los cultivos trofoblásticos, ya que se realizó la concentración de

las muestras a 1/3 y en el caso de los líquidos amnióticos la concentración de HLA-Gs fue multiplicada por el factor de dilución, es decir, multiplicada por 3.

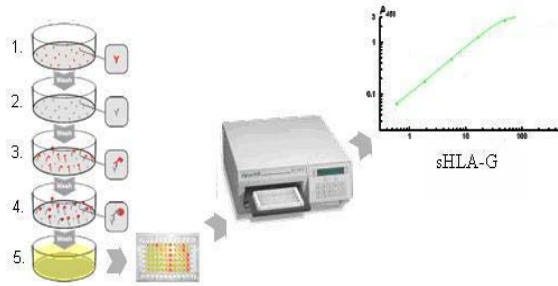


Figura 29: Protocolo de realización del ELISA. Se añaden las diferentes muestras y componentes necesarios para la detección del HLA-G en los diferentes pocillos de la placa de ELISA, se introduce en el espectrofotómetro y se obtiene una curva patrón donde extrapolar nuestros resultados.

4.9. Detección de HLA-G en secciones de trofoblasto. Inmunohistoquímica.

Para la determinación del objetivo específico número 3 la técnica empleada fue la inmunohistoquímica.

Las muestras de trofoblasto obtenidas en la histeroembrioscopia fueron procesadas para la realización de la inmunohistoquímica con el fin de valorar el perfil de expresión proteica del HLA-G y HLA-E. De tal modo, que pudiéramos evaluar el posible impacto que determinadas mutaciones en distintas regiones del gen del HLA-G pudieran tener sobre la producción proteica y la posible implicación que una alteración en los niveles de expresión del HLA-G pudiera tener sobre la detención espontánea del embarazo de origen no cromosómico.

4.9.1. Preparación de las muestras:

La congelación de la muestra de trofoblasto embrionario se hizo en Tissue-Tek OCT compound (SAKURA Finetek Europe B.V. Tissue Tek. Referencia 4583). Se incluyó la muestra en un bloque de OCT, que es un medio de inclusión de muestras para cortes en fresco que contiene polietilén glicol, polivinil alcohol y carbowax. Algunos autores utilizan este método de inclusión de muestras al conseguir

criosecciones más finas que las obtenidas mediante otras técnicas (Barthel and Raymond, 1990; Bogic et al., 1999; Houlihan et al., 1995). Esto es debido a la disminución de agua presente en el tejido, mínima formación de cristales y, por lo tanto, obtención de un mínimo daño de congelación. Además, la calidad y resolución de la imagen se ven muy mejoradas. Dicho bloque se congeló en nitrógeno líquido y fue almacenado a -80°C hasta su utilización.

Los cortes fueron realizados en el criostato LEICA 1900 a una temperatura de -20°C . Conseguimos un grosor aproximado de 5 micras y fueron colocados en un portaobjetos con adhesivo Poly-L Lysina (Superfrost Plus. Ref A5069M) (Menzes-Glaser, Brunswick, Alemania). Los cortes se dejaron secar 1 hora a temperatura ambiente y se guardaron a -20°C hasta el comienzo de la inmunohistoquímica.

4.9.2. Protocolo de inmunohistoquímica:

El tejido se sumergió en acetona fría para su fijación. Se incubó con 50 μl de agua oxigenada al 0,6% en PBS para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Utilizando el Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratorios, Peterborough, UK) se añadió una solución de bloqueo general de los sitios cargados en la superficie del tejido, que son sitios de unión inespecífica de los anticuerpos. Tras varios lavados con PBS se incubó con el anticuerpo primario a una dilución adecuada durante toda una noche a una temperatura de 4°C .

Para la detección del HLA-G utilizamos el anticuerpo de ratón monoclonal MEM-G/09 anti-humano (ABCAM; ab7758) del isotipo IgG1. Este anticuerpo reconoce la forma nativa de la molécula de HLA-G asociada con la cadena B-2-microglobulina, es decir, reconoce los dominios extracelulares de las isoformas HLA-G1 unida a membrana y la isoforma soluble HLA-G5. Dicho anticuerpo fue empleado a una dilución 1/500 usual igual que en otras investigaciones (Menier et al., 2003; Pangault et al., 2002; Patel et al., 2003).

Para la detección del HLA-E utilizamos el anticuerpo de ratón monoclonal 4D12 anti-humano (MBL Internacional Corporation; K0215-3) del isotipo IgG1. Este anticuerpo reconoce a las cadenas pesadas libres o unidas a la B-2-microglobulina del HLA-E. Dicho anticuerpo fue empleado a una dilución 1/100.

El siguiente paso fue la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado (anti-ratón) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con la solución ABC reactiva (Avidina Biotina Complejo) (Vector Laboratorios,

Peterborough, UK) durante 30 minutos. Seguidamente se incubó con 50 µl de DAB (diaminobenzidina) que es el sustrato de la peroxidasa. Después de 3-5 minutos a temperatura ambiente nos proporcionó un color marrón-negro en los sitios donde estaba presente el antígeno buscado. Por último, se realizó una contratinción o tinción de contraste con hematoxilina de Mayer durante 1 minuto.

Para el montaje del portaobjetos realizamos la deshidratación con alcoholes crecientes (85% - 96% - 100%) y Xilol y añadimos el medio de montaje Eukitt® quick-hardening mounting medium (SIGMA, Misuri, Estados Unidos). Una vez realizado el montaje se cuantificó la cantidad e intensidad de expresión de cada antígeno bajo el objetivo de 10x, 20x y 40x, realizando fotografías para su posterior evaluación.

Los lavados necesarios entre cada paso para eliminar el exceso de reactivos fueron realizados con PBS (pH 7.4).

Para comprobar la especificidad de la inmunohistoquímica usamos secciones de tejido citotrofoblástico en ausencia de anticuerpo primario y secciones de amígdala como tejido de control negativo.

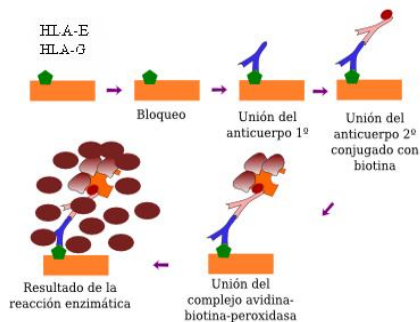


Figura 30: Esquema de marcate de la inmunohistoquímica.

Por último procedimos a evaluar la intensidad de expresión mediante la valoración de 5 investigadores independientes que desconocían el cariotipo de las muestras. Cada muestra fue evaluada de la siguiente manera:

- 1: ausencia de expresión.
- 2: expresión débil.
- 3: expresión media.
- 4: máxima intensidad de expresión.

4.10. Análisis estadístico.

Frecuencia de un polimorfismo:

El análisis estadístico de los resultados de la presencia o ausencia de un polimorfismo entre las muestras de trofoblasto embrionario de cariotipo normal y anormal fue realizado mediante tablas de contingencia de tipo Chi-cuadrado.

Frecuencia de haplotipos:

El análisis estadístico de distribución de los haplotipos del HLA-G en nuestra población de estudio fue realizado mediante tablas de contingencia de tipo Chi-cuadrado.

Por otro lado, el análisis estadístico de la frecuencia de un haplotipo determinado entre muestras de cariotipo normal y anormal fue realizado mediante tablas de contingencia de tipo Chi-cuadrado. Así como la frecuencia de aparición de los haplotipos agrupados en función de la secreción de HLA-G que éstos producen, entre gestaciones detenidas de cariotipos normales y anormales, fue realizada mediante tablas de contingencia de tipo Chi-cuadrado.

Expresión de HLA-G:

El análisis estadístico de los resultados de la expresión proteica del HLA-G y HLA-E en los diferentes tejidos utilizando la técnica inmunohistoquímica y el ELISA fue realizado mediante el test no paramétrico de U-de Mann Withney, ya que al no tener más de 30 valores a analizar no se considera una distribución normal.

Expresión de HLA-G en función de un polimorfismo:

El análisis estadístico de los resultados de la diferencia de expresión de HLA-G en las muestras de trofoblasto embrionario de cariotipo normal o anormal que contenían o no un determinado polimorfismo fue realizado mediante el test no paramétrico de U-de Mann Withney, ya que al no tener más de 30 valores a analizar no se considera una distribución normal.

El análisis de las diferencias de expresión de HLA-G entre los 3 tipos de curvas o polimorfismos encontrados en el exón 2 fue realizado mediante el test estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis para n muestras independientes.

Expresión de HLA-G en función de los haplotipos:

El análisis estadístico de las diferencias de expresión de HLA-G entre los diferentes haplotipos creados, es decir, ver si un determinado haplotipo tiene una mayor expresión de HLA-G con respecto al resto, fue realizado mediante el test no paramétrico para n muestras independientes de H de Kruskal Wallis, ya que al no tener más de 30 valores a analizar no se considera una distribución normal.

El análisis estadístico de la diferencia de expresión de HLA-G dentro de un determinado haplotipo entre muestras de trofoblasto de cariotipo normal y anormal fue realizado mediante el test no paramétrico de U-de Mann Withney, ya que al no tener más de 30 valores a analizar no se considera una distribución normal.

El análisis estadístico de los resultados en cuanto a la diferencia de expresión de HLA-G en un determinado haplotipo secretor entre muestras de trofoblasto de cariotipo normal y anormal fue realizado mediante el test no paramétrico para n muestras independientes de H de Kruskal-Wallis, ya que al no tener más de 30 valores a analizar no se considera una distribución normal.

Se consideró estadísticamente significativo cualquier valor de probabilidad $<5\%$ ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Análisis de la población estudiada.

La población de estudio de este trabajo partía de 90 mujeres con gestaciones detenidas en el primer trimestre del embarazo. La toma de muestra trofoblástica se hizo sobre 99 embriones, ya que 9 de las pacientes contenían dos sacos gestacionales y fue posible la obtención de muestras independientes de ambos sacos.

La media de edad poblacional fue de $34,1 \pm 3,4$ años. Al haber casos, en nuestra población de estudio, donde el embarazo se consiguió a través de ovodonación, la media de edad se calculó, en estos casos, utilizando la edad de la donante.

El 23,3% (21/90) de las gestaciones fueron de concepción natural mientras que el 76,7% (69/90) fueron conseguidas mediante TRA, concretamente 12 tratamientos de IAH (inseminación artificial homóloga) y 57 de FIV (Fecundación In Vitro) ó ICSI (Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides).

Además, dentro la población total de estudio, un 16,7% (15/90) de las pacientes que fueron consideradas como abortadoras de repetición, mientras que un 83,3% (75/90) no lo fueron.

Con respecto a la etiología femenina de las pacientes incluidas en este estudio tenemos que:

- 1) 28,9% (26/90): Sin causa conocida de infertilidad.
- 2) 16,7% (15/90): Abortadoras de repetición.
- 3) 2,2% (2/90): Cromosopatías maternas no asociadas con el aborto.
- 4) 8,9% (8/90): Síndrome de ovarios poliquísticos.
- 5) 20% (18/90): Edad avanzada (mayor de 38 años).
- 6) 8,9% (8/90): Endometriosis.
- 7) 5,6% (5/90): Fallo ovárico.
- 8) 1,1% (1/90): Fallo fecundación en ciclos anteriores.
- 9) 4,4% (4/90): Tubárica.
- 10) 3,3% (3/90): Fallo de IAH.

Clasificaciones poblacionales

De entre las 21 pacientes con gestaciones espontáneas tenemos que un 19% (4/21) de los análisis de cariotipo embrionario resultaron cromosómicamente normales, mientras que un 81% (17/21) de los casos resultaron de cariotipo embrionario anormal. Además, un 42,8% (9/21) eran abortadoras de repetición, mientras que un 57,2% (12/21) no lo eran.

Con respecto a las pacientes sometidas a TRA para conseguir gestación tenemos que, un 8,7% (6/69) del total de pacientes infértiles resultaron ser abortadoras de repetición, mientras que un 91,3% (63/69) no lo eran.

De entre las 69 pacientes infértiles que consiguen su embarazo a través de TRA, un 27,5% (19/69) de los análisis de cariotipo embrionario resultaron cromosómicamente normales, mientras que un 72,5% (50/69) de los casos resultaron con cariotipo embrionario anormal. Además, un 20,3% (14/69) gestaron con el uso de ovocitos donados y tan solo un 14,2% (2/14) de las pacientes sometidas a ovodonación presentaron etiología de aborto recurrente antes de someterse a la donación de ovocitos.

Además, un 8,9% (8/90) de las pacientes abortadoras incluidas en este estudio, se sometieron a la técnica de DGP (diagnóstico genético pre-implantacional) tras el ICSI, realizándose la transferencia de uno o dos embriones normales para los cromosomas analizados. Tras la detención del embarazo, únicamente 2 embriones de entre los 10 analizados (20%) resultaron con cariotipo trofoblástico normal. Dos de las pacientes tuvieron gestaciones gemelares, resultando que, tras el análisis de los restos abortivos, una de las pacientes contenía un embrión con cariotipo normal y otro con cariotipo anormal, concretamente trisomía del cromosoma 14, y la otra paciente contenía un embrión con cariotipo anormal, concretamente trisomía del cromosoma 9 y el otro sin resultados de crecimiento del cultivo trofoblástico. El resto de embriones procedentes de gestaciones únicas resultaron tener trisomías en los cromosomas 4, 10, 15, 17 y un tetraploide, mientras que solo 1 resultó con cariotipo normal. Debido a que existen muestras de trofoblasto con trisomías que fueron analizadas a nivel del embrión por la técnica del DGP, como son las del cromosoma 15 y 17, cabe la posibilidad de un embrión mosaico y obtención de una célula de cariotipo normal para el diagnóstico.

Con respecto a las gestaciones gemelares observamos que todas ellas procedían de TRA, concretamente 8 mediante la técnica ICSI y 1 tras IAH. Por último, 3 de las pacientes con gestaciones gemelares procedían además de donación de ovocitos. De entre los 9 embarazos gemelares se encontraron 3 casos donde cada embrión resultó con un cariotipo discordante, es decir, uno normal y el otro anormal, de manera que 6/18 (33,3%) fetos presentaron cariotipo normal y 11/18 (61,1%) cariotipo anormal y en 1/18 por no crecimiento del cultivo, no se obtuvo el cariotipo.

Los resultados cromosómicos de la población total de estudio se verán con más detalle en la sección de resultados 5.2.

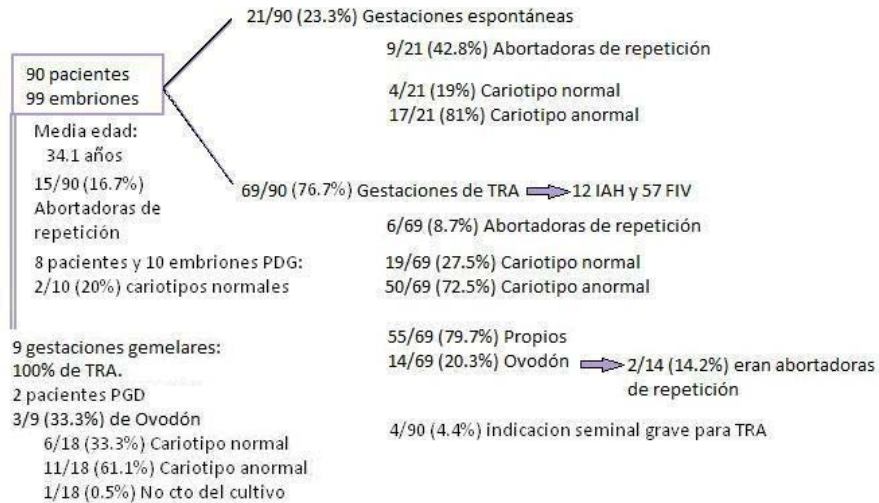


Figura 31: Características poblacionales según TRA.

Clasificaciones poblacionales según pruebas realizadas.

A continuación mostramos las características poblacionales en función de las distintas muestras utilizadas para cada técnica de análisis del HLA-G.

- Inmunohistoquímica: un 95,8% (23/24) de las pacientes consiguieron el embarazo mediante ovocitos propios frente a un 4,2% (1/24) con ovocitos donados. Además, un 20,8% (5/24) de las pacientes eran abortadoras de repetición.
- ELISA en cultivos de trofoblasto: un 79,2% (19/24) de las pacientes consiguieron el embarazo mediante ovocitos propios frente a un 20,8% (5/24) con ovocitos donados. Además, un 16,6% (4/24) de las pacientes eran abortadoras de repetición.

ELISA en líquido amniótico: todas las pacientes incluidas en este análisis tuvieron embarazos conseguidos mediante ovocitos propios. Además, una única paciente, es decir, un 7,7% (1/13) de las pacientes fue considerada abortadora de repetición. La edad gestacional de las pacientes de las cuales se pudo obtener muestra de líquido amniótico estaba entre la semana 6 y 11 de gestación. El bajo número de casos o muestras conseguidas para la realización de este análisis se debe a la dificultad de la obtención de este tipo de muestra en edades gestacionales tempranas.

5. RESULTADOS

c) Análisis de polimorfismos: un 90,9% (50/55) de las pacientes consiguieron el embarazo mediante ovocitos propios frente a un 9,1% (5/55) con ovocitos donados, todas ellas con cariotipos embrionarios normales. Además, un 21,8% (15/55) de las pacientes eran abortadoras de repetición.

Clasificación poblacional según estudios	Inmuno histoquímica	ELISA Trofoblasto	ELISA Líquido Amniótico	Polimorfismos
Propios	95,8%	79,2%	100%	90,9%
Ovodón	4,2%	20,8%	0	9,1%
Abortadoras de repetición.	20,8%	16,6%	7,7%	21,8%

Tabla 4: Clasificación poblacional según estudios realizados.

Con respecto a la etiología masculina observamos que únicamente 4 casos de 90 (4,4%) tenían una indicación seminal grave para someterse a un ciclo de reproducción asistida como es azoospermia obstructiva, criptoospermia o una translocación genética.

Al incluir en nuestro estudio pacientes con abortos espontáneos de repetición y abortos espontáneos aislados, a la hora de estudiar la expresión proteica y los polimorfismos del HLA-G, debíamos hacer una separación en los dos grupos de pacientes según lo mencionado anteriormente, y a su vez, una separación en función del cariotipo embrionario obtenido. Uno de los inconvenientes asociados a la separación fue una disminución del número de pacientes en cada grupo, con lo cual se hacen aún más difíciles los análisis estadísticos. Pero, tras comprobar que los resultados no se alteraron en ninguno de los casos, decidimos agrupar las pacientes en un solo grupo de aborto para así conseguir tener una mayor muestra representativa de pacientes. No se muestran los datos.

5.2. Resultados cromosómicos de las histeroembrioscopias.

Tras la realización de 90 intervenciones de histeroembrioscopia-legrado se pudo obtener muestra de trofoblasto de 99 fetos para su análisis citogenético. Solo en 4 casos no fue posible la determinación del cariotipo por falta de crecimiento del cultivo.

Estos son los resultados cromosómicos obtenidos:

	Histeroscopias-legrado	Análisis genéticos	Falta de crecimiento del cultivo	Cariotipos normales	Cariotipos anormales
Número (%)	90	95/99 (95,95%)	4/99 (4,1%)	27/95 (28,4%)	68/95 (71,6%)

Tabla 5: Resultados cromosómicos de los análisis citogenéticos.

También, debemos mencionar la presencia de mosaicismos placentarios (tabla 6), donde se determinaron discrepancias embrio-trofoblásticas en 7 casos de las 95 determinaciones del cariotipo (7,3%). En estos casos, donde el embrión resultó con cariotipo normal y el cultivo del trofoblasto resultó con cariotipo anormal o con mosaicismo, consideramos la muestra como un trofoblasto con cariotipo anormal, ya que las anomalías cromosómicas en el trofoblasto son causa de aborto.

Paciente	Cariotipo embrión	Cariotipo Trofoblasto
1	46,XX	46,XX,+15.
2	46,XX	46,XX,+22
3	46,XX	MOSAICO: 47,XX,+2[8]/47,XX,del(1)(12q),+2[3]/47,XX,del(1)(p11.1),+2[2]
4	46,XX	MOSAICO: 47,XX,+15[1/3]/46,XX.
5	46,XY	46,XY,+16
6	46,XX	MOSAICO: Tetraploide 92,XXXX[8] /46,XX[12]
7	46,XX	MOSAICO: 47,XX+16/46,XX.

Tabla 6: Mosaicismos placentarios.

5. RESULTADOS

A continuación se muestran diferentes tablas con la distribución de anomalías cromosómicas en la población de estudio, los tipos de anomalías cromosómicas, con el porcentaje de cariotipos femeninos o masculinos y la distribución de anomalías según sexo.

Anomalías cromosómicas	Trisomías autosómicas	Anomalías de cromosomas sexuales	Triploidías	Tetraploidías	Mosaicos	Múltiples anomalías autosómicas asociadas	Translocaciones	Deleciones
68	40/68 (58,8%)	6/68 (8,8%)	4/68 (5,8%)	3/68 (4,4%)	7/68 (10,3%)	6/68 (8,8%)	1/68 (1,4%)	1/68 (1,4%)

Tabla 7: Distribución de anomalías las cromosómicas.

5. RESULTADOS

	Histeroscopias -legrado	Análisis genéticos	Cariotipo masculino XY	Cariotipo femenino XX
Número (%)	90	95/99 (95,95%)	52/95 (54,7%)	43/95 (45,2%)

Tabla 9: Determinación del sexo.



Cariotipo	Pacientes con cariotipo femenino	Pacientes con cariotipo masculino
Normal	15	12
Trisomías autosómicas	19	21
Sexuales	6	0
Triploides	1	3
Tetraploides	0	3
Mosaicos	6	1
Múltiple	3	3
Translocación	1	0
Delección	1	0

Tabla 10: Distribución de anomalías cromosómicas según sexo.

Por último, debemos mencionar la distribución de cariotipos en las muestras trofoblásticas utilizadas para cada uno de nuestros objetivos:

- 1) De entre las 57 muestras de trofoblasto embrionario analizadas genéticamente para el gen del HLA-G, 27 mostraron un cariotipo embrionario normal y 30 cariotipo anormal.
- 2) La técnica ELISA fue realizada en 24 sobrenadantes de los medios de cultivo de trofoblasto, resultando 15 muestras trofoblásticas de cariotipo anormal y 9 de cariotipo normal. La técnica ELISA fue realizada también sobre 13 muestras de líquido amniótico, 9 de cariotipo anormal y 4 de cariotipo normal.

- 3) La inmunohistoquímica fue realizada únicamente en 25 pacientes y 27 muestras de trofoblasto embrionario, resultando 13 con cariotipo anormal y 14 con cariotipo normal.

En cualquiera de los casos de estudio las características poblacionales como son la media de edad, la media del IMC o los porcentajes infertilidad o aborto de repetición fueron similares al total poblacional.

5.3. Respuesta a los objetivos específicos.

5.3.1. Resultados del análisis de polimorfismos.

5.3.1.1. Análisis de la integridad de la región del HLA-G.

Los resultados muestran un elevado grado de heterocigosidad para cada marcador según lo esperado, confirmando que, en todos los casos, el ADN extraído a partir de las muestras indicadas con anterioridad presenta información diploide. Así mismo, estos resultados demuestran que no existe contaminación materna en el momento de recogida de la muestra que pueda interferir en la determinación del cariotipo embrionario.

En la siguiente imagen se muestran dos ejemplos de los resultados del análisis de la integridad de la región del HLA-G mediante los marcadores moleculares indicados anteriormente.

Antes de ello, debemos recordar el fragmento generado por cada uno de los diferentes marcadores polimórficos.

- 1) Marcador MOG3 (azul) muestra un fragmento de aproximadamente 120 pb.
- 2) Marcador D6S273 (verde) muestra un fragmento de aproximadamente 130 pb.
- 3) Marcador TAP1-CA (Castro et al.) muestra un fragmento de aproximadamente 210 pb.
- 4) Marcador D6S1560 (verde) muestra un fragmento de aproximadamente 240 pb.

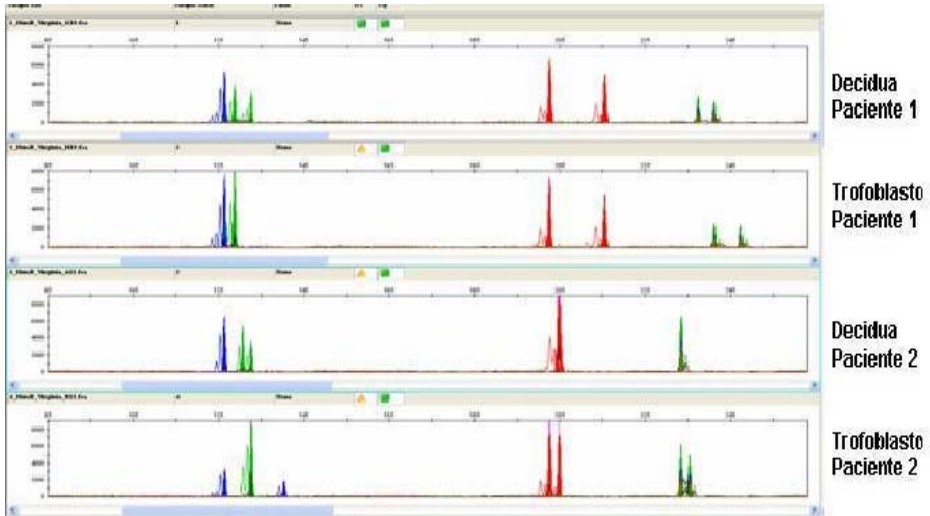


Figura 32: Ejemplo para la interpretación de los electrogramas de la región del HLA.

Paciente 1: Decidua y trofoblasto embrionario. El primer marcador MOG3 (azul) no es informativo puesto que la madre genera dos fragmentos de 126 pb y el feto también. El marcador D6S273 (verde) tampoco es informativo ya que la madre genera un fragmento de 128 pb y otro de 132 pb y el feto dos fragmentos de 128 pb. El marcador TAP1-CA tampoco es informativo por la misma razón, por lo que con estos tres marcadores no podemos descartar la no contaminación materna. Sin embargo, el marcador D6S1560 (verde) sí es informativo, ya que la madre contiene un fragmento de 237 pb y otro de 241 pb y el feto hereda de la madre el fragmento de 241 pb y del padre otro de 247 pb, de manera que aseguramos que la muestra analizada no está contaminada con ADN materno.

Paciente 2: Decidua y trofoblasto embrionario. El marcador D6S273 no es informativo de ausencia de contaminación materna. Sin embargo, los marcadores MOG3, TAP1-CA y D6S1560 sí son informativos, ya que el feto contiene fragmentos que no aparecen en la muestra materna, como son un fragmento de 140 pb de MOG3, un fragmento de 202 pb de TAP1-CA y un fragmento de 235 pb de D6S1560.

5.3.1.2. Análisis del polimorfismo -725C>G en el promotor 5'.

Mediante el test estadístico Chi-cuadrado no se observaron diferencias significativas (X^2 : 0,02; $p=0,88$) en cuanto a la presencia del polimorfismo en la región 5' promotora (-725C>G) en nuestra población de muestras trofoblásticas procedentes de abortos, es decir, entre las muestras usadas como referencia (trofoblasto de cariotipo anormal donde suponemos que la causa de la detención de la gestación era cromosómica) y las que no tenían dicha condición.

Así pues, con respecto a la mutación buscada en la región del promotor, encontramos que un 80% de las muestras de trofoblasto con cariotipo anormal y un 81,5 % de las muestras de trofoblasto con cariotipo normalno contenían la mutación en la posición -725. Sin embargo, la presencia de la mutación ocurre en un 18,5 % de las muestras de cariotipo normal y en un 20% de las muestras de cariotipo anormal.

No se detectó ninguna muestra de tejido trofoblástico donde el polimorfismo ocurriese en homocigosis, es decir, no existió ningún caso con el genotipo GG.

5' PROMOTOR	No polimorfismo en el promotor	Polimorfismo en el promotor	p
Cariotipo Anormal	24/30 (80%)	6/30 (20%)	0,88
Cariotipo Normal	22/27 (81,5%)	5/27 (18,5%)	

(Chi-cuadrado)

Tabla 11: Distribución del polimorfismo en la posición -725C>G.

En la siguiente figura se muestra un electrograma con los resultados del polimorfismo -725C>G en la región del promotor mediante análisis de fragmentos. Recordamos que el producto de PCR será digerido cuando esté presente una C, es decir, cuando no esté presente el polimorfismo.

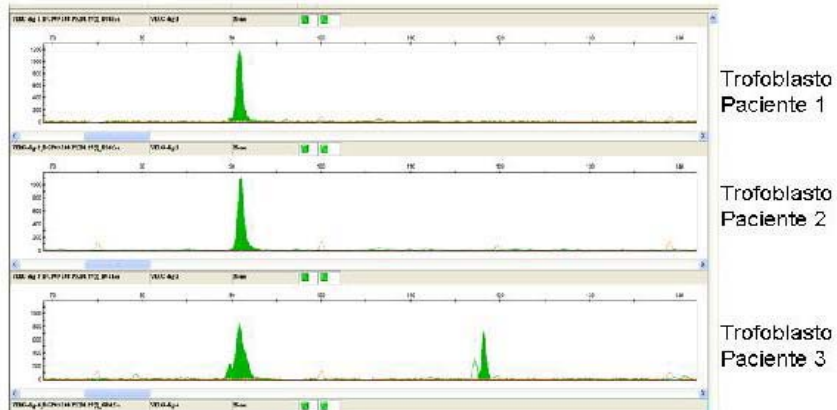


Figura 33: Electrograma del polimorfismo -725C>G del promotor.

Paciente 1 y 2: Muestras de trofoblasto embrionario con genotipo CC. Se muestra un solo pico que representa a un fragmento del promotor de 90 pb correspondiente con la ausencia presencia del polimorfismo. A la derecha de la imagen debe de haber un fragmento de 27 pb que no aparece en la imagen obtenida.

Paciente 3: Muestra de trofoblasto embrionario con genotipo CG. Se muestran 2 picos que representan un fragmento de 90 pb y otro de 117 pb correspondiente a la presencia del polimorfismo en heterocigosis. A la derecha de la imagen debe de haber un fragmento de 27 pb que no aparece en la imagen obtenida.

En el caso de haberse presentado alguna muestra con el genotipo GG debería haber un único fragmento de 117 pb.

5.3.1.3. Análisis de polimorfismos en el exón 2, dominio $\alpha 1$.

Mediante los cebadores seleccionados para el análisis de polimorfismos del exón 2, dominio $\alpha 1$, podemos detectar variaciones de nucleótidos en la parte final del exón 2, donde han sido publicados los polimorfismos más importantes, y que se corresponden con el codón 54 y codón 57.

Entre todas las muestras de trofoblasto analizadas mediante HRM se detectaron mayoritariamente tres tipos de curvas, probablemente correspondientes a las distintas posibilidades de mutación que pueden ocurrir en el codón 57, que son la mutación en homocigosis, mutación en heterocigosis y no presencia de mutación.

5. RESULTADOS

A continuación, en la figura 34 se presentan algunos ejemplos de tipos de curvas observados.

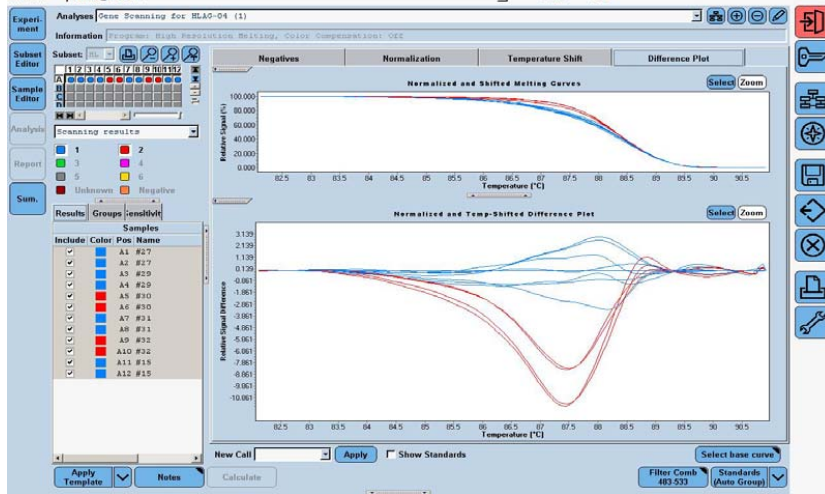


Figura 34: Análisis del exón 2 mediante HRM.

Mediante esta técnica obtenemos diferentes tipos de curvas en función de las distintas secuencias genéticas encontradas en el fragmento analizado.

Grupo de muestras tipo A: color azul.

Grupo de muestras tipo B: color rojo.

En la siguiente tabla se muestra el análisis de la distribución de las diferentes curvas observadas por HRM.

EXÓN 2 Dominio $\alpha 1$	Curva Tipo A	Curva Tipo B	Curva Tipo C	P
Cariotipo normal	3/25 (12%)	9/25(36%)	13/25 (52%)	0,065
Cariotipo anormal	12/30 (40%)	8/30 (26,6%)	10/30 (33,3%)	

(Chi-cuadrado)

Tabla 12: Distribución de las muestras con respecto al patrón de la curva de melting.

A pesar de que parecen observarse algunas diferencias en la frecuencia del polimorfismo entre abortos de cariotipo normal y anormal, tras el análisis estadístico mediante Chi-cuadrado no existen diferencias significativas (χ^2 : 5,44; $p=0,065$) con respecto a la distribución de los genotipos o tipos de curvas entre las muestras de trofoblasto donde la causa de la detención de la gestación fue cromosómica y las que no tenían dicha condición. Quizás aumentando el número de muestras analizadas podrían obtenerse resultados significativos pero no mucho más concluyentes.

5.3.1.4. Análisis de polimorfismos en el exón 3, dominio $\alpha 2$.

Tras la secuenciación del exón 3 detectamos en nuestra población de estudio mutaciones en determinados codones ya descritas con anterioridad.

A) Codón 93.

Mediante el test estadístico Chi-cuadrado no se observaron diferencias significativas (χ^2 : 1,04; $p=0,30$), en cuanto a la presencia o no del polimorfismo C>T en el codón 93, entre nuestras muestras de referencia (donde suponemos que la causa de la detención de la gestación era cromosómica) y las que no tenían dicha condición.

CODÓN 93	No mutación	Mutación en Heterocigosis	Mutación en Homocigosis	P
Cariotipo normal	21/25 (84%)	3/25 (12%)	1/25 (4%)	0,30
Cariotipo anormal	21/29 (72,4%)	7/29 (24,1%)	1/29 (3,5%)	

(Chi-cuadrado)

Tabla 13: Distribución del polimorfismo del codón 93.

B) Codón 110.

Mediante el test estadístico Chi-cuadrado no se observaron diferencias significativas (χ^2 : 0,19; $p=0,65$), en cuanto a la presencia o no del polimorfismo en el codón 110 C>A, entre nuestras muestras de referencia (donde suponemos que la causa de la detención de la gestación era cromosómica) y las que no tenían dicha condición.

La presencia del polimorfismo se detectó en porcentajes similares (16% vs 20,6%) en las muestras de cariotipo normal y anormal; estando en los trofoblastos de

5. RESULTADOS

cariotipo normal en un 12% de forma heterocigota y un 4% de forma homocigota, y en los trofoblastos de cariotipo anormal en un 17,2% de forma heterocigota y en un 3,4% de forma homocigota.

CODÓN 110	No mutación	Mutación en Heterocigosis	Mutación en Homocigosis	p
Cariotipo normal	21/25 (84%)	3/25 (12%)	1/25 (4%)	0,65
Cariotipo anormal	23/29 (79,3%)	5/29 (17,2%)	1/29 (3,4%)	

(Chi-cuadrado)

Tabla 14: Distribución de los polimorfismos del codón 110.

C) Codón 130 (del1597C).

Recordemos que la mutación del1597C presentaba un desplazamiento del sitio de lectura pudiendo originar un cambio de los aminoácidos a partir de la segunda mitad del exón 3 y, a su vez, pudiendo originar una proteína distinta o no funcional.

Mediante el test estadístico Chi-cuadrado, no se observaron diferencias significativas (χ^2 : 2,5; $p=0,11$), en cuanto a la presencia o no del polimorfismo en el codón 130 (delección de Citosina), entre las muestras de referencia (trofoblasto de cariotipo anormal donde suponemos que la causa de la detención de la gestación era cromosómica) y las que no tenían dicha condición. Este polimorfismo resultó estar presente en una proporción diferente pero no significativa entre las muestras con cariotipo normal y anormal, 16% y 3,4% respectivamente.

CODÓN 130	No mutación	Sí mutación	p
Cariotipo normal	21/25 (84%)	4/25 (16%)	0,11
Cariotipo anormal	28/29 (96,6%)	1/29 (3,4%)	

(Chi-cuadrado)

Tabla 15: Distribución de los polimorfismos del codón 130.

5.3.1.5. Análisis del polimorfismo INDEL 14pb en el exón 8.

Tras el análisis de los fragmentos generados, con el fin de detectar el polimorfismo INDEL 14pb, los resultados encontrados mediante el test estadístico Chi-cuadrado fueron que no se observaron diferencias significativas (χ^2 : 0,003; $p=0,95$) en cuanto a la presencia o no del polimorfismo en el exón 8 entre las muestras de referencia (trofoblasto de cariotipo anormal donde suponemos que la causa de la detención de la gestación era cromosómica) y las que no tenían dicha condición.

Encontramos porcentajes similares en la distribución de los diferentes genotipos entre cariotipo normales y anormales, de manera que, con respecto a la delección homocigota, un 40% (12/30) de las muestras de trofoblasto con cariotipo anormal tenían este genotipo frente a un 40,7% (11/27) presente en las muestras de cariotipo normal. Con respecto a la inserción/delección heterocigota, un 50% (15/30) de las muestras de trofoblasto embrionario con cariotipo anormal tenían este genotipo frente a un 59,2% (16/27) presente en las muestras con cariotipo normal. Con respecto a la inserción homocigota, un 10% (3/30) de las muestras de trofoblasto con cariotipo anormal tenían este genotipo frente a un 0% presente en las muestras con cariotipo normal.

EXÓN 8	Genotipo -/- 14 pb (Homocigosis)	Genotipo +/-14 pb (Heterocigosis)	Genotipo +/+ 14 pb (Homocigosis)	P
Cariotipo normal	11/27 (40,7%)	16/27 (59,2%)	0/25 (0%)	0,95
Cariotipo anormal	12/30 (40%)	15/30 (50%)	3/30 (10%)	

(Chi-cuadrado)

Tabla 16: Distribución de los polimorfismos del exón 8.

En la figura siguiente se muestra un electrograma con los resultados del polimorfismo 14 pb INDEL en la región 3' del exón 8 mediante análisis de fragmentos.

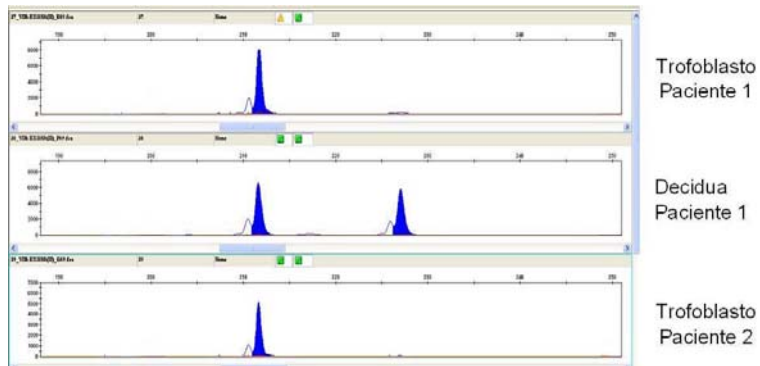


Figura 35: Electrograma del polimorfismo INDEL 14 pb del exón 8.

Paciente 1: Muestra de trofoblasto embrionario con genotipo homocigoto para la delección de las 14 pb. Se muestra un solo pico que representa un fragmento de 211 pb.

El segundo electrograma corresponde a la decidua de la misma paciente donde se muestran 2 picos que representan un fragmento de 211 pb y otro de 227 pb correspondientes a la presencia del polimorfismo de 14 pb en heterocigosis.

Paciente 2: Muestra de trofoblasto embrionario con genotipo homocigoto para la delección de las 14 pb.

En el caso de un único pico de 227 pb se trataría de un genotipo homocigoto para la inserción de 14 pb.

5.3.1.6. Determinación de haplotipos.

Tras la determinación de algunos de los polimorfismos presentes en la molécula del HLA-G en cada paciente de nuestra población de estudio elaboramos una serie de haplotipos posibles, la mayoría de ellos ya descritos por otros autores, los cuales son detallados a continuación (Tabla 19).

Mediante el test estadístico Chi-cuadrado se observaron algunas diferencias significativas en cuanto a la distribución de algunos de los haplotipos encontrados en toda nuestra población de estudio, de manera que el haplotipo número 1, correspondiente a muestras sin ningún polimorfismo de entre los analizados, estaba significativamente en mayor proporción (12/54) que los haplotipos 4 ($p=0,0003$), 5 ($p=0,0003$), 7 ($p=0,024$), 8 ($p=0,024$), 10 ($p=0,0003$), 11 ($p=0,0003$), 12 ($p=0,0003$), 13

($p=0,0003$), 14 ($p=0,0003$), 15 ($p=0,0009$), 16 ($p=0,0003$), 17 ($p=0,0082$) y 19 ($p=0,0002$).

También se observaron algunas diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de aparición del haplotipo 2, correspondiente a la INDEL de 14 pb, de manera que este polimorfismo, que genera dicho haplotipo, está significativamente en mayor proporción (13/54) que los haplotipos 4 ($p=0,0003$), 5 ($p=0,0003$), 6 ($p=0,033$), 7 ($p=0,013$), 8 ($p=0,013$), 9 ($p=0,033$), 10 ($p=0,0003$), 11 ($p=0,0003$), 12 ($p=0,0003$), 13 ($p=0,0003$), 14 ($p=0,0003$), 15 ($p=0,0009$), 16 ($p=0,0003$), 17 ($p=0,0042$) y 19 ($p=0,0009$).

No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de aparición en la población de estudio del resto de haplotipos.

Por otro lado, mediante el test estadístico Chi-cuadrado, no se observaron diferencias significativas, en cuanto a la frecuencia de un haplotipo concreto del HLA-G, en muestras trofoblásticas procedentes de abortos espontáneos, entre las muestras usadas como referencia (trofoblasto de cariotipo anormal donde suponemos que la causa de la detención de la gestación era cromosómica) y las que no tenían dicha condición (*ver valores en Tabla 17*).

5. RESULTADOS

Nº	Haplotipos	Cariotipo Normal	Cariotipo Anormal	p
1	Wt, Wt, Wt, Wt, Wt	6/25 (24%)	6/29 (20,6%)	1,0
2	Wt, Wt, Wt, Wt, INDEL 14pb	7/25 (28%)	6/29 (20,6%)	0,75
3	-725C>G, Wt, Wt, Wt, Wt	3/25 (12%)	3/29 (10,3%)	1,0
4	Wt, Wt, Wt, del1597C, Wt	0	0	
5	Wt, codón 93, Wt, Wt, Wt	0	0	
6	Wt, Wt, codón 110, Wt, Wt	1/25 (4%)	3/29 (10,3%)	0,61
7	-725C>G, Wt, Wt, Wt, INDEL 14pb	1/25 (4%)	2/29 (6,8%)	1,0
8	Wt, Wt, Wt, del1597C, INDEL 14pb	2/25 (8%)	1/29 (3,4%)	0,59
9	Wt, codón 93, Wt, Wt, INDEL 14pb	0	4/29 (13,7%)	0,11
10	Wt, Wt, codón 110, Wt, INDEL 14pb	0	0	
11	Wt, Wt, codón 110, del1597C, Wt	0	0	
12	Wt, codón 93, Wt, del1597C, Wt	0	0	
13	-725G>C, Wt, Wt, del1597C, Wt	0	0	
14	-725G>C, codón 93, Wt, Wt, Wt	0	0	
15	-725G>C, Wt, codón 110, Wt, Wt	1/25 (4%)	0	0,46
16	Wt, Codón 93, codón 110, Wt, Wt	0	0	
	Triple combinación			
17	Wt, codón 93, Wt, del1597C, INDEL 14pb	2/25 (8%)	0	0,21
18	Wt, codón 93, codón 110, Wt, INDEL 14pb	2/25 (8%)	3/29 (10,3%)	1,0
19	-725G>C, codón 93, Wt, Wt, INDEL 14pb	0	1/29 (3,4%)	1,0

(Chi-cuadrado)

Tabla 17: Haplotipos posibles del HLA-G.

*A pesar de haber analizado genéticamente el exón 2 para la detección de polimorfismos no llegamos a ningún resultado concluyente sobre el tipo de polimorfismo detectado y el genotipo concreto de las muestras, por lo que no fue incluido en la generación de haplotipos.

5. RESULTADOS

Tras la determinación de los distintos haplotipos presentes en nuestra población de estudio, agrupamos dichos haplotipos en función de la secreción de HLA-G *in vitro* que supuestamente estos producen, según lo publicado en la literatura.

Haplotipos	
Bajos secretores de HLA-G	2_Wt, Wt, Wt, Wt, INDEL 14pb 4_Wt, Wt, Wt, del1597C, Wt 8_Wt, Wt, Wt, del1597C, INDEL 14pb 9_Wt, codón 93, Wt, Wt, INDEL 14pb 12_Wt, codón 93, Wt, del1597C, Wt 17_Wt, codón 93, Wt, del1597C, INDEL 14pb 18_Wt, codón 93, codón 110, Wt, INDEL 14pb
Altos secretores de HLA-G	3_-725C>G, Wt, Wt, Wt, Wt 6_Wt, Wt, codón 110, Wt, Wt 14_725G>C, codón 93, Wt, Wt, Wt 16_Wt, Codón 93, codón 110, Wt, Wt
No afectan a la expresión	1_Wt, Wt, Wt, Wt, Wt 7_-725C>G, Wt, Wt, Wt, INDEL 14pb 10_Wt, Wt, codón 110, Wt, INDEL 14pb 11_Wt, Wt, codón 110, del1597C, Wt 13_-725G>C, Wt, Wt, del1597C, Wt

Tabla 18: Agrupación de los haplotipos del HLA-G en función de la secreción de HLA-G.

A continuación, mostramos la distribución de haplotipos secretores entre las muestras de cariotipo embrionario normal y anormal para conocer la frecuencia con la que dichos haplotipos secretores aparecen en nuestra población de estudio.

Haplotipos	Cariotipo Normal	Cariotipo Anormal	P
Bajos secretores de HLA-G	13/25 (52%)	15/29 (51,7%)	0,99
Altos secretores de HLA-G	5/25 (20%)	6/29 (20,7%)	
No afectan a la expresión	7/25 (28%)	8/29 (27,6%)	

(Chi-cuadrado)

Tabla 19: Distribución de muestras en función de los haplotipos secretores del HLA-G.

Mediante el test estadístico Chi-cuadrado no se observaron diferencias significativas ($p=0,99$) en cuanto a la distribución de los haplotipos secretores del HLA-G, agrupados por niveles de secreción, entre muestras trofoblásticas de cariotipos normales y anormales.

5.3.2. Resultados de la detección de HLA-G soluble en cultivos trofoblásticos y líquidos amnióticos. Enzimoimmunoanálisis (ELISA).

La técnica ELISA para detectar HLA-G soluble fue realizada en sobrenadantes de 24 medios de cultivo de trofoblasto de 72 horas elegidos aleatoriamente; de las cuales 9 muestras procedían de embriones con cariotipo normal y 15 de embriones con cariotipo anormal. A pesar de concentrar hasta 3 veces el volumen de sobrenadante inicial no conseguimos detectar la presencia de HLA-G soluble en los medios de cultivo de trofoblasto.

Además, el ELISA fue realizado en 13 muestras de líquido amniótico, procedentes de los 13 únicos casos donde pudo tomarse dicha muestra. Las muestras de líquido amniótico fueron diluidas a un 1/3 de su volumen inicial. De los 13 casos conseguidos, 4 muestras procedían de embriones con cariotipo normal y 9 de embriones con cariotipo anormal. Los datos obtenidos fueron multiplicados por el factor de dilución. Mediante el test estadístico no paramétrico de U-de Mann Withney observamos que no se encontraron diferencias significativas ($p=0,75$) en la expresión de HLA-G soluble en los líquidos amnióticos entre abortos con cariotipo normal y cariotipo anormal (25,67 IU/ml vs. 22,54 IU/ml).

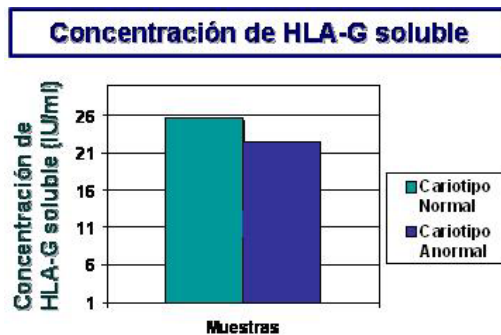


Figura 36: Expresión de HLA-G soluble en líquidos amnióticos.

Además, quisimos ver la asociación entre la cantidad de HLA-G soluble encontrada en las muestras de líquido amniótico y el haplotipo secretor de HLA-G que mostraban las muestras utilizadas. Al igual que no se encontraron diferencias significativas en la expresión de HLA-G soluble, tras el ELISA, en el líquido amniótico, entre muestras de cariotipo normal y anormal, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tipos de haplotipos secretores encontrados, entre muestras de cariotipo normal y anormal. Todas las muestras de líquido amniótico resultaron tener haplotipos bajos secretores de HLA-G, excepto dos muestras donde no se veía afectada la secreción de HLA-G.

5.3.3. Resultados de la detección de HLA-G en secciones de trofoblasto. Inmunohistoquímica.

La inmunohistoquímica fue realizada en 13 muestras de trofoblasto de cariotipo anormal y 14 muestras de trofoblasto de cariotipo normal, seleccionadas ambas aleatoriamente del total poblacional.

Como recordatorio hemos de mencionar que la intensidad de expresión, tanto de HLA-G como de HLA-E, fue valorada por cinco investigadores independientes que desconocían el cariotipo de las muestras. Cada muestra fue evaluada de la siguiente manera:

1. Ausencia de expresión.
2. Expresión débil.
3. Expresión moderada.
4. Expresión intensa.

Al encontrarse algunas discrepancias entre los 5 investigadores, se consideró el resultado final como la media de las 5 lecturas realizadas por cada uno de ellos.

Para evaluar las posibles diferencias entre los diferentes observadores y ver cómo de fiables son los resultados obtenidos, realizamos el índice Kappa ponderado cuadrático. No se observaron diferencias significativas entre los observadores (tabla 20).

Observadores	Indice Kappa	Intervalo de confianza 95%
1 vs. 2	0,76	0,63-0,89
1vs. 3	0,70	0,54-0,85
1 vs. 4	0,62	0,42-0,80
1 vs. 5	0,69	0,54-0,84
2 vs. 3	0,82	0,72-0,93
2 vs. 4	0,60	0,52-0,82
2 vs.5	0,83	0,73-0,93
3 vs. 4	0,68	0,71-0,86
3 vs.5	0,92	0,84-0,99
4 vs. 5	0,51	0,34-0,69

Tabla 20: Índice de Kappa ponderado cuadrático.

Nota: Valores por encima del 70% se consideran adecuados.

Mediante el test estadístico no paramétrico de U-de Mann Withney observamos que no se encontraron diferencias significativas ($p=0,75$) en la expresión de HLA-G en las muestras de trofoblasto embrionario, entre abortos con cariotipo normal y cariotipo anormal (2,92 vs. 2,65). De la misma manera, no se encontraron diferencias significativas ($p=0,76$) en la expresión de HLA-E en las muestras de trofoblasto embrionario, entre abortos con cariotipo normal y cariotipo anormal (1,175 vs. 1,44).

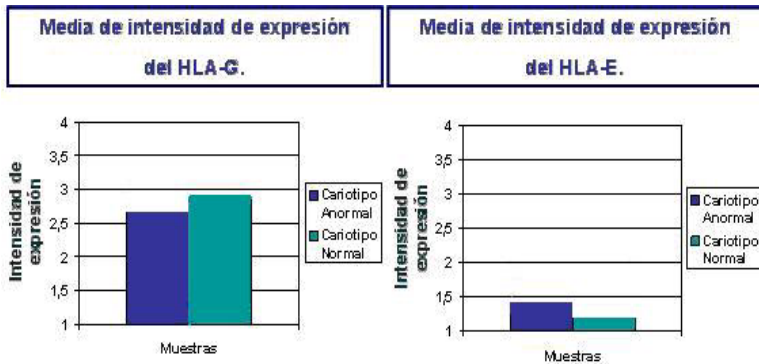


Figura 37: Media de intensidad de expresión del HLA-G y HLA-E en muestras de trofoblasto extraveloso de cariotipo normal y anormal.

A continuación presentamos algunas fotos con la expresión de ambos antígenos (HLA-G y HLA-E) en las muestras de vellosidades coriónicas. Cada observador evaluó la expresión de dichos antígenos del 1 al 4 a nivel del citotrofoblasto extraveloso.

Paciente 1

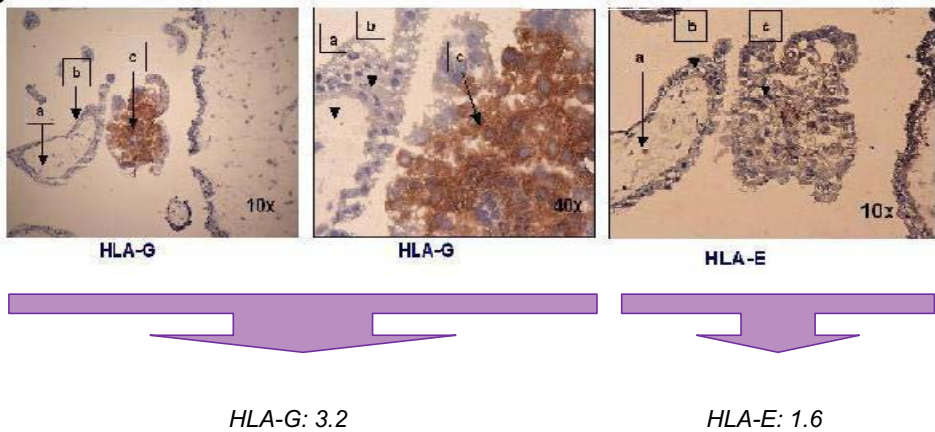
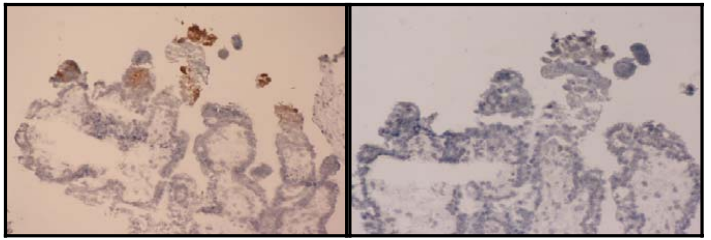


Figura 38: Media de intensidad de expresión proteica del HLA-G y HLA-E.

- a) mesénquima.
- b) sincitiotrofoblasto.
- c) citotrofoblasto extraveloso.

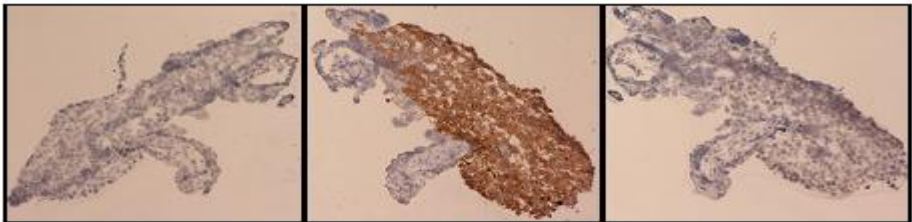
Paciente 2



HLA-G: 2.6

HLA-E: 1

Paciente 3



Control negativo

HLA-G: 4

HLA-E: 1.6

Por último, en nuestra población de estudio, podemos decir que la expresión de HLA-E no se vio afectada por la expresión de HLA-G, ya que no todas las muestras de trofoblasto que expresaron HLA-G, expresaron a su vez HLA-E, y que una disminución de la expresión de HLA-G no se reflejó en una disminución de la expresión de HLA-E. De la misma manera, no todas las muestras de trofoblasto que expresaban HLA-E se correspondían con mayores niveles de expresión de HLA-G.

5.3.4. Asociación entre los polimorfismos analizados y la expresión proteica del HLA-G.

5.3.4.1. Relación proteica del HLA-G con el polimorfismo -725C>G en el promotor.

Mediante el test estadístico no paramétrico de U-de Mann Withney observamos que no se encontraron diferencias significativas ($p=0,55$) en la media de intensidad de expresión proteica del HLA-G de las muestras abortivas de trofoblasto embrionario, entre las muestras con presencia del polimorfismo y las que no lo contenían, incluyendo tanto las muestras cuya causa de la detención de la gestación era cromosómica como las que no tenían dicha condición.

Expresión HLA-G	No mutación -725C>G	Mutación en -725C>G	P
Cariotipo Anormal	2,8	2,98	0,55
Cariotipo Normal	2,74	No Dato	

(U-de Mann Withney)

Tabla 21: Expresión HLA-G en presencia o no del polimorfismo en la posición -725C>G.

*Las cifras expresadas en la tabla son los valores semicuantitativos obtenidos en la inmunohistoquímica con escala del 1 al 4.

5.3.4.2. Relación proteica del HLA-G con los polimorfismos del exón 2.

Mediante el test estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis para n muestras independientes observamos que no se encontraron diferencias significativas ($p=0,14$) en la media de intensidad de expresión de HLA-G en muestras abortivas de trofoblasto embrionario, entre los distintos tipos de curvas, incluyendo tanto las muestras cuya causa de la detención de la gestación era cromosómica como las que no tenían dicha condición.

Expresión HLA-G	Curva tipo A	Curva tipo B	Curva tipo C	p
Cariotipo normal	2	3,5	2,16	0,14
Cariotipo anormal	2,9	3,1	2,5	

(Kruskal-Wallis)

Tabla 22: Expresión HLA-G en cada tipo de curva.

*Las cifras expresadas en la tabla son los valores semicuantitativos obtenidos en la inmunohistoquímica con escala del 1 al 4.

Además, mediante el test estadístico no paramétrico de U-de Mann Withney observamos que no se encontraron diferencias significativas ($p=0,25$ para el grupo A, $p=0,25$ para el grupo B y $p=0,65$ para el grupo C), en la media de intensidad de expresión del HLA-G en muestras abortivas de trofoblasto embrionario, dentro de un tipo de polimorfismo o curva de melting concreta, entre las muestras cuya causa de la detención de la gestación era cromosómica como las que no tenían dicha condición.

5.3.4.3. Relación proteica del HLA-G con los polimorfismos en el exón 3.

A) Codón 93.

Nuestra hipótesis inicial consistía en que este polimorfismo por sí mismo no produciría ninguna repercusión sobre la expresión proteica y sobre la funcionalidad del HLA-G, ya que representa una sustitución sinónima del mismo aminoácido. De hecho, mediante el test estadístico no paramétrico de U-de Mann Withney no se observan diferencias significativas ($p=0,66$) en la media de intensidad de expresión proteica del HLA-G en muestras abortivas de trofoblasto embrionario, entre muestras con la presencia del polimorfismo y las que no lo contenían, incluyendo tanto las muestras cuya causa de la detención de la gestación era supuestamente cromosómica como las que no tenían dicha condición.

Expresión HLA-G	No mutación Codón 93	Mutación Codón 93	p
Cariotipo normal	2,98	2,2	0,66
Cariotipo anormal *	2,72 *	4 *	

(U-de Mann Withney)

Tabla 23: Expresión del HLA-G en presencia o no del polimorfismo del codón 93.

*Las cifras expresadas en la tabla son los valores semicuantitativos obtenidos en la inmunohistoquímica con escala del 1 al 4.

* Sin embargo, categorizando la población en función del cariotipo embrionario, sí encontramos una diferencia significativa ($p=0,047$), en la media de intensidad de expresión de HLA-G, entre la presencia o no del polimorfismo en los casos cuya causa de la pérdida gestacional fue supuestamente el cariotipo anormal embrionario. De manera que, en las muestras de trofoblasto embrionario anormal, resultó haber una mayor expresión de HLA-G (valor de 4) en presencia del polimorfismo CAT del codón 93.

B) Codón 110.

Mediante el test estadístico no paramétrico de U-de Mann Withney no se observaron diferencias significativas ($p=0,374$) en la media de intensidad de expresión proteica de HLA-G en muestras abortivas de trofoblasto embrionario, entre muestras con la presencia del polimorfismo del codón 110 y las que no contenían dicho polimorfismo, incluyendo tanto los abortos cuya causa de la detención de la gestación era cromosómica como las que no tenían dicha condición.

Expresión HLA-G	No mutación Codón 110	Mutación Codón 110	p
Cariotipo normal	2,82	2,3	0,37
Cariotipo anormal	2,76	3,8	

(U-de Mann Withney)

Tabla 24: Expresión HLA-G en presencia o no del polimorfismo del codón 110.

*Las cifras expresadas en la tabla son los valores semicuantitativos obtenidos en la inmunohistoquímica con escala del 1 al 4.

C) Codón 130 (del1597C).

Dado que, en los casos donde se produce el polimorfismo del codón 130, las sustituciones se presentaron siempre en heterocigosis, pensamos que no tendría ninguna repercusión en el fenotipo de expresión del HLA-G y consecuentemente en la función esperada de dicha molécula, debido a los mecanismos de compensación génica, tal como se demostró en los resultados de expresión proteica del HLA-G obtenidos mediante los ensayos de inmunohistoquímica.

Mediante el test estadístico no paramétrico de U-de Mann Withney no se observaron diferencias significativas ($p=0,88$) en la media de intensidad de expresión proteica del HLA-G en muestras abortivas de trofoblasto embrionario, entre muestras con la presencia del polimorfismo del codón 130 y las que no contenían dicho polimorfismo, incluyendo tanto los abortos cuya causa de la detención de la gestación era cromosómica como las que no tenían dicha condición.

Expresión HLA-G	No mutación Del1597C	Mutación Del1597C	p
Cariotipo normal	2,8	2,5	0,88
Cariotipo anormal	2,8	3,6	

(U-de Mann Withney)

Tabla 25: Expresión del HLA-G en presencia o no del polimorfismo del codón 130.

*Las cifras expresadas en la tabla son los valores semicuantitativos obtenidos en la inmunohistoquímica con escala del 1 al 4.

5.3.4.4. Relación proteica del HLA-G con el polimorfismo INDEL 14pb.

Mediante el test estadístico no paramétrico de U-de Mann Withney no se observaron diferencias significativas ($p=0,25$) en la media de intensidad de expresión proteica del HLA-G en muestras abortivas de trofoblasto embrionario, entre muestras con la presencia del polimorfismo 14pb INDEL y las que no contenían dicho polimorfismo, incluyendo tanto los abortos cuya causa de la detención de la gestación era cromosómica como las que no tenían dicha condición.

Expresión HLA-G	Delección 14pb Homocigota	Inserción 14 pb Heterocigota	Inserción 14pb Homocigota	p
Cariotipo normal	3,35	2,47	No Dato	0,25
Cariotipo anormal	3,08	2,56	3,6	

(U-de Mann Withney)

Tabla 26: Expresión de HLA-G en presencia o no del polimorfismo 14 pb INDEL.

*Las cifras expresadas en la tabla son los valores semicuantitativos obtenidos en la inmunohistoquímica con escala del 1 al 4.

A modo resumen, mostramos una tabla donde comprobamos que no existen diferencias significativas ($p=0,79$) en la expresión de HLA-G entre muestras trofoblásticas que no contienen ningún polimorfismo y las que sí lo contienen.

Expresión HLA-G	Cariotipo Normal	Cariotipo Anormal	Media	p
Ningún polimorfismo	3,35	2,86	3,1	0,79
Promotor (-725C>G)	2,74	2,9	2,82	
Codón 93	2,6	3,3	2,95	
Codón 110	2,56	3,3	2,93	
Codón 130 (del1597C)	2,65	3,2	2,92	
INDEL 14pb	2,9	3,1	3,0	

(Chi-cuadrado)

Tabla 27: Comparación de la expresión de HLA-G entre las muestras que no contienen ningún polimorfismo y las que sí.

5.3.4.5. Relación proteica de la expresión de HLA-G con los haplotipos genéticos encontrados en el HLA-G.

Como en los anteriores apartados, donde buscamos una relación entre cada uno de los polimorfismos por separado y la expresión proteica del HLA-G, quisimos buscar la misma asociación entre los posibles haplotipos que se pueden generar en el HLA-G en nuestra población de estudio y la secreción proteica de la molécula del HLA-G.

Por un lado, mediante el test estadístico H de Kruskal Wallis, quisimos ver si algún haplotipo tenía una mayor expresión de HLA-G con respecto al resto, pero no se encontraron diferencias significativas ($p=0,53$) en la expresión de HLA-G entre los diferentes haplotipos creados.

Por otro lado, mediante el test estadístico U-de Mann Withney, quisimos evaluar, dentro de un haplotipo concreto, posibles diferencias de expresión de HLA-G entre muestras usadas como control (trofoblasto con cariotipo anormal donde suponemos que la causa de la detención de la gestación era cromosómica) y las que

5. RESULTADOS

no tenían dicha condición (trofoblasto con cariotipo normal). En ningún haplotipo se observaron diferencias significativas (haplotipo 1 $p=0,58$; haplotipo 2 $p=0,35$; haplotipo 8 $p=0,32$; haplotipo 18 $p=0,22$) en cuanto a la expresión de HLA-G entre muestras con cariotipo normal y anormal (ver Tabla 28).

Nº	Haplotipos	Cariotipo Normal Expresión HLA-G	Cariotipo Anormal Expresión HLA-G	p
1	Wt, Wt, Wt, Wt, Wt	3,35	2,86	0,58
2	Wt, Wt, Wt, Wt, INDEL 14pb	2,5	1,65	0,35
3	-725C>G, Wt, Wt, Wt, Wt	No Dato	3.13	---
6	Wt, Wt, codón 110, Wt, Wt	No Dato	3.6	---
7	-725C>G Wt, Wt, Wt, INDEL 14pb	No Dato	1,5	---
8	Wt, Wt, Wt, del1597C, INDEL 14pb	3,5	3,6	0,32
9	Wt, codón 93, Wt, Wt, INDEL 14pb	No dato	No dato	---
15	-725C>G, Wt, codón 110, Wt, Wt	No Dato	No dato	---
	Triple combinación			
17	Wt, codón 93, Wt, del1597C, INDEL 14pb	2,1	No dato	---
18	Wt, codón 93, codón 110, Wt, INDEL 14pb	2,3	4	0,22
19	-725C>G, codón 93, Wt, Wt, INDEL 14pb	No dato	2,75	---

(U-de Mann Withney)

Tabla 28: Expresión de HLA-G en presencia de cada haplotipo.

*Solo se muestran los datos de expresión de HLA-G de los haplotipos en los que se encontró alguna muestra con dicho haplotipo.

*Las cifras expresadas en la tabla son la media de los valores semicuantitativos obtenidos en la inmunohistoquímica con escala del 1 al 4.

** No Dato: No existen valores de expresión de HLA-G para ese haplotipo.

5. RESULTADOS

Por último, quisimos evaluar si la expresión proteica de HLA-G obtenida en nuestro estudio mediante inmunohistoquímica se correspondía con la clasificación teórica del tipo de haplotipo secretor.

Expresión HLA-G	Cariotipo Normal	Cariotipo Anormal	Media	p
Bajos secretores de HLA-G	2,47	2,98	2,75	0,59
Altos secretores de HLA-G	ND	3,25	3,25	
No afectan a la expresión	3,35	2,5	2,92	

(H de Kruskal Wallis)

Tabla 29: Media de expresión proteica del HLA-G en función de los distintos haplotipos secretores agrupados.

**Las cifras expresadas en la tabla son la media de los valores semicuantitativos obtenidos en la inmunohistoquímica con escala del 1 al 4.*

Obtuvimos una correspondencia entre la media de los valores obtenidos de expresión proteica de HLA-G y la clasificación de haplotipo secretor. Es decir, nuestros datos se corresponden con lo publicado en la literatura sobre la cantidad de expresión de HLA-G de cada haplotipo. Sin embargo, tras la realización del test estadístico no paramétrico para n muestras independientes Kruskal-Wallis, no se observaron diferencias significativas ($p=0,59$) en cuanto a las diferencias de expresión de HLA-G entre los tres tipos de haplotipos secretores de HLA-G. Además, de la misma manera, no se observaron diferencias significativas ($p=0,59$) en la expresión de HLA-G, dentro de un tipo de haplotipo secretor, entre muestras de trofoblasto con cariotipo normal y anormal.

6. DISCUSIÓN

Son muchas las causas propuestas como origen de los abortos espontáneos de primer trimestre. Es cierto que la mayoría de los abortos espontáneos tienen su etiología en las anomalías cromosómicas, ahora bien, la patogenia de todos ellos, está asociada a respuestas del sistema inmune (Olivares et al., 2002; Vassiliadou et al., 1999). El sistema inmune de la decidua no solo actúa para defender frente a posibles infecciones o secretar factores favorecedores del embarazo, sino que también actúa para finalizar los embarazos en los que se ha producido alguna anomalía. Tanto las DC como los linfocitos deciduales son importantes en el control de la respuesta inmune contra la detención del embarazo ya que son los encargados del ataque del trofoblasto fetal e inducir el aborto en estos casos (Tirado-Gonzalez et al., 2010). La clave está en detectar la conexión entre la etiología (por ejemplo, anomalía cromosómica) y la patogenia (respuesta inmune).

La generación de una nueva vida nos proporciona un modelo natural excelente para estudiar los mecanismos de la tolerancia inmune y las características que determinados lugares privilegiados inmunológicamente presentan. El embarazo ha sido catalogado como la prueba definitiva de un trasplante satisfactorio, el cual incluye al feto como un tejido extraño que efectúa una serie de complejos mecanismos para evitar el rechazo por parte de la madre. Existen muchos mecanismos inmunológicos maternos implicados en el mantenimiento o pérdida del embarazo, pero pensamos que es más importante analizar qué propiedades inmunológicas tiene el embrión para su propia supervivencia, como es la selección de la expresión del MHC tipo Ib en el citotrofoblasto fetal. Y concretamente, analizar una de las moléculas inmunes más importantes para la obtención del embarazo, el **HLA-G**.

Algo muy similar ocurre fuera del contexto del embarazo. En los procesos tumorales, la expresión de HLA-G, y en menor medida de HLA-E y HLA-F, parece tener un papel fundamental en el mecanismo por el cual las células tumorales escapan de la vigilancia inmunológica, a pesar de la gran concentración local de células inmunes competentes en la región tumoral. Además, existe una correlación positiva significativa entre el estado avanzado del cáncer y su malignidad con la expresión de HLA-G (Rouas-Freiss et al., 2005). Una hipótesis sobre esta expresión anómala de HLA-G es que las células tumorales, durante el proceso de transformación maligna, alteran sus controles genómicos desencadenando una inapropiada expresión de HLA-G. De hecho, nunca ha sido detectada la expresión de HLA-G en tejidos normales adyacentes a las lesiones tumores (Rouas-Freiss et al., 2005). La expresión de HLA-G

es tan importante hasta el punto de que su expresión un marcador de malignidad e invasividad del tumor, de la posibilidad de metástasis, así como de la posibilidad de supervivencia. También se ha visto un aumento de HLA-G soluble en suero en pacientes con determinados tipos de tumores, lo cual podría ser también un potente marcador tumoral (Nuckel et al., 2005; Singer et al., 2003). De hecho, el bloqueo de la expresión, y por lo tanto de las funciones, del HLA-G, mediante el uso de anticuerpos específicos, aparece entre el abanico de posibles estrategias para el tratamiento curativo del cáncer. El mecanismo de escape inmunológico consiste en que la expresión de HLA-G en las células tumorales protege del ataque de las células NK, CTL y APC mediante la interacción con los receptores inhibidores presentes en ellas, favorece el balance de citoquinas hacia Th2 versus Th1, y aumenta la expresión de células T reguladoras (Du et al., 2011; Wiendl et al., 2002).

Centrándonos en la situación inmunológica gestacional, como es el objetivo de este proyecto de tesis doctoral, observamos que la mayoría de los estudios que se han realizado hasta la fecha, indican que tanto el HLA-G como el HLA-E, expresados durante el embarazo en el citotrofoblasto fetal, podrían ser fuertes candidatos a proteger al feto del sistema inmune materno mediante diferentes funciones. Dichas funciones podrían ser la inhibición de la actividad citotóxica de las células NK deciduales, inhibición de la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ y generación de linfocitos T reguladores o favorecimiento de la remodelación de las arterias espirales uterinas para permitir la implantación (Carosella et al., 1999; King et al., 2000a; Ober et al., 1998). Incluso hoy día, estudios recientes siguen intentando esclarecer el mecanismo por el cual se llevan a cabo dichas funciones. La presencia de estas moléculas es muy importante ya que una expresión del HLA-G disminuida o deficitaria parece estar asociada con ciertas complicaciones del embarazo como fallo de implantación, pre-eclampsia, aborto, y esto puede además estar relacionado con los polimorfismos que ocurren en el gen del HLA-G. Incluso, el HLA-G codifica el péptido líder que se une a la molécula del HLA-E, proceso que es necesario para su expresión superficial y estabilidad. Tanto el péptido líder como la molécula en sí del HLA-G tienen una gran importancia en la expresión del HLA-E.

Por todo ello, nuestro objetivo fue determinar el papel inmunológico del HLA-G, analizando algunos polimorfismos genéticos que podrían tener relevancia durante la gestación y que habían sido relacionados con alteración de la expresión proteica de HLA-G. Además, decidimos evaluar la presencia y cantidad de expresión de dicha

molécula, así como la expresión del HLA-E, en el citotrofoblasto fetal de muestras procedentes de abortos espontáneos, comparando gestaciones detenidas probablemente por causa cromosómica frente a otras de origen no cromosómico.

Dada la influencia de la presencia del HLA-G en el embarazo pensamos que no tenía mucho sentido evaluar únicamente la presencia de un determinado polimorfismo genético sin evaluar su influencia sobre la expresión proteica. De manera que quisimos analizar si los distintos polimorfismos en el gen del HLA-G afectaban a la expresión superficial en las células del trofoblasto de la interfase feto-materna, a la función de la molécula o al papel que tienen en la interacción materno-fetal, ya que esto sí podría estar relacionado con la detención de la gestación.

Igualmente, debido al fuerte DE en la región genómica del HLA-G, relacionamos la expresión proteica del HLA-G con determinados haplotipos presentes en nuestra población de estudio.

Con respecto a la población de estudio hemos de mencionar que, al menos en nuestro proyecto, no existe una mayor incidencia de anomalías cromosómicas en las gestaciones de pacientes procedentes de TRA, al contrario, la tasa de cariotipos trofoblásticos anormales fue muy parecida entre pacientes procedentes de TRA y gestaciones espontáneas, incluso siendo mayor en éstas últimas (81% espontáneas vs. 72.5% TRA). Incluso el porcentaje de pacientes consideradas abortadoras de repetición antes de ser incluidas en nuestro estudio era menor en las pacientes procedentes de TRA (8.7% TRA vs. 42.8% espontáneas).

Con respecto a nuestro tejido de estudio, el citotrofoblasto, es de origen fetal, es decir, que contiene información genética de la madre y del padre. Los estudios que analizan la sangre periférica de los progenitores en busca de polimorfismos en el gen del HLA-G contienen la mitad de la información genética, en este sentido, nuestro estudio es el primero en analizar la expresión proteica y la presencia de determinados polimorfismos sobre el propio tejido embrionario que no fue capaz de terminar de forma exitosa su implantación. La originalidad de este trabajo está en la utilización de muestras trofoblásticas embrionarias procedentes de abortos tempranos y con una gran certeza de la no contaminación materna así como del cariotipo embrionario diagnosticado debido a la técnica utilizada, denominada histeroembrioscopia.

Además, hemos de mencionar que existieron una serie de casos (7.3%) en los que ocurrieron mosaicismos placentarios, donde el embrión resultó con cariotipo normal y el trofoblasto anormal o mosaico. Esta es otra muestra de la originalidad del estudio donde podemos observar que en determinados casos no existe homogeneidad entre el trofoblasto y el embrión. A pesar de esto las anomalías del trofoblasto desencadenaron en la pérdida de la gestación, por ello estas muestras fueron consideradas con cariotipo anormal.

Otros estudios han analizado también tejido placentario en sus ensayos (Hviid et al., 2004b; O'Brien et al., 2001; Rousseau et al., 2003). Sin embargo, han utilizado placentas obtenidas a término de la gestación, no tras sufrir un aborto. Otros autores utilizan tejido placentario de primer trimestre del embarazo tras la IVE (Hiby et al., 1999; Hviid et al., 2003) o tras el aborto (Moreau et al., 2008), pero en todos ellos no se especifica el método de obtención de la muestra, suponiendo que la determinación cromosómica se hizo a través de un legrado convencional. Además, algunos de los estudios mencionados buscan asociaciones entre determinados genotipos con los niveles de ARNm, pero no analizan la expresión proteica del HLA-G.

Otra de las mayores diferencias con respecto a los grupos que han estudiado la expresión de HLA-G en los abortos espontáneos y recurrentes es el análisis de tejidos o células procedentes de gestaciones detenidas sin distinguir entre fetos con cariotipo normal y anormal. Este análisis conjunto puede confundir o distorsionar los resultados, por lo que resulta imprescindible el análisis del cariotipo de la gestación detenida para eliminar una de las posibles causas del aborto. Tal vez uno de los principales problemas que ralentizan el avance en el estudio del papel del sistema inmunitario en el rechazo de la gestación, es que, aproximadamente el 70% de los abortos son debidos a alteraciones de origen cromosómico del embrión por lo que resulta muy difícil conseguir muestras procedentes de gestaciones con cariotipo normal. De hecho, en nuestro proyecto, tras conseguir 99 muestras de trofoblasto embrionario y poder analizar genéticamente 95 de ellos obtuvimos que un 28,4% de los embriones tenían un trofoblasto con cariotipo normal y un 71,6% con cariotipo anormal. Nosotros también somos los primeros en analizar tejido trofoblástico procedente de fetos cromosómicamente normales y anormales con gran seguridad en la determinación del cariotipo. Como hemos mencionado anteriormente, nuestro grupo ha desarrollado una técnica histeroscópica para la obtención de muestras selectivas en abortos

espontáneos precoces de gran pureza y minimización de contaminación con tejido materno.

La necesidad de la unidad placentaria de inactivar a las células inmunitarias maternas para asegurar su supervivencia, mientras al mismo tiempo mantiene la cantidad suficiente de células inmunitarias competentes en el útero para luchar contra una posible infección debe requerir un fino balance entre haplotipos del HLA-G altamente secretores y losbajos secretores de HLA-G. Los haplotipos altos secretores pueden verse favorecidos en poblaciones con poca frecuencia de infecciones, ya que, supuestamente, producirían una disminución de la respuesta inmune frente a dichas infecciones. De hecho, se ha observado una mayor tasa de implantación en embriones que expresan HLA-G comparados con los que no (Fuzzi et al., 2002) y un incremento de las tasas de aborto en parejas que contenían el alelo nulo para la secreción de HLA-G1 y G5 (Aldrich et al., 2001; Pfeiffer et al., 2001). Sin embargo, un haplotipo bajo secretor puede verse favorecido y seleccionado positivamente en poblaciones con alta carga de patógenos y alta probabilidad de infecciones. Es el caso del alelo nulo HLA-G*0105N, con alta frecuencia en poblaciones africanas, donde los reducidos niveles de HLA-G pueden ser ventajosos para el mantenimiento de la gestación ya que se permite una respuesta inmune materna más fuerte ante patógenos invasores (Aldrich et al., 2001).

6.1. Polimorfismos del gen HLA-G y su distribución entre las gestaciones con cariotipo normal y anormal.

De acuerdo con nuestros resultados, no existen diferencias en la frecuencia de aparición de los diferentes polimorfismos estudiados entre muestras trofoblásticas con cariotipo normal y anormal. Sin embargo, debemos de admitir que la falta de diferencias significativas puede ser, en algunos casos, debida al tamaño muestral, sobre todo en lo referente al polimorfismo del codón 130, que generaría un codón stop y una proteína truncada. Sin embargo, como veremos más adelante, no existen diferencias significativas en la producción de proteína HLA-G entre cariotipos normales y anormales. O en el caso del exón 2 donde a pesar de observarse algunas diferencias en la frecuencia del polimorfismo entre abortos de cariotipo normal y anormal, no son diferencias significativas (X^2 : 5,44; $p=0,065$). Quizás aumentando el número de muestras analizadas en este caso podrían obtenerse resultados significativos pero no mucho más concluyentes, debido a la inexactitud de la técnica.

6. DISCUSIÓN

En la actualidad, existen resultados contradictorios entre los diferentes estudios genéticos del HLA-G, de manera que algunos autores no encuentran asociación entre determinados polimorfismos y el aborto, mientras que otros piensan que una delección o una mutación en el gen del HLA-G puede tener repercusión sobre la generación de la proteína final y llevar incluso a la pérdida del embarazo.

Las variaciones entre estudios pueden ser debidas al diseño del estudio, al pequeño volumen de muestra, a la utilización de una región codificante o no, o incluso al exón analizado, de manera que entre determinadas regiones puede haber un fuerte DE (Hviid et al., 2002). Además, puede haber variaciones en los resultados dependiendo de si los polimorfismos en el gen del HLA-G son analizados en sangre periférica únicamente de la madre o de ambos parentales o analizados en el propio tejido fetal incapaz de terminar de forma exitosa su gestación.

También existe ambigüedad con respecto a si uno o varios alelos del HLA-G podrían estar envueltos en la patogénesis de los abortos de repetición. Por ejemplo, Pfeiffer en 2003 encuentra asociación entre el aborto de repetición y el alelo HLA-G*01013 y, sin embargo, Aldrich en el mismo año, con un estudio similar, no encuentra dicha asociación (Aldrich et al., 2001; Pfeiffer et al., 2001). Esto puede ser probablemente debido al fuerte DE entre regiones genéticas y que la causa responsable del aborto esté muy cercana a esa región. Este hallazgo hace que sea casi imposible la asociación de un SNP con el aborto de repetición. Sin embargo, sí se cree que es posible realizar una asociación entre un determinado haplotipo del HLA-G y los abortos recurrentes espontáneos.

A continuación, mostramos una tabla resumen de cómo los polimorfismos HLA-G, según diferentes autores, pueden afectar sobre el mantenimiento del embarazo y la pérdida gestacional (Tabla 30).

Autor	Polimorfismo	Relación con Aborto	Tejido estudiado	Frecuencia AR vs. RNV
(Sipak-Szmigiel et al., 2008)	-725G	NO	Sangre periférica	20,7 vs. 25,9%
(Sipak-Szmigiel et al., 2007)	-725G	NO	Sangre periférica	CC: 79 vs. 74% CG: 20 vs. 24% GG: 0 vs. 1,7%

6. DISCUSIÓN

(Ober et al., 2003)	-725G (en ambos parentales)	SI	Sangre periférica	28 vs. 17 y 10%
(Pfeiffer et al., 2001)	HLA-G*0105N	SI	Sangre periférica	70 vs. 32%
	HLA-G*01013			
(Aldrich et al., 2001)	HLA-G*0105N	SI	Sangre periférica	80 vs. 20%
	HLA-G*0104			64 vs. 36%
(Yan et al., 2006a)	HLA-G*0105N	NO	Sangre periférica	0,7 vs. 1,4%
(Suryanarayana et al., 2008)	Exón 2	NO	Sangre periférica	-----
	INDEL 14 pb	SI		
(Aruna et al., 2010b; Berger et al., 2010; Hviid et al., 2002)	HLA-G*0106 +/- 14pb Heterocigotos	NO	Sangre periférica	Está con más frecuencia en el grupo de mujeres fértiles
(Moreau et al., 2008)	HLA-G*0106 +/- 14pb Heterocigotos	SI (NS) Pre-eclampsia	Placenta	+/+ : 11,6 vs. 13,3% +/- : 45,3 vs. 43,3% -/- : 40 vs. 43%
(Tripathi et al., 2004)	+/- 14pb Heterocigotos	SI	Sangre periférica	+/+ : 19,1 vs. 26,6% +/- : 58,3 vs. 42,5% -/- : 22,5 vs. 30,8%
(Xue et al., 2007)	+/- 14pb Heterocigotos	SI	Sangre periférica	+/+ : 4 vs 7% +/- : 71 vs.43 % -/- : 25 vs.50 %
(Zhu et al., 2010)	+/+ 14pb Homocigotos	SI	Sangre periférica	+/+ : 27,4 vs. 11,6 % +/- : 49,2 vs. 49,4% -/- : 27,4vs. 39,0%
(Yan et al., 2006b)	+/+ 14pb Homocigotos	SI (NS)	Sangre periférica	+/+ : 43,7 vs. 30,4 % +/- : 46,9 vs. 52,2 % -/- : 9,4 vs. 17,4 %
(Hviid et al., 2004a)	+/+ 14pb Homocigotos	SI	Sangre periférica	+/+ : 24,6 vs. 10,8% +/- : 44,3 vs. 55,9% -/- : 31,1 vs. 33,3%

(Ober et al., 2003)	-/- 14pb Homocigotos (ambos parentales)	SI	Sangre periférica	21 vs. 11 y 16%
(Sipak-Szmigiel et al., 2007)	INDEL 14pb (ningún genotipo)	NO	Sangre periférica	+/+ : 15,5 vs. 17,2% +/- : 37,9 vs. 48,2% -/- : 46,5 vs. 34,5%
(Mendes-Junior et al., 2007)	INDEL 14pb (ningún genotipo)	NO	Sangre periférica	-----
(Berger et al., 2010)				
(Penzes et al., 1999)	Ningún alelo del HLA-G	NO	Sangre periférica	-----
(Karhukorpi et al., 1997)				
(Aruna et al., 2010b)				
(Yamashita et al., 1999)				
(Abbas et al., 2004)	HLA-G*010103	SI	Sangre periférica	9,5 vs. 5%

Tabla 30: Resumen de la influencia de determinados polimorfismos sobre la pérdida gestacional.

Como observamos en la literatura, varios autores encuentran una frecuencia del polimorfismo -725C>G similar a la nuestra (alrededor del 20%) (Ober et al., 2003; Sipak-Szmigiel et al., 2008; Sipak-Szmigiel et al., 2007). Con respecto al polimorfismo del codón 130, alelo HLA-G*0105N, nuestros datos de frecuencia son del 10% en la población de estudio en general, mientras que otros autores encuentran desde un 1% (Yan et al., 2006a) a un 80% de frecuencia de aparición (Aldrich et al., 2001) en los casos de aborto recurrente. Por último, el polimorfismo INDEL 14 pb, en la región 3'URT, se presenta en una frecuencia del 5% en homocigosis (+/+ 14 pb) en nuestra población de estudio, encontrando porcentajes similares (Xue et al., 2007) y mayores (aproximadamente del 38%) (Yan et al., 2006b). El polimorfismo INDEL 14 pb en heterocigosis (+/- 14 pb) se presenta en un 55% en nuestra población de estudio, porcentaje similar al de la mayoría de los autores. Por último, el polimorfismo en homocigosis (-/- 14 pb) está en un 40% en nuestra población de estudio, porcentaje similar al resto de estudios, excepto un 13% de casos encontrados en un estudio (Yan et al., 2006b). Existen datos contradictorios sobre la variante de este polimorfismo

(inserción o delección homocigota y heterocigotos) que está relacionada con los abortos de repetición, incluso llegando a no encontrarse ninguna asociación (Aruna et al., 2010b; Hviid et al., 2002; Sipak-Szmigiel et al., 2007).

6.2. Haplotipos generados.

Según nuestras investigaciones, las muestras trofoblásticas en general, que no contienen ningún polimorfismo (haplotipo 1) en el gen del HLA-G fueron, significativamente ($p < 0.05$), las más frecuentes entre nuestra población de estudio, tanto en muestras cromosómicamente normales como anormales, lo cual corrobora de alguna forma el bajo polimorfismo del gen del HLA-G en comparación con otros HLA clásicos.

A pesar de no ver diferencias en la distribución de un determinado polimorfismo por sí solo entre muestras trofoblásticas de cariotipo normal y anormal, quisimos evaluar si la combinación de varios polimorfismos (denominados haplotipos) podría tener frecuencias diferentes entre nuestras dos poblaciones de estudio. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la distribución de dichos haplotipos generados entre muestras trofoblásticas de cariotipo normal y anormal. Es decir, las muestras con cariotipo normal y anormal mostraron una incidencia muy similar en la frecuencia de aparición de un determinado haplotipo.

Lo mismo ocurrió cuando agrupamos los haplotipos obtenidos en función de su teórica secreción proteica de HLA-G. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de los haplotipos secretores del HLA-G, agrupados por niveles de secreción, entre muestras trofoblásticas de cariotipos normales y anormales.

Muchos estudios analizan la frecuencia de un determinado haplotipo en una población de individuos, pero hasta hoy día, no existe ningún estudio que compare la frecuencia de aparición de un haplotipo en pacientes con abortos espontáneos y menos aún comparando abortos cromosómicamente normales y anormales.

Las asociaciones no aleatorias entre los polimorfismos en locus diferentes o dentro del mismo locus se miden por el grado de desequilibrio de enlace (DE). Es sabido que existe un elevado DE dentro de algunas posiciones de la región del HLA-G, así como, existe un elevado DE del HLA-G con otros locus (Ober et al., 1996) como el HLA-G con el HLA-DR (Hviid and Christiansen, 2005). En general, existe un fuerte DE dentro de toda la región del HLA. Por ejemplo, la región 3' del HLA-E tiene una unión significativa a la región 5' del HLA-G. Esto hace que el genotipo de una región genética no sea independiente de la otra y la combinación de determinados alelos puede ocurrir con mayor o menor frecuencia en una población que la esperada al azar.

De manera que algunos autores piensan que es casi imposible la asociación de un determinado SNP con el aborto de repetición pero, sin embargo, sí creen posible la asociación de un determinado haplotipo del HLA-G (con un conjunto de polimorfismos en una determinada zona) con los abortos espontáneos de repetición (Berger et al., 2010) y por esto, varios investigadores (Ober et al., 2003; Sipak-Szmigiel et al., 2007) estudian algunos polimorfismos en conjunto, como es el caso de la región 5' con el polimorfismo INDEL 14 pb en la región 3'.

También es sabido que existe un fuerte DE entre los genes del HLA y otros genes que no pertenecen al MHC pero que se encuentran en el mismo cromosoma y en la misma región genética. Nos referimos a genes del sistema del complemento que codifican para moléculas como C2, C4, TNF- α y TNF- β , Factor β y HSP-70. Concretamente, TNF- β es una molécula que induce la expresión de MHC tipo II en algunos tipos celulares. Si ocurre un polimorfismo en el gen TNF- β y se afecta su funcionalidad, se afecta también la eficiencia de inducción de expresión celular de MCH tipo II. Debido a que estas moléculas tienen una importante función en el sistema inmune se pueden llegar a producir determinadas enfermedades autoinmunes. Algo parecido ocurre para la proteína HSP-70. Por lo tanto, debido al fuerte DE en la región del HLA hay que tener precaución al asociar a las moléculas o a los haplotipos del HLA con determinadas enfermedades. Existe la posibilidad de que la verdadera susceptibilidad génica de algunas enfermedades asociadas al HLA resida en genes no HLA.

6.3. Expresión de HLA-G y HLA-E.

La presencia de variaciones puntuales en el gen HLA-G puede implicar alteraciones en la respuesta inmune en dos aspectos importantes:

a) Afectando a la funcionalidad y expresión superficial de la molécula del HLA-G; incidiendo sobre la estructura terciaria, conformación de la proteína y su polimerización (formación de dímeros). Estos cambios podrían afectar su afinidad por los receptores inhibidores de las células NK deciduales, no pudiendo evitar el ataque a las células del trofoblasto. Incluso se podrían generar proteínas no funcionales.

b) Afectando a la secuencia de su péptido líder, la cual es imprescindible para la expresión superficial del HLA-E y que redundaría en la falta de protección del embrión frente a la madre.

Según lo descrito en la literatura, los polimorfismos estudiados en este proyecto (-725C>G, final del exón 2, codón 93, codón 110, codón 130 e INDEL 14pb) no están relacionados con cambios en la estructura terciaria del HLA-G, por lo que, en principio,

no deberían verse afectadas funciones de interacción de esta molécula con otras, por ejemplo, la inhibición de las células NK a través de la interacción de sus receptores. Sin embargo, todos estos polimorfismos han sido relacionados con cambios en los niveles de expresión superficial de HLA-G por lo que al aumentar excesivamente la cantidad de HLA-G, así como al disminuirla, podrían verse afectadas alguna de sus funciones.

Tras detectar la presencia de determinados polimorfismos del HLA-G en nuestras muestras de estudio quisimos evaluar el impacto que éstos producían sobre la secreción proteica de la molécula del HLA-G en el trofoblasto embrionario, así como su efecto en la expresión del HLA-E.

La expresión de HLA-G ocurre principalmente en el TEV, pero incluso se ha detectado en estadios mucho más precoces durante el desarrollo embrionario y dicha expresión se relaciona, según determinados autores, con la capacidad de implantación (Fuzzi et al., 2002; Jurisicova et al., 1996; Noci et al., 2005; Yie et al., 2005a).

Según nuestros datos, mediante la técnica de inmunohistoquímica, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de HLA-G entre las muestras de trofoblasto procedentes de aborto de cariotipo normal y las de cariotipo anormal, utilizadas éstas últimas como muestras de referencia donde la causa del aborto fue debida, casi con seguridad, a la anomalía cromosómica. Por lo tanto, no podemos afirmar que, en los casos donde no existe una causa conocida de aborto o abortos cromosómicamente normales, el causante de la detención de la gestación sea la ausencia o la disminución de la expresión del HLA-G en el citotrofoblasto fetal. Además, nuestros datos coinciden con los de otros autores (Bhalla et al., 2006; Patel et al., 2003) donde el HLA-G no parece ser una molécula determinante en el mantenimiento del embarazo.

El anticuerpo utilizado en la técnica inmunohistoquímica reconoce las isoformas HLA-G1 y la HLA-G5 soluble, ambas las más abundantes en la interfase feto-materna. La isoforma HLA-G1, correspondiente a la molécula al completo y unida a membrana, es la isoforma con más relevancia en el mantenimiento del embarazo ya que, al tener todos los dominios estipulados, es capaz de realizar todas las funciones inmunoregulatoras asignadas al HLA-G. Por otro lado, la isoforma soluble HLA-G5 es la segunda isoforma más importante en el mantenimiento del embarazo, ya que se trata que la forma escindida o extracelular de la HLA-G1. Se expresa en los mismos tejidos que el HLA-G completo y realiza las mismas funciones. Dicho anticuerpo fue empleado a una dilución 1/500, considerada suficiente, según otras publicaciones

(Bhalla et al., 2006; Menier et al., 2003), para la detección del HLA-G en las muestras de trofoblasto embrionario. De hecho, pudimos encontrar expresión de HLA-G en la gran mayoría de las muestras de trofoblasto embrionario (26/27) aunque con diferentes intensidades.

Por otro lado, quisimos ver la distribución e intensidad de la expresión proteica del HLA-E en las muestras trofoblásticas y si su expresión estaba condicionada de alguna manera por el HLA-G. Es bien sabido que para que se produzca la expresión del HLA-E en la superficie celular es necesaria la presencia de un péptido líder procedente de otras moléculas de HLA de clase I. Como hemos mencionado anteriormente, en el citotrofoblasto solo hay expresión de HLA-G, por lo que la expresión de HLA-E quedaría supeditada al péptido líder del HLA-G y por lo tanto, de forma indirecta, a la expresión de HLA-G. Tras observar que existen muestras que expresan HLA-G en el citotrofoblasto fetal pero que a su vez no expresan HLA-E, podemos evidenciar que la expresión del HLA-G no es determinante para que se produzca la expresión de HLA-E. Estos datos son contradictorios a los hallazgos de otros autores (Ishitani et al., 2003; Llano et al., 1998) que piensan que donde encuentran expresión de HLA-G soluble o unido a membrana debe haber expresión de HLA-E. Por ello, pensamos que otros muchos factores podrían estar influyendo en este mecanismo de expresión superficial.

En este proyecto encontramos una importante reducción general de la expresión de HLA-E en nuestras muestras de estudio, con respecto a la expresión de HLA-G. Además, y coincidiendo con la falta de correlación encontrada con el HLA-G, tampoco encontramos diferencias significativas en la expresión de HLA-E entre las muestras de trofoblasto procedentes de aborto de cariotipo normal y las de cariotipo anormal. Por lo tanto, suponemos que la disminución de su expresión o la no presencia de HLA-E, en algunos casos, en el citotrofoblasto fetal no sería el responsable de la pérdida gestacional. Nuestros resultados coinciden con los encontrados por otro autor en un estudio similar (Bhalla et al., 2006).

El anticuerpo utilizado para la detección del HLA-E fue utilizado anteriormente en otras publicaciones (Ishitani et al., 2003; Lee et al., 1998a) y, en nuestro caso, a una dilución 1/100. Así mismo, encontramos expresión de HLA-E en, aproximadamente, la mitad de las muestras de trofoblasto embrionario (13/27), asegurándonos el funcionamiento del anticuerpo en nuestro tejido.

Con respecto a las isoformas solubles del HLA-G sabemos que éstas son capaces de desencadenar respuestas inmunes iguales a las de la proteína completa. De manera que los niveles de las isoformas solubles del HLA-G pueden diagnosticar la pobre invasión del trofoblasto en la pre-eclampsia o dar un halo de luz en los abortos de repetición, e incluso pueden diagnosticar el potencial de implantación de los embriones en FIV (Sargent, 2005). Por esto, consideramos relevante estudiar la presencia y niveles de las isoformas solubles del HLA-G en el citotrofoblasto fetal de abortos espontáneos de primer trimestre.

Algunos grupos (Chu et al., 1998; Hunt et al., 2000; Ishitani et al., 2003) encuentran que el trofoblasto vellositario y el extraveloso secretan las isoformas solubles del HLA-G, e incluso que son las más abundantes en la interfase feto-materna de primer trimestre. Sin embargo, otros grupos (Blaschitz et al., 2005) encuentran que las isoformas solubles HLA-G5 y HLA-G6 no están presentes en el citotrofoblasto fetal y atribuyen su presencia mayoritariamente a los eritoblastos fetales y mínimamente al citotrofoblasto extraveloso y a las células endoteliales.

Varios métodos han sido propuestos para evaluar los niveles de HLA-G soluble. Sin embargo, es difícil llegar a un consenso sobre un método que permita la estandarización y comparación de resultados. Nosotros pensamos que las diferencias entre grupos se deben mayoritariamente a los tipos y combinación de anticuerpos usados, tiempo de recogida del tejido utilizado y al medio en el que se mide la cantidad de HLA-G soluble. Con respecto a este último punto, la medida de HLA-G soluble puede realizarse en medios de cultivo de embriones tempranos, en sangre periférica, en el sobrenadante de líneas celulares transfectadas con HLA-G1 o HLA-G5 o en el sobrenadante de cultivo de trofoblasto purificado, creyendo que estos dos últimos métodos no llegan a conseguir una proteína perfecta y pura. Además, los modelos *in vitro* necesitan unos procesos de digestión enzimática o derivación desde explantes placentarios, purificación y cultivo *in vitro*, pudiendo no conseguirse una población de citotrofoblasto extraveloso puro al 100% (Tarrade et al., 2001).

Por todo lo mencionado anteriormente, nosotros consideramos adecuado en este proyecto de tesis doctoral utilizar el sobrenadante de cultivos celulares de citotrofoblasto extraveloso embrionario obtenido directamente desde el saco embrionario, mediante histeroembrioscopia, y cultivado *in vitro*.

Para la detección de la presencia de HLA-G utilizamos el anticuerpo monoclonal MEM-G9 que detecta tanto la isoforma soluble HLA-G1 shed como la HLA-G5 activamente secretada, que están unidas a la cadena de β -2-microglobulina y que son expresadas en la superficie celular del citotrofoblasto extraveloso.

Dicho anticuerpo empleado en la técnica ELISA fue utilizado por muchos otros autores, por ejemplo para detectar HLA-G soluble en el cultivo de embriones de día 3 de desarrollo (Coulam, Roussev et al. 2009; Desai, Filipovits et al. 2006), o en muestras de sangre periférica (Alegre, Diaz-Lagares et al. 2007), o en el medio de cultivo de líneas celulares transfectadas con HLA-G, JEG-3 y JAR (Fournel S. et al. 1999), encontrando todos ellos presencia y diversas concentraciones de HLA-G soluble.

A pesar de que, aparentemente, nuestro método de ELISA funcionaba en otros estudios, nosotros encontramos que, tras concentrar hasta 3 veces el volumen de sobrenadante inicial no conseguimos detectar la presencia de HLA-G soluble en los medios de cultivo de trofoblasto extravelositario obtenidos a través de la histeroembrioscopia-legrado. Estos resultados son similares a los encontrados por Blaschitz A. en 2005 donde a pesar de concentrar hasta 7 veces el medio de cultivo de trofoblasto primario y de líneas celulares transfectadas no detectó la presencia de HLA-G soluble (Blaschitz A. en 2005). Pensamos que esto es probablemente debido a que la diferenciación *in vitro* es descontrolada y los cultivos o las divisiones o las mitosis alteran las células del trofoblasto y pueden no expresar HLA-G. Además, opinamos que los autores que sí encuentran HLA-G soluble en los medios de cultivo de trofoblasto (Solier C 2002) o en líneas celulares (Martí S 2007) puede no ser debida al "splicing" alternativo desde la membrana celular o a la secreción celular propia, sino a la rotura de HLA-G1 unido a la membrana debido a la actividad de las metaloproteinasas (Park GM 2004) encontradas con mucha frecuencia y actividad en el citotrofoblasto invasor.

También se ha observado que el incremento de HLA-G soluble en medios de cultivo depende de las condiciones del cultivo y el estado metabólico de las células, de manera que, aparentemente, las células liberan más HLA-G soluble en condiciones de estrés (Juch H 2005).

Dada la imposibilidad de detectar HLA-G soluble en los cultivos de trofoblasto embrionario, quisimos evaluar la presencia de HLA-G soluble en el líquido amniótico de las gestaciones detenidas donde pudo conseguirse dicha muestra. Las células epiteliales del amnios son las productoras del líquido amniótico, así como del HLA-G soluble presente en él (Hammer et al., 1997). Dicha producción ocurre en mayor proporción en el líquido amniótico que en otros compartimentos materno-fetales como puede ser el cordón umbilical. Este líquido es ingerido por el feto por lo cual se cree que es relevante para la inducción de la tolerancia fetal. Además, la generación de HLA-G soluble en el líquido amniótico va disminuyendo a lo largo del embarazo

(Hackmon et al., 2004), al igual que ocurre en el suero materno (Yie et al., 2005a), lo cual se cree que puede ayudar a llevar a cabo una respuesta inmunológica en la madre contra el feto que desencadene el parto. En nuestros resultados observamos que, al igual que tras la inmunohistoquímica en muestras de trofoblasto, no existen diferencias significativas en la expresión de HLA-G en los líquidos amnióticos de cariotipo normal y anormal. No obstante seguía siendo una prueba de la falta de poder diagnóstico de la expresión de HLA-G sobre la causa del aborto al mantenerse a niveles similares en ambos tipos de detecciones del embarazo.

6.4. Asociación entre los polimorfismos estudiados, y sus correspondientes haplotipos, y la expresión proteica de HLA-G.

Tal y como hemos comentado anteriormente, todos los polimorfismos estudiados han sido relacionados con cambios en los niveles de expresión superficial de HLA-G por lo que al aumentar excesivamente la cantidad de HLA-G, así como al disminuirla, podrían verse alteradas algunas de sus funciones.

En nuestro estudio, no se observaron diferencias significativas en la expresión de HLA-G para cada polimorfismo entre las muestras de cariotipo normal y anormal. Únicamente, sí encontramos una diferencia significativa ($p=0,047$) en la media de expresión de HLA-G entre la presencia o no del polimorfismo en el codón 93, pero solo únicamente cuando se categoriza la población, en los casos cuya causa del aborto fue supuestamente el cariotipo anormal embrionario. De manera que, en las muestras de trofoblasto embrionario anormal resultó haber una mayor expresión de HLA-G en presencia del polimorfismo CAT del codón 93 (4 vs. 2,72). Aun así, no le damos mucha importancia a este resultado ya que, como hemos mencionado anteriormente, pueden estar interviniendo muchos otros factores como es el DE, y por el hecho de que resultan ser datos contrarios a lo publicado por otros autores, donde la presencia de la mutación CAT del codón 93 junto con la inserción de las 14 pb del exón 8 se reflejaba en una disminución de la expresión del HLA-G (Larsen and Hviid, 2009) y a nosotros nos da un aumento de la expresión en los casos de presencia de la mutación. Además de que este hecho no ocurre en los casos de cariotipo normal.

Además, tras agrupar las muestras independientemente de su cariotipo embrionario, y haciendo una media de la expresión de HLA-G, no existen diferencias significativas ($p=0,79$) en la media de expresión de HLA-G entre muestras trofoblásticas que no contienen ningún polimorfismo (valor 3,1) y las que sí lo contienen (valores 2,8-3,0) (Tabla 29). Por lo tanto, podemos deducir que la presencia

de un polimorfismo concreto no influencia los niveles de expresión de HLA-G en las muestras de trofoblasto.

Por otro lado, a pesar de que cada polimorfismo por sí solo no presentaba diferencias de expresión de HLA-G, quisimos ver si existían diferencias en la expresión de HLA-G cuando se agrupaban los polimorfismos y se generaban los diferentes haplotipos, entre muestras de cariotipo normal y anormal. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los haplotipos generados. Además, no se encontró ningún haplotipo que, de forma significativa, presentara mayor expresión de HLA-G que otro.

Con respecto a la expresión de HLA-G en los distintos haplotipos secretores generados, ésta se corresponde con el tipo de haplotipo secretor teórico (2,75 los bajos secretores, 3,25 los altos secretores y 2,92 los haplotipos que no afectan a la expresión). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de HLA-G de los haplotipos secretores en función del tipo de cariotipo, normal o anormal.

Evidentemente, no fue posible establecer una relación entre los polimorfismos del gen del HLA-G o los posibles haplotipos y la expresión proteica de HLA-G soluble medido mediante ELISA, tanto en el caso de los medios de cultivo de trofoblasto, por no encontrarse expresión, como en el caso de los líquidos amnióticos, por no haber casos suficientes estadísticamente.

A continuación, mostramos una tabla resumen de cómo los polimorfismos HLA-G, según diferentes autores, pueden afectar sobre la producción de HLA-G en diferentes tejidos (Tabla 31).

Autor	Polimorfismo	Expresión HLA-G	Tejido estudiado
(Ober et al., 2006)	-725G	↑ Transcripción HLA-G5	Línea celular JEG-3
(Hviid, 2006)	Región 5' (promotor)	No existe asociación	Sangre periférica
(Mendes-Junior et al., 2010)	HLA-G*0113N (codón 54)	Proteína truncada. No secreción.	Sangre periférica

6. DISCUSIÓN

(Rebmann et al., 1999; Rebmann et al., 2001)	Alelos HLA-G*010103, 010102, 0103, Alelos HLA-G*0105N y 0106 (ins 14pb)	↓ HLA-G1	Suero
(Rebmann et al., 1999; Rebmann et al., 2001)	Alelos HLA-G*0104 (codón 110) Alelos HLA-G*010101 y 0102 (del 14pb)	↑ HLA-G1	Suero
(Ober et al., 1998; Rebmann et al., 1999; Rebmann et al., 2001)	HLA-G*0105N	↓ HLA-G	Suero
(Hviid et al., 2004b)	INDEL 14pb (ningún genotipo)	No existe asociación	Placenta a término
(Hiby et al., 1999; Hviid et al., 2003; O'Brien et al., 2001; Rousseau et al., 2003)	Inserción de 14pb	↓ Estabilidad y niveles de RNAm	Placenta
(Chen et al., 2008; Hviid et al., 2004b; Rizzo et al., 2005a)	+/+ 14pb Homocigotos	↓ HLA-G	Suero
(Gonzalez et al., 2010)	+/- 14pb Heterocigotos	↑ HLA-G5	Suero
(Larsen and Hviid, 2009)	HLA-G*010101 (del 14pb y CAC codón 93)	↑ Transcripción y proteína HLA-G	Placenta
(Larsen and Hviid, 2009)	HLA-G*010102 (ins 14pb y CAT codón 93)	↓ Transcripción y proteína HLA-G	Placenta

Tabla 31: Resumen de la influencia de determinados polimorfismos sobre la producción de HLA-G en diferentes tejidos.

Como se ilustra en la tabla anterior, algunas investigaciones se han dirigido al estudio de los niveles de expresión de HLA-G en distintos haplotipos como por ejemplo el polimorfismo +/-14 pb , que puede influenciar los niveles de expresión de HLA-Gs en suero (Chen et al., 2008; Hviid et al., 2004c; Rizzo et al., 2005a). Además, las deleciones en el extremo 3' de 14 pb son asignadas a alelos altos secretores de HLA-Gs en plasma. Y las inserciones de 14pb son asignadas a alelos bajos secretores de HLA-Gs en plasma (Rebmann et al., 2001).

Finalmente, basándonos en los datos aportados en el presente estudio, parece ser que el embrión, al comienzo del embarazo, expresa correctamente la proteína HLA-G en todos los casos, es decir, la producción de HLA-G en la interfase feto-materna se realiza de forma constitutiva, no habiendo diferencias significativas ni entre las diferentes variantes polimórficas ni entre los datos de expresión proteica entre las detenciones de embarazo por causa cromosómica y causa desconocida. Es más, podría existir una selección de los embriones productores de HLA-G soluble antes de implantar, basándonos en los estudios que asocian la secreción de HLA-S en los pre-embriones humanos con la capacidad de implantación (Kotze et al., 2010). Debido a la completa maquinaria inmunocompetente que existe en el útero humano para facilitar la aceptación del embarazo nos inclinamos a pensar que la pérdida de la gestación debe de depender de otros defectos de regulación no desencadenados necesariamente por la molécula del HLA-G, como podrían ser las anomalías genéticas en las células NK o en sus receptores inhibidores, de tal manera que no podrían llevar a cabo sus funciones beneficiosas para el mantenimiento del embarazo o una determinada situación inmunológica materna en ese momento gestacional concreto.

Por lo tanto, consideramos que el estudio de la decidua, utilizando nuestro mismo modelo de estudio, podría aportar nuevos datos en futuros estudios sobre el esclarecimiento de las causas de la pérdida gestacional.

Limitaciones del estudio.

Las limitaciones presentes a lo largo de este estudio fueron las siguientes:

* Una de las mayores limitaciones de este proyecto es el bajo tamaño muestral debido a la dificultad de conseguir un aceptable número de muestras trofoblásticas con cariotipo normal. Por ello pensamos que, en determinados casos, si se aumenta el tamaño muestral se podrían conseguir resultados significativos.

* Para el análisis de las muestras y la presentación de los resultados se ha realizado una agrupación de los casos de aborto espontáneo recurrente con aborto esporádico, tras comprobar que no se alteraban los resultados si se realizaba una separación de ambos casos.

* La cantidad e intensidad de expresión del HLA-G fue valorada subjetivamente del 1 (ausencia de expresión) al 4 (máxima expresión) por cinco investigadores independientes que desconocían el origen del cariotipo de las muestras, pudiendo haber diferentes valoraciones. Para intentar minimizar este efecto se tomó la media de las valoraciones semicuantitativas realizadas por los 5 investigadores. Para poder dar un resultado más fiable se calculó la variabilidad entre los diferentes observadores mediante el índice kappa, obteniéndose un resultado favorable con valores por encima del 70%, lo cual indica poca variabilidad entre los diferentes observadores.

* El anticuerpo monoclonal MEM-G/09 utilizado en la técnica inmunohistoquímica no discrimina entre el HLA-G1 cortado proteolíticamente y el HLA-G5 soluble; pero, en teoría, esto no es trascendente porque ambas tienen propiedades inhibitorias similares sobre las células inmunitarias.

* Existe una gran variabilidad en la elección de los anticuerpos para la detección de HLA-G soluble. La combinación de anticuerpos elegida en este proyecto para la realización del ELISA (MEM-G/09 y Anti-humano β 2m) ha sido considerada como el mejor método de detección de las moléculas solubles HLA-G1 cortadas por metaloproteinasas junto con las moléculas de HLA-G5 soluble activamente secretadas; pues es el más usado, fiable, sensible y el que está más fácilmente disponible a nivel comercial (Rebmann et al., 2005).

* No ha sido posible analizar muestras de terminaciones electivas del embarazo (IVE) como grupo control, lo cual consideramos que sería la situación ideal, pero en su lugar hemos analizado muestras con causa cromosómica como probable causa de la detención del embarazo. Además, la obtención de muestra de trofoblasto embrionario tras una IVE mediante legrado aspirativo no tendría las mismas características que el trofoblasto obtenido tras histeroembrioscopia, no pudiéndose asegurar la ausencia de contaminación y certeza del cariotipo embrionario.

7. CONCLUSIONES

1. Un porcentaje significativo de las muestras analizadas (22,2%) no contuvo ningún polimorfismo en el HLA-G, lo cual confirma la baja variabilidad genética de dicho gen. La distribución de los diferentes polimorfismos (-725C>G, final del exón 2, codón 93, codón 110, codón 130 e INDEL 14pb) no fue diferente entre detenciones del embarazo por causa cromosómica y causa no cromosómica.
2. La expresión de HLA-G1 y HLA-G5 no varió entre las vellosidades coriónicas de las detenciones del embarazo por causa cromosómica y por causa desconocida o abortos cromosómicamente normales. Por esto, parece ser que la causa de la detención de la gestación no fue la ausencia o la disminución de la expresión del HLA-G en el citotrofoblasto fetal.

El HLA-E se expresó en la interfase feto-materna, aunque a muy bajas concentraciones. Igualmente, la expresión de HLA-E no varió entre las vellosidades coriónicas de las detenciones del embarazo por causa cromosómica y por causa desconocida o abortos cromosómicamente normales, por lo que la disminución de la expresión o la no presencia de HLA-E en el citotrofoblasto fetal no fue el responsable mayor de la pérdida gestacional.

La expresión del HLA-G no es determinante para que se produzca la expresión de HLA-E.

3. El cultivo de células trofoblásticas no parece ser un buen modelo para la determinación del HLA-G soluble. No existieron diferencias en la expresión de HLA-G soluble en el líquido amniótico entre cariotipos normales y anormales.
4. No existió relación entre los polimorfismos del HLA-G y la secreción proteica a nivel del trofoblasto.
5. El HLA-G parece expresarse de forma constitutiva en la interfase materno-fetal, de forma que otros mecanismos no necesariamente relacionados con dicha molécula pueden desencadenar el desequilibrio inmune que puede existir en la pérdida de la gestación en el primer trimestre del embarazo.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Javed, S., and Agrawal, S. (2006). Transcriptional status of HLA-G at the maternal-fetal interface in recurrent spontaneous abortion. In *Int J Gynaecol Obstet*, pp. 148-149.
- Abbas, A., Tripathi, P., Naik, S., and Agrawal, S. (2004). Analysis of human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphism in normal women and in women with recurrent spontaneous abortions. *Eur J Immunogenet* 31, 275-278.
- Abdalla, H.I., Billett, A., Kan, A.K., Baig, S., Wren, M., Korea, L., and Studd, J.W. (1998). Obstetric outcome in 232 ovum donation pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 105, 332-337.
- Adams, K.M., Yan, Z., Stevens, A.M., and Nelson, J.L. (2007). The changing maternal "self" hypothesis: a mechanism for maternal tolerance of the fetus. *Placenta* 28, 378-382.
- Adelberg, A.M., and Kuller, J.A. (2002). Thrombophilias and recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol Surv* 57, 703-709.
- Aikhionbare, F.O., Kumaresan, K., Shamsa, F., and Bond, V.C. (2006). HLA-G DNA sequence variants and risk of perinatal HIV-1 transmission. *AIDS Res Ther* 3, 28.
- Albieri, A., Hoshida, M.S., Gagiotti, S.M., Leanza, E.C., Abrahamsohn, I., Croy, A., Ashkar, A.A., and Bevilacqua, E. (2005). Interferon-gamma alters the phagocytic activity of the mouse trophoblast. *Reprod Biol Endocrinol* 3, 34.
- Aldrich, C., Wambebe, C., Odama, L., Di Rienzo, A., and Ober, C. (2002). Linkage disequilibrium and age estimates of a deletion polymorphism (1597DeltaC) in HLA-G suggest non-neutral evolution. *Hum Immunol* 63, 405-412.
- Aldrich, C.J., DeCloux, A., Woods, A.S., Cotter, R.J., Soloski, M.J., and Forman, J. (1994). Identification of a Tap-dependent leader peptide recognized by alloreactive T cells specific for a class Ib antigen. *Cell* 79, 649-658.
- Aldrich, C.L., Stephenson, M.D., Karrison, T., Odem, R.R., Branch, D.W., Scott, J.R., Schreiber, J.R., and Ober, C. (2001). HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 7, 1167-1172.
- Alegre, E., Diaz-Lagares, A., Lemaoult, J., Lopez-Moratalla, N., Carosella, E.D., and Gonzalez, A. (2007). Maternal antigen presenting cells are a source of plasmatic HLA-G during pregnancy: longitudinal study during pregnancy. *Hum Immunol* 68, 661-667.
- Alizadeh, M., Legras, C., Semana, G., Le Bouteiller, P., Genetet, B., and Fauchet, R. (1993). Evidence for a polymorphism of HLA-G gene. *Hum Immunol* 38, 206-212.

- Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M., and Betz, A.G. (2004). Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 5, 266-271.
- Alvarez, M., Piedade, J., Balseiro, S., Ribas, G., and Regateiro, F. (2009). HLA-G 3'-UTR SNP and 14-bp deletion polymorphisms in Portuguese and Guinea-Bissau populations. *Int J Immunogenet* 36, 361-366.
- Aplin, J.D. (1991). Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 99 (Pt 4), 681-692.
- Aplin, J.D. (2010). Developmental cell biology of human villous trophoblast: current research problems. *Int J Dev Biol* 54, 323-329.
- Arias, F., Romero, R., Joist, H., and Kraus, F.T. (1998). Thrombophilia: a mechanism of disease in women with adverse pregnancy outcome and thrombotic lesions in the placenta. *J Matern Fetal Med* 7, 277-286.
- Arnaiz-Villena, A., Martinez-Laso, J., Castro, M.J., Morales, P., Moscoso, J., Varela, P., Gomez-Casado, E., and Allende, L.M. (2001). The evolution of the MHC-G gene does not support a functional role for the complete protein. *Immunol Rev* 183, 65-75.
- Arnett, K.L., and Parham, P. (1995). HLA class I nucleotide sequences, 1995. *Tissue Antigens* 46, 217-257.
- Aruna, M., Sirisha, P.V., Andal Bhaskar, S., Tarakeswari, S., Thangaraj, K., and Reddy, B.M. (2010a). Role of 14-bp insertion/deletion polymorphism in HLA-G among Indian women with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* 77, 131-135.
- Aruna, M., Sudheer, P.S., Andal, S., Tarakeswari, S., Reddy, A.G., Thangaraj, K., Singh, L., and Reddy, B.M. (2010b). HLA-G polymorphism patterns show lack of detectable association with recurrent spontaneous abortion. *Tissue Antigens* 76, 216-222.
- Ashkar, A.A., and Croy, B.A. (2001). Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy. *Semin Immunol* 13, 235-241.
- Ashkar, A.A., Di Santo, J.P., and Croy, B.A. (2000). Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med* 192, 259-270.
- Askelund, K., Liddell, H.S., Zanderigo, A.M., Fernando, N.S., Khong, T.Y., Stone, P.R., and Chamley, L.W. (2004). CD83(+) dendritic cells in the decidua of women with recurrent miscarriage and normal pregnancy. *Placenta* 25, 140-145.
- Athanassakis, I., Pafliis, M., Ranella, A., and Vassiliadis, S. (1999). Detection of soluble HLA-G levels in maternal serum can be predictive for a successful pregnancy. *Transplant Proc* 31, 1834-1837.

- Bahri, R., Hirsch, F., Josse, A., Rouas-Freiss, N., Bidere, N., Vasquez, A., Carosella, E.D., Charpentier, B., and Durrbach, A. (2006). Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes. *J Immunol* 176, 1331-1339.
- Bainbridge, D.R., Ellis, S.A., and Sargent, I.L. (2000). The short forms of HLA-G are unlikely to play a role in pregnancy because they are not expressed at the cell surface. *J Reprod Immunol* 47, 1-16.
- Barrier, B.F., Kendall, B.S., Sharpe-Timms, K.L., and Kost, E.R. (2006). Characterization of human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 103, 25-30.
- Barthel, L.K., and Raymond, P.A. (1990). Improved method for obtaining 3-microns cryosections for immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 38, 1383-1388.
- Beer, A.E., Kwak, J.Y., and Ruiz, J.E. (1994). The biological basis of passage of fetal cellular material into the maternal circulation. *Ann N Y Acad Sci* 731, 21-35.
- Beer, A.E., Semprini, A.E., Zhu, X.Y., and Quebbeman, J.F. (1985). Pregnancy outcome in human couples with recurrent spontaneous abortions: HLA antigen profiles; HLA antigen sharing; female serum MLR blocking factors; and paternal leukocyte immunization. *Exp Clin Immunogenet* 2, 137-153.
- Beever, C.L., Stephenson, M.D., Penaherrera, M.S., Jiang, R.H., Kalousek, D.K., Hayden, M., Field, L., Brown, C.J., and Robinson, W.P. (2003). Skewed X-chromosome inactivation is associated with trisomy in women ascertained on the basis of recurrent spontaneous abortion or chromosomally abnormal pregnancies. *Am J Hum Genet* 72, 399-407.
- Bellver, J., Meseguer, M., Muriel, L., Garcia-Herrero, S., Barreto, M.A., Garda, A.L., Remohi, J., Pellicer, A., and Garrido, N. (2010). Y chromosome microdeletions, sperm DNA fragmentation and sperm oxidative stress as causes of recurrent spontaneous abortion of unknown etiology. *Hum Reprod* 25, 1713-1721.
- Berger, D.S., Hogge, W.A., Barmada, M.M., and Ferrell, R.E. (2010). Comprehensive analysis of HLA-G: implications for recurrent spontaneous abortion. *Reprod Sci* 17, 331-338.
- Bevilacqua, E., Hoshida, M.S., Amarante-Paffaro, A., Albieri-Borges, A., and Zago Gomes, S. (2010). Trophoblast phagocytic program: roles in different placental systems. *Int J Dev Biol* 54, 495-505.
- Beydoun, H., and Saftlas, A.F. (2005). Association of human leukocyte antigen sharing with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* 65, 123-135.
- Bhalla, A., Stone, P.R., Liddell, H.S., Zanderigo, A., and Chamley, L.W. (2006). Comparison of the expression of human leukocyte antigen (HLA)-G and HLA-E

- in women with normal pregnancy and those with recurrent miscarriage. *Reproduction* 131, 583-589.
- Billingham, R.E., Brent, L., and Medawar, P.B. (1953). Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172, 603-606.
- Bischof, P., Friedli, E., Martelli, M., and Campana, A. (1991). Expression of extracellular matrix-degrading metalloproteinases by cultured human cytotrophoblast cells: effects of cell adhesion and immunopurification. *Am J Obstet Gynecol* 165, 1791-1801.
- Bischof, P., Haenggeli, L., and Campana, A. (1995a). Effect of leukemia inhibitory factor on human cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *Am J Reprod Immunol* 34, 225-230.
- Bischof, P., Martelli, M., Campana, A., Itoh, Y., Ogata, Y., and Nagase, H. (1995b). Importance of matrix metalloproteinases in human trophoblast invasion. *Early Pregnancy* 1, 263-269.
- Bischof, P., Meisser, A., and Campana, A. (2001). Biochemistry and molecular biology of trophoblast invasion. *Ann N Y Acad Sci* 943, 157-162.
- Bjorkman, P.J., and Parham, P. (1990). Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* 59, 253-288.
- Blaschitz, A., Hutter, H., and Dohr, G. (2001). HLA Class I protein expression in the human placenta. *Early Pregnancy* 5, 67-69.
- Blaschitz, A., Juch, H., Volz, A., Hutter, H., Daxboeck, C., Desoye, G., and Dohr, G. (2005). The soluble pool of HLA-G produced by human trophoblasts does not include detectable levels of the intron 4-containing HLA-G5 and HLA-G6 isoforms. *Mol Hum Reprod* 11, 699-710.
- Blois, S.M., Kammerer, U., Alba Soto, C., Tometten, M.C., Shaikly, V., Barrientos, G., Jurd, R., Rukavina, D., Thomson, A.W., Klapp, B.F., *et al.* (2007). Dendritic cells: key to fetal tolerance? *Biol Reprod* 77, 590-598.
- Bogic, L.V., Ohira, R.H., Yamamoto, S.Y., Okazaki, K.J., Millar, K., and Bryant-Greenwood, G.D. (1999). Tissue plasminogen activator and its receptor in the human amnion, chorion, and decidua at preterm and term. *Biol Reprod* 60, 1006-1012.
- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* 196, 1627-1638.
- Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E.H., Coligan, J.E., and Brooks, A.G. (1998). Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med* 187, 813-818.

- Boucraut, J., Guillaudeux, T., Alizadeh, M., Boretto, J., Chimini, G., Malecaze, F., Semana, G., Fauchet, R., Pontarotti, P., and Le Bouteiller, P. (1993). HLA-E is the only class I gene that escapes CpG methylation and is transcriptionally active in the trophoblast-derived human cell line JAR. *Immunogenetics* 38, 117-130.
- Boue, J., Bou, A., and Lazar, P. (1975). Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology* 12, 11-26.
- Branch, D.W., Silver, R., Pierangeli, S., van Leeuwen, I., and Harris, E.N. (1997). Antiphospholipid antibodies other than lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in women with recurrent pregnancy loss, fertile controls, and antiphospholipid syndrome. *Obstet Gynecol* 89, 549-555.
- Braud, V., Jones, E.Y., and McMichael, A. (1997). The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur J Immunol* 27, 1164-1169.
- Braud, V.M., Allan, D.S., O'Callaghan, C.A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., *et al.* (1998a). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, 795-799.
- Braud, V.M., Allan, D.S., Wilson, D., and McMichael, A.J. (1998b). TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Curr Biol* 8, 1-10.
- Breart, G., and de Mouzon, J. (1995). [Assisted reproduction vigilance]. *Bull Acad Natl Med* 179, 1759-1764.
- Breburda, E.E., Dambaeva, S.V., Slukvin, II, and Golos, T.G. (2006). Selective distribution and pregnancy-specific expression of DC-SIGN at the maternal-fetal interface in the rhesus macaque: DC-SIGN is a putative marker of the recognition of pregnancy. *Placenta* 27, 11-21.
- Bronet, F., Martinez, E., Gaytan, M., Linan, A., Cernuda, D., Ariza, M., Nogales, M., Pacheco, A., San Celestino, M., and Garcia-Velasco, J.A. (2012). Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients. *Hum Reprod* 27, 1922-1929.
- Brooks, A.G., Borrego, F., Posch, P.E., Patamawenu, A., Scorzelli, C.J., Ulbrecht, M., Weiss, E.H., and Coligan, J.E. (1999). Specific recognition of HLA-E, but not classical, HLA class I molecules by soluble CD94/NKG2A and NK cells. *J Immunol* 162, 305-313.
- Buchholz, T., and Thaler, C.J. (2003). Inherited thrombophilia: impact on human reproduction. *Am J Reprod Immunol* 50, 20-32.

- Bulmer, J.N., and Lash, G.E. (2005). Human uterine natural killer cells: a reappraisal. *Mol Immunol* 42, 511-521.
- Bulmer, J.N., Morrison, L., Longfellow, M., Ritson, A., and Pace, D. (1991). Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod* 6, 791-798.
- Bulmer, J.N., and Sunderland, C.A. (1984). Immunohistological characterization of lymphoid cell populations in the early human placental bed. *Immunology* 52, 349-357.
- Burton, G.J., Jauniaux, E., and Charnock-Jones, D.S. (2007). Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. *Placenta* 28 Suppl A, S64-69.
- Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., Pessino, A., Cilli, M., Conte, R., Pende, D., Ponte, M., Mikaelsson, M.S., Moretta, L., *et al.* (1998). p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily. *Eur J Immunol* 28, 1980-1990.
- Carosella, E.D., Dausset, J., and Kirszenbaum, M. (1996). HLA-G revisited. *Immunol Today* 17, 407-409.
- Carosella, E.D., Khalil-Daher, I., Dausset, J., and Rouas-Freiss, N. (1999). HLA-G mediates protection from natural killer cytolysis: implications in immune tolerance. *Transplant Proc* 31, 1192-1193.
- Carosella, E.D., Moreau, P., Aractingi, S., and Rouas-Freiss, N. (2001). HLA-G: a shield against inflammatory aggression. *Trends Immunol* 22, 553-555.
- Carp, H., Feldman, B., Oelsner, G., and Schiff, E. (2004). Parental karyotype and subsequent live births in recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 81, 1296-1301.
- Carranza-Lira, S., and Celis-Rico, G.J. (2011). [Differences in spermatid morphology between couples with repeated pregnancy loss and infertility]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 49, 523-526.
- Carrell, D.T., Liu, L., Peterson, C.M., Jones, K.P., Hatasaka, H.H., Erickson, L., and Campbell, B. (2003). Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* 49, 49-55.
- Carretero, M., Palmieri, G., Llano, M., Tullio, V., Santoni, A., Geraghty, D.E., and Lopez-Botet, M. (1998). Specific engagement of the CD94/NKG2-A killer inhibitory receptor by the HLA-E class Ib molecule induces SHP-1 phosphatase recruitment to tyrosine-phosphorylated NKG2-A: evidence for receptor function in heterologous transfectants. *Eur J Immunol* 28, 1280-1291.
- Castelli, E.C., Mendes-Junior, C.T., Deghaide, N.H., de Albuquerque, R.S., Muniz, Y.C., Simoes, R.T., Carosella, E.D., Moreau, P., and Donadi, E.A. (2010). The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun* 11, 134-141.

- Castelli, E.C., Moreau, P., Oya e Chiromatzo, A., Mendes-Junior, C.T., Veiga-Castelli, L.C., Yaghi, L., Giuliani, S., Carosella, E.D., and Donadi, E.A. (2009). In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Hum Immunol* 70, 1020-1025.
- Castro, M.J., Morales, P., Rojo-Amigo, R., Martinez-Laso, J., Allende, L., Varela, P., Garcia-Berciano, M., Guillen-Perales, J., and Arnaiz-Villena, A. (2000). Homozygous HLA-G*0105N healthy individuals indicate that membrane-anchored HLA-G1 molecule is not necessary for survival. *Tissue Antigens* 56, 232-239.
- Caumartin, J., Favier, B., Daouya, M., Guillard, C., Moreau, P., Carosella, E.D., and LeMaoult, J. (2007). Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. *Embo J* 26, 1423-1433.
- Clements, C.S., Kjer-Nielsen, L., Kostenko, L., Hoare, H.L., Dunstone, M.A., Moses, E., Freed, K., Brooks, A.G., Rossjohn, J., and McCluskey, J. (2005). Crystal structure of HLA-G: a nonclassical MHC class I molecule expressed at the fetal-maternal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3360-3365.
- Clements, C.S., Kjer-Nielsen, L., McCluskey, J., and Rossjohn, J. (2007). Structural studies on HLA-G: implications for ligand and receptor binding. *Hum Immunol* 68, 220-226.
- Clifford, K., Flanagan, A.M., and Regan, L. (1999). Endometrial CD56+ natural killer cells in women with recurrent miscarriage: a histomorphometric study. *Hum Reprod* 14, 2727-2730.
- Cohen, M., and Bischof, P. (2007). Factors regulating trophoblast invasion. *Gynecol Obstet Invest* 64, 126-130.
- Cohen, M., Meisser, A., and Bischof, P. (2006). Metalloproteinases and human placental invasiveness. *Placenta* 27, 783-793.
- Cohen, M., Wuillemin, C., Irion, O., and Bischof, P. (2010). Role of decidua in trophoblastic invasion. *Neuro Endocrinol Lett* 31, 193-197.
- Colbern, G.T., Chiang, M.H., and Main, E.K. (1994). Expression of the nonclassical histocompatibility antigen HLA-G by preeclamptic placenta. *Am J Obstet Gynecol* 170, 1244-1250.
- Collodel, G., Giannerini, V., Antonio Pascarelli, N., Federico, M.G., Comodo, F., and Moretti, E. (2009). TEM and FISH studies in sperm from men of couples with recurrent pregnancy loss. *Andrologia* 41, 352-360.
- Contini, P., Ghio, M., Merlo, A., Poggi, A., Indiveri, F., and Puppo, F. (2005). Apoptosis of antigen-specific T lymphocytes upon the engagement of CD8 by soluble HLA class I molecules is Fas ligand/Fas mediated: evidence for the involvement of p56lck, calcium calmodulin kinase II, and Calcium-independent protein kinase C signaling pathways and for NF-kappaB and NF-AT nuclear translocation. *J Immunol* 175, 7244-7254.

- Contini, P., Ghio, M., Poggi, A., Filaci, G., Indiveri, F., Ferrone, S., and Puppo, F. (2003). Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol* 33, 125-134.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E., and Caligiuri, M.A. (2001). Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 97, 3146-3151.
- Copeman, J., Han, R.N., Caniggia, I., McMaster, M., Fisher, S.J., and Cross, J.C. (2000). Posttranscriptional regulation of human leukocyte antigen G during human extravillous cytotrophoblast differentiation. *Biol Reprod* 62, 1543-1550.
- Coulam, C.B., and Stern, J.J. (1994). Endocrine factors associated with recurrent spontaneous abortion. *Clin Obstet Gynecol* 37, 730-744.
- Crisa, L., McMaster, M.T., Ishii, J.K., Fisher, S.J., and Salomon, D.R. (1997). Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts. *J Exp Med* 186, 289-298.
- Chamley, L.W. (2002). Antiphospholipid antibodies: biological basis and prospects for treatment. *J Reprod Immunol* 57, 185-202.
- Chao, K.H., Wu, M.Y., Chen, C.D., Yang, J.H., Yang, Y.S., and Ho, H.N. (1999). The expression of killer cell inhibitory receptors on natural killer cells and activation status of CD4+ and CD8+ T cells in the decidua of normal and abnormal early pregnancies. *Hum Immunol* 60, 791-797.
- Chao, K.H., Yang, Y.S., Ho, H.N., Chen, S.U., Chen, H.F., Dai, H.J., Huang, S.C., and Gill, T.J., 3rd (1995). Decidual natural killer cytotoxicity decreased in normal pregnancy but not in anembryonic pregnancy and recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 34, 274-280.
- Chaouat, G. (2007). The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol* 29, 95-113.
- Chaouat, G., Ledee-Bataille, N., Zourbas, S., Ostojic, S., Dubanchet, S., Martal, J., and Frydman, R. (2003). Cytokines, implantation and early abortion: re-examining the Th1/Th2 paradigm leads to question the single pathway, single therapy concept. *Am J Reprod Immunol* 50, 177-186.
- Chapman, T.L., Heikeman, A.P., and Bjorkman, P.J. (1999). The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity* 11, 603-613.
- Chen, X.Y., Yan, W.H., Lin, A., Xu, H.H., Zhang, J.G., and Wang, X.X. (2008). The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. *Tissue Antigens* 72, 335-341.
- Chernyshov, V.P., Tumanova, L.E., Sudoma, I.A., and Bannikov, V.I. (2008). Th1 and Th2 in human IVF pregnancy with allogenic fetus. *Am J Reprod Immunol* 59, 352-358.

- Christiansen, O.B. (2006). Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss. *Curr Opin Obstet Gynecol* 18, 304-312.
- Christiansen, O.B., Mohapeloa, H.P., Steffensen, R., and Jersild, C. (1997). HLA-C and -Bw typing of couples with unexplained recurrent miscarriages. *J Reprod Immunol* 37, 63-77.
- Chu, W., Fant, M.E., Geraghty, D.E., and Hunt, J.S. (1998). Soluble HLA-G in human placentas: synthesis in trophoblasts and interferon-gamma-activated macrophages but not placental fibroblasts. *Hum Immunol* 59, 435-442.
- Chumbley, G., King, A., Holmes, N., and Loke, Y.W. (1993). In situ hybridization and northern blot demonstration of HLA-G mRNA in human trophoblast populations by locus-specific oligonucleotide. *Hum Immunol* 37, 17-22.
- Dal Porto, J., Johansen, T.E., Catipovic, B., Parfiit, D.J., Tuveson, D., Gether, U., Kozlowski, S., Fearon, D.T., and Schneck, J.P. (1993). A soluble divalent class I major histocompatibility complex molecule inhibits alloreactive T cells at nanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6671-6675.
- Damsky, C.H., Fitzgerald, M.L., and Fisher, S.J. (1992). Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J Clin Invest* 89, 210-222.
- Daniely, M., Aviram-Goldring, A., Barkai, G., and Goldman, B. (1998). Detection of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 13, 805-809.
- Dankers, M.K., Witvliet, M.D., Roelen, D.L., de Lange, P., Korfage, N., Persijn, G.G., Duquesnoy, R., Doxiadis, II, and Claas, F.H. (2004). The number of amino acid triplet differences between patient and donor is predictive for the antibody reactivity against mismatched human leukocyte antigens. *Transplantation* 77, 1236-1239.
- Davis, D.M., Reyburn, H.T., Pazmany, L., Chiu, I., Mandelboim, O., and Strominger, J.L. (1997). Impaired spontaneous endocytosis of HLA-G. *Eur J Immunol* 27, 2714-2719.
- De Braekeleer, M., and Dao, T.N. (1990). Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum Reprod* 5, 519-528.
- de la Rochebrochard, E., and Thonneau, P. (2002). Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. *Hum Reprod* 17, 1649-1656.
- De Oliveira, L.G., Lash, G.E., Murray-Dunning, C., Bulmer, J.N., Innes, B.A., Searle, R.F., Sass, N., and Robson, S.C. (2010). Role of interleukin 8 in uterine natural killer cell regulation of extravillous trophoblast cell invasion. *Placenta* 31, 595-601.

- Demaria, S., Schwab, R., Gottesman, S.R., and Bushkin, Y. (1994). Soluble beta 2-microglobulin-free class I heavy chains are released from the surface of activated and leukemia cells by a metalloprotease. *J Biol Chem* *269*, 6689-6694.
- Dewan, S., Puscheck, E.E., Coulam, C.B., Wilcox, A.J., and Jeyendran, R.S. (2006). Y-chromosome microdeletions and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* *85*, 441-445.
- Dimitriadis, E., White, C.A., Jones, R.L., and Salamonsen, L.A. (2005). Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* *11*, 613-630.
- Dong, Y., Lieskovska, J., Kedrin, D., Porcelli, S., Mandelboim, O., and Bushkin, Y. (2003). Soluble nonclassical HLA generated by the metalloproteinase pathway. *Hum Immunol* *64*, 802-810.
- Dosiou, C., and Giudice, L.C. (2005). Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr Rev* *26*, 44-62.
- Du, L., Xiao, X., Wang, C., Zhang, X., Zheng, N., Wang, L., Zhang, X., Li, W., Wang, S., and Dong, Z. (2011). Human leukocyte antigen-G is closely associated with tumor immune escape in gastric cancer by increasing local regulatory T cells. *Cancer Sci* *102*, 1272-1280.
- Eblen, A.C., Gercel-Taylor, C., Shields, L.B., Sanfilippo, J.S., Nakajima, S.T., and Taylor, D.D. (2000). Alterations in humoral immune responses associated with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* *73*, 305-313.
- Ellery, P.M., Cindrova-Davies, T., Jauniaux, E., Ferguson-Smith, A.C., and Burton, G.J. (2009). Evidence for transcriptional activity in the syncytiotrophoblast of the human placenta. *Placenta* *30*, 329-334.
- Ellis, S.A., Palmer, M.S., and McMichael, A.J. (1990). Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. *J Immunol* *144*, 731-735.
- Emmer, P.M., Steegers, E.A., Kerstens, H.M., Bulten, J., Nelen, W.L., Boer, K., and Joosten, I. (2002). Altered phenotype of HLA-G expressing trophoblast and decidual natural killer cells in pathological pregnancies. *Hum Reprod* *17*, 1072-1080.
- Ezra, Y., and Schenker, J.G. (1995). Abortion rate in assisted reproduction--true increase? *Early Pregnancy* *1*, 171-175.
- Fan, L., Zhang, X., Xu, L., Yang, J., Li, W., and Liu, B. (1999). Preliminary study on the expression of HLA-G mRNA in normal placenta and placenta with RSA after immunotherapy. *Transplant Proc* *31*, 1854-1856.
- Fang, C.Y., Wu, X.W., Liang, Z.H., Chen, H., Han, J.Y., Huang, Y.F., and Gong, F.L. (2003). [Immune tolerance inducing effects of soluble human leucocyte antigen G1 on natural killer cells and T cells]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* *83*, 584-587.

- Fedele, L., Dorta, M., Brioschi, D., Giudici, M.N., and Candiani, G.B. (1989). Pregnancies in septate uteri: outcome in relation to site of uterine implantation as determined by sonography. *AJR Am J Roentgenol* *152*, 781-784.
- Ferro, J., Martinez, M.C., Lara, C., Pellicer, A., Remohi, J., and Serra, V. (2003). Improved accuracy of hysteroembryoscopic biopsies for karyotyping early missed abortions. *Fertil Steril* *80*, 1260-1264.
- Flori, E., Doray, B., Gautier, E., Kohler, M., Ernault, P., Flori, J., and Costa, J.M. (2004). Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytio-trophoblastic cells. Case report. *Hum Reprod* *19*, 723-724.
- Fons, P., Chabot, S., Cartwright, J.E., Lenfant, F., L'Faqihi, F., Giustiniani, J., Herault, J.P., Gueguen, G., Bono, F., Savi, P., *et al.* (2006). Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood* *108*, 2608-2615.
- Fournel, S., Aguerre-Girr, M., Huc, X., Lenfant, F., Alam, A., Toubert, A., Bensussan, A., and Le Bouteiller, P. (2000). Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. *J Immunol* *164*, 6100-6104.
- Frauli, M., and Ludwig, H. (1987). Demonstration of the ability of Hofbauer cells to phagocytose exogenous antibodies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* *26*, 135-144.
- Friebe, A., and Arck, P. (2008). Causes for spontaneous abortion: what the bugs 'gut' to do with it? *Int J Biochem Cell Biol* *40*, 2348-2352.
- Fujii, T., Ishitani, A., and Geraghty, D.E. (1994). A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol* *153*, 5516-5524.
- Fuzzi, B., Rizzo, R., Criscuoli, L., Noci, I., Melchiorri, L., Scarselli, B., Bencini, E., Menicucci, A., and Baricordi, O.R. (2002). HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol* *32*, 311-315.
- Gansuud, B., Hagihara, M., Munkhbat, B., Kanai, N., Morita, N., Munkhtuvshin, N., Chargui, J., Kato, S., Hotta, T., and Tsuji, K. (2000). Inhibition of Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity by soluble HLA class I in vitro. *Clin Exp Immunol* *119*, 107-114.
- Gardner, L., and Moffett, A. (2003). Dendritic cells in the human decidua. *Biol Reprod* *69*, 1438-1446.
- Gazit, E., Slomov, Y., Goldberg, I., Brenner, S., and Loewenthal, R. (2004). HLA-G is associated with pemphigus vulgaris in Jewish patients. *Hum Immunol* *65*, 39-46.
- Gendron, R.L., and Baines, M.G. (1988). Infiltrating decidual natural killer cells are associated with spontaneous abortion in mice. *Cell Immunol* *113*, 261-267.

- Geraghty, D.E., Koller, B.H., and Orr, H.T. (1987). A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9145-9149.
- Gerretsen, G., Huisjes, H.J., and Elema, J.D. (1981). Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and fetal growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* 88, 876-881.
- Giorlandino, C., Calugi, G., Iaconianni, L., Santoro, M.L., and Lippa, A. (1998). Spermatozoa with chromosomal abnormalities may result in a higher rate of recurrent abortion. *Fertil Steril* 70, 576-577.
- Goldman-Wohl, D.S., Ariel, I., Greenfield, C., Hochner-Celnikier, D., Cross, J., Fisher, S., and Yagel, S. (2000). Lack of human leukocyte antigen-G expression in extravillous trophoblasts is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 6, 88-95.
- Gomez-Casado, E., Martinez-Laso, J., Vargas-Alarcon, G., Varela, P., Diaz-Campos, N., Alvarez, M., Alegre, R., and Arnaiz-Villena, A. (1997). Description of a new HLA-E (E*01031) allele and its frequency in the Spanish population. *Hum Immunol* 54, 69-73.
- Gonzalez, A., Alegre, E., Torres, M.I., Diaz-Lagares, A., Lorite, P., Palomeque, T., and Arroyo, A. (2010). Evaluation of HLA-G5 plasmatic levels during pregnancy and relationship with the 14-bp polymorphism. *Am J Reprod Immunol* 64, 367-374.
- Gorelik, L., Constant, S., and Flavell, R.A. (2002). Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med* 195, 1499-1505.
- Grabowska, A., Chumbley, G., Carter, N., and Loke, Y.W. (1990). Interferon-gamma enhances mRNA and surface expression of class I antigen on human extravillous trophoblast. *Placenta* 11, 301-308.
- Gray, R.H., and Wu, L.Y. (2000). Subfertility and risk of spontaneous abortion. *Am J Public Health* 90, 1452-1454.
- Grimsley, C., Kawasaki, A., Gassner, C., Sageshima, N., Nose, Y., Hatake, K., Geraghty, D.E., and Ishitani, A. (2002). Definitive high resolution typing of HLA-E allelic polymorphisms: Identifying potential errors in existing allele data. *Tissue Antigens* 60, 206-212.
- Grzybowska, E.A., Wilczynska, A., and Siedlecki, J.A. (2001). Regulatory functions of 3'UTRs. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 291-295.
- Gundogan, F., Bianchi, D.W., Scherjon, S.A., and Roberts, D.J. (2009). Placental pathology in egg donor pregnancies. *Fertil Steril* 93, 397-404.
- Guzeloglu-Kayisli, O., Kayisli, U.A., and Taylor, H.S. (2009). The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions. *Semin Reprod Med* 27, 62-79.

- Hackmon, R., Hallak, M., Krup, M., Weitzman, D., Sheiner, E., Kaplan, B., and Weinstein, Y. (2004). HLA-G antigen and parturition: maternal serum, fetal serum and amniotic fluid levels during pregnancy. *Fetal Diagn Ther* 19, 404-409.
- Hammer, A., Hutter, H., Blaschitz, A., Mahnert, W., Hartmann, M., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., and Dohr, G. (1997). Amnion epithelial cells, in contrast to trophoblast cells, express all classical HLA class I molecules together with HLA-G. *Am J Reprod Immunol* 37, 161-171.
- Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Avraham, I., Greenfield, C., Natanson-Yaron, S., Prus, D., Cohen-Daniel, L., Arnon, T.I., Manaster, I., *et al.* (2006). Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 12, 1065-1074.
- Hanna, J., and Mandelboim, O. (2007). When killers become helpers. *Trends Immunol* 28, 201-206.
- Hanna, J., Wald, O., Goldman-Wohl, D., Prus, D., Markel, G., Gazit, R., Katz, G., Haimov-Kochman, R., Fujii, N., Yagel, S., *et al.* (2003). CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells. *Blood* 102, 1569-1577.
- Hara, N., Fujii, T., Yamashita, T., Kozuma, S., Okai, T., and Taketani, Y. (1996). Altered expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblasts in preeclampsia: immunohistological demonstration with anti-HLA-G specific antibody "87G" and anti-cytokeratin antibody "CAM5.2". *Am J Reprod Immunol* 36, 349-358.
- Harlap, S., and Shiono, P.H. (1980). Alcohol, smoking, and incidence of spontaneous abortions in the first and second trimester. *Lancet* 2, 173-176.
- Harrison, G.A., Humphrey, K.E., Jakobsen, I.B., and Cooper, D.W. (1993). A 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene. *Hum Mol Genet* 2, 2200.
- Hashimoto, K., Azuma, C., Koyama, M., Nobunaga, T., Kimura, T., Shimoya, K., Kubota, Y., Saji, F., and Murata, Y. (1997). Biparental alleles of HLA-G are co-dominantly expressed in the placenta. *Jpn J Hum Genet* 42, 181-186.
- Hassold, T.J. (1980). A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions. *Am J Hum Genet* 32, 723-730.
- Heikkinen, J., Mottonen, M., Alanen, A., and Lassila, O. (2004). Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol* 136, 373-378.
- Heikkinen, J., Mottonen, M., Komi, J., Alanen, A., and Lassila, O. (2003). Phenotypic characterization of human decidual macrophages. *Clin Exp Immunol* 131, 498-505.
- Heilmann, L., von Tempelhoff, G.F., and Pollow, K. (2003). Antiphospholipid syndrome in obstetrics. *Clin Appl Thromb Hemost* 9, 143-150.

- Heinrichs, H., and Orr, H.T. (1990). HLA non-A,B,C class I genes: their structure and expression. *Immunol Res* 9, 265-274.
- Hiby, S.E., King, A., Sharkey, A., and Loke, Y.W. (1999). Molecular studies of trophoblast HLA-G: polymorphism, isoforms, imprinting and expression in preimplantation embryo. *Tissue Antigens* 53, 1-13.
- Hiby, S.E., Regan, L., Lo, W., Farrell, L., Carrington, M., and Moffett, A. (2008). Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 23, 972-976.
- Higuma-Myojo, S., Sasaki, Y., Miyazaki, S., Sakai, M., Siozaki, A., Miwa, N., and Saito, S. (2005). Cytokine profile of natural killer cells in early human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 54, 21-29.
- Holmes, C.H., Simpson, K.L., Okada, H., Okada, N., Wainwright, S.D., Purcell, D.F., and Houlihan, J.M. (1992). Complement regulatory proteins at the fetomaternal interface during human placental development: distribution of CD59 by comparison with membrane cofactor protein (CD46) and decay accelerating factor (CD55). *Eur J Immunol* 22, 1579-1585.
- Holling, T.M., Bergevoet, M.W., Wierda, R.J., van Eggermond, M.C., and van den Elsen, P.J. (2009). Genetic and epigenetic control of the major histocompatibility complex class Ib gene HLA-G in trophoblast cell lines. *Ann N Y Acad Sci* 1173, 538-544.
- Homer, H.A., Li, T.C., and Cooke, I.D. (2000). The septate uterus: a review of management and reproductive outcome. *Fertil Steril* 73, 1-14.
- Honig, A., Rieger, L., Kapp, M., Dietl, J., and Kammerer, U. (2005). Immunohistochemistry in human placental tissue--pitfalls of antigen detection. *J Histochem Cytochem* 53, 1413-1420.
- Honig, A., Rieger, L., Kapp, M., Sutterlin, M., Dietl, J., and Kammerer, U. (2004). Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance. *J Reprod Immunol* 61, 79-86.
- Hoskin, D.W., and Murgita, R.A. (1989). Specific maternal anti-fetal lymphoproliferative responses and their regulation by natural immunosuppressive factors. *Clin Exp Immunol* 76, 262-267.
- Houchins, J.P., Lanier, L.L., Niemi, E.C., Phillips, J.H., and Ryan, J.C. (1997). Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. *J Immunol* 158, 3603-3609.
- Houlihan, J.M., Biro, P.A., Fergar-Payne, A., Simpson, K.L., and Holmes, C.H. (1992). Evidence for the expression of non-HLA-A,-B,-C class I genes in the human fetal liver. *J Immunol* 149, 668-675.
- Houlihan, J.M., Biro, P.A., Harper, H.M., Jenkinson, H.J., and Holmes, C.H. (1995). The human amnion is a site of MHC class Ib expression: evidence for the expression of HLA-E and HLA-G. *J Immunol* 154, 5665-5674.

- Hsi, B.L., Hunt, J.S., and Atkinson, J.P. (1991). Differential expression of complement regulatory proteins on subpopulations of human trophoblast cells. *J Reprod Immunol* *19*, 209-223.
- Humphrey, K.E., Harrison, G.A., Cooper, D.W., Wilton, A.N., Brennecke, S.P., and Trudinger, B.J. (1995). HLA-G deletion polymorphism and pre-eclampsia/eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* *102*, 707-710.
- Hunt, J.S., Hsi, B.L., King, C.R., and Fishback, J.L. (1991). Detection of class I MHC mRNA in subpopulations of first trimester cytotrophoblast cells by in situ hybridization. *J Reprod Immunol* *19*, 315-323.
- Hunt, J.S., Jadhav, L., Chu, W., Geraghty, D.E., and Ober, C. (2000). Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* *183*, 682-688.
- Hunt, J.S., and Langat, D.L. (2009). HLA-G: a human pregnancy-related immunomodulator. *Curr Opin Pharmacol* *9*, 462-469.
- Hutter, H., Hammer, A., Blaschitz, A., Hartmann, M., Ebbesen, P., Dohr, G., Ziegler, A., and Uchanska-Ziegler, B. (1996). Expression of HLA class I molecules in human first trimester and term placenta trophoblast. *Cell Tissue Res* *286*, 439-447.
- Hviid, T.V. (2006). HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update* *12*, 209-232.
- Hviid, T.V., and Christiansen, O.B. (2005). Linkage disequilibrium between human leukocyte antigen (HLA) class II and HLA-G--possible implications for human reproduction and autoimmune disease. *Hum Immunol* *66*, 688-699.
- Hviid, T.V., Hylenius, S., Hoegh, A.M., Kruse, C., and Christiansen, O.B. (2002). HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* *60*, 122-132.
- Hviid, T.V., Hylenius, S., Lindhard, A., and Christiansen, O.B. (2004a). Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome. *Tissue Antigens* *64*, 66-69.
- Hviid, T.V., Hylenius, S., Rorbye, C., and Nielsen, L.G. (2003). HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics* *55*, 63-79.
- Hviid, T.V., Larsen, L.G., Hoegh, A.M., and Bzorek, M. (2004b). HLA-G expression in placenta in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Am J Reprod Immunol* *52*, 212-217.
- Hviid, T.V., Meldgaard, M., Sorensen, S., and Morling, N. (1997). Polymorphism of exon 3 of the HLA-G gene. *J Reprod Immunol* *35*, 31-42.
- Hviid, T.V., Moller, C., Sorensen, S., and Morling, N. (1998). Co-dominant expression of the HLA-G gene and various forms of alternatively spliced HLA-G mRNA in human first trimester trophoblast. *Hum Immunol* *59*, 87-98.

Hviid, T.V., Rizzo, R., Christiansen, O.B., Melchiorri, L., Lindhard, A., and Baricordi, O.R. (2004c). HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Immunogenetics* 56, 135-141.

Hviid, T.V., Sorensen, S., and Morling, N. (1999). Polymorphism in the regulatory region located more than 1.1 kilobases 5' to the start site of transcription, the promoter region, and exon 1 of the HLA-G gene. *Hum Immunol* 60, 1237-1244.

Hylenius, S., Andersen, A.M., Melbye, M., and Hviid, T.V. (2004). Association between HLA-G genotype and risk of pre-eclampsia: a case-control study using family triads. *Mol Hum Reprod* 10, 237-246.

Ishitani, A., and Geraghty, D.E. (1992). Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3947-3951.

Ishitani, A., Sageshima, N., Lee, N., Dorofeeva, N., Hatake, K., Marquardt, H., and Geraghty, D.E. (2003). Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J Immunol* 171, 1376-1384.

Ito, K., Tanaka, T., Tsutsumi, N., Obata, F., and Kashiwagi, N. (1999). Possible mechanisms of immunotherapy for maintaining pregnancy in recurrent spontaneous aborters: analysis of anti-idiotypic antibodies directed against autologous T-cell receptors. *Hum Reprod* 14, 650-655.

Juriscova, A., Casper, R.F., MacLusky, N.J., Mills, G.B., and Librach, C.L. (1996). HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 161-165.

Kaiser, B.K., Barahmand-Pour, F., Paulsene, W., Medley, S., Geraghty, D.E., and Strong, R.K. (2005). Interactions between NKG2x immunoreceptors and HLA-E ligands display overlapping affinities and thermodynamics. *J Immunol* 174, 2878-2884.

Kalousek, D.K., Pantzar, T., Tsai, M., and Paradise, B. (1993). Early spontaneous abortion: morphologic and karyotypic findings in 3,912 cases. *Birth Defects Orig Artic Ser* 29, 53-61.

Kalter, H. (1987). Diabetes and spontaneous abortion: a historical review. *Am J Obstet Gynecol* 156, 1243-1253.

Kamishikiryo, J., and Maenaka, K. (2009). HLA-G molecule. *Curr Pharm Des* 15, 3318-3324.

Kammerer, U., Eggert, A.O., Kapp, M., McLellan, A.D., Geijtenbeek, T.B., Dietl, J., van Kooyk, Y., and Kampgen, E. (2003). Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *Am J Pathol* 162, 887-896.

Kanai, T., Fujii, T., Keicho, N., Tokunaga, K., Yamashita, T., Hyodo, H., Miki, A., Unno, N., Kozuma, S., and Taketani, Y. (2001a). Polymorphism of human

leukocyte antigen-E gene in the Japanese population with or without recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol* 45, 168-173.

Kanai, T., Fujii, T., Unno, N., Yamashita, T., Hyodo, H., Miki, A., Hamai, Y., Kozuma, S., and Taketani, Y. (2001b). Human leukocyte antigen-G-expressing cells differently modulate the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua versus peripheral blood. *Am J Reprod Immunol* 45, 94-99.

Kapasi, K., Albert, S.E., Yie, S., Zavazava, N., and Librach, C.L. (2000). HLA-G has a concentration-dependent effect on the generation of an allo-CTL response. *Immunology* 101, 191-200.

Karhukorpi, J., Laitinen, T., and Tiilikainen, A.S. (1997). HLA-G polymorphism in Finnish couples with recurrent spontaneous miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol* 104, 1212-1214.

Khong, T.Y., Liddell, H.S., and Robertson, W.B. (1987). Defective haemochorial placentation as a cause of miscarriage: a preliminary study. *Br J Obstet Gynaecol* 94, 649-655.

King, A., Allan, D.S., Bowen, M., Powis, S.J., Joseph, S., Verma, S., Hiby, S.E., McMichael, A.J., Loke, Y.W., and Braud, V.M. (2000a). HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur J Immunol* 30, 1623-1631.

King, A., Birkby, C., and Loke, Y.W. (1989). Early human decidual cells exhibit NK activity against the K562 cell line but not against first trimester trophoblast. *Cell Immunol* 118, 337-344.

King, A., Boocock, C., Sharkey, A.M., Gardner, L., Beretta, A., Siccardi, A.G., and Loke, Y.W. (1996). Evidence for the expression of HLAA-C class I mRNA and protein by human first trimester trophoblast. *J Immunol* 156, 2068-2076.

King, A., Burrows, T.D., Hiby, S.E., Bowen, J.M., Joseph, S., Verma, S., Lim, P.B., Gardner, L., Le Bouteiller, P., Ziegler, A., *et al.* (2000b). Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast. *Placenta* 21, 376-387.

King, A., and Loke, Y.W. (1991). On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. *Immunol Today* 12, 432-435.

Kirszenbaum, M., Moreau, P., Gluckman, E., Dausset, J., and Carosella, E. (1994). An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4209-4213.

Knofler, M. (2010). Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol* 54, 269-280.

Kojima, K., Kanzaki, H., Iwai, M., Hatayama, H., Fujimoto, M., Narukawa, S., Higuchi, T., Kaneko, Y., Mori, T., and Fujita, J. (1995). Expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor in human placenta: a possible role for LIF in the growth and differentiation of trophoblasts. *Hum Reprod* 10, 1907-1911.

- Kokawa, K., Shikone, T., and Nakano, R. (1998). Apoptosis in human chorionic villi and decidua during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester. *Placenta* *19*, 21-26.
- Koller, B.H., Geraghty, D.E., Shimizu, Y., DeMars, R., and Orr, H.T. (1988). HLA-E. A novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. *J Immunol* *141*, 897-904.
- Kondera-Anasz, Z., Sikora, J., and Mielczarek-Palacz, A. (2004). Leukemia inhibitory factor: an important regulator of endometrial function. *Am J Reprod Immunol* *52*, 97-105.
- Kopcow, H.D., Allan, D.S., Chen, X., Rybalov, B., Andzelm, M.M., Ge, B., and Strominger, J.L. (2005). Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 15563-15568.
- Kotze, D.J., Hansen, P., Keskinetepe, L., Snowden, E., Sher, G., and Kruger, T. (2010). Embryo selection criteria based on morphology VERSUS the expression of a biochemical marker (sHLA-G) and a graduated embryo score: prediction of pregnancy outcome. *J Assist Reprod Genet* *27*, 309-316.
- Krensky, A.M., and Clayberger, C. (1996). Structure of HLA molecules and immunosuppressive effects of HLA derived peptides. *Int Rev Immunol* *13*, 173-185.
- Kruse, C., Steffensen, R., Varming, K., and Christiansen, O.B. (2004). A study of HLA-DR and -DQ alleles in 588 patients and 562 controls confirms that HLA-DRB1*03 is associated with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* *19*, 1215-1221.
- Kudo, Y., Hara, T., Katsuki, T., Toyofuku, A., Katsura, Y., Takikawa, O., Fujii, T., and Ohama, K. (2004). Mechanisms regulating the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase during decidualization of human endometrium. *Hum Reprod* *19*, 1222-1230.
- Kuersten, S., and Goodwin, E.B. (2003). The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet* *4*, 626-637.
- Kusumi, M., Yamashita, T., Fujii, T., Nagamatsu, T., Kozuma, S., and Taketani, Y. (2006). Expression patterns of lectin-like natural killer receptors, inhibitory CD94/NKG2A, and activating CD94/NKG2C on decidual CD56bright natural killer cells differ from those on peripheral CD56dim natural killer cells. *J Reprod Immunol* *70*, 33-42.
- Kutteh, W.H. (1996). Antiphospholipid antibody-associated recurrent pregnancy loss: treatment with heparin and low-dose aspirin is superior to low-dose aspirin alone. *Am J Obstet Gynecol* *174*, 1584-1589.
- Kwak, J.Y., Beer, A.E., Kim, S.H., and Mantouvalos, H.P. (1999). Immunopathology of the implantation site utilizing monoclonal antibodies to natural killer cells in women with recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol* *41*, 91-98.

- Lafon, M. (2005). Modulation of the immune response in the nervous system by rabies virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 289, 239-258.
- Lajoie, J., Jeanneau, A., Faucher, M.C., Moreau, P., and Roger, M. (2008). Characterisation of five novel HLA-G alleles with coding DNA base changes. *Tissue Antigens* 72, 502-504.
- Lanasa, M.C., Hogge, W.A., Kubik, C.J., Ness, R.B., Harger, J., Nagel, T., Prosen, T., Markovic, N., and Hoffman, E.P. (2001). A novel X chromosome-linked genetic cause of recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 185, 563-568.
- Lanier, L.L. (1998). NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16, 359-393.
- Lanier, L.L. (2003). Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 15, 308-314.
- Larsen, M.H., and Hviid, T.V. (2009). Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease. *Hum Immunol* 70, 1026-1034.
- Lash, G.E., Otun, H.A., Innes, B.A., Kirkley, M., De Oliveira, L., Searle, R.F., Robson, S.C., and Bulmer, J.N. (2006). Interferon-gamma inhibits extravillous trophoblast cell invasion by a mechanism that involves both changes in apoptosis and protease levels. *Faseb J* 20, 2512-2518.
- Laskarin, G., Kammerer, U., Rukavina, D., Thomson, A.W., Fernandez, N., and Blois, S.M. (2007). Antigen-presenting cells and materno-fetal tolerance: an emerging role for dendritic cells. *Am J Reprod Immunol* 58, 255-267.
- Lata, J.A., Tuan, R.S., Shepley, K.J., Mulligan, M.M., Jackson, L.G., and Smith, J.B. (1992). Localization of major histocompatibility complex class I and II mRNA in human first-trimester chorionic villi by in situ hybridization. *J Exp Med* 175, 1027-1032.
- Lauritsen, J.G. (1975). The significance of oral contraceptives in causing chromosome anomalies in spontaneous abortions. *Acta Obstet Gynecol Scand* 54, 261-264.
- Le Bouteiller, P., Solier, C., Proll, J., Aguerre-Girr, M., Fournel, S., and Lenfant, F. (1999). Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? *Hum Reprod Update* 5, 223-233.
- Le Discorde, M., Le Danff, C., Moreau, P., Rouas-Freiss, N., and Carosella, E.D. (2005). HLA-G*0105N null allele encodes functional HLA-G isoforms. *Biol Reprod* 73, 280-288.
- Le Discorde, M., Moreau, P., Sabatier, P., Legeais, J.M., and Carosella, E.D. (2003). Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Hum Immunol* 64, 1039-1044.
- Le Fricc, G., Gros, F., Sebti, Y., Guilloux, V., Pangault, C., Fauchet, R., and Amiot, L. (2004). Capacity of myeloid and plasmacytoid dendritic cells

especially at mature stage to express and secrete HLA-G molecules. *J Leukoc Biol* 76, 1125-1133.

Le Fricc, G., Laupeze, B., Fardel, O., Sebti, Y., Pangault, C., Guilloux, V., Beauplet, A., Fauchet, R., and Amiot, L. (2003). Soluble HLA-G inhibits human dendritic cell-triggered allogeneic T-cell proliferation without altering dendritic differentiation and maturation processes. *Hum Immunol* 64, 752-761.

Le Gal, F.A., Riteau, B., Sedlik, C., Khalil-Daher, I., Menier, C., Dausset, J., Guillet, J.G., Carosella, E.D., and Rouas-Freiss, N. (1999). HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 11, 1351-1356.

Lee, N., Goodlett, D.R., Ishitani, A., Marquardt, H., and Geraghty, D.E. (1998a). HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol* 160, 4951-4960.

Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., Lopez-Botet, M., and Geraghty, D.E. (1998b). HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5199-5204.

Lee, R.M., and Silver, R.M. (2000). Recurrent pregnancy loss: summary and clinical recommendations. *Semin Reprod Med* 18, 433-440.

Lefebvre, S., Berrih-Aknin, S., Adrian, F., Moreau, P., Poeta, S., Gourand, L., Dausset, J., Carosella, E.D., and Paul, P. (2001). A specific interferon (IFN)-stimulated response element of the distal HLA-G promoter binds IFN-regulatory factor 1 and mediates enhancement of this nonclassical class I gene by IFN-beta. *J Biol Chem* 276, 6133-6139.

Lefebvre, S., Moreau, P., Dausset, J., Carosella, E.D., and Paul, P. (1999). Downregulation of HLA class I gene transcription in choriocarcinoma cells is controlled by the proximal promoter element and can be reversed by CIITA. *Placenta* 20, 293-301.

LeMaoult, J., Caumartin, J., Daouya, M., Favier, B., Le Rond, S., Gonzalez, A., and Carosella, E.D. (2007). Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. *Blood* 109, 2040-2048.

LeMaoult, J., Krawice-Radanne, I., Dausset, J., and Carosella, E.D. (2004). HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7064-7069.

LeMaoult, J., Zafaranloo, K., Le Danff, C., and Carosella, E.D. (2005). HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *Faseb J* 19, 662-664.

Lenfant, F., Fort, M., Rodriguez, A.M., Campan, A., Aguerre-Girr, M., Sommer, E., Abbal, M., Ohayon, E., and Le Bouteiller, P. (1998). Absence of imprinting of HLA class Ia genes leads to co-expression of biparental alleles on term human trophoblast cells upon IFN-gamma induction. *Immunogenetics* 47, 297-304.

- Levine, J.S., Branch, D.W., and Rauch, J. (2002). The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 346, 752-763.
- Li, T.C., Makris, M., Tomsu, M., Tuckerman, E., and Laird, S. (2002a). Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Hum Reprod Update* 8, 463-481.
- Li, T.C., Tuckerman, E.M., and Laird, S.M. (2002b). Endometrial factors in recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 8, 43-52.
- Lila, N., Amrein, C., Guillemain, R., Chevalier, P., Latremouille, C., Fabiani, J.N., Dausset, J., Carosella, E.D., and Carpentier, A. (2002). Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *Circulation* 105, 1949-1954.
- Lila, N., Rouas-Freiss, N., Dausset, J., Carpentier, A., and Carosella, E.D. (2001). Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the allo-proliferative response: a CD4+ T cell regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12150-12155.
- Lim, K.H., Zhou, Y., Janatpour, M., McMaster, M., Bass, K., Chun, S.H., and Fisher, S.J. (1997). Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *Am J Pathol* 151, 1809-1818.
- Lin, A., Yan, W.H., Xu, H.H., Tang, L.J., Chen, X.F., Zhu, M., and Zhou, M.Y. (2007). 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene is a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in a Chinese Han population. *Tissue Antigens* 70, 427-431.
- Lin, Q.D. (1993). [Investigation of the association between autoantibodies and recurrent abortions]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 28, 674-677, 702.
- Lindaman, A., Dowden, A., and Zavazava, N. (2006). Soluble HLA-G molecules induce apoptosis in natural killer cells. *Am J Reprod Immunol* 56, 68-76.
- Liu, H.C., Jones, G.S., Jones, H.W., Jr., and Rosenwaks, Z. (1988). Mechanisms and factors of early pregnancy wastage in in vitro fertilization-embryo transfer patients. *Fertil Steril* 50, 95-101.
- Lodererova, A., Honsova, E., and Viklicky, O. (2003). Detection of HLA-G on human extravillous cytotrophoblast and skeletal muscle with a new monoclonal antibody MEM-G/1. *Folia Microbiol (Praha)* 48, 239-242.
- Loke, Y.W., and King, A. (1997). Immunology of human placental implantation: clinical implications of our current understanding. *Mol Med Today* 3, 153-159.
- Loke, Y.W., and King, A. (2000). Decidual natural-killer-cell interaction with trophoblast: cytolysis or cytokine production? *Biochem Soc Trans* 28, 196-198.
- Loke, Y.W., King, A., and Burrows, T.D. (1995). Decidua in human implantation. *Hum Reprod* 10 Suppl 2, 14-21.
- Lopez-Botet, M., and Bellon, T. (1999). Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Curr Opin Immunol* 11, 301-307.

- Lukassen, H.G., Joosten, I., van Cranenbroek, B., van Lierop, M.J., Bulten, J., Braat, D.D., and van der Meer, A. (2004). Hormonal stimulation for IVF treatment positively affects the CD56bright/CD56dim NK cell ratio of the endometrium during the window of implantation. *Mol Hum Reprod* 10, 513-520.
- Llano, M., Lee, N., Navarro, F., Garcia, P., Albar, J.P., Geraghty, D.E., and Lopez-Botet, M. (1998). HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. *Eur J Immunol* 28, 2854-2863.
- Mallet, V., Proll, J., Solier, C., Aguerre-Girr, M., DeRossi, M., Loke, Y.W., Lenfant, F., and Le Bouteiller, P. (2000). The full length HLA-G1 and no other alternative form of HLA-G is expressed at the cell surface of transfected cells. *Hum Immunol* 61, 212-224.
- Marchal-Bras-Goncalves, R., Rouas-Freiss, N., Connan, F., Choppin, J., Dausset, J., Carosella, E.D., Kirszenbaum, M., and Guillet, J. (2001). A soluble HLA-G protein that inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Transplant Proc* 33, 2355-2359.
- Martin, D.H., Koutsky, L., Eschenbach, D.A., Daling, J.R., Alexander, E.R., Benedetti, J.K., and Holmes, K.K. (1982). Prematurity and perinatal mortality in pregnancies complicated by maternal Chlamydia trachomatis infections. *Jama* 247, 1585-1588.
- Matte, C., Lacaille, J., Zijenah, L., Ward, B., and Roger, M. (2002). HLA-G exhibits low level of polymorphism in indigenous East Africans. *Hum Immunol* 63, 495-501.
- McMaster, M.T., Librach, C.L., Zhou, Y., Lim, K.H., Janatpour, M.J., DeMars, R., Kovats, S., Damsky, C., and Fisher, S.J. (1995). Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J Immunol* 154, 3771-3778.
- Medawar, P.B. (1953). Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. In *Symposium of Society for Experimental Biology*, pp 7:320-338
- Mendes-Junior, C.T., Castelli, E.C., Moreau, P., Simoes, A.L., and Donadi, E.A. (2010). Absence of the HLA-G*0113N allele in Amerindian populations from the Brazilian Amazon region. *Hum Immunol* 71, 428-431.
- Mendes-Junior, C.T., Castelli, E.C., Simoes, R.T., Simoes, A.L., and Donadi, E.A. (2007). HLA-G 14-bp polymorphism at exon 8 in Amerindian populations from the Brazilian Amazon. *Tissue Antigens* 69, 255-260.
- Menezes, Y., Elder, K., and Viville, S. (2006). Soluble HLA-G release by the human embryo: an interesting artefact? *Reprod Biomed Online* 13, 763-764.

- Menicucci, A., Noci, I., Fuzzi, B., Criscuoli, L., Scarselli, G., Baricordi, O., and Mattiuz, P.L. (1999). Non-classic sHLA class I in human oocyte culture medium. *Hum Immunol* *60*, 1054-1057.
- Menier, C., Riteau, B., Dausset, J., Carosella, E.D., and Rouas-Freiss, N. (2000). HLA-G truncated isoforms can substitute for HLA-G1 in fetal survival. *Hum Immunol* *61*, 1118-1125.
- Menier, C., Saez, B., Horejsi, V., Martinozzi, S., Krawice-Radanne, I., Bruel, S., Le Danff, C., Reboul, M., Hilgert, I., Rabreau, M., *et al.* (2003). Characterization of monoclonal antibodies recognizing HLA-G or HLA-E: new tools to analyze the expression of nonclassical HLA class I molecules. *Hum Immunol* *64*, 315-326.
- Messer, G., Zemmour, J., Orr, H.T., Parham, P., Weiss, E.H., and Girdlestone, J. (1992). HLA-J, a second inactivated class I HLA gene related to HLA-G and HLA-A. Implications for the evolution of the HLA-A-related genes. *J Immunol* *148*, 4043-4053.
- Miller, J.D., Weber, D.A., Ibegbu, C., Pohl, J., Altman, J.D., and Jensen, P.E. (2003). Analysis of HLA-E peptide-binding specificity and contact residues in bound peptide required for recognition by CD94/NKG2. *J Immunol* *171*, 1369-1375.
- Miwa, N., Hayakawa, S., Miyazaki, S., Myojo, S., Sasaki, Y., Sakai, M., Takikawa, O., and Saito, S. (2005). IDO expression on decidual and peripheral blood dendritic cells and monocytes/macrophages after treatment with CTLA-4 or interferon-gamma increase in normal pregnancy but decrease in spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod* *11*, 865-870.
- Miyazaki, S., Tsuda, H., Sakai, M., Hori, S., Sasaki, Y., Futatani, T., Miyawaki, T., and Saito, S. (2003). Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. *J Leukoc Biol* *74*, 514-522.
- Moffett, A., and Hiby, S.E. (2007). How Does the maternal immune system contribute to the development of pre-eclampsia? *Placenta* *28 Suppl A*, S51-56.
- Morales, P., Corell, A., Martinez-Laso, J., Martin-Villa, J.M., Varela, P., Paz-Artal, E., Allende, L.M., and Arnaiz-Villena, A. (1993). Three new HLA-G alleles and their linkage disequilibria with HLA-A. *Immunogenetics* *38*, 323-331.
- Morales, P.J., Pace, J.L., Platt, J.S., Phillips, T.A., Morgan, K., Fazleabas, A.T., and Hunt, J.S. (2003). Placental cell expression of HLA-G2 isoforms is limited to the invasive trophoblast phenotype. *J Immunol* *171*, 6215-6224.
- Moreau, P., Contu, L., Alba, F., Lai, S., Simoes, R., Orru, S., Carcassi, C., Roger, M., Rabreau, M., and Carosella, E.D. (2008). HLA-G gene polymorphism in human placentas: possible association of G*0106 allele with preeclampsia and miscarriage. *Biol Reprod* *79*, 459-467.

- Moreau, P., Dausset, J., Carosella, E.D., and Rouas-Freiss, N. (2002). Viewpoint on the functionality of the human leukocyte antigen-G null allele at the fetal-maternal interface. *Biol Reprod* 67, 1375-1378.
- Moreau, P., Flajollet, S., and Carosella, E.D. (2009). Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. *J Cell Mol Med* 13, 2973-2989.
- Moreau, P., Lefebvre, S., Gourand, L., Dausset, J., Carosella, E.D., and Paul, P. (1998a). Specific binding of nuclear factors to the HLA-G gene promoter correlates with a lack of HLA-G transcripts in first trimester human fetal liver. *Hum Immunol* 59, 751-757.
- Moreau, P., Mouillot, G., Rousseau, P., Marcou, C., Dausset, J., and Carosella, E.D. (2003). HLA-G gene repression is reversed by demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1191-1196.
- Moreau, P., Paul, P., Gourand, L., Prost, S., Dausset, J., Carosella, E., and Kirszenbaum, M. (1997). HLA-G gene transcriptional regulation in trophoblasts and blood cells: differential binding of nuclear factors to a regulatory element located 1.1 kb from exon 1. *Hum Immunol* 52, 41-46.
- Moreau, P., Paul, P., Rouas-Freiss, N., Kirszenbaum, M., Dausset, J., and Carosella, E.D. (1998b). 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* 40, 136-144.
- Moretta, A., Vitale, M., Bottino, C., Orengo, A.M., Morelli, L., Augugliaro, R., Barbaresi, M., Ciccone, E., and Moretta, L. (1993). P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med* 178, 597-604.
- Moscoso, J., Serrano-Vela, J.I., Perez-Saborido, B., Moreno, E., and Arnaiz-Villena, A. (2007). A novel HLA-G allele (HLA-G*0108) with an alpha-3 domain amino acid change. *Tissue Antigens* 70, 171-173.
- Murphy, S.P., Choi, J.C., and Holtz, R. (2004). Regulation of major histocompatibility complex class II gene expression in trophoblast cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2, 52.
- Naruse, K., Lash, G.E., Innes, B.A., Otun, H.A., Searle, R.F., Robson, S.C., and Bulmer, J.N. (2009). Localization of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitors for MMPs (TIMPs) in uterine natural killer cells in early human pregnancy. *Hum Reprod* 24, 553-561.
- Navarro, F., Llano, M., Bellon, T., Colonna, M., Geraghty, D.E., and Lopez-Botet, M. (1999). The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol* 29, 277-283.

- Noci, I., Fuzzi, B., Rizzo, R., Melchiorri, L., Criscuoli, L., Dabizzi, S., Biagiotti, R., Pellegrini, S., Menicucci, A., and Baricordi, O.R. (2005). Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod* 20, 138-146.
- Norwitz, E.R., Schust, D.J., and Fisher, S.J. (2001). Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 345, 1400-1408.
- Ntrivalas, E.I., Bowser, C.R., Kwak-Kim, J., Beaman, K.D., and Gilman-Sachs, A. (2005). Expression of killer immunoglobulin-like receptors on peripheral blood NK cell subsets of women with recurrent spontaneous abortions or implantation failures. *Am J Reprod Immunol* 53, 215-221.
- Ntrivalas, E.I., Kwak-Kim, J.Y., Gilman-Sachs, A., Chung-Bang, H., Ng, S.C., Beaman, K.D., Mantouvalos, H.P., and Beer, A.E. (2001). Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology. *Hum Reprod* 16, 855-861.
- Nuckel, H., Rebmann, V., Durig, J., Duhrsen, U., and Grosse-Wilde, H. (2005). HLA-G expression is associated with an unfavorable outcome and immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 105, 1694-1698.
- Nybo Andersen, A.M., Wohlfahrt, J., Christens, P., Olsen, J., and Melbye, M. (2000). Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *Bmj* 320, 1708-1712.
- O'Brien, M., McCarthy, T., Jenkins, D., Paul, P., Dausset, J., Carosella, E.D., and Moreau, P. (2001). Altered HLA-G transcription in pre-eclampsia is associated with allele specific inheritance: possible role of the HLA-G gene in susceptibility to the disease. *Cell Mol Life Sci* 58, 1943-1949.
- O'Callaghan, C.A., and Bell, J.I. (1998). Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Immunol Rev* 163, 129-138.
- Ober, C., Aldrich, C., Rosinsky, B., Robertson, A., Walker, M.A., Willadsen, S., Verp, M.S., Geraghty, D.E., and Hunt, J.S. (1998). HLA-G1 protein expression is not essential for fetal survival. *Placenta* 19, 127-132.
- Ober, C., Aldrich, C.L., Chervoneva, I., Billstrand, C., Rahimov, F., Gray, H.L., and Hyslop, T. (2003). Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. *Am J Hum Genet* 72, 1425-1435.
- Ober, C., Billstrand, C., Kuldane, S., and Tan, Z. (2006). The miscarriage-associated HLA-G -725G allele influences transcription rates in JEG-3 cells. *Hum Reprod* 21, 1743-1748.
- Ober, C., Rosinsky, B., Grimsley, C., van der Ven, K., Robertson, A., and Runge, A. (1996). Population genetic studies of HLA-G: allele frequencies and linkage disequilibrium with HLA-A1. *J Reprod Immunol* 32, 111-123.

- Ogasawara, M., Aoki, K., Okada, S., and Suzumori, K. (2000). Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil Steril* 73, 300-304.
- Ohya, K., Kondo, K., and Mizuno, S. (1990). Polymorphism in the human class I MHC locus HLA-E in Japanese. *Immunogenetics* 32, 205-209.
- Olivares, E.G., Munoz, R., Tejerizo, G., Montes, M.J., Gomez-Molina, F., and Abadia-Molina, A.C. (2002). Decidual lymphocytes of human spontaneous abortions induce apoptosis but not necrosis in JEG-3 extravillous trophoblast cells. *Biol Reprod* 67, 1211-1217.
- Ostojic, S., Dubanchet, S., Chaouat, G., Abdelkarim, M., Truyens, C., and Capron, F. (2003). Demonstration of the presence of IL-16, IL-17 and IL-18 at the murine fetomaternal interface during murine pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 49, 101-112.
- Pandey, M.K., and Agrawal, S. (2004). Induction of MLR-Bf and protection of fetal loss: a current double blind randomized trial of paternal lymphocyte immunization for women with recurrent spontaneous abortion. *Int Immunopharmacol* 4, 289-298.
- Pangault, C., Le Fricc, G., Caulet-Maugendre, S., Lena, H., Amiot, L., Guilloux, V., Onno, M., and Fauchet, R. (2002). Lung macrophages and dendritic cells express HLA-G molecules in pulmonary diseases. *Hum Immunol* 63, 83-90.
- Parham, P. (2004). NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy. *J Exp Med* 200, 951-955.
- Park, B., Lee, S., Kim, E., Chang, S., Jin, M., and Ahn, K. (2001). The truncated cytoplasmic tail of HLA-G serves a quality-control function in post-ER compartments. *Immunity* 15, 213-224.
- Park, G.M., Lee, S., Park, B., Kim, E., Shin, J., Cho, K., and Ahn, K. (2004). Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 606-611.
- Patel, R.N., Quack, K.C., Hill, J.A., and Schust, D.J. (2003). Expression of membrane-bound HLA-G at the maternal-fetal interface is not associated with pregnancy maintenance among patients with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 9, 551-557.
- Paul, P., Cabestre, F.A., Ibrahim, E.C., Lefebvre, S., Khalil-Daher, I., Vazeux, G., Quiles, R.M., Bermond, F., Dausset, J., and Carosella, E.D. (2000). Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol* 61, 1138-1149.
- Pende, D., Sivori, S., Accame, L., Pareti, L., Falco, M., Geraghty, D., Le Bouteiller, P., Moretta, L., and Moretta, A. (1997). HLA-G recognition by human natural killer cells. Involvement of CD94 both as inhibitory and as activating receptor complex. *Eur J Immunol* 27, 1875-1880.

- Peng, B., Zhang, L., Xing, A.Y., Hu, M., and Liu, S.Y. (2008). [The expression of human leukocyte antigen G and E on human first trimester placenta and its relationship with recurrent spontaneous abortion]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 39, 976-979.
- Penzes, M., Rajczyk, K., Gyodi, E., Reti, M., Feher, E., and Petranyi, G. (1999). HLA-G gene polymorphism in the normal population and in recurrent spontaneous abortion in Hungary. *Transplant Proc* 31, 1832-1833.
- Perez-Villar, J.J., Melero, I., Navarro, F., Carretero, M., Bellon, T., Llano, M., Colonna, M., Geraghty, D.E., and Lopez-Botet, M. (1997). The CD94/NKG2-A inhibitory receptor complex is involved in natural killer cell-mediated recognition of cells expressing HLA-G1. *J Immunol* 158, 5736-5743.
- Pessino, A., Sivori, S., Bottino, C., Malaspina, A., Morelli, L., Moretta, L., Biassoni, R., and Moretta, A. (1998). Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med* 188, 953-960.
- Petrie, E.J., Clements, C.S., Lin, J., Sullivan, L.C., Johnson, D., Huyton, T., Heroux, A., Hoare, H.L., Beddoe, T., Reid, H.H., *et al.* (2008). CD94-NKG2A recognition of human leukocyte antigen (HLA)-E bound to an HLA class I leader sequence. *J Exp Med* 205, 725-735.
- Pezeshki, K., Feldman, J., Stein, D.E., Lobel, S.M., and Grazi, R.V. (2000). Bleeding and spontaneous abortion after therapy for infertility. *Fertil Steril* 74, 504-508.
- Pfeiffer, K.A., Fimmers, R., Engels, G., van der Ven, H., and van der Ven, K. (2001). The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod* 7, 373-378.
- Pfeiffer, K.A., Rebmann, V., Passler, M., van der Ven, K., van der Ven, H., Krebs, D., and Grosse-Wilde, H. (2000). Soluble HLA levels in early pregnancy after in vitro fertilization. *Hum Immunol* 61, 559-564.
- Piccinni, M.P. (2006). T cells in normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 13, 840-844.
- Piccinni, M.P., Beloni, L., Livi, C., Maggi, E., Scarselli, G., and Romagnani, S. (1998). Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med* 4, 1020-1024.
- Pidoux, G., Gerbaud, P., Marpeau, O., Guibourdenche, J., Ferreira, F., Badet, J., Evain-Brion, D., and Frenedo, J.L. (2007). Human placental development is impaired by abnormal human chorionic gonadotropin signaling in trisomy 21 pregnancies. *Endocrinology* 148, 5403-5413.
- Pietra, G., Romagnani, C., Falco, M., Vitale, M., Castriconi, R., Pende, D., Millo, E., Anfossi, S., Biassoni, R., Moretta, L., *et al.* (2001). The analysis of the natural

killer-like activity of human cytolytic T lymphocytes revealed HLA-E as a novel target for TCR alpha/beta-mediated recognition. *Eur J Immunol* 31, 3687-3693.

Pijnenborg, R., Dixon, G., Robertson, W.B., and Brosens, I. (1980). Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta* 1, 3-19.

Poehlmann, T.G., Schaumann, A., Busch, S., Fitzgerald, J.S., Aguerre-Girr, M., Le Bouteiller, P., Schleussner, E., and Markert, U.R. (2006). Inhibition of term decidual NK cell cytotoxicity by soluble HLA-G1. *Am J Reprod Immunol* 56, 275-285.

Ponte, M., Cantoni, C., Biassoni, R., Tradori-Cappai, A., Bentivoglio, G., Vitale, C., Bertone, S., Moretta, A., Moretta, L., and Mingari, M.C. (1999). Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5674-5679.

Proll, J., Blaschitz, A., Hutter, H., and Dohr, G. (1999). First trimester human endovascular trophoblast cells express both HLA-C and HLA-G. *Am J Reprod Immunol* 42, 30-36.

Propst, A.M., and Hill, J.A., 3rd (2000). Anatomic factors associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 18, 341-350.

Puppo, F., Contini, P., Ghio, M., Brenci, S., Scudeletti, M., Filaci, G., Ferrone, S., and Indiveri, F. (2000). Soluble human MHC class I molecules induce soluble Fas ligand secretion and trigger apoptosis in activated CD8(+) Fas (CD95)(+) T lymphocytes. *Int Immunol* 12, 195-203.

Puppo, F., Contini, P., Ghio, M., and Indiveri, F. (2002). Soluble HLA class I molecules/CD8 ligation trigger apoptosis of CD8+ cells by Fas/Fas-ligand interaction. *ScientificWorldJournal* 2, 421-423.

Puppo, F., Costa, M., Contini, P., Brenci, S., Cevasco, E., Ghio, M., Norelli, R., Bensussan, A., Capitano, G.L., and Indiveri, F. (1999). Determination of soluble HLA-G and HLA-A, -B, and -C molecules in pregnancy. *Transplant Proc* 31, 1841-1843.

Pyo, C.W., Williams, L.M., Moore, Y., Hyodo, H., Li, S.S., Zhao, L.P., Sageshima, N., Ishitani, A., and Geraghty, D.E. (2006). HLA-E, HLA-F, and HLA-G polymorphism: genomic sequence defines haplotype structure and variation spanning the nonclassical class I genes. *Immunogenetics* 58, 241-251.

Qiu, L.H., and Lin, Q.D. (2004). [Study on the relationship between regulatory T cells and unexplained recurrent spontaneous abortion]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 39, 816-818.

Quenby, S., Bates, M., Doig, T., Brewster, J., Lewis-Jones, D.I., Johnson, P.M., and Vince, G. (1999). Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 14, 2386-2391.

- Rabreau, M., Rouas-Freiss, N., Landi, M., Le Danff, C., and Carosella, E.D. (2000). HLA-G expression in trophoblast cells is independent of embryonic development. *Hum Immunol* *61*, 1108-1112.
- Raghupathy, R. (1997). Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* *18*, 478-482.
- Raghupathy, R., Makhseed, M., Azizieh, F., Omu, A., Gupta, M., and Farhat, R. (2000). Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* *15*, 713-718.
- Rai, R., and Regan, L. (2006). Recurrent miscarriage. *Lancet* *368*, 601-611.
- Rajagopalan, S., Bryceson, Y.T., Kuppusamy, S.P., Geraghty, D.E., van der Meer, A., Joosten, I., and Long, E.O. (2006). Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol* *4*, e9.
- Rajagopalan, S., Fu, J., and Long, E.O. (2001). Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol* *167*, 1877-1881.
- Rajagopalan, S., and Long, E.O. (1999). A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med* *189*, 1093-1100.
- Raziel, A., Friedler, S., Schachter, M., Strassburger, D., Mordechai, E., and Ron-El, R. (2002). Increased early pregnancy loss in IVF patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* *17*, 107-110.
- Rebmann, V., Busemann, A., Lindemann, M., and Grosse-Wilde, H. (2003). Detection of HLA-G5 secreting cells. *Hum Immunol* *64*, 1017-1024.
- Rebmann, V., Lemaout, J., Rouas-Freiss, N., Carosella, E.D., and Grosse-Wilde, H. (2005). Report of the Wet Workshop for Quantification of Soluble HLA-G in Essen, 2004. *Hum Immunol* *66*, 853-863.
- Rebmann, V., Pfeiffer, K., Passler, M., Ferrone, S., Maier, S., Weiss, E., and Grosse-Wilde, H. (1999). Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid. *Tissue Antigens* *53*, 14-22.
- Rebmann, V., van der Ven, K., Passler, M., Pfeiffer, K., Krebs, D., and Grosse-Wilde, H. (2001). Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens* *57*, 15-21.
- Red-Horse, K., Rivera, J., Schanz, A., Zhou, Y., Winn, V., Kapidzic, M., Maltepe, E., Okazaki, K., Kochman, R., Vo, K.C., *et al.* (2006). Cytotrophoblast induction of arterial apoptosis and lymphangiogenesis in an in vivo model of human placentation. *J Clin Invest* *116*, 2643-2652.
- Regan, L., Braude, P.R., and Trembath, P.L. (1989). Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *Bmj* *299*, 541-545.

- Rieger, L., Hofmeister, V., Probe, C., Dietl, J., Weiss, E.H., Steck, T., and Kammerer, U. (2002). Th1- and Th2-like cytokine production by first trimester decidual large granular lymphocytes is influenced by HLA-G and HLA-E. *Mol Hum Reprod* 8, 255-261.
- Rieger, L., Honig, A., Sutterlin, M., Kapp, M., Dietl, J., Ruck, P., and Kammerer, U. (2004). Antigen-presenting cells in human endometrium during the menstrual cycle compared to early pregnancy. *J Soc Gynecol Investig* 11, 488-493.
- Ristich, V., Liang, S., Zhang, W., Wu, J., and Horuzsko, A. (2005). Tolerization of dendritic cells by HLA-G. *Eur J Immunol* 35, 1133-1142.
- Riteau, B., Menier, C., Khalil-Daher, I., Sedlik, C., Dausset, J., Rouas-Freiss, N., and Carosella, E.D. (1999). HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. *J Reprod Immunol* 43, 203-211.
- Riteau, B., Rouas-Freiss, N., Menier, C., Paul, P., Dausset, J., and Carosella, E.D. (2001). HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. *J Immunol* 166, 5018-5026.
- Ritson, A., and Bulmer, J.N. (1987). Extraction of leucocytes from human decidua. A comparison of dispersal techniques. *J Immunol Methods* 104, 231-236.
- Rizzo, R., Andersen, A.S., Lassen, M.R., Sorensen, H.C., Bergholt, T., Larsen, M.H., Melchiorri, L., Stignani, M., Baricordi, O.R., and Hviid, T.V. (2009). Soluble human leukocyte antigen-G isoforms in maternal plasma in early and late pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 62, 320-338.
- Rizzo, R., Hviid, T.V., Govoni, M., Padovan, M., Rubini, M., Melchiorri, L., Stignani, M., Carturan, S., Grappa, M.T., Fotinidi, M., *et al.* (2008). HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 71, 520-529.
- Rizzo, R., Hviid, T.V., Stignani, M., Balboni, A., Grappa, M.T., Melchiorri, L., and Baricordi, O.R. (2005a). The HLA-G genotype is associated with IL-10 levels in activated PBMCs. *Immunogenetics* 57, 172-181.
- Rizzo, R., Mapp, C.E., Melchiorri, L., Maestrelli, P., Visentin, A., Ferretti, S., Bononi, I., Miotto, D., and Baricordi, O.R. (2005b). Defective production of soluble HLA-G molecules by peripheral blood monocytes in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 115, 508-513.
- Rizzo, R., Rubini, M., Govoni, M., Padovan, M., Melchiorri, L., Stignani, M., Carturan, S., Ferretti, S., Trotta, F., and Baricordi, O.R. (2006). HLA-G 14-bp polymorphism regulates the methotrexate response in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenet Genomics* 16, 615-623.

- Robberecht, C., Schuddinck, V., Fryns, J.P., and Vermeesch, J.R. (2009). Diagnosis of miscarriages by molecular karyotyping: benefits and pitfalls. *Genet Med* *11*, 646-654.
- Romagnani, C., Pietra, G., Falco, M., Millo, E., Mazzarino, P., Biassoni, R., Moretta, A., Moretta, L., and Mingari, M.C. (2002). Identification of HLA-E-specific alloreactive T lymphocytes: a cell subset that undergoes preferential expansion in mixed lymphocyte culture and displays a broad cytolytic activity against allogeneic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 11328-11333.
- Romagnani, S. (2000). T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* *85*, 9-18; quiz 18, 21.
- Rouas-Freiss, N., Goncalves, R.M., Menier, C., Dausset, J., and Carosella, E.D. (1997a). Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 11520-11525.
- Rouas-Freiss, N., Marchal, R.E., Kirszenbaum, M., Dausset, J., and Carosella, E.D. (1997b). The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 5249-5254.
- Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Ferrone, S., and Carosella, E.D. (2005). HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res* *65*, 10139-10144.
- Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Menier, C., and Carosella, E.D. (2003). HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system. *Semin Cancer Biol* *13*, 325-336.
- Rousseau, P., Le Discorde, M., Mouillot, G., Marcou, C., Carosella, E.D., and Moreau, P. (2003). The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol* *64*, 1005-1010.
- Rousseau, P., Paul, P., O'Brien, M., Dausset, J., Carosella, E.D., and Moreau, P. (2000). The X1 box of HLA-G promoter is a target site for RFX and Sp1 factors. *Hum Immunol* *61*, 1132-1137.
- Roussev, R.G., Ng, S.C., and Coulam, C.B. (2007). Natural killer cell functional activity suppression by intravenous immunoglobulin, intralipid and soluble human leukocyte antigen-G. *Am J Reprod Immunol* *57*, 262-269.
- Rubio, C., Simon, C., Vidal, F., Rodrigo, L., Pehlivan, T., Remohi, J., and Pellicer, A. (2003). Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* *18*, 182-188.
- Rudstein-Svetlicky, N., Loewenthal, R., Horejsi, V., and Gazit, E. (2007). HLA-G levels in serum and plasma. *Tissue Antigens* *69 Suppl 1*, 140-142.
- Sageshima, N., Shobu, T., Awai, K., Hashimoto, H., Yamashita, M., Takeda, N., Odawara, Y., Nakanishi, M., Hatake, K., and Ishitani, A. (2007). Soluble HLA-G

- is absent from human embryo cultures: a reassessment of sHLA-G detection methods. *J Reprod Immunol* 75, 11-22.
- Saito, S., Nishikawa, K., Morii, T., Enomoto, M., Narita, N., Motoyoshi, K., and Ichijo, M. (1993). Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *Int Immunol* 5, 559-563.
- Saito, S., and Sakai, M. (2003). Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 59, 161-173.
- Saito, S., Sasaki, Y., and Sakai, M. (2005). CD4(+)CD25high regulatory T cells in human pregnancy. *J Reprod Immunol* 65, 111-120.
- Sala, F.G., Del Moral, P.M., Pizzato, N., Legrand-Abravanel, F., Le Bouteiller, P., and Lenfant, F. (2004). The HLA-G*0105N null allele induces cell surface expression of HLA-E molecule and promotes CD94/NKG2A-mediated recognition in JAR choriocarcinoma cell line. *Immunogenetics* 56, 617-624.
- Salerno-Goncalves, R., Fernandez-Vina, M., Lewinsohn, D.M., and Szein, M.B. (2004). Identification of a human HLA-E-restricted CD8+ T cell subset in volunteers immunized with Salmonella enterica serovar Typhi strain Ty21a typhoid vaccine. *J Immunol* 173, 5852-5862.
- Sargent, I.L. (2005). Does 'soluble' HLA-G really exist? Another twist to the tale. *Mol Hum Reprod* 11, 695-698.
- Sasaki, Y., Darmochwal-Kolarz, D., Suzuki, D., Sakai, M., Ito, M., Shima, T., Shiozaki, A., Rolinski, J., and Saito, S. (2007). Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol* 149, 139-145.
- Saunders, D.M., and Lancaster, P. (1989). The wider perinatal significance of the Australian in vitro fertilization data collection program. *Am J Perinatol* 6, 252-257.
- Scaife, P.J., Bulmer, J.N., Robson, S.C., Innes, B.A., and Searle, R.F. (2006). Effector activity of decidual CD8+ T lymphocytes in early human pregnancy. *Biol Reprod* 75, 562-567.
- Schieve, L.A., Tatham, L., Peterson, H.B., Toner, J., and Jeng, G. (2003). Spontaneous abortion among pregnancies conceived using assisted reproductive technology in the United States. *Obstet Gynecol* 101, 959-967.
- Sebire, N.J., Fox, H., Backos, M., Rai, R., Paterson, C., and Regan, L. (2002). Defective endovascular trophoblast invasion in primary antiphospholipid antibody syndrome-associated early pregnancy failure. *Hum Reprod* 17, 1067-1071.
- Seppala, M. (1985). The world collaborative report on in vitro fertilization and embryo replacement: current state of the art in January 1984. *Ann N Y Acad Sci* 442, 558-563.

- Shakhawat, A., Shaikly, V., Elzatma, E., Mavrakos, E., Jabeen, A., and Fernandez, N. (2010). Interaction between HLA-G and monocyte/macrophages in human pregnancy. *J Reprod Immunol* *85*, 40-46.
- Sharkey, A.M., King, A., Clark, D.E., Burrows, T.D., Jokhi, P.P., Charnock-Jones, D.S., Loke, Y.W., and Smith, S.K. (1999). Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy. *Biol Reprod* *60*, 355-364.
- Sheffer-Mimouni, G., Mashiach, S., Dor, J., Levran, D., and Seidman, D.S. (2002). Factors influencing the obstetric and perinatal outcome after oocyte donation. *Hum Reprod* *17*, 2636-2640.
- Sher, G., Keskinetepe, L., Nouriani, M., Roussev, R., and Batzofin, J. (2004). Expression of sHLA-G in supernatants of individually cultured 46-h embryos: a potentially valuable indicator of 'embryo competency' and IVF outcome. *Reprod Biomed Online* *9*, 74-78.
- Shiroishi, M., Kuroki, K., Ose, T., Rasubala, L., Shiratori, I., Arase, H., Tsumoto, K., Kumagai, I., Kohda, D., and Maenaka, K. (2006). Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and crystal structure of disulfide-linked HLA-G dimer. *J Biol Chem* *281*, 10439-10447.
- Shiroishi, M., Tsumoto, K., Amano, K., Shirakihara, Y., Colonna, M., Braud, V.M., Allan, D.S., Makadzange, A., Rowland-Jones, S., Willcox, B., *et al.* (2003). Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 8856-8861.
- Shokry, M., Omran, O.M., Hassan, H.I., Elsedfy, G.O., and Hussein, M.R. (2009). Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human trophoblasts of normal and preeclamptic placentas: preliminary findings. *Exp Mol Pathol* *87*, 219-225.
- Singer, G., Rebmann, V., Chen, Y.C., Liu, H.T., Ali, S.Z., Reinsberg, J., McMaster, M.T., Pfeiffer, K., Chan, D.W., Wardelmann, E., *et al.* (2003). HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites. *Clin Cancer Res* *9*, 4460-4464.
- Sipak-Szmigiel, O., Cybulski, C., Lubinski, J., and Ronin-Walknowska, E. (2008). HLA-G polymorphism in a Polish population and reproductive failure. *Tissue Antigens* *71*, 67-71.
- Sipak-Szmigiel, O., Ronin-Walknowska, E., Cybulski, C., Plonka, T., and Lubinski, J. (2007). Antigens HLA-G, sHLA-G and sHLA-class I in reproductive failure. *Folia Histochem Cytobiol* *45 Suppl 1*, S137-141.
- Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (1997). p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med* *186*, 1129-1136.

- Soderstrom, K., Corliss, B., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1997). CD94/NKG2 is the predominant inhibitory receptor involved in recognition of HLA-G by decidual and peripheral blood NK cells. *J Immunol* *159*, 1072-1075.
- Solier, C., Aguerre-Girr, M., Lenfant, F., Campan, A., Berrebi, A., Rebmann, V., Grosse-Wilde, H., and Le Bouteiller, P. (2002). Secretion of pro-apoptotic intron 4-retaining soluble HLA-G1 by human villous trophoblast. *Eur J Immunol* *32*, 3576-3586.
- Solier, C., Mallet, V., Lenfant, F., Bertrand, A., Huchénq, A., and Le Bouteiller, P. (2001). HLA-G unique promoter region: functional implications. *Immunogenetics* *53*, 617-625.
- Somerset, D.A., Zheng, Y., Kilby, M.D., Sansom, D.M., and Drayson, M.T. (2004). Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology* *112*, 38-43.
- Spaggiari, G.M., Contini, P., Carosio, R., Arvigo, M., Ghio, M., Oddone, D., Dondero, A., Zocchi, M.R., Puppo, F., Indiveri, F., *et al.* (2002a). Soluble HLA class I molecules induce natural killer cell apoptosis through the engagement of CD8: evidence for a negative regulation exerted by members of the inhibitory receptor superfamily. *Blood* *99*, 1706-1714.
- Spaggiari, G.M., Contini, P., Dondero, A., Carosio, R., Puppo, F., Indiveri, F., Zocchi, M.R., and Poggi, A. (2002b). Soluble HLA class I induces NK cell apoptosis upon the engagement of killer-activating HLA class I receptors through FasL-Fas interaction. *Blood* *100*, 4098-4107.
- Starkey, P.M., Sargent, I.L., and Redman, C.W. (1988). Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. *Immunology* *65*, 129-134.
- Steer, C., Campbell, S., Davies, M., Mason, B., and Collins, W. (1989). Spontaneous abortion rates after natural and assisted conception. *Bmj* *299*, 1317-1318.
- Steffensen, R., Christiansen, O.B., Bennett, E.P., and Jersild, C. (1998). HLA-E polymorphism in patients with recurrent spontaneous abortion. *Tissue Antigens* *52*, 569-572.
- Steril, F. (1995). Pregnancies and births resulting from in vitro fertilization: French national registry, analysis of data 1986 to 1990. FIVNAT (French In Vitro National). *Fertil Steril* *64*, 746-756.
- Stern, J.J., Dorfmann, A.D., Gutierrez-Najar, A.J., Cerrillo, M., and Coulam, C.B. (1996). Frequency of abnormal karyotypes among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* *65*, 250-253.
- Suarez, M.B., Morales, P., Castro, M.J., Fernandez, V., Varela, P., Alvarez, M., Martinez-Laso, J., and Arnaiz-Villena, A. (1997). A new HLA-G allele (HLA-

- G*0105N) and its distribution in the Spanish population. *Immunogenetics* 45, 464-465.
- Sugiura-Ogasawara, M., Furukawa, T.A., Nakano, Y., Hori, S., Aoki, K., and Kitamura, T. (2002). Depression as a potential causal factor in subsequent miscarriage in recurrent spontaneous aborters. *Hum Reprod* 17, 2580-2584.
- Sullivan, A.E., Silver, R.M., LaCoursiere, D.Y., Porter, T.F., and Branch, D.W. (2004). Recurrent fetal aneuploidy and recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol* 104, 784-788.
- Sullivan, L.C., Clements, C.S., Beddoe, T., Johnson, D., Hoare, H.L., Lin, J., Huyton, T., Hopkins, E.J., Reid, H.H., Wilce, M.C., *et al.* (2007). The heterodimeric assembly of the CD94-NKG2 receptor family and implications for human leukocyte antigen-E recognition. *Immunity* 27, 900-911.
- Sullivan, L.C., Clements, C.S., Rossjohn, J., and Brooks, A.G. (2008). The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. *Tissue Antigens*.
- Suryanarayana, V., Rao, L., Kanakavalli, M., Padmalatha, V., Raseswari, T., Deenadayal, M., and Singh, L. (2008). Association between novel HLA-G genotypes and risk of recurrent miscarriages: a case-control study in a South Indian population. *Reprod Sci* 15, 817-824.
- Taglauer, E.S., Adams Waldorf, K.M., and Petroff, M.G. (2010). The hidden maternal-fetal interface: events involving the lymphoid organs in maternal-fetal tolerance. *Int J Dev Biol* 54, 421-430.
- Tan, Z., Randall, G., Fan, J., Camoretti-Mercado, B., Brockman-Schneider, R., Pan, L., Solway, J., Gern, J.E., Lemanske, R.F., Nicolae, D., *et al.* (2007). Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet* 81, 829-834.
- Tan, Z., Shon, A.M., and Ober, C. (2005). Evidence of balancing selection at the HLA-G promoter region. *Hum Mol Genet* 14, 3619-3628.
- Tarrade, A., Lai Kuen, R., Malassine, A., Tricottet, V., Blain, P., Vidaud, M., and Evain-Brion, D. (2001). Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab Invest* 81, 1199-1211.
- Tilburgs, T., Roelen, D.L., van der Mast, B.J., de Groot-Swings, G.M., Kleijburg, C., Scherjon, S.A., and Claas, F.H. (2008). Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4+CD25bright regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy. *J Immunol* 180, 5737-5745.
- Tirado-Gonzalez, I., Munoz-Fernandez, R., Blanco, O., Leno-Duran, E., Abadia-Molina, A.C., and Olivares, E.G. (2010). Reduced proportion of decidual DC-SIGN+ cells in human spontaneous abortion. *Placenta* 31, 1019-1022.
- Tomasec, P., Braud, V.M., Rickards, C., Powell, M.B., McSharry, B.P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L.K., McMichael, A.J., and Wilkinson, G.W.

- (2000). Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 287, 1031.
- Toncheva, D., and Tzoneva, M. (1985). Prenatal selection and fetal development disturbances occurring in carriers of G6PD deficiency. *Hum Genet* 69, 88.
- Tripathi, P., Abbas, A., Naik, S., and Agrawal, S. (2004). Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy. *Tissue Antigens* 64, 706-710.
- Tripathi, P., Naik, S., and Agrawal, S. (2006). HLA-E and immunobiology of pregnancy. *Tissue Antigens* 67, 207-213.
- Tuckerman, E., Laird, S.M., Prakash, A., and Li, T.C. (2007). Prognostic value of the measurement of uterine natural killer cells in the endometrium of women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 22, 2208-2213.
- Tulppala, M., Stenman, U.H., Cacciatori, B., and Ylikorkala, O. (1993). Polycystic ovaries and levels of gonadotrophins and androgens in recurrent miscarriage: prospective study in 50 women. *Br J Obstet Gynaecol* 100, 348-352.
- Ulbrecht, M., Honka, T., Person, S., Johnson, J.P., and Weiss, E.H. (1992). The HLA-E gene encodes two differentially regulated transcripts and a cell surface protein. *J Immunol* 149, 2945-2953.
- Ulbrecht, M., Maier, S., Hofmeister, V., Falk, C.S., Brooks, A.G., McMaster, M.T., and Weiss, E.H. (2004). Truncated HLA-G isoforms are retained in the endoplasmic reticulum and insufficiently provide HLA-E ligands. *Hum Immunol* 65, 200-208.
- Vales-Gomez, M., Reyburn, H., and Strominger, J. (2000). Interaction between the human NK receptors and their ligands. *Crit Rev Immunol* 20, 223-244.
- Vales-Gomez, M., Reyburn, H.T., Erskine, R.A., Lopez-Botet, M., and Strominger, J.L. (1999). Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *Embo J* 18, 4250-4260.
- van der Hoorn, M.L., Lashley, E.E., Bianchi, D.W., Claas, F.H., Schonkeren, C.M., and Scherjon, S.A. (2010). Clinical and immunologic aspects of egg donation pregnancies: a systematic review. *Hum Reprod Update* 16, 704-712.
- van der Meer, A., Lukassen, H.G., van Cranenbroek, B., Weiss, E.H., Braat, D.D., van Lierop, M.J., and Joosten, I. (2007). Soluble HLA-G promotes Th1-type cytokine production by cytokine-activated uterine and peripheral natural killer cells. *Mol Hum Reprod* 13, 123-133.
- van der Meer, A., Lukassen, H.G., van Lierop, M.J., Wijnands, F., Mosselman, S., Braat, D.D., and Joosten, I. (2004). Membrane-bound HLA-G activates proliferation and interferon-gamma production by uterine natural killer cells. *Mol Hum Reprod* 10, 189-195.

- van der Ven, K., and Ober, C. (1994). HLA-G polymorphisms in African Americans. *J Immunol* *153*, 5628-5633.
- van der Ven, K., Pfeiffer, K., and Skrablin, S. (2000). HLA-G polymorphisms and molecule function--questions and more questions--a review. *Placenta* *21 Suppl A*, S86-92.
- van der Ven, K., Skrablin, S., Ober, C., and Krebs, D. (1998). HLA-G polymorphisms: ethnic differences and implications for potential molecule function. *Am J Reprod Immunol* *40*, 145-157.
- Van Lierop, M.J., Wijnands, F., Loke, Y.W., Emmer, P.M., Lukassen, H.G., Braat, D.D., van der Meer, A., Mosselman, S., and Joosten, I. (2002). Detection of HLA-G by a specific sandwich ELISA using monoclonal antibodies G233 and 56B. *Mol Hum Reprod* *8*, 776-784.
- van Mourik, M.S., Macklon, N.S., and Heijnen, C.J. (2009). Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *J Leukoc Biol* *85*, 4-19.
- van Wijk, I.J., Griffioen, S., Tjoa, M.L., Mulders, M.A., van Vugt, J.M., Loke, Y.W., and Oudejans, C.B. (2001). HLA-G expression in trophoblast cells circulating in maternal peripheral blood during early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* *184*, 991-997.
- Varla-Leftherioti, M., Spyropoulou-Vlachou, M., Niokou, D., Keramitsoglou, T., Darlamitsou, A., Tsekoura, C., Papadimitropoulos, M., Lepage, V., Balafoutas, C., and Stavropoulos-Giokas, C. (2003). Natural killer (NK) cell receptors' repertoire in couples with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* *49*, 183-191.
- Vassiliadou, N., and Bulmer, J.N. (1996). Immunohistochemical evidence for increased numbers of 'classic' CD57+ natural killer cells in the endometrium of women suffering spontaneous early pregnancy loss. *Hum Reprod* *11*, 1569-1574.
- Vassiliadou, N., Searle, R.F., and Bulmer, J.N. (1999). Elevated expression of activation molecules by decidual lymphocytes in women suffering spontaneous early pregnancy loss. *Hum Reprod* *14*, 1194-1200.
- Veit, T.D., Vianna, P., Scheibel, I., Brenol, C.V., Brenol, J.C., Xavier, R.M., Delgado-Canedo, A., Gutierrez, J.E., Brandalize, A.P., Schuler-Faccini, L., *et al.* (2008). Association of the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism with juvenile idiopathic arthritis and rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* *71*, 440-446.
- Vianna, P., Dalmaz, C.A., Veit, T.D., Tedoldi, C., Roisenberg, I., and Chies, J.A. (2007). Immunogenetics of pregnancy: role of a 14-bp deletion in the maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic Brazilian women. *Hum Immunol* *68*, 668-674.

- Vince, G.S., and Johnson, P.M. (1995). Materno-fetal immunobiology in normal pregnancy and its possible failure in recurrent spontaneous abortion? *Hum Reprod 10 Suppl 2*, 107-113.
- Vince, G.S., and Johnson, P.M. (2000). Leucocyte populations and cytokine regulation in human uteroplacental tissues. *Biochem Soc Trans 28*, 191-195.
- Vince, G.S., Starkey, P.M., Jackson, M.C., Sargent, I.L., and Redman, C.W. (1990). Flow cytometric characterisation of cell populations in human pregnancy decidua and isolation of decidual macrophages. *J Immunol Methods 132*, 181-189.
- Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., and Moretta, A. (1998). NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med 187*, 2065-2072.
- Wada, H., Matsumoto, N., Maenaka, K., Suzuki, K., and Yamamoto, K. (2004). The inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct sets of HLA-E residues. *Eur J Immunol 34*, 81-90.
- Waldmann, H., Graca, L., Cobbold, S., Adams, E., Tone, M., and Tone, Y. (2004). Regulatory T cells and organ transplantation. *Semin Immunol 16*, 119-126.
- Wang, H., Zhang, M., Soda, K., Sama, A., and Tracey, K.J. (1997). Fetuin protects the fetus from TNF. *Lancet 350*, 861-862.
- Wang, J.X., Norman, R.J., and Wilcox, A.J. (2004). Incidence of spontaneous abortion among pregnancies produced by assisted reproductive technology. *Hum Reprod 19*, 272-277.
- Wang, T., Hamann, W., and Hartge, R. (1983). Structural aspects of a placenta from a case of maternal acute lymphatic leukaemia. *Placenta 4*, 185-195.
- Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L., and Mosmann, T.R. (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today 14*, 353-356.
- Wei, X.H., and Orr, H.T. (1990). Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Hum Immunol 29*, 131-142.
- Wettasinghe, T.K., Jayasekara, R.W., and Dissanayake, V.H. (2010). Y chromosome microdeletions are not associated with spontaneous recurrent pregnancy loss in a Sinhalese population in Sri Lanka. *Hum Reprod 25*, 3152-3156.
- Whitelaw, P.F., and Croy, B.A. (1996). Granulated lymphocytes of pregnancy. *Placenta 17*, 533-543.

- Wiendl, H., Mitsdoerffer, M., Hofmeister, V., Wischhusen, J., Bornemann, A., Meyermann, R., Weiss, E.H., Melms, A., and Weller, M. (2002). A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J Immunol* *168*, 4772-4780.
- Wiggins, D.A., and Main, E. (2005). Outcomes of pregnancies achieved by donor egg in vitro fertilization--a comparison with standard in vitro fertilization pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* *192*, 2002-2006; discussion 2006-2008.
- Wilcox, A.J., Weinberg, C.R., O'Connor, J.F., Baird, D.D., Schlatterer, J.P., Canfield, R.E., Armstrong, E.G., and Nisula, B.C. (1988). Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* *319*, 189-194.
- Williams, Z., Zepf, D., Longtine, J., Anchan, R., Broadman, B., Missmer, S.A., and Hornstein, M.D. (2009). Foreign fetal cells persist in the maternal circulation. *Fertil Steril* *91*, 2593-2595.
- Xue, S., Yang, J., Yao, F., Xu, L., and Fan, L. (2007). Recurrent spontaneous abortions patients have more -14 bp/+14 bp heterozygotes in the 3'UT region of the HLA-G gene in a Chinese Han population. *Tissue Antigens* *69 Suppl 1*, 153-155.
- Yamada, H., Atsumi, T., Kato, E.H., Shimada, S., Morikawa, M., and Minakami, H. (2003). Prevalence of diverse antiphospholipid antibodies in women with recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* *80*, 1276-1278.
- Yamashita, T., Fujii, T., Tokunaga, K., Tadokoro, K., Hamai, Y., Miki, A., Kozuma, S., Juji, T., and Taketani, Y. (1999). Analysis of human leukocyte antigen-G polymorphism including intron 4 in Japanese couples with habitual abortion. *Am J Reprod Immunol* *41*, 159-163.
- Yamashita, T., Fujii, T., Watanabe, Y., Tokunaga, K., Tadokoro, K., Juji, T., and Taketani, Y. (1996). HLA-G gene polymorphism in a Japanese population. *Immunogenetics* *44*, 186-191.
- Yan, W.H., and Fan, L.A. (2005). Residues Met76 and Gln79 in HLA-G alpha1 domain involve in KIR2DL4 recognition. *Cell Res* *15*, 176-182.
- Yan, W.H., Fan, L.A., Yang, J.Q., Xu, L.D., Ge, Y., and Yao, F.J. (2006a). HLA-G polymorphism in a Chinese Han population with recurrent spontaneous abortion. *Int J Immunogenet* *33*, 55-58.
- Yan, W.H., Lin, A., Chen, X.J., Dai, M.Z., Gan, L.H., Zhou, M.Y., Zhu, M., Shi, W.W., and Liu, J.M. (2006b). Association of the maternal 14-bp insertion polymorphism in the HLA-G gene in women with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* *68*, 521-523.
- Yang, H., Qiu, L., Chen, G., Ye, Z., Lu, C., and Lin, Q. (2008). Proportional change of CD4+CD25+ regulatory T cells in decidua and peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil Steril* *89*, 656-661.

- Yang, Y., Chu, W., Geraghty, D.E., and Hunt, J.S. (1996). Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by IFN-gamma. *J Immunol* *156*, 4224-4231.
- Yang, Y., Geraghty, D.E., and Hunt, J.S. (1995). Cytokine regulation of HLA-G expression in human trophoblast cell lines. *J Reprod Immunol* *29*, 179-195.
- Yelavarthi, K.K., Fishback, J.L., and Hunt, J.S. (1991). Analysis of HLA-G mRNA in human placental and extraplacental membrane cells by in situ hybridization. *J Immunol* *146*, 2847-2854.
- Yie, S.M., Balakier, H., Motamedi, G., and Librach, C.L. (2005a). Secretion of human leukocyte antigen-G by human embryos is associated with a higher in vitro fertilization pregnancy rate. *Fertil Steril* *83*, 30-36.
- Yie, S.M., Li, L.H., Li, Y.M., and Librach, C. (2004). HLA-G protein concentrations in maternal serum and placental tissue are decreased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* *191*, 525-529.
- Yie, S.M., Li, L.H., Xiao, R., and Librach, C.L. (2008). A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with preeclampsia. *Mol Hum Reprod* *14*, 649-653.
- Yie, S.M., Taylor, R.N., and Librach, C. (2005b). Low plasma HLA-G protein concentrations in early gestation indicate the development of preeclampsia later in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* *193*, 204-208.
- Yokoyama, W.M. (1997). The mother-child union: the case of missing-self and protection of the fetus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 5998-6000.
- Zenclussen, A.C. (2006). Regulatory T cells in pregnancy. *Springer Semin Immunopathol* *28*, 31-39.
- Zenclussen, A.C., Gerlof, K., Zenclussen, M.L., Sollwedel, A., Bertoja, A.Z., Ritter, T., Kotsch, K., Leber, J., and Volk, H.D. (2005). Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *Am J Pathol* *166*, 811-822.
- Zhang, M., Caragine, T., Wang, H., Cohen, P.S., Botchkina, G., Soda, K., Bianchi, M., Ulrich, P., Cerami, A., Sherry, B., *et al.* (1997). Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *J Exp Med* *185*, 1759-1768.
- Zhu, Y., Huo, Z., Lai, J., Li, S., Jiao, H., Dang, J., and Jin, C. (2010). Case-control study of a HLA-G 14-bp insertion-deletion polymorphism in women with recurrent miscarriages. *Scand J Immunol* *71*, 52-54.