

Trabajo Original

Participación de factores proteicos inducidos por progesterona en la prevención del aborto séptico

Participation of progesterone-regulated immunomodulatory factors in a murine model of lipopolysaccharide-induced pregnancy loss

Dra. Julieta Aisemberg, Dra. Claudia A. Vercelli, Dra. Silvia Billi, Dr. Manuel L. Wolfson, Dra. Ana P. Domínguez Rubio, Dra. Ana M. Franchi

Laboratorio de Fisiopatología de la preñez y el parto

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO), CONICET-UBA

Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires

Paraguay 2155, piso 16 (C1121ABG) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

E-mail: jaisemberg@yahoo.com.ar

RESUMEN

La pérdida precoz del embarazo es la complicación más frecuente de la gestación y en la mayoría de los casos, no se puede prevenir. Se sabe que las infecciones del tracto genital inducen aborto y parto prematuro, pero los mecanismos involucrados no están aún dilucidados. Hemos desarrollado un modelo de aborto mediante la administración de lipopolisacárido (LPS) a hembras preñadas Balb/C de día 7 de gestación. El tratamiento produce reabsorción embrionaria (RE) completa en 24 h, con la posterior expulsión de los restos de fetos reabsorbidos. Demostramos que en este modelo de aborto, están implicados el sistema nitrérgico y las prostaglandinas. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con progesterona, hormona que se encuentra disminuida en los animales tratados con la endotoxina, previene la RE. Caracterizamos en la interfase materno-fetal la expresión de glicodelina y LIF (factor inhibidor de leucemia), ambos reconocidos inmunomoduladores inducidos por progesterona. Obtuvimos una secuencia parcial del ARNm de la glicodelina murina y observamos inhibición de su expresión proteica por LPS. La progesterona indujo el ARNm de LIF in vitro y es parte del mecanismo antiinflamatorio uterino, ya que reduce el incremento en los niveles de prostaglandinas y óxido nítrico inducidos por LPS. En este último caso, el efecto protector ejercido por la progesterona parece estar mediado por LIF. Estos resultados demuestran la importancia de la progesterona durante la gestación, por sus funciones endocrinas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras, y la posible participación de LIF y glicodelina en el aborto inducido por sepsis.

Palabras clave: LPS, progesterona, LIF, glicodelina, aborto, inflamación.

ABSTRACT

Lipopolysaccharide (LPS) administration to mice on day 7 of pregnancy led to 100% of embryonic resorption (ER) after 24 h. Besides its endocrine effects, progesterone acts as an immunosteroid. Some immunological effects are mediated by peptidic factors such as leukemia inhibitory factor (LIF) and glycodeilin (Gd). Gd has immunosuppressive and morphogenic properties and is the major decidual progesterone-regulated glycoprotein. Our aim was to evaluate the involvement of progesterone, LIF and Gd in the mechanism of LPS-induced ER. Female mice were treated with either LPS or vehicle to evaluate ER percentages. Serum progesterone was quantified and tissues were removed to determine LIF and Gd expression. In addition, animals were treated with progesterone to evaluate resorption rates. LIF expression, prostaglandin E₂ (PGE₂) and nitric oxide (NO) levels were determined in uterine cultures incubated with and without LPS, progesterone, LIF and LIF antibody. Progesterone levels decreased after LPS treatment and hormone supplementation prevented ER. Gd expression was significantly decreased in decidual tissue by LPS treatment and we showed for the first time a predictive mRNA sequence which is homolog to the human Gd. Progesterone incubation increased LIF mRNA expression as compared to LIF production by control and LPS uterine explants. Progesterone and exogenous LIF blocked LPS-induced increase of proinflammatory molecules, NO and PGE₂. Also, we found that endogenous uterine LIF participates in progesterone effects preventing NO increase. Our observations support the critical contribution of progesterone to successful pregnancy and its possible therapeutic application for prevention of reproductive failure associated with inflammatory disorders.

Introducción

El término aborto, desde el punto de vista gineco-obstétrico, hace referencia a la interrupción de un embarazo en desarrollo antes de la semana veinte. Esto implica la pérdida gestacional previa al desarrollo de un feto capacitado para la vida extrauterina en forma independiente.

El hecho de que un feto que posee tanto antígenos maternos como paternos pueda desarrollarse durante nueve meses en el vientre materno pone en evidencia la existencia de mecanismos protectores muy precisos que evitan el rechazo y que permiten que la madre continúe con la homeostasis perfecta de su sistema inmune. Dentro de las etiologías conocidas del aborto, están las fallas a nivel inmunológico; el síndrome antifosfolípídico y el lupus eritematoso sistémico son un ejemplo de ello. Otra causa importante son las infecciones, que inducen aborto y parto prematuro.

Se ha reportado que la pérdida precoz del embarazo es la complicación más frecuente de la gestación. El aborto espontáneo ocurre en el 20% de todos los embarazos comprobados. Sin embargo, las estadísticas importantes no incluyen los casos subclínicos. La realidad en cuanto a pérdida de embarazos trasciende lo observado clínicamente ya que muchas mujeres nunca llegan a saber que han tenido un aborto. Teniendo esto en cuenta, las tasas de aborto espontáneo pueden estar cerca del 40% o 50%. Datos epidemiológicos indican que el riesgo de un nuevo aborto después de uno espontáneo es del 24%, pero asciende al 40% después de 4 abortos consecutivos.

La ausencia de una terapéutica adecuada para el aborto impone la necesidad de **determinar los mecanismos involucrados en su desencadenamiento y desarrollo**, como también intentar definir más claramente la inmunomodulación tanto en embarazos normales como patológicos. Conocer cómo puede ser la aceptación o el rechazo del embrión concebido por la futura mamá, determinar qué infecciones y cómo provocan la pérdida del embrión es algo esencial.

Algunos estudios han demostrado que el aborto por desbalance inmunológico es dependiente de factores ambientales como los lipopolisacáridos bacterianos (LPS)^{1,2}. Este componente de la pared de las bacterias gramnegativas es causante de muerte fetal y aborto en animales³ y está implicado en el mecanismo de parto pretérmino en humanos^{4,5}.

Está extensamente descrito que el LPS induce una marcada respuesta inflamatoria mediada primariamente por la activación de macrófagos, la producción de citoquinas inflamatorias y la liberación de prostanoides⁶⁻⁹.

Hace algunos años, desarrollamos en nuestro laboratorio un modelo murino de reabsorción embrionaria

(RE) inducida por LPS. El modelo consiste en la administración de una única dosis por vía intraperitoneal de LPS, de 1 ug/g de peso, a hembras BALB/c en el día 7 de gestación. Éste puede ser considerado un modelo de RE temprana ya que es posimplantatorio y apenas unas horas antes de administrar la endotoxina se ha iniciado el proceso de gastrulación.

La dosis de toxina utilizada produce el 100% de reabsorción embrionaria a las 24 h e involucra la destrucción y asimilación parcial del tejido. Nosotros observamos en cortes histológicos que el tratamiento con LPS produce la necrosis total del embrión y de la mayor parte de la decidua, y los restos son expulsados 24 h después, es decir, a las 48 h de haber administrado el LPS. Sin embargo, se observa una zona de la decidua que no ha sido totalmente necrosada y permanece pegada al útero, con elevada infiltración de granulocitos y células LGL (linfocitos granulares grandes)¹⁰.

El sentido biológico del aborto es impedir que el patógeno alcance al embrión, ya que éste posee un sistema inmunológico inmaduro y puede convertirse en un foco para la proliferación del microorganismo, preservando a la madre para futuras gestaciones. Por ello, luego de transcurridas las 48 h que dura el proceso infeccioso, la hembra restituye su capacidad gestacional. El aborto espontáneo es una patología no asociada a mortandad materna, característica que se ve reflejada en nuestro modelo murino de aborto.

El LPS genera aumento en la producción de óxido nítrico (NO) e infiltración leucocitaria en diversos tejidos¹¹. La mayor parte de ese NO liberado proviene de la actividad de la NOS inducible (NOSi). En trabajos previos, observamos por inmunohistoquímica infiltrados deciduales de macrófagos y granulocitos, NOSi y CD14 positivos que son parte del exudado¹⁰.

In vitro, las células deciduales responden al LPS a través del receptor CD14, el que también se expresa en el útero de ratón^{12,13}. Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron una inmunomarcación CD14 positiva importante en la decidua de animales control y un incremento en los niveles del receptor en el útero de hembras tratadas con LPS. Por otro lado, la administración de aminoguanidina (AG), un inhibidor selectivo de la actividad de la NOSi, revirtió completamente la reabsorción embrionaria inducida por LPS. La inhibición en la síntesis de NO redujo significativamente la fibrinólisis e infiltración del tejido, visualizándose una matriz extracelular mucho menos dañada¹⁰.

En conjunto, estos datos sugieren que el NO participa en el proceso de reabsorción embrionaria inducido por LPS.

Como ya mencionamos, el LPS induce una marcada respuesta inflamatoria mediada en parte por la

producción y la liberación de prostanoideos (PG); estos son potentes estimuladores de la musculatura lisa uterina, por ello son utilizados terapéuticamente para la maduración cervical y como inductores del trabajo de parto. Por la misma razón, los PG son abortivos en las primeras semanas de embarazo¹⁴.

Nosotros hemos demostrado que los PG participan y cumplen un papel fundamental en el proceso de RE inducido por LPS y que el proceso inflamatorio involucra, a nivel local, la inducción por parte del LPS de: los niveles de su propio receptor (TLR4), los niveles de PG generados principalmente por la ciclooxigenasa-2 (COX-2), la regulación positiva del ARNm de esta enzima y de sus niveles proteicos a nivel decidual. A su vez observamos que en el útero, los niveles de COX disminuyen pero la regulación negativa de la enzima que cataboliza los PG contribuye a mantener los elevados niveles de PG. También demostramos que la nitración de la COX por peroxinitrito parece ser un mecanismo eficaz para modular la actividad de la enzima y por ende la producción de PG, y es parte importante del proceso de RE inducido por LPS¹⁵.

La progesterona (P) es una hormona clave para el desarrollo y funcionamiento de los tejidos reproductivos¹⁶. Este esteroide sexual se produce en las glándulas suprarrenales, en el cuerpo lúteo del ovario y en la placenta. En algunas especies, incluyendo la humana, la producción de P es eventualmente sostenida por la placenta durante la gestación.

La preñez está caracterizada por un cambio hormonal global y la P es una de las hormonas críticas, no sólo para el establecimiento, sino para el mantenimiento mismo del proceso. Después de la fecundación, la P induce la proliferación, diferenciación y decidualización de las células del endometrio, creando un ambiente propicio para el proceso de implantación. Asimismo la hormona contribuye a la inhibición de las contracciones uterinas, estimula la actividad de la óxido nítrico sintasa uterina y regula la secreción de citoquinas^{17, 18}. Las concentraciones séricas de la hormona en la mujer se incrementan significativamente en forma lineal conforme avanza la gestación. Este aumento favorece la adaptación a cambios directos sobre los blancos específicos de la hormona o a su biotransformación a otros esteroides.

El embarazo es una condición única que garantiza el desarrollo de un organismo independiente con diferente perfil antigénico al de la madre. Las células deciduales y del trofoblasto tienen una importante participación en la regulación del aspecto inmunológico materno, son susceptibles a los efectos de la P debido a la creciente producción de la hormona y de sus receptores. Estos efectos incluyen regulación de: el reconocimiento de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad

paternos, la polaridad de las células T efectoras, la sensibilidad de las células presentadoras de antígeno y de la actividad de los macrófagos¹⁹⁻²¹.

La inmunomodulación ejercida por la hormona, en algunos casos, se produce a través de factores proteicos como: el PIBF, el LIF o factor inhibidor de leucemia y la glicodelina, que se cree median el control de la reactividad del sistema inmune.

La proteína placentaria 14 (pp14) o glicodelina (Gd) es un péptido de 28 KDa que tiene en su estructura casi el 18% de carbohidratos y es miembro de una familia de proteínas denominadas lipocalinas presentes en la mayoría de los fluidos biológicos humanos e implicadas en múltiples procesos biológicos. Estudios utilizando técnicas de mutagénesis sugieren que la glicosilación es crucial tanto para su secreción como para sus funciones²².

La expresión de este péptido está relacionada directamente con la acción de la progesterona. Se expresa sólo en el endometrio secretorio o decidualizado^{23, 24}; el aumento sérico de los niveles de Gd se restringe a ciclos ovulatorios y a mujeres infértiles que han sido tratadas con la hormona^{24, 25}. Por otro lado, el promotor del gen de la Gd tiene potenciales elementos de respuesta a P; en cultivos de células endometriales hay inducción del péptido por progestágenos y se ha demostrado que los ligandos que activan los receptores de progesterona son capaces de estimular *in vitro* la expresión del gen de Gd²⁶⁻²⁹. La Gd es una proteína de secreción que pasa al fluido uterino o al líquido amniótico, y en menor medida, al suero. Durante el ciclo de la mujer, hay un pico temprano de expresión de Gd en el endometrio secretor y uno más tardío en el suero materno y el líquido amniótico²³.

Es de especial interés para nosotros su función inmunosupresora. En la actualidad se sabe que la Gd inhibe la proliferación de células T y las vuelve menos sensibles a ser estimuladas, actividad dirigida directamente hacia la respuesta Th1 producida por estas células^{30, 31}. Este péptido también inhibe la activación y proliferación de células B, así como la secreción de IgM y la expresión del MHC II en superficie. Además de sus acciones sobre la inmunidad humoral y celular, la Gd es capaz de inhibir la actividad citotóxica de las células NK de sangre periférica³². Las aisladas de decidua muestran expresión aumentada de Gd, lo que sugiere una acción local³³. Recientemente se ha informado que el tejido decidual de abortadoras espontáneas tiene menores niveles de Gd en relación con la expresión en mujeres con gestaciones normales³⁴.

El factor inhibidor de leucemia (LIF) es un mediador de comunicación celular con un rango verdaderamente amplio de actividades biológicas. Por su naturaleza pleiotrópica, participa en diversos eventos patológicos relacionados con muchos desórdenes.

En la actualidad, se ha determinado la presencia de LIF en todas las especies de mamíferos estudiadas y se le han atribuido actividades muy diversas sobre distintos linajes celulares como megacariocitos, macrófagos, adipocitos, epiteliales renales y de mama, así como sobre diversos tejidos neoplásicos y del tracto reproductivo femenino³⁵.

Es una proteína altamente glicosilada que se expresa tanto en tejido embrionario como adulto, con niveles particularmente elevados en el útero^{36,37}. Su expresión preponderantemente constitutiva se caracteriza por bajos niveles en ciertos tejidos, sin embargo, es posible su inducción en distintos tipos celulares. Tal inducción es disparada por citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento o mitógenos, y es inhibida por múltiples agentes antiinflamatorios y/o inmunosupresores.

El LIF se sintetiza como una glicoproteína secretada con un rango de peso molecular de 38 a 67 KDa. Las diversas isoformas se producen por glicosilación preferencial de un núcleo proteico de 20 KDa y por *splicing* alternativo del ARNm. En la actualidad se reconocen 3 variantes: LIF-M de unión a matriz extracelular, LIF-T o isoforma truncada que funciona como factor de transcripción y la llamada LIF-D que se produce por clivaje proteolítico de LIF-M.

Su receptor β en la superficie celular se une a la glicoproteína gp-130, el receptor común de la familia de la IL-6³⁸. Se han detectado también receptores solubles en plasma que se producen una vez que el LIF ha actuado y que poseen actividad señuelo sobre el propio LIF³⁹. La cascada de segundos mensajeros clásica de LIF se caracteriza por el reclutamiento de enzimas citosólicas con actividad tirosina-quinasa pertenecientes a la familia JAK/TYK, que fosforilan factores de transcripción.

Se ha detectado LIF en folículos ováricos^{40,41} y expresión constitutiva en las trompas de Falopio. En el útero, existen trabajos que reportan su expresión miometrial y endometrial. El LIF también es producido por el trofoblasto.

En la actualidad es reconocida su participación en los procesos de decidualización, implantación y control de la invasión trofoblástica⁴². Se ha demostrado que la producción materna de LIF es crucial para una implantación exitosa en el ratón y que los embriones de hembras *knock-out* de LIF (LIF^{-/-}) no implantan, fenotipo que se revierte suplementando con el péptido⁴³. Trabajos posteriores confirman la importancia del LIF para la implantación en la mujer⁴⁴ y aumento pronunciado de los niveles de LIF en decidua y endometrio durante el primer trimestre de embarazo. También es producido por leucocitos endometriales y placentarios de naturaleza linfocitaria, principalmente del linaje Th2 y por células NK.

Se han reconocido anomalías de LIF en diversos desórdenes reproductivos: infertilidad, síndrome de falla ovárica prematura, gestaciones ectópicas, endometriosis y preeclampsia^{45,46}.

En lo que se refiere a la regulación de LIF por hormonas sexuales, lo reportado hasta el momento es variado y controvertido. Se observa regulación positiva por progesterona en conejos y monos^{47,48} y por estradiol en ratón, decidua humana y oviducto bovino⁴⁷⁻⁵⁰. Se observa regulación negativa ejercida por la progesterona en la mujer y por el estradiol en cabras^{49,51}.

El LIF, al igual que otras citoquinas, está involucrado en aspectos relacionados con el desarrollo y la regulación de la respuesta inflamatoria. La producción de LIF es inducida por LPS⁵²⁻⁵⁴ e incluso se ha observado que está incrementado en el suero de pacientes con cuadros sépticos de distinta severidad inducidos por bacterias gramnegativas⁵⁵. En la actualidad, muchos trabajos le otorgan al LIF un rol antiinflamatorio y protector contra la endotoxemia generada por LPS e incluso lo consideran parte del mecanismo de defensa del hospedador⁵⁶⁻⁵⁹. En contraste, al menos a nivel del sistema nervioso, el LIF podría ser quimiotáctico para células inflamatorias⁶⁰.

OBJETIVOS

En conjunto, los antecedentes mencionados nos permitieron plantear la siguiente hipótesis:

“Las funciones inmunomoduladoras ejercidas por la progesterona y mediadas por los factores proteicos LIF y Gd se encuentran alteradas en la RE temprana inducida por LPS”.

Nuestros objetivos fueron:

- Evaluar la participación de la progesterona en nuestro modelo de RE.
- Analizar posibles alteraciones en la expresión de los péptidos inmunomoduladores LIF y Gd en la interfase materno-fetal.
- Profundizar los estudios asociados a la expresión, regulación y función del LIF con relación a los mediadores inflamatorios NO y PG.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Se utilizaron hembras BALB/c vírgenes de 8 a 12 semanas de edad que se aparearon con machos adultos fértiles de la misma cepa. Los animales se mantuvieron bajo un régimen de 12 h luz/12 h oscuridad, temperatura constante (23-25 °C), alimento y agua *ad libitum*. Se sacrificaron por dislocación cervical.

2. TÉCNICAS

2.1. Cultivo de tejidos

Los úteros (miometrio + endometrio no modificado) fueron extraídos, inmediatamente pesados y cultivados en placas de 24 pozos que contenían DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico/antimicótico al 1% (penicilina G 20 U/ml, estreptomina 20 ug/ml, anfotericina B 50 ng/ml). Los explantos fueron mantenidos en estufa gaseada (5% CO₂) a 37 °C durante 2, 6 ó 24 h. Se recuperaron los medios de cultivo (sobrenadantes) y los tejidos para las determinaciones de cada caso. Las concentraciones usadas en cultivo fueron: LPS 1 µg/ml; P: 50 ng/ml; LIF: 50 y 100 ng/ml; anticuerpo anti-LIF: 5 µg/ml.

2.2. Medición de NO₃-+ NO₂-

Se cuantificaron los niveles de NO₃-+ NO₂- utilizando la técnica de Griess⁶¹.

2.3. RT-PCR de LIF y Gd

La técnica se realizó según¹⁵. Los cebadores utilizados fueron:

- β-actina: sentido 5'-TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA-3'; antisentido 5'-TCT CAG CTG TGG TGG TGA AG-3'; tamaño del producto: 392 pb.

- Gd: sentido 5'-ATG CTG TGC CTC CTG CTC-3'; antisentido 5'-AAC AAC ATC TCC CTC ATG GC-3'; tamaño del producto: 208 pb.

- LIF: sentido 5'-GGA GTC CAG CCC ATA ATG AA-3'; antisentido 5'-TGA GCT GTG CCA GTT GAT TC-3'; tamaño del producto: 184 pb.

2.4. Western blot

Se homogeneizaron los tejidos en buffer RIPA, fueron sonicados y centrifugados a 1500 x g por 10 min. Los niveles proteicos de cada muestra se determinaron por el método de Bradford⁶². Se realizaron separaciones electroforéticas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), sembrando 100 µg de proteína total. Se utilizaron anticuerpos primarios específicos para cada caso (anti-Gd: dilución 1/100 y anti-PR: 1/300). Las bandas obtenidas se normalizaron contra la banda correspondiente a la actina. Los resultados se expresaron como DO relativa a la actina.

2.5. Radioinmunoensayos

Por esta técnica se determinaron los niveles de PGE y de P⁶³ utilizando antisueros específicos.

2.6. Determinación de los porcentajes de reabsorción embrionaria

Los animales control y tratados con LPS y progesterona se sacrificaron en el día 12 de gestación. El porcentaje de reabsorción embrionaria fue calculado como: n° de embriones reabsorbidos / (n° de embriones

viables + n° de embriones reabsorbidos) X 100. Para los experimentos de retraso de la RE, los animales tratados en el día 7 de gestación fueron sacrificados en el día 9.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

La evaluación estadística (GraphPad InStat PRISM 3.0 Software, San Diego, CA, USA) se realizó aplicando análisis de varianza (ANOVA) de uno o dos factores seguido por el test de comparaciones múltiples de Tukey. Para el caso de dos tratamientos se utilizó la prueba "t" de Student (para muestras no pareadas). Los valores expresados como proporciones (%RE) se analizaron utilizando estadística no paramétrica con el análisis de varianza unifactorial por rangos de Kruskal-Wallis. Los datos fueron expresados como los valores medios ± SEM (error estándar de la mediana). Las diferencias se consideraron significativas cuando p era menor a 0,05.

RESULTADOS

Progesterona y reabsorción embrionaria

Los niveles séricos de progesterona en la mujer durante la gestación se correlacionan significativamente con el éxito del embarazo. Se ha observado que los niveles bajos de P sérica están asociados a altos niveles de abortos espontáneos (85,5%) y embarazos ectópicos (15,4%)⁶⁴.

La P es un agente antiinflamatorio, en parte por oponerse a los efectos proinflamatorios del estrógeno sobre el útero y también por su función inmunosupresora durante el embarazo.

1. NIVELES SÉRICOS DE PROGESTERONA

Decidimos entonces determinar los niveles séricos de progesterona en nuestro modelo. Para ello se realizaron radioinmunoensayos en muestras de suero provenientes de animales control y tratados con LPS por 6 h en el día 7 de preñez. La **Figura 1** muestra que el tratamiento con la endotoxina disminuye significativamente los niveles séricos de la hormona.

2. RECEPTORES DE PROGESTERONA

Se ha propuesto que los cambios en la expresión de los receptores PRA y PRB estarían asociados a condiciones fisiológicas y patológicas del endometrio, y al inicio del parto.

Continuando con la caracterización de nuestro modelo, decidimos evaluar la expresión de estos receptores en los sitios de implantación. Los tejidos provenientes de animales tratados con LPS o vehículo por 6 h fueron procesados para identificar por Western blot las isoformas de PR. La **Figura 2** muestra el incremento significativo de los niveles de PRB decidual en los animales tratados con LPS.

3. PROGESTERONA Y REABSORCIÓN EMBRIONARIA

Para intentar determinar la magnitud del efecto “menores niveles de progesterona” en suero, suplementamos los animales tratados con la hormona. El diseño experimental que finalmente fue utilizado consistió en administrar a hembras en su día 7 de gestación, una única dosis de 2 mg/animal (s.c.) de progesterona, 2 h antes de la endotoxina. Varios grupos de animales fueron sacrificados a las 48 h de administrar LPS y P, para observar el grado de avance de la reabsorción, y otros fueron sacrificados en el día 12 para determinar las tasas de RE. Los porcentajes de RE en los animales suplementados con P variaron significativamente respecto de la tasa observada en los animales control y en los tratados con LPS (Tabla 1).

En las fotos de la Figura 3 es evidente el retraso en el proceso de RE que provoca el tratamiento con progesterona. La imagen A muestra un útero luego de 48 h de tratamiento sólo con LPS. El embrión y la decidua circundante han perdido su forma, tamaño y la unión al tejido uterino, y se han convertido en una masa amorfa que es fácilmente extraída del útero. Es imposible determinar el número de embriones implantados originalmente en el útero, pero como la camada en estos animales en promedio es de 8 crías, podríamos sugerir que las restantes ya han sido expulsadas.

En las fotos B-F (animales suplementados con hormona) se observan distintos estadios de avance de la reabsorción. El panel B muestra embriones aparentemente viables. En el panel C se puede ver un embrión en proceso de reabsorción entre otros dos que no muestran indicios visibles del proceso. En D todos los embriones están visiblemente hemorrágicos pero no hay alteración de su forma y/o tamaño. El cuadro E muestra varios embriones que corresponden a distintas hembras, todos en proceso de reabsorción. En algunos casos se puede observar claramente la reducción de tamaño, en otros la hemorragia y la apariencia necrótica. La foto del panel F muestra otro de los fenotipos encontrados: hemorragia

Tratamiento	% de RE
Control	6,6 ± 2,1 ^a (n=12)
LPS	100 ± 0,0 ^b (n=6)
LPS + Progesterona	59,8 ± 11,6 ^c (n=10)

Tabla 1. Efecto in vivo de la progesterona sobre la RE inducida por LPS. Hembras BALB/c en el día 7 de preñez fueron inyectadas con PBS (control), LPS (1 µg/g) o LPS + P (2 mg/animal) y fueron sacrificadas en el día 12. Los porcentajes de RE fueron calculados como: 100 X n° de embriones reabsorbidos/(n° de embriones viables + reabsorbidos). Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

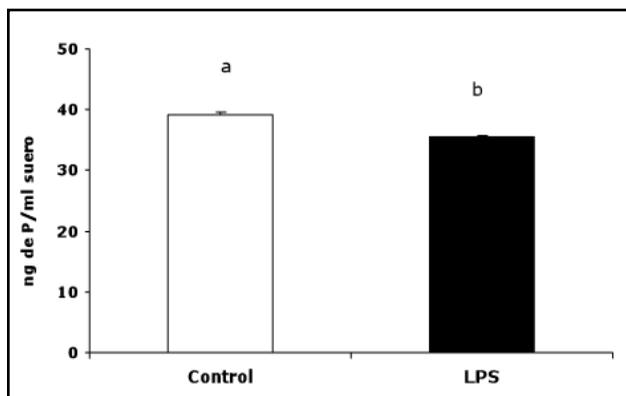


Figura 1. Efecto in vivo del LPS sobre los niveles de progesterona sérica. Hembras BALB/c se inyectaron en el día 7 de preñez con PBS (control) o LPS y fueron sacrificadas luego de 6 h de tratamiento. Se realizaron extracciones de sangre y se separó el suero para determinar los niveles de P por RIA. Los valores representan el promedio ± SEM (n=9). Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas: p<0,05.

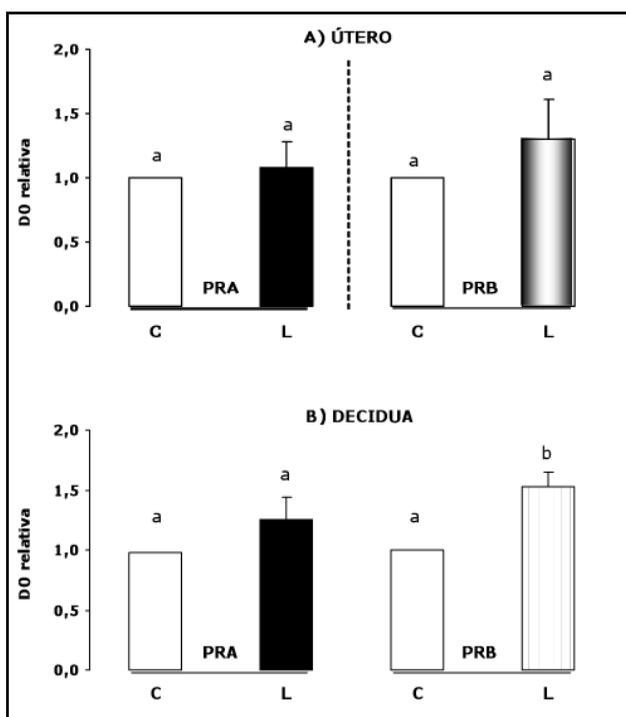


Figura 2. Efecto in vivo del LPS sobre los niveles proteicos de PR. Hembras BALB/c se inyectaron en el día 7 de preñez con PBS (control) o LPS y fueron sacrificadas luego de 6 h. El gráfico representa el análisis densitométrico de los Western blots. Los resultados se expresan como: DO de PR/DO de actina, relativizado al control (con valor arbitrario de 1). Los valores representan el promedio ± SEM (n=5). Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas (p<0,01).

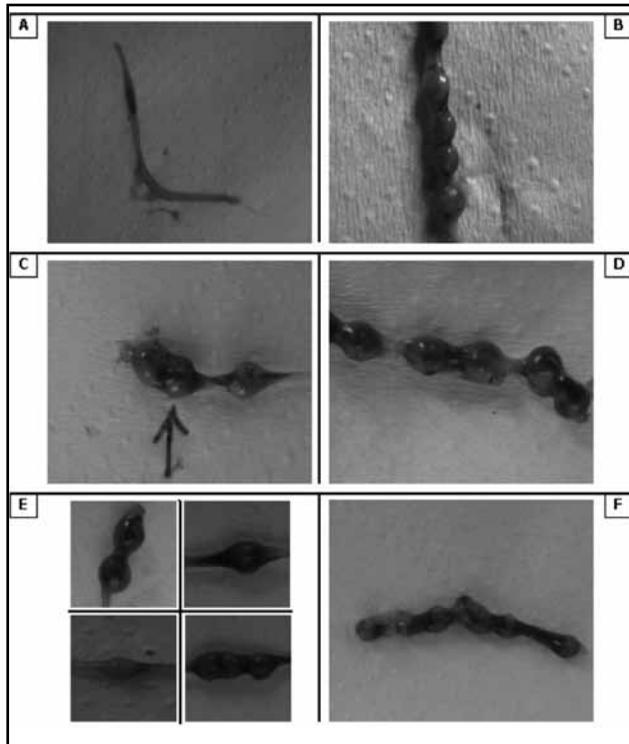


Figura 3. Efecto in vivo de la administración de progesterona sobre la RE inducida por el LPS a las 48 h. Hembras BALB/c se inyectaron en el día 7 de preñez con LPS o P (2 mg/animal) 2 h antes del LPS y fueron sacrificadas luego de 48 h. A: LPS; B, C, D, E y F: LPS + P. LPS + P: n=7.

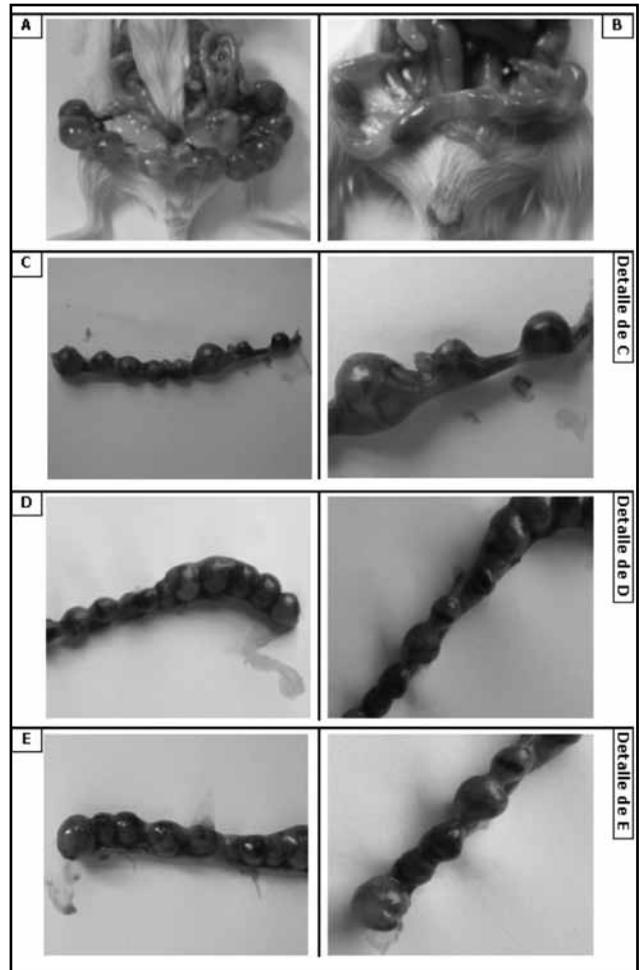


Figura 4. Efecto in vivo de la administración de progesterona sobre la RE inducida por LPS en el día 12 de gestación. Hembras BALB/c se inyectaron en el día 7 de preñez con LPS o P (2 mg/animal) 2 h antes del LPS y fueron sacrificadas en el día 12. A, B, C, D y E: LPS + P. LPS + P: n=5.

abundante que alcanza los espacios interimplantatorios donde es difícil distinguir los embriones. Por lo tanto, podemos concluir que la hormona, al momento y la dosis administrada, es capaz de retrasar el inicio de la RE inducida por LPS. Si se compara el panel A contra B-F, se puede observar que el avance de la RE es siempre menor en todos los casos en los que se dio suplemento hormonal.

La **Figura 4** muestra fotos representativas del grupo de animales tratados con LPS y progesterona pero esta vez sacrificados en el día 12 de gestación, momento en el que también se determinaron los porcentajes de RE que se muestran en la Tabla 1. Los paneles A y B muestran situaciones totalmente opuestas. En A la totalidad de los embriones es viable, así lo evidencian el tamaño y aspecto normales, adecuados a un día 12 de gestación. Lo contrario se observa en el panel B donde todos los embriones están reabsorbidos y sólo se pueden distinguir masas de tejido necrosado de color más oscuro y zonas del útero con gran cantidad de líquido. En el cuadro C puede observarse un útero completo con embriones sanos y reabsorbidos. En este caso la mayoría de ellos están reabsorbidos. Entre los 6 que no son viables puede notarse cierta diferencia en el aspecto, algunos sólo tienen un tamaño muy reducido y los otros además

están completamente hemorrágicos. En los paneles D y E se muestran situaciones idénticas, embriones sanos y reabsorbidos con distinto fenotipo y distinto avance del proceso de reabsorción.

FACTORES INMUNOMODULADORES Y REABSORCIÓN EMBRIONARIA

Ciertos esteroides, péptidos y mediadores neuroendocrinos se han sugerido en los últimos años como colaboradores del proceso de inmunomodulación necesario para el éxito de la preñez^{17, 65, 66}.

Nosotros hemos enfocado nuestro estudio en explorar cambios potenciales de dos péptidos con reconocida función inmunosupresora en la interfase materno-fetal. Evaluamos la expresión y modulación del LIF y la glicodelina en nuestro modelo de RE.

1. GLICODELINA Y REABSORCIÓN EMBRIONARIA

1.1. Secuencia del gen de glicodelina

La mayoría de los trabajos sobre esta proteína endometrial se han realizado principalmente en mono y en la mujer. En los casos en los que han utilizado la proteína, fue obtenida por purificación utilizando como fuente el líquido amniótico humano donde se encuentra en altas concentraciones. Otros grupos utilizan como herramienta la clonación y expresión en vectores determinados, para luego purificar la proteína secretada al medio condicionado²⁸. El péptido no se comercializa y hasta principios del año 2008 no existía tampoco un anticuerpo comercial para detectarlo. En la actualidad, en las bases de datos de los ARNm precursores de Gd se pueden encontrar las secuencias de *Homo sapiens*, *Macaca mulatta* o *mono Rhesus*, *Canis familiaris* y *Rattus norvegicus*. Existen pocas evidencias de la existencia de una glicodelina murina. No hay prácticamente trabajos realizados en ratón y no se ha detectado la proteína ni se han secuenciado el péptido o el gen.

Más adelante observarán que en este trabajo detectamos “glicodelina” en ratón (su ARNm y dos péptidos). Para realizar las PCR se diseñaron cebadores adecuados cuyas secuencias coinciden con zonas de homología altamente conservada entre las secuencias conocidas: la humana, la de mono y la del gen en perros. Para inmunodetectar la proteína por Western blot, utilizamos el único anticuerpo comercial existente al momento de la realización del trabajo, un anti-Gd humana hecho en conejo (de Epitomics, Inc.).

Los resultados exitosos nos permitieron pensar en la posibilidad de poder secuenciar la Gd murina. Procedimos a secuenciar el gen a partir del producto amplificado que se obtiene por PCR, en primer lugar concentrando las muestras para obtener la masa necesaria del producto requerida para secuenciar. La secuenciación se

realizó por triplicado en dos servicios de secuenciación diferentes y como resultado se obtuvo la secuencia que se muestra en la **Figura 5**.

Se determinaron por comparación de la secuenciación de 3 muestras, 115 bases con certeza. Utilizando el programa CLUSTAL 2.0 se realizaron múltiples alineamientos de ella con otras secuencias conocidas. De las 115 bases, 81 coinciden con la secuencia de la glicodelina humana, incluyendo las secuencias completas de los cebadores sentido y antisentido utilizadas para amplificar el producto. La misma homología se encontró con la secuencia del gen de Gd del mono *Rhesus*.

Los resultados de la secuenciación evidencian la existencia de por lo menos un mensajero *like-Gd* que posee una homología del 70% con las secuencias reportadas para la Gd humana y de mono.

1.2. Efecto in vivo del LPS sobre los niveles de ARNm de Gd

Para evaluar los niveles de ARNm de Gd en los tejidos, los animales fueron inyectados con LPS o vehículo y sacrificados luego de 2 y 6 h de tratamiento. Se extrajeron los cuernos uterinos y luego de separar el útero de la decidua se procesaron los tejidos para realizar la técnica de RT-PCR.

En la **Figura 6** se puede observar que tanto en útero como en decidua, los niveles de ARNm de Gd no se modifican por el tratamiento con la endotoxina en ninguno de los tiempos evaluados.

1.3. Efecto in vivo del LPS sobre los niveles proteicos de Gd

La glicodelina es un péptido altamente glicosilado y esta característica se puede apreciar en las múltiples bandas que aparecen en los Western blots. Una de ellas es de un peso molecular relativamente bajo, aproximadamente 14 KDa, y la otra, de 28 KDa. Las



Figura 5. Secuencia parcial del ARNm de la glicodelina murina. Los tejidos fueron procesados adecuadamente para realizar RT-PCR y el producto amplificado fue secuenciado. En los extremos y en gris se muestran los cebadores utilizados, el “sentido” en el extremo 5’ y el “antisentido” en el 3’. N= bases que no pudieron ser determinadas ($n=6$).

dos bandas se pueden asociar a la proteína sin glicosilar que sería la de menor peso molecular y a la glicosilada o de mayor peso, que es la que posee actividad biológica.

Aparentemente la proteína decidual, la Gd glicosilada de 28 KDa, está modulada por el tratamiento con endotoxina ya que disminuye significativamente su expresión en los animales tratados (Figura 7). Aunque esta metodología es semicuantitativa, se puede observar que los niveles de la proteína no modificada (14 KDa) superaron en todos los casos los niveles de la forma glicosilada, lo que se puede apreciar en las fotos de los gels representativos de la Figura 7.

2. LIF Y REABSORCIÓN EMBRIONARIA

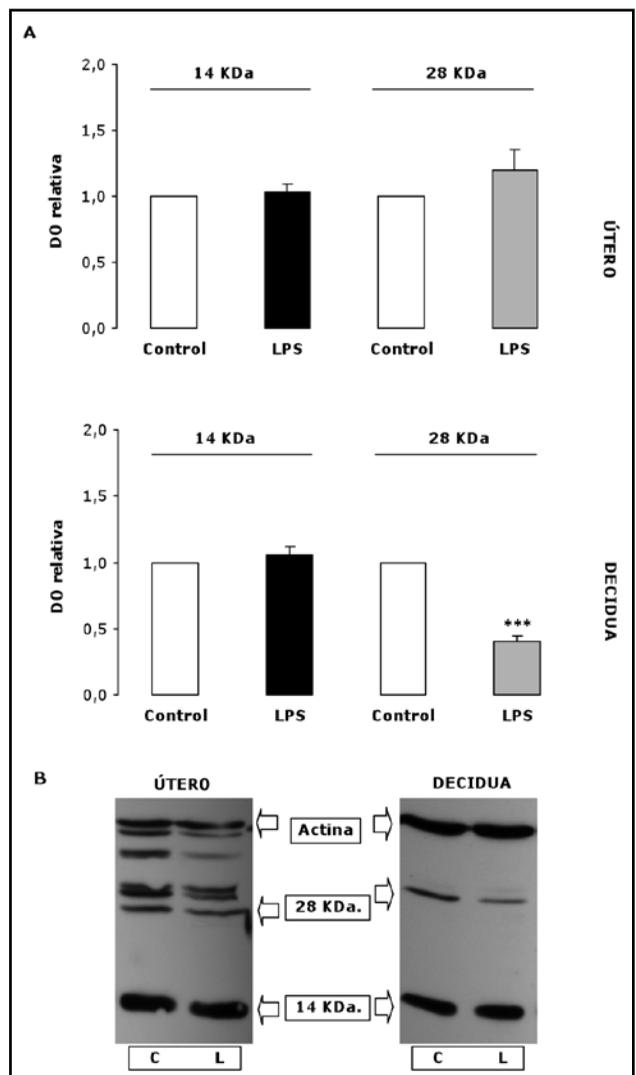
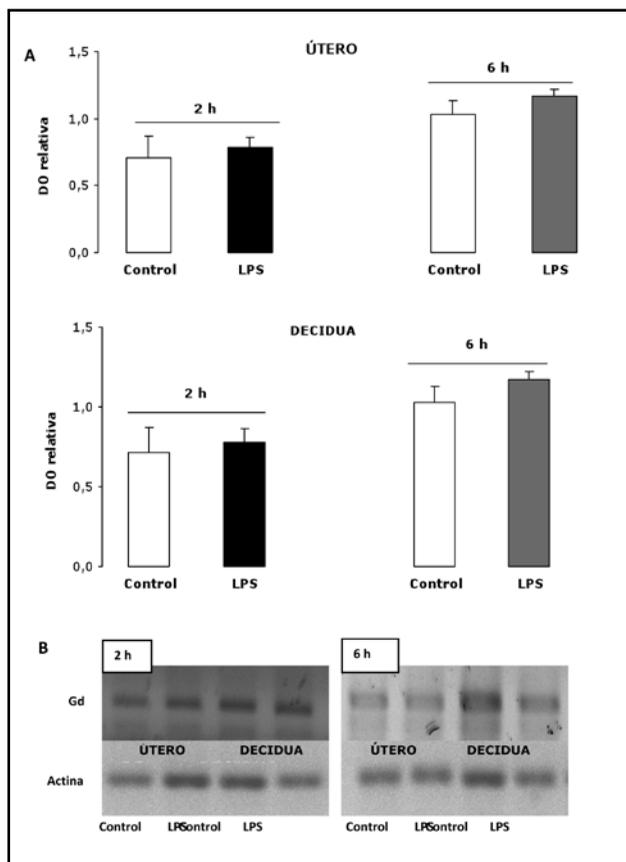
2.1. Efecto in vivo del LPS sobre los niveles de ARNm de LIF

Para la determinación de los niveles de ARNm de LIF en los tejidos, se administró LPS o vehículo a grupos de hembras en el día 7 de gestación y se los sacrificó 2 y 6 h postratamiento. Se extrajeron los cuernos

uterinos y se procesaron los tejidos, útero y decidua, para realizar la técnica de RT-PCR. En la Figura 8 se puede observar que los niveles de ARNm de LIF se incrementan significativamente en ambos tejidos luego de 6 h de tratamiento con la endotoxina.

2.2. Efecto de la progesterona in vitro sobre los niveles de ARNm de LIF

En 1996, Yang y colaboradores⁴⁷ demostraron que los niveles proteicos de LIF en el epitelio y las glándulas uterinas de ratones ovariectomizados están muy reducidos y que aumentan al administrar 17β estradiol sólo o combinado con progesterona. Hasta el día de hoy, parece ser éste el único trabajo que hace referencia a una



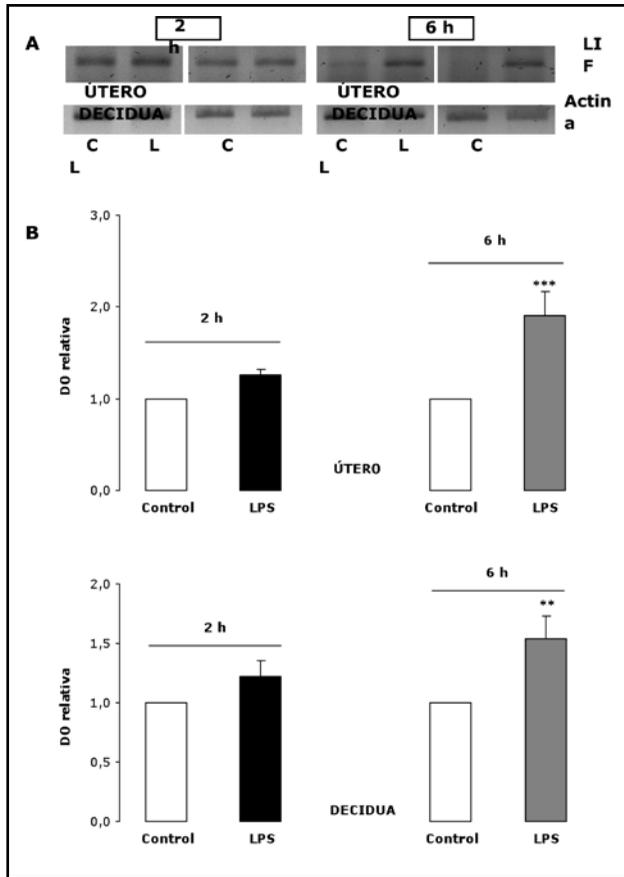


Figura 8. Efecto in vivo del LPS sobre los niveles de ARNm de LIF. (A) Geles representativos de las RT-PCR y análisis densitométrico (B). Arriba: útero, abajo: decidua. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 6 h de tratamiento (LPS o vehículo) en el día 7 de gestación. Los resultados representan el promedio \pm SEM y están expresados como DO del ARNm de LIF/DO del ARNm de actina, relativizado al control 1 ($n=5$). *** $p<0,001$ y ** $p<0,01$. LPS vs. control.

modulación de LIF en ratón por hormonas sexuales. Sin embargo, se sabe que en otras especies, incluyendo la humana, la progesterona es capaz de regular los niveles de este péptido. Con un ensayo in vitro evaluamos el efecto de la progesterona sobre los niveles de ARNm de LIF murino. Se sacrificaron hembras de día 7 de preñez, se extrajeron los cuernos uterinos y aislaron los úteros para realizar cultivos de 2 y 6 h, en presencia/ausencia de LPS y progesterona. Los tejidos recuperados se procesaron por la técnica de PCR convencional.

La concentración de LPS utilizada se eligió según trabajos previos de nuestro laboratorio que muestran que ésta es la menor concentración de LPS capaz de aumentar la producción de NO en estos tejidos. En la **Figura 9** se puede observar que el ARNm de LIF es modulado positivamente por la progesterona. Este incremento fue detectado en ambos tiempos evaluados, en presencia de 50 ng/ml de la hormona.

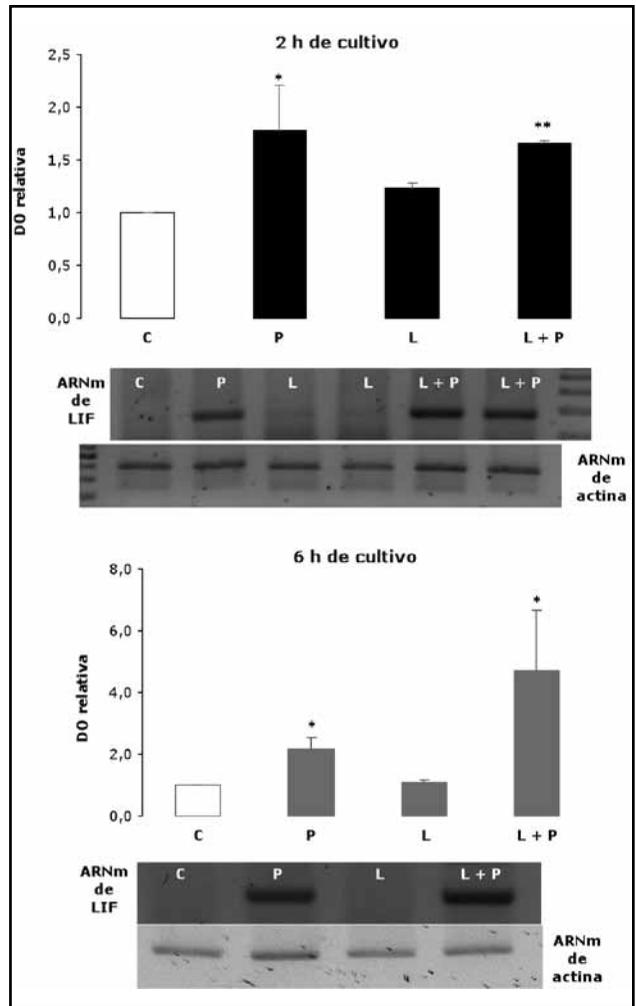


Figura 9. Efecto in vitro de la progesterona sobre los niveles de ARNm de LIF. Análisis densitométrico de las bandas de las RT-PCR y geles representativos. Explantos de útero se cultivaron por 2 y 6 h en presencia/ausencia de P (50 ng/ml) y/o LPS (1 μ g/ml). Los resultados representan el promedio \pm SEM. La DO está expresada como DO del ARNm de LIF/DO del ARNm de actina, relativizado al control 1 ($n=4$). Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas. $p<0,05$.

2.3. Efecto del LIF sobre la producción de NO y PG

La sepsis inicia una cascada de mediadores inflamatorios e inmunosupresores que incitan al tejido a la patogénesis. Esta cascada incluye mediadores peptídicos como el LIF, que participan en el desarrollo y la regulación de la respuesta inflamatoria.

En nuestro modelo de aborto observamos in vivo un incremento en los niveles de NO y PG. Para evaluar la posibilidad de una modulación vía LIF de la producción local de estos mediadores inflamatorios, realizamos cultivos en presencia de LIF. Los úteros (de día 7 de gestación) fueron cultivados en presencia/ausencia de LPS y/o LIF recombinante murino. Luego de 24 h de cultivo se recuperaron los sobrenadantes y en ellos

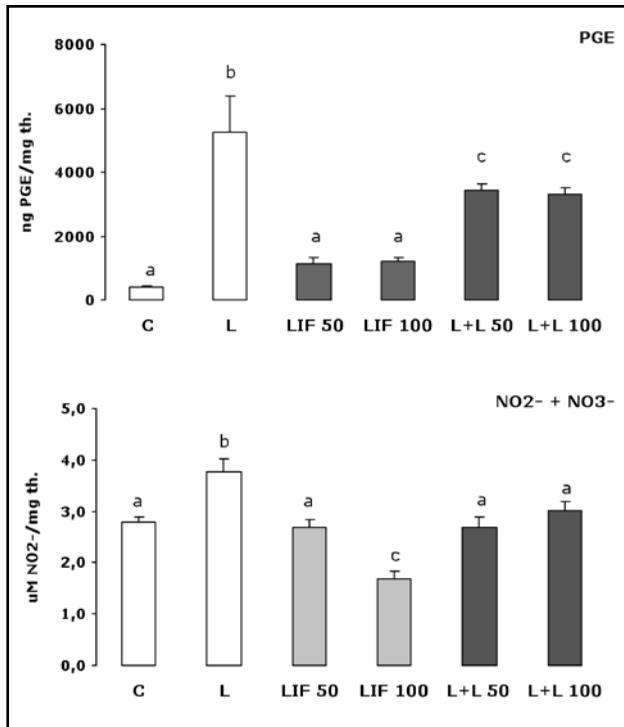


Figura 10. Efecto in vitro del LIF sobre los niveles de PGE y NO. Se determinaron los niveles de PGE por RIA (arriba) y de NO₂+NO₃⁻ por la técnica de Griess (abajo) en medios de cultivo recuperados de explantos uterinos. Los tejidos fueron incubados con LPS (1 µg/ml), LIF recombinante murino solo (50 y 100 ng/ml) o LPS + LIF durante 24 h en estufa gaseada a 37 °C. Los valores representan el promedio ± SEM (n=6). Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas. p<0,05.

se determinaron los niveles de NO y PG. El LPS en la concentración usada in vitro aumenta los niveles de PGE y NO. Este efecto es revertido por la adición al medio de cultivo de LIF recombinante, en ambos casos y con las 2 concentraciones de LIF utilizadas. Esto sugiere que el LIF podría estar cumpliendo un papel antiinflamatorio (Figura 10).

2.4. Efecto de la progesterona y participación del LIF

Los resultados mostrados en las Figuras 8 y 9 indican: primero, una modulación positiva por parte de la progesterona sobre los niveles de ARNm de LIF. Segundo, una modulación negativa ejercida por el LIF recombinante sobre la producción de mediadores proinflamatorios como el NO y la PGE inducidos por LPS.

Estos antecedentes nos permitieron plantear la posibilidad de que sea la hormona vía LIF la que mantenga controlados los niveles de moléculas proinflamatorias. Para evaluar esta alternativa, se realizaron cultivos de tejido en presencia de progesterona y un anticuerpo hecho en conejo contra la proteína murina LIF. Los úteros provenientes de animales de día 7 de

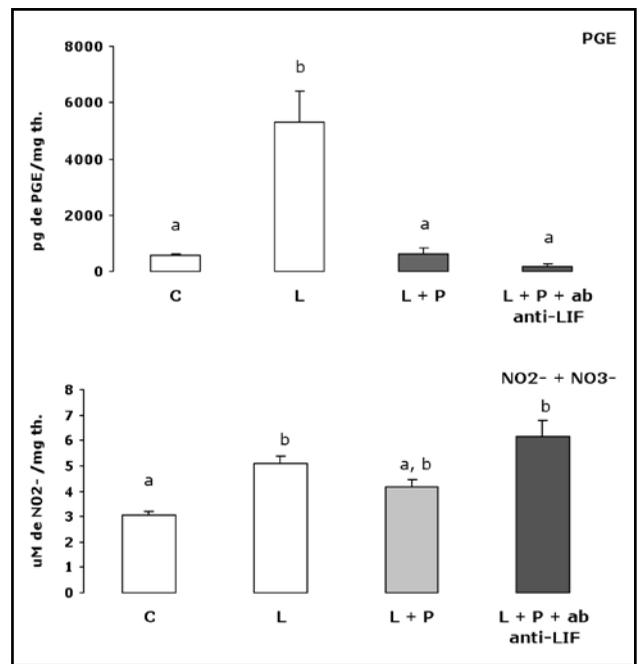


Figura 11. Efecto in vitro de la progesterona sobre los niveles de PGE y NO. Se determinaron los niveles de PGE por RIA (arriba) y de NO₂+NO₃⁻ por la técnica de Griess (abajo) en los medios de cultivo de explantos uterinos. Los tejidos fueron incubados con LPS (1 µg/ml), LPS+P (50 ng/ml) y LPS+P+anticuerpo anti-LIF (5 µg/ml) durante 24 h en estufa gaseada a 37 °C. Los valores representan el promedio ± SEM (n=5). Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas. p<0,001.

gestación fueron cultivados en estufa gaseada a 37 °C en presencia de LPS, LPS + P o LPS + P + anticuerpo anti-LIF. Pasadas 24 h se recuperaron los medios de cultivo y en ellos se determinaron los niveles de NO y PG.

En la Figura 11 se muestran los resultados. La progesterona revierte el incremento de PGE inducido por la endotoxina, lo que evidencia un rol antiinflamatorio de la hormona. Sin embargo, en presencia del anticuerpo anti-LIF este efecto permanece, por lo tanto, aparentemente no estaría mediado por LIF. En cambio, los niveles de nitritos que se reducen levemente en presencia de P (no es significativa la diferencia respecto al LPS) se mantienen elevados en presencia del anticuerpo anti-LIF, lo que sugiere su intervención en la modulación negativa de los niveles de óxido nítrico mediados por la hormona.

Los resultados de este ensayo indicarían también que no sólo la coincubación con LIF recombinante murino, sino el propio LIF endógeno tiene efectos antiinflamatorios.

Discusión

En la actualidad, la tasa aceptada de gestaciones que terminan en aborto es aproximadamente del 30% y, en el 80% de los casos, estos se producen en las primeras

12 semanas. Si tenemos en cuenta que es común que estas pérdidas pasen clínicamente inadvertidas, este valor puede llegar incluso a duplicarse. Este último dato confirma la aseveración de que la pérdida precoz del embarazo es la complicación más frecuente de la gestación.

Lo antedicho muestra que el establecimiento y mantenimiento del embarazo es una situación mucho menos exitosa de lo que uno podría imaginar. Si bien hay identificadas varias etiologías frecuentes, existen muchos casos en los que la causa puede no estar caracterizada. Un buen ejemplo que muestra la imperante necesidad de resolución de esta temática lo representan el crecimiento y el desarrollo que ha experimentado en los últimos años el campo de la reproducción asistida.

En lo que se refiere a investigación básica, la realidad muestra que las causas y los mecanismos de las pérdidas embrionarias tempranas no están aún dilucidados. La mayoría de los estudios sobre el tema se han realizado en la cruce murina CBA/J x DBA/2, que presenta una alta tasa de reabsorción espontánea. Sin embargo, también las endotoxinas bacterianas se han reconocido como agentes causantes de reabsorción embrionaria temprana. El LPS representa un agente infeccioso que está en el ambiente, con el que nos encontramos en contacto constante y directo y, por otro lado, las infecciones del tracto genitourinario son un hecho muy común durante el embarazo. En general, éstas se caracterizan por la presencia de una cantidad significativa de bacterias que colonizan parte o la totalidad del tracto reproductivo y que pertenecen al grupo de las enterobacterias. En las bacterias gramnegativas, el LPS es el factor de mayor virulencia y estas son responsables de aproximadamente el 90% de las infecciones, que es uno de los factores de riesgo más importantes para la salud fetal.

El 50% de los antígenos fetales son de origen paterno. La presencia de anticuerpos contra el feto, contra la placenta y contra los antígenos paternos en el suero materno de mujeres con embarazos normales muestra claramente que el reconocimiento materno de estos antígenos no compromete la preñez⁶⁷; al contrario, induce cambios funcionales que permiten que el feto sobreviva y se desarrolle. Por ejemplo, durante la fase lútea del ciclo, la respuesta inmune cambia hacia un tipo de respuesta Th2⁶⁸. Otro fenómeno interesante ocurre en las mujeres con abortos recurrentes; en estas mujeres la baja relación Th1/Th2 está asociada a mayores niveles de P en suero, lo que sugiere que los niveles de P sérica pueden tener alguna influencia sobre la producción de citoquinas⁶⁹. También se sabe que el tratamiento con el progestágeno dihidroprogesterona en mujeres con riesgo de parto pretérmino induce un cambio a nivel del sistema inmune y se observa disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias y aumento de las antiinflamatorias⁷⁰.

Uno de los mecanismos a través de los cuales la P modula el sistema inmune es estimulando la síntesis y secreción de ciertos factores proteicos con reconocida capacidad inmunomoduladora. El más conocido de ellos es el factor bloqueante inducido por progesterona o PIBF. Sin embargo, existen otros 2 péptidos menos conocidos en su papel inmunomodulador, que se cree median el control de la reactividad del sistema inmune y que son el LIF y la glicodelina.

Está bien documentada la disminución en los niveles séricos de la hormona durante la gestación que cursa con algún tipo de infección o en modelos animales donde se administra LPS. Se han informado también menores niveles de la hormona en mujeres abortadoras⁷¹⁻⁷³. En coincidencia, nosotros encontramos que los animales tratados con LPS por 6 h tienen menores niveles séricos de la hormona. El mecanismo por el cual la administración de LPS disminuye los niveles séricos de progesterona no está estudiado, pero un efecto inhibitorio de la endotoxina sobre la capacidad de las células de la granulosa para responder a la LH in vitro fue observado en ratas⁷⁴.

Nos preguntamos de qué forma este efecto producido por el LPS se relaciona con el proceso de RE que se desencadena en estos animales. Para intentar contestar esta pregunta, las hembras preñadas tratadas con la endotoxina fueron suplementadas con progesterona. Podemos afirmar que el tratamiento con la hormona tuvo efecto sobre la reabsorción. En todos los casos evaluados, a las 48 h se observa un retraso evidente del proceso. En el día 12 de gestación los porcentajes de RE fueron menores a los observados al tratar con LPS y estadísticamente significativos.

En la actualidad, las terapias hormonales para el tratamiento del aborto recurrente, del parto pretérmino o la infertilidad incluyen la administración de progesterona en dosis diarias y en muchos casos durante varios días o semanas^{75, 76}. Lo observado en los animales suplementados no es un efecto menor si se tiene en cuenta que el estímulo que induce el aborto es potente, en 24 h la reabsorción es del 100%, y que se ha dado una única dosis de progesterona. El hecho de que esta única dosis de P haya retrasado y en algunos casos revertido la RE sugiere que un tratamiento, con previo ajuste de la dosis, del n° de dosis y la duración, podría llegar a ser preventivo.

Se sabe que el tratamiento con antagonistas de PR como el RU-486, inducen aborto tempranamente o inician el parto en estadios más avanzados de la preñez en la mujer y en modelos animales^{77, 78}. La expresión de ambas isoformas en el miometrio humano sugiere que la hormona actúa directamente sobre el útero afectando su contractilidad; sin embargo, las acciones de la hormona

no deben limitarse a las células del miometrio. Durante la preñez temprana, la activación de ambas isoformas de PR lleva a la estimulación de la expresión de reguladores del ciclo celular y supervivencia en las células deciduales, lo que sugiere una absoluta dependencia por parte de la decidua de la acción de la progesterona para su crecimiento y mantenimiento⁷⁹. Los efectos de la P dependen de: los niveles de la hormona, los sitios de acción y los niveles y las isoformas que se expresen de su receptor. Por ello decidimos evaluar la expresión de ambas isoformas del receptor en nuestro modelo.

Los resultados muestran aumento en los niveles de PRB en la decidua de los animales tratados con LPS luego de 6 h. Es decir, que mientras los niveles séricos de la hormona están disminuidos, la isoforma B de su receptor en la decidua está incrementada.

La mayoría de las acciones biológicas de la P parecen estar mediadas por PRB mientras que PRA actuaría como un represor de la actividad transcripcional de PRB. Durante casi todo el período que dura la gestación, la hormona ejerce sus acciones vía PRB. En el momento del parto, en la mayoría de los mamíferos hay una disminución en los niveles de la hormona y en la mujer, a pesar de que esto no ocurre, hay una modulación de la actividad de la hormona a través de un cambio en la relación PRA/PRB. Esto se debe a un aumento en la expresión de PRA que, actuando como represor, inhibe las acciones de la hormona, lo que permite que el útero sea sensible a los estímulos contráctiles. Es posible entonces que la disminución de los niveles séricos de progesterona sea contrarrestada en la interfase materno-fetal con el aumento en los niveles de su receptor PRB, como una respuesta inicial tendiente a mantener el estado de preñez. Podemos interpretarlo de esta manera ya que los efectos reportados se producen tempranamente (6 h) en relación con la duración del proceso inflamatorio completo, de aproximadamente 48 h. Para completar este estudio, deberíamos evaluar si la expresión de los receptores cambia a tiempos más avanzados y examinar, si en las cercanías al momento de expulsión de los restos de embriones reabsorbidos, la relación entre ambas isoformas se altera, de manera tal que permita que el útero se contraiga, tal cual ocurre en el momento del parto.

En 1994 Chan y colaboradores realizaron un mapeo comparativo de algunos genes de lipocalinas, la familia a la que pertenece la glicodelina, entre el genoma humano y el murino⁸⁰. Más adelante, Keil y colaboradores, en un trabajo relacionado con la expresión del ARNm de Gd en el tracto genital de la rata y como control de detección entre especies, muestran un Southern blot donde se observa la hibridización de la sonda antisentido de la Gd al producto de PCR en ratón⁸¹. Estos son los únicos dos registros que hacen referencia a una

glicodelina de origen murino. En la actualidad, no se ha detectado la proteína ni se han secuenciado el péptido o el gen en el ratón.

Por todo esto, consideramos que este trabajo hace un gran aporte al respecto. Primero, porque detectamos el ARNm y la proteína en el útero y la decidua de ratón. Segundo, obtuvimos una secuencia parcial del ARNm de la Gd murina que presenta el 70% de homología con la secuencias reportadas de la Gd humana y de mono. Estos resultados refuerzan la existencia de una proteína tipo glicodelina en el ratón, su semejanza en secuencia con el ARNm de la Gd humana y su expresión en tejidos u órganos reproductivos. La presencia del ARNm y la proteína en el útero y la decidua del ratón coincide con los sitios de expresión por excelencia en la mujer, ya que la Gd es considerada el mayor producto de secreción del endometrio secretor (fase lútea) y de la decidua^{82, 83}.

En nuestro modelo de RE no detectamos cambios en los niveles de ARNm de Gd luego de 2 y 6 h de tratamiento con LPS. Sí encontramos una disminución en los niveles proteicos en decidua. Aparentemente el mecanismo modulador a nivel proteico se ejerce sobre la isoforma glicosilada (biológicamente activa) y no sobre los niveles de expresión del polipéptido base. No hay antecedentes en cuanto a la expresión y/o modulación de la proteína o el ARNm de este péptido durante la sepsis, la inflamación o por acción directa del LPS.

La disminución de los niveles de Gd en la interfase materno-fetal implica depresión de los mecanismos inmunomoduladores a nivel local. En este contexto, la modulación negativa ejercida por el LPS sobre los niveles de esta proteína puede interpretarse como parte del mecanismo inflamatorio que subyace a la pérdida de la preñez en nuestro modelo. En coincidencia con nuestros resultados, recientemente se ha observado que la decidua proveniente de mujeres con abortos espontáneos tiene menores niveles de Gd, comparado con la expresión en mujeres con gestaciones normales³⁴. Por otro lado, no se han encontrado diferencias en los niveles séricos de Gd pero sí en la secreción endometrial de la proteína, entre mujeres con gestaciones normales y aquellas con problemas de fertilidad o las que sufren abortos recurrentes^{84, 85}. Es posible entonces que uno de los mecanismos que subyacen a la reabsorción embrionaria en nuestro modelo sea reducir los niveles de Gd.

La patología del aborto recurrente también está asociada al factor inhibidor de leucemia (LIF). Se ha informado que las células T de la decidua de mujeres con abortos a repetición producen menos LIF, en relación con la actividad de las células T deciduales de mujeres con embarazos normales^{86, 87}. También se ha observado

baja secreción endometrial de esta citoquina en mujeres infértiles⁸⁸. En nuestro modelo de RE encontramos aumentados los niveles de ARNm de LIF en la interfase materno-fetal, luego de 6 h de tratamiento con la endotoxina. Esto puede deberse a que el LIF, al igual que otras citoquinas, está involucrado en aspectos relacionados con la inflamación. Además, está bien documentado el incremento en la producción de LIF inducida por LPS^{52, 53, 55}. En este sentido, podemos decir que en la mayoría de los trabajos se le ha otorgado al LIF un papel antiinflamatorio contra la endotoxemia generada por LPS, lo que concuerda con nuestros resultados obtenidos *in vitro*.

La expresión de LIF en modelos murinos de pseudopreñez es idéntica a su expresión durante la preñez normal, lo que indica que su regulación podría estar bajo control materno. El LIF se expresa transitoriamente en el epitelio endometrial, con un pico de expresión en momentos previos a la implantación⁸⁹⁻⁹¹.

Se ha informado que en ratones ovariectomizados, la expresión uterina del ARNm de LIF aumenta luego de administrar estrógenos, lo que no ocurre al inyectar progesterona^{89, 92, 47}. Coinciden con esto los altos niveles de LIF que se han reportado en hembras vírgenes durante el estro y el proestro, cuando los niveles de los estrógenos maternos son elevados⁹³. Generalmente se habla de una modulación estrogénica de los niveles murinos de LIF. Sin embargo, con ensayos *in vitro*, en este trabajo mostramos por primera vez una modulación positiva ejercida por la progesterona sobre los niveles del mensajero de esta citoquina en ratón.

Diversos estudios muestran que el LIF endometrial es regulado de forma diferencial en mujeres fértiles, infértiles y en mujeres sin función ovárica⁹⁴. Estudios *in vitro* utilizando células endometriales/deciduales humanas o explantos uterinos muestran al mismo tiempo resultados contradictorios^{49, 86, 95}. Más allá de las diferencias en cuanto a la regulación del LIF por esteroides sexuales que puedan existir entre la mujer y el ratón, se ha llegado a la conclusión de que los efectos de la progesterona sobre el LIF producido por el endometrio son muy complejos. Aparentemente, dependen de múltiples factores como el tipo de tejido o de células, las condiciones experimentales o el estatus fisiológico, así como también de la especie que se trate. Sin lugar a dudas, las hormonas sexuales juegan un papel fundamental, pero el normal funcionamiento y las interacciones de otros mediadores, como citoquinas y factores de crecimiento, resultan ser cruciales para la modulación de LIF⁹⁵⁻⁹⁷.

Si bien nuestros resultados muestran una modulación positiva por parte del LPS sobre los niveles de ARNm de LIF *in vivo*, esto no ocurre *in vitro*. Los estudios realizados que ponen en evidencia la inducción de

LIF mediada por LPS, se corresponden con estudios *in vivo* en los que los animales fueron tratados con la bacteria *E. coli* o directamente con LPS. No hay antecedentes de la modulación *in vitro* de LIF por esta endotoxina. Si bien los estudios *in vitro* constituyen herramientas de gran ayuda, hay que tener en cuenta las limitaciones y los condicionamientos de cada técnica al momento de evaluar resultados. En los estudios *in vivo* o *ex vivo*, la administración de endotoxina dispara un proceso inflamatorio que no es comparable con las interacciones que puedan producirse por estimulación de explantos de tejido con el LPS *in vitro*.

La progesterona, que induce el ARNm de LIF *in vitro*, parece ser parte del mecanismo antiinflamatorio a nivel del útero. En presencia de la hormona, la inducción de los niveles de PGE por la endotoxina es revertida completamente. Sin embargo, los niveles de NO que también aumentan en respuesta al LPS, disminuyen parcialmente al coincubar con P. En este último caso, el mecanismo regulatorio ejercido por la progesterona aparentemente estaría mediado por LIF.

Hambartsoumian y colaboradores informaron, en un trabajo publicado en el año 2001, aumento de los niveles de ARNm de la NOSi inducido por LIF en cultivo de células trofoblásticas humanas⁹⁸. Por otro lado, también se ha informado que esta citoquina regula positivamente los niveles de PGE y de su receptor en una línea celular de trofoblasto extravellado⁹⁹. Particularmente *in vivo*, se ha encontrado expresión disminuida de la COX-2 a nivel endometrial en animales deficientes en LIF (LIF^{-/-})^{100, 101}. Aparte de estos casos, no existen evidencias directas de una posible modulación ejercida por LIF sobre el NO y las PG. En apariencia, nuestros resultados parecen contradecir lo informado en estos trabajos ya que encontramos que el LIF disminuye los niveles de ambos mediadores en cultivo. Sin embargo, en nuestro caso, los estudios se realizan sobre la estimulación de estos mediadores por LPS. Esto nos permite pensar que es posible que, bajo condiciones de sepsis, el LIF esté ejerciendo un papel antiinflamatorio que de alguna manera preserva al tejido de la acción de la endotoxina.

Cuando estudiamos si el efecto antiinflamatorio de la P podría ser vía LIF, observamos que la incubación de los explantos uterinos en presencia de un anticuerpo anti-LIF bloqueaba el efecto supresor de la hormona sobre la producción estimulada de NO por endotoxina. Esto nos sugirió que la acción de la P podría estar mediada por LIF, a través de los efectos antiinflamatorios del propio LIF endógeno.

Sin embargo, al evaluar los mismos efectos pero sobre los niveles de PGE, no encontramos reversión en presencia del anticuerpo anti-LIF. Estos resultados indicarían que el LIF no participa en el mecanismo

antiinflamatorio de la P que involucra la modulación de los niveles de PG. Sin embargo, no podemos descartar que la concentración utilizada de anticuerpo no haya sido suficiente para bloquear el efecto del LIF, ya que efectivamente vimos que esta citoquina es capaz de disminuir la producción de PGE uterina estimulada por LPS.

Referencias

- Clark DA, Chaouat G, Gorczynski RM. Thinking outside the box: mechanisms of environmental selective pressures on the outcome of the materno-fetal relationship. *Am J Reprod Immunol* 2002; 47(5):275-82.
- Clark DA, Manuel J, Lee L, Chaouat G, Gorczynski RM, Levy GA. Ecology of danger-dependent cytokine-boosted spontaneous abortion in the CBA x DBA/2 mouse model. I. Synergistic effect of LPS and (TNF-alpha + IFN-gamma) on pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52(6):370-8.
- Zahl PA, Bjerknes C. Induction of decidual placental hemorrhage in mice by endotoxins in certain Gram negative bacteria. *Proc Soc Exp Biol Med* 1943; 54:329-32.
- Romero R, Roslansky P, Oyarzun E, Wan M, Emamian M, Novitsky TJ, Gould MJ, Hobbins JC. Labor and infection. II. Bacterial endotoxin in amniotic fluid and its relationship to the onset of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158(5):1044-9.
- Cox SM, MacDonald PC, Casey ML. Assay of bacterial endotoxin (lipopolysaccharide) in human amniotic fluid: potential usefulness in diagnosis and management of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159(1):99-106.
- Shackelford R, Adams DO, Johnson SP. IFN-gamma and lipopolysaccharide induce DNA binding of transcription factor PU.1 in murine tissue macrophages. *J Immunol* 1995; 154(3):1374-82.
- Michalek SM, Kiyono H, Babb JL, McGhee JR. Inheritance of LPS nonresponsiveness and elevated splenic IgA immune responses in mice orally immunized with heterologous erythrocytes. *J Immunol* 1980; 125(5):2220-4.
- Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM, Wilmore DW. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* 1988; 318(23):1481-6.
- Spinas GA, Bloesch D, Keller U, Zimmerli W, Cammisuli S. Pretreatment with ibuprofen augments circulating tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and elastase during acute endotoxemia. *J Infect Dis* 1991; 163(1):89-95.
- Ogando DG, Paz D, Cella M, Franchi AM. The fundamental role of increased production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced embryonic resorption in mice. *Reproduction* 2003; 125(1):95-110.
- Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett* 1991; 291(1): 145-149.
- Arntzen KJ, Egeberg K, Rahimipour S, Vatten L, Austgulen R. LPS mediated production of IL-1, PGE2alpha from term decidua involves tumor necrosis factor and tumor necrosis factor receptor p55. *J Reprod Immunol* 1999; 45(2):113-125.
- Fearns C, Kravchenko VV, Ulevitch RJ, Loskutoff DJ. Murine CD14 gene expression in vivo: extramyeloid synthesis and regulation by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1995; 181:857-866.
- Katzung BG. The Eicosanoids: Prostaglandins, Thromboxanes, Leukotrienes and Related Compounds. En: Katzung BG (ed.). *Basic and clinical Pharmacology*. Norwalk, Connecticut: Appleton & Lange. 1992:264.
- Aisemberg J, Vercelli C, Billi S, Ribeiro ML, Oganondo D, Meiss R, McCann SM, Rettori V, Franchi AM. Nitric oxide mediates prostaglandins' deleterious effect on lipopolysaccharide-triggered murine fetal resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104 (18):7534-9.
- Graham JD, Clarck CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 1997; 18:502-19.
- Ragusa A, de Carolis C, dal Lago A, Miriello D, Ruggiero G, Brucato A, Pisoni MP, Muscarà M, Merati R, Maccario L, Nobili M. Progesterone supplement in pregnancy: an immunologic therapy? *Lupus* 2004; 13(9):639-42.
- Astle S, Slater DM, Thornton S. The involvement of progesterone in the onset of human labour. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 108(2):177-81.
- Szekeres-Bartho J, Polgar B, Kozma N, Miko E, Par G, Szereday L, Barakonyi A, Palkovics T, Papp O, Varga P. Progesterone-dependent immunomodulation. *Chem Immunol Allergy* 2005; 89:118-25.
- King A, Burrows T, Verma S, Hiby S, Loke YW. Human uterine lymphocytes. *Hum Reprod Update* 1998; 4(5):480-5.
- Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Curr Opin Immunol* 2000; 12(6):731-7.
- Jayachandran R, Shaila MS, Karande AA. Analysis of the role of oligosaccharides in the apoptotic activity of glycodelin A. *J Biom Chem* 2004; 279:8585-91.
- Julkunen M, Rutanen EM, Koskimies A, Ranta T, Bohn H, Seppälä M. Distribution of placental protein 14 in tissues and body fluids during pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1985; 442:571-2.
- Julkunen M. Human decidua synthesizes placental protein 14 (PP14) in vitro. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1986; 112(2):271-7.

25. Mandelin E, Koistinen H, Koistinen R, Affandi B, Seppälä M. Levonorgestrel-releasing intrauterine device-wearing women express contraceptive glycodeilin A in endometrium during midcycle: another contraceptive mechanism? *Hum Reprod* 1997; 12(12):2671-5.
26. Vaisse C, Atger M, Potier B, Milgrom E. Human placental protein 14 gene: sequence and characterization of a short duplication. *DNA Cell Biol* 1990; 9(6):401-13.
27. Taylor RN, Savouret JF, Vaisse C, Vigne JL, Ryan I, Hornung D, Seppälä M, Milgrom E. Promegestone (R5020) and mifepristone (RU486) both function as progestational agonists of human glycodeilin gene expression in isolated human epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(11):4006-12.
28. Taylor RN, Vigne JL, Zhang P, Hoang P, Lebovic DI, Mueller MD. Effects of progestins and relaxin on glycodeilin gene expression in human endometrial cells. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182(4):841-7.
29. Gao J, Mazella J, Seppala M, Tseng L. Ligand activated hPR modulates the glycodeilin promoter activity through the Sp1 sites in human endometrial adenocarcinoma cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 176(1-2):97-102.
30. Rachmilewitz J, Riely GJ, Tykocinski ML. Placental protein 14 functions as a direct T- cell inhibitor. *Cell Immunol* 1999; 191:26-33.
31. Rachmilewitz J, Riely GJ, Huang JH, Chen A, Tykocinski ML. A rheostatic mechanism for T-cell inhibition based on elevation of activation thresholds. *Blood* 2001; 98:3727-32.
32. Okamoto N, Uchida A, Takakura K, Kariya Y, Kanzaki H, Riittinen L, Koistinen R, Seppälä M, Mori T. Suppression by human placental protein 14 of natural killer cell activity. *Am J Reprod Immunol* 1991; 26:137-42.
33. Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 2003; 198(8):1201-12.
34. Toth B, Roth K, Kunert-Keil C, Scholz C, Schulze S, Mylonas I, Friese K, Jeschke U. Glycodeilin protein and mRNA is downregulated in human first trimester abortion and partially upregulated in mole pregnancy. *J Histochem Cytochem* 2008; 56(5):477-85.
35. Auernhammer AC, Melmed S. Leukemia-Inhibitory Factor-Neuroimmune Modulator of Endocrine Function. *Endocr Rev* 2000; 21:313-45.
36. Haines BP, Voyle RB, Rathjen PD. Intracellular and extracellular leukemia inhibitory factor proteins have different cellular activities that are mediated by distinct protein motifs. *Mol Biol Cell* 2000; 11(4):1369-83.
37. Hilton DJ, Gough NM. Leukemia inhibitory factor: a biological perspective. *J Cell Biochem* 1988; 46(1):21-6.
38. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003; 374(Pt 1):1-20.
39. Zhang JG, Zhang Y, Owczarek CM, Ward LD, Moritz RL, Simpson RJ. Identification and characterization of two distinct truncated forms of gp130 and a soluble form of leukemia inhibitory factor receptor-chain in normal human urine and plasma. *J Biol Chem* 1998; 273:10798-805.
40. Arici A, Oral E, Bahtiyar O, Engin O, Seli E, Jones EE. Leukaemia inhibitory factor expression in human follicular fluid and ovarian cells. *Hum Reprod* 1997; 12(6):1233-9.
41. Jean M, Mirallie S, Barriere P, Godard A, Mensier A, Lopes P. Leukaemia inhibitory factor expression in human follicular fluid. *Hum Reprod* 1999; 14(2):571.
42. Kimber SJ. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology *Reproduction* 2005; 130:131-45.
43. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992; 359(6390):76-9.
44. Rodriguez CI, Cheng JG, Liu L, Cochlin CL. A secreted von Willebrand factor type a domain-containing factor, is regulated by leukemia inhibitory factor in the uterus at the time of embryo implantation. *Endocrinology* 2004; 145:1410-8.
45. Goggin T, Nguyen QT, Munafo A. Population pharmacokinetic modelling of Emfilermin (recombinant human leukaemia inhibitory factor, r-hLIF) in healthy postmenopausal women and in infertile patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 57:576-85.
46. Steck T, Giess R, Suetterlin MW, Bolland M, Wiest S, Pöhls UG, Dietl J. Leukaemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women with unexplained infertility and recurrent failure of implantation after IVF and embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 112:69-73.
47. Yang ZM, Chen DB, Le SP, Harper MJ. Differential hormonal regulation of leukemia inhibitory factor (LIF) in rabbit and mouse uterus. *Mol Reprod Dev* 1996; 43(4):470-6.
48. Ace CI, Okulicz WC. Differential gene regulation by estrogen and progesterone in the primate endometrium. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 115(1):95-103.
49. Sawai K, Matsuzaki N, Okada T, Shimoya K, Koyama M, Azuma C, Saji F, Murata Y. Human decidual cell biosynthesis of leukemia inhibitory factor: regulation by decidual cytokines and steroid hormones. *Biol Reprod* 1997; 56(5):1274-80.
50. Reinhart KC, Dubey RK, Mummery CL, van Rooijen M, Keller PJ, Marinella R. Synthesis and regulation of leukaemia inhibitory factor in cultured bovine oviduct

- cells by hormones. *Mol Hum Reprod* 1998; 4(3):301-8.
51. Vogiagis D, Fry RC, Sandeman RM, Salamonsen LA. Leukaemia inhibitory factor in endometrium during the oestrous cycle, early pregnancy and in ovariectomized steroid-treated ewes. *J Reprod Fertil* 1997; 109(2):279-88.
52. Ulich TR, Fann MJ, Patterson PH, Williams JH, Samal B, Del Castillo J, Yin S, Guo K, Remick DG. Intratracheal injection of LPS and cytokines. V. LPS induces expression of LIF and LIF inhibits acute inflammation. *Am J Physiol* 1994; 267(4 Pt 1):L442-6.
53. Chesnokova V, Kariagina A, Melmed S. Opposing effects of pituitary leukemia inhibitory factor and SOCS-3 on the ACTH axis response to inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282 (5):E1110-8.
54. Brown MA, Metcalf D, Gough NM. Leukaemia inhibitory factor and interleukin 6 are expressed at very low levels in the normal adult mouse and are induced by inflammation. *Cytokine* 1994; 6 (3):300-9.
55. Waring PM, Waring LJ, Billington T, Metcalf D. Leukemia inhibitory factor protects against experimental lethal *Escherichia coli* septic shock in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(5):1337-41.
56. Block MI, Fraker DL, Strassmann G, Billingsley KG, Arnold WS, Perlis C, Alexander HR. Endogenous D-factor activity partially mediates the toxic but not the therapeutic effects of tumor necrosis factor. *Int J Cancer* 1995 63(2):245-9.
57. Weber MA, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Quesniaux V, Poli V, Stewart CL. Endogenous leukemia inhibitory factor attenuates endotoxin response. *Lab Invest* 2005; 85:276-84.
58. Zhu M, Oishi K, Lee SC, Patterson PH. Studies using leukemia inhibitory factor (LIF) knockout mice and a LIF adenoviral vector demonstrate a key anti-inflammatory role for this cytokine in cutaneous inflammation. *J Immunol* 2001; 166(3):2049-54.
59. Alexander HR, Wong GG, Doherty GM, Venzon DJ, Fraker DL, Norton JA. Differentiation factor/leukemia inhibitory factor protection against lethal endotoxemia in mice: synergistic effect with interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1992; 175(4):1139-42.
60. Gadiant RA, Patterson PH. Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. *Stem Cells* 1999; 17(3):127-37.
61. Grisham MB, Johnson GG, Lancaster JR Jr. Quantification of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods in Enzymol* 1996; 268:237-246.
62. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
63. Jaffe BM, Behrman HR (eds.). *Methods of Hormone Radioimmunoassay*. New York: Academic Press. 1974:19.
64. Schindler AE. Role of progestogens for the prevention of premature birth. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97(5):435-8.
65. Elenkov IJ, Chrousos GP, Wilder RL. Neuroendocrine regulation of IL-12 and TNF-alpha/IL-10 balance. Clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:94-105.
66. Kidd D, Wilson P, Unwin B, Dorward N. Lymphocytic hypophysitis presenting early in pregnancy. *J Neurol* 2003; 250(11):1385-7.
67. Billington WD. The normal fetomaternal immune relationship. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1992; 6(3):417-38.
68. Faas M, Bouman A, Moesa H, Heineman MJ, de Leij L, Schuiling G. The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: a Th2-type response? *Fertil Steril* 2000; 74(5):1008-13.
69. Kruse C, Varming K, Christiansen OB. Prospective, serial investigations of in-vitro lymphocyte cytokine production, CD62L expression and proliferative response to microbial antigens in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2003; 18(11):2465-72.
70. Raghupathy R, Al Mutawa E, Makhseed M, Al-Azemi M, Azizieh F. Redirection of cytokine production by lymphocytes from women with pre-term delivery by dydrogesterone. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58(1):31-8.
71. Fidel PI Jr, Romero R, Maymon E, Hertelendy F. Bacteria-induced or bacterial product-induced preterm parturition in mice and rabbits is preceded by a significant fall in serum progesterone concentrations. *J Matern Fetal Med* 1998; 7(5):222-6.
72. Mitreski A, Radeka G. Prostacyclin and hormone levels in patients with symptoms of miscarriage and infection. *Med Pregl* 2002; 55(9-10):371-9.
73. Wang H, Hirsch E. Bacterially-induced preterm labor and regulation of prostaglandin-metabolizing enzyme expression in mice: the role of toll-like receptor 4. *Biol Reprod* 2003; 69(6):1957-63.
74. Shakil T, Whitehead SA. Inhibitory action of peritoneal macrophages on progesterone secretion from co-cultured rat granulosa cells. *Biol Reprod* 1994; 50(5):1183-9.
75. Walch K, Hefler L, Nagele F. Oral dydrogesterone treatment during the first trimester of pregnancy: the prevention of miscarriage study (PROMIS). A double-blind, prospectively randomized, placebo-controlled, parallel group trial. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005; 18(4):265-9.
76. El-Zibdeh MY. Dydrogesterone in the reduction of recurrent spontaneous abortion. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97(5):431-4.

77. Frydman R, Lelaidier C, Baton-Saint-Mieux C, Fernández H, Vial M, Bourget P. Labor induction in woman at term with mifepristone (RU 486): a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Obstet Gynecol* 1988; 80:972-75.
78. Mahajan DK, London SN. Mifepristone (RU486): a review. *Fertil Steril* 1997; 68(6):967-76.
79. Ogle TF. Progesterone-action in the decidual mesometrium of pregnancy. *Steroids* 2002; 67(1):1-14.
80. Chan P, Simon-Chazottes D, Mattei MG, Guenet JL, Salier JP. Comparative mapping of lipocalin genes in human and mouse: the four genes for complement C8 gamma chain, prostaglandin-D-synthase, oncogene-24p3, and progesterone-associated endometrial protein map to 81. HSA9 and MMU2. *Genomics* 1994; 23(1):145-50.
81. Keil C, Husen B, Giebel J, Rune G, Walther R. Glycodelin mRNA is expressed in the genital tract of male and female rats (*Rattus norvegicus*). *J Mol Endocrinol* 1999 23(1):57-66.
82. Zhou HM, Ramachandran S, Kim JG, Raynor DB, Rock JA, Parthasarathy S. Implications in the management of pregnancy: II. Low levels of gene expression but enhanced uptake and accumulation of umbilical cord glycodelin. *Fertil Steril* 2000; 73(4):843-7.
83. Rutanen EM, Koistinen R, Seppälä M, Julkunen M, Suikkari AM, Huhtala ML. Progesterone-associated proteins PP12 and PP14 in the human endometrium. *J Steroid Biochem* 1987; 27(1-3):25-31.
84. Dalton CF, Laird SM, Estdale SE, Saravelos HG, Li TC. Endometrial protein PP14 and CA-125 in recurrent miscarriage patients; correlation with pregnancy outcome. *Hum Reprod* 1998; 13(11):3197-202.
85. Nylund L, Gustafson O, Lindblom B, Pousette A, Seppälä M, Riittinen L, Akerlöf E. Placental protein 14 in human in-vitro fertilization early pregnancies. *Hum Reprod* 1992; 7(1):128-30.
86. Piccinni MP, Romagnani S. Regulation of fetal allograft survival by a hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines. *Immunol Res* 1998; 15(2):141-50.
87. Piccinni MP, Scaletti C, Vultaggio A, Maggi E, Romagnani S. Defective production of LIF, M-CSF and Th2-type cytokines by T cells at fetomaternal interface is associated with pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2001; 52(1-2):35-43.
88. Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Li TC, Zhang X. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod* 1997; 12(3):569-74.
89. Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(24):11408-12.
90. Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology* 2000; 141(12):4365-72.
91. Fouladi Nashta AA, Andreu CV, Nijjar N, Heath JK, Kimber SJ. Role of leukemia inhibitor factor (LIF) in decidualisation of murine uterine stromal cells in vitro. *J Endocrinol* 2004; 181(3):477-92.
92. Stewart CL, Cullinan EB. Preimplantation development of the mammalian embryo and its regulation by growth factors. *Dev Genet* 1997; 21(1):91-101.
93. Shen MM, Leder P. Leukemia inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(17):8240-4.
94. Hambartsoumian E, Taupin JL, Moreau JF, Frydman R y Chaouat G. In-vivo administration of progesterone inhibits the secretion of endometrial leukaemia inhibitory factor in vitro. *Mol Hum Reprod* 1998; 4(11):1039-44.
95. Arici A, Engin O, Attar E, Olive DL. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80(6):1908-15.
96. Klentzeris LD. The role of endometrium in implantation. *Hum Reprod* 1997; 12 Suppl 11:170-5.
97. Hambartsoumian E, Srivastava RK, Seibel MM. Differential expression and regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA in human trophoblasts in vitro. *Am J Reprod Immunol* 2001; 45(2):78-85.
98. Kishimoto T. Signal transduction through homo- or heterodimers of gp130. *Stem Cells* 1994; 12 Suppl. 1:37-44.
99. Horita H, Kuroda E, Hachisuga T, Kashimura M, Yamashita U. Induction of prostaglandin E2 production by leukemia inhibitory factor promotes migration of first trimester extravillous trophoblast cell line, HTR-8/SVneo. *Hum Reprod* 2007; 22(7):1801-9.
100. Fouladi-Nashta AA, Jones CJ, Nijjar N, Mohamet L, Smith A, Chambers I, Kimber SJ. Characterization of the uterine phenotype during the peri-implantation period for LIF-null, MF1 strain mice. *Dev Biol* 2005; 281(1):1-21.
101. Song H, Lim H, Das SK, Paria BC, Dey SK. Dysregulation of EGF family of growth factors and COX-2 in the uterus during the preattachment and attachment reactions of the blastocyst with the luminal epithelium correlates with implantation failure in LIF-deficient mice. *Mol Endocrinol* 2000; 14(8):1147-61.