

El rol de la Interleuquina 6 en el éxito gestacional

Gabriela Gutiérrez, Dr. en Ciencias de la UBA^{1,2}

Gisela Junovich, Lic. En Ciencias Biológicas, FCEN-UBA^{1,2}

Valeria Dubinsky, Lic. En Ciencias Biológicas, FCEN-UBA¹

R. Sergio Pasqualini, Dr. Especialista en Ginecología²

M. Teresa Gentile, Dr. en Ciencias de la UBA¹

¹Dep. Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires – IDEHU, CONICET - Junín 956 4P (1113) Buenos Aires, Argentina - gabgutie@ffyb.uba.ar

²Halitus Instituto Médico - MT de Alvear 2084 (1122) Buenos Aires, Argentina
gabriela.gutierrez@halitus.com

Resumen

La principal explicación para el aborto de embriones genéticamente normales es el daño vascular producido por algunas citoquinas. Se ha hecho crucial identificar el rol de cada una en la vascularización endometrial y placentaria. Entre las citoquinas estudiadas, la interleuquina-6 ha sido recientemente considerada un factor capaz de resolver el final de un proceso inflamatorio a favor de la síntesis de citoquinas antiinflamatorias. En esta revisión analizamos el rol de IL-6 en el control de la transición de la implantación a la vascularización placentaria; en la capacidad invasiva del embrión; en la modulación de la respuesta inmune mediada por anticuerpos y en la respuesta a infecciones bacterianas, durante la gestación. Para ello utilizamos el modelo murino abortador de hembras CBA/J preñadas por machos DBA/2. Demostramos que estas placentas son deficientes en la producción de IL-6 durante la etapa de vascularización placentaria, y que esto puede ser corregido con una terapia de reemplazo de IL-6, así como con tratamiento anticoagulante o antioxidante con vitamina E. Los tres tratamientos fueron capaces de disminuir el índice de pérdidas fetales. Asimismo, IL-6 fue capaz de incrementar la producción de anticuerpos protectores de la unidad fetoplacentaria, en hembras múltiparas.

Durante una infección bacteriana, la IL-6 tendría un rol diferente. Los receptores de la inmunidad innata tipo Toll para lipopolisacárido, estarían involucrados en este proceso abortogénico. La inducción de tolerancia a LPS durante la preñez del modelo murino fue capaz de prevenir un incremento exacerbado y abortogénico de IL-6 durante la etapa de vascularización placentaria.

Palabras claves:

implantación; aborto recurrente; citoquinas, IL-6; VEGF, NK endometriales; enoxaparina; vitamina E

Introducción

Desde que se ha aceptado que la principal explicación para el aborto de embriones genéticamente normales es el daño vascular producido por algunas citoquinas^(1,2) la Inmunología se ha acercado a la Hematología en términos de Medicina Reproductiva. A partir de ello, se ha caracterizado que tanto el proceso de vascularización endometrial como placentaria están gobernados por citoquinas, y que el balance final de estas moléculas reguladoras es específico de cada etapa de la gestación^(3,4). En este sentido se ha hecho crucial tanto identificar el rol de cada una en la vascularización endometrial y placentaria, como definir las reglas que regulan la transición desde un proceso inflamatorio necesario para que la implantación embrionaria se produzca, hacia un proceso antiinflamatorio y angiogénico propio de la placentación. Entre las citoquinas estudiadas, la IL-6 había sido hasta ahora muy controvertida en reproducción, ya que su rol fue incluido tanto en los procesos pro-inflamatorios como antiinflamatorios^(5,6). Algunos autores consideraron que un exceso en los niveles de su producción estaría implicado en la causa de infertilidad o aborto recurrente⁽⁷⁾, mientras que otros atribuyen el mismo efecto a su deficiencia^(8,9). En este punto era lógico postular que el efecto de IL-6 podría depender, no solo de su concentración, sino de la etapa de la gestación en que fuera estudiado.

Considerando además que esta citoquina ha sido recientemente considerada como un factor capaz de resolver el final de un proceso inflamatorio a favor de la síntesis de citoquinas antiinflamatorias ⁽¹⁰⁾, hemos planteado como hipótesis que esta interleuquina podría ser uno de los factores reguladores de la transición de un ambiente propio de una implantación exitosa, a uno apto para una correcta vascularización placentaria.

En esta revisión analizaremos, además, su rol en el control de la capacidad invasiva del embrión, así como en la modulación de la respuesta inmune mediada por anticuerpos durante la gestación, y en la respuesta a infecciones bacterianas durante la misma.

Interleukina 6 y reproducción: que se sabía hasta hoy

IL-6 es una citoquina pleiotrópica y multifuncional, que pertenece a una familia que comparte el mismo receptor de membrana CD130. Estudios realizados en ratones knock-out para IL-6, han demostrado que la mayoría de sus funciones pueden ser llevadas a cabo por otras citoquinas de la familia, como lo son el LIF, la IL-11, la oncostatina M, el factor neutrófilo ciliar y la cardiotropina. A pesar de que la mayoría de sus funciones biológicas ocurren por activación de CD130 al unirse IL-6, existe un receptor soluble específico (CD126) que forma un complejo agonista, capaz de desencadenar respuestas de señalización a través de la vía de JAK-STAT. La regulación de su actividad se da a través de SOCS 3 (supresor de la señalización de citoquinas).

La clasificación de la Interleuquina-6 como Th1 o Th2 ha sido considerada muy controvertida durante varios años. Esta controversia está basada en que la misma molécula puede presentar ambas características dependiendo de la dosis, la fuente celular y la etapa gestacional estudiada ⁽¹¹⁾. Hoy en día se considera que la presencia de IL-6 desplaza la balanza Th1/Th2 hacia una respuesta Th2 ⁽¹²⁾.

Se ha demostrado que es necesaria en la implantación, posiblemente debido a que regula la producción de enzimas del tipo de las metaloproteasas, responsables de la digestión de la matriz extracelular ⁽¹³⁾. Hacia el final del embarazo, los niveles de expresión de ARN mensajero de IL-6 son cuatro veces mayores que en el primer trimestre, posiblemente porque está involucrada en el proceso pro-inflamatorio del trabajo pre-parto ⁽¹⁴⁾. La exposición de células estromales del endometrio a IL-6 desencadena el proceso de decidualización ⁽¹⁵⁾. Mientras que sus niveles de producción endometrial durante la preñez temprana también se refuerzan por acción del embrión ⁽¹⁶⁾, niveles deciduales exacerbados de esta citoquina son perjudiciales para el mantenimiento de la preñez. El estradiol y la progesterona estarían implicados

en la regulación de su expresión ⁽¹⁷⁾. Sin embargo, poco se sabe hasta ahora de los posibles mecanismos implicados en el éxito gestacional.

IL-6 y la prevención del aborto recurrente

La placenta constituye la principal fuente de IL-6 durante la gestación ⁽¹⁸⁾ y su deficiencia está frecuentemente asociada a aborto recurrente ^(19,20). Considerando además que durante el primer trimestre la IL-6 está implicada en la remodelación de tejidos placentarios, así como en la hematopoyesis y la vascularización de las vellosidades placentarias, hemos decidido caracterizar los niveles de esta citoquina en el aborto recurrente asociado a fallas inmunológicas y hematológicas.

Para ello ha sido particularmente útil el uso del modelo murino abortador de hembras CBA/J preñadas por machos DBA/2 ⁽²¹⁾. Esta cruce alogénea muestra una exacerbada expresión placentaria de citoquinas inflamatorias, que desencadena un desequilibrio en la expresión del factor pro-coagulante fgl2. Esto correlaciona con un alto índice de muerte fetal por isquemia ⁽¹⁾. Hemos demostrado en este modelo, que las placentas correspondientes a la cruce abortadora expresan menores niveles de IL-6 que los de la cruce control alogénea no abortadora: de hembras CBA/J preñadas por machos BALB/c ⁽²²⁾. Sin embargo, es importante destacar que esta deficiencia se observa durante el período correspondiente a la ventana de vascularización placentaria (día 8 a 10,5 de la gestación del ratón). A partir de este dato, hemos postulado que la deficiencia de IL-6 que presentan las placentas del modelo abortador sería en parte la causa de un inapropiado control que lleva a una inflamación exacerbada, la cual deriva en una inadecuada angiogénesis. Este desbalance conduce a la muerte fetal por isquemia en el momento en que debía producirse el establecimiento de una adecuada circulación.

Considerando que varios autores han demostrado, *in vitro*, que existe un efecto autócrino de la IL-6, el cual es dependiente de los valores de ARN mensajero ^(23, 24), analizamos el efecto *in vivo* de la inoculación post-implantación de 2500U de IL-6 recombinante humana (rhIL-6). Demostramos un incremento en los niveles locales de IL-6 feto-placentaria murina, alcanzando valores similares a los expresados por la cruce normal (CBA/J x BALB/c). Este incremento de IL-6 endógena fue acompañado de una disminución del índice de pérdidas fetales de las hembras tratadas ⁽²²⁾. Sin embargo, cuando se ensayó la misma dosis de 2500U de rhIL-6 a hembras preñadas, pero inoculadas desde el período pre-implantación, encontramos que esta dosis producía un 100% de aborto. El mismo efecto perjudicial se produjo cuando se inocularon 5000U tanto al grupo abortador como al

grupo control ⁽²²⁾. Estos datos sostienen la hipótesis de que la IL-6 tiene diferentes roles dependiendo de la dosis y de la etapa gestacional estudiada.

IL-6 y su rol en la terapia anticoagulante y antioxidante del aborto recurrente

Ha sido demostrado que el proceso trombótico inducido por citoquinas en el endotelio de la vasculatura útero-placentaria es causa de aborto ⁽²⁵⁾. Por otra parte, se ha confirmado el efecto preventivo de la terapia con heparina de bajo peso molecular (enoxaparina) en mujeres trombofílicas con fallas de aborto recurrente ⁽²⁴⁾. Es necesario tener en cuenta, además, que la IL-6 es una *heparin-binding-protein*, y que esta unión protegería a la IL-6 de la degradación enzimática ⁽²⁶⁾. Considerando estos antecedentes, hemos investigado el efecto del tratamiento post-implantación con enoxaparina de las hembras del modelo abortador CBA/J x DBA/2 sobre los niveles de producción de IL-6 placentaria y sobre el índice de aborto. El tratamiento de la preñez con enoxaparina, es capaz de disminuir el índice de pérdidas fetales e inducir al mismo tiempo un efecto inmunomodulador mediante la regulación de la síntesis de IL-6, ya que revierte la deficiencia placentaria de esta citoquina que presentan las hembras de esta cruce abortadora ⁽²²⁾.

Este efecto protector de la gestación, podría estar asociado a un efecto antiinflamatorio ejercido por la heparina. Sin embargo, la inflamación es un mecanismo necesario pero no suficiente para que el evento trombótico se produzca. A partir de esto, consideramos la hipótesis donde se postula que el estrés oxidativo es un mecanismo implicado en la etiología del aborto, a pesar de que aun no se ha podido esclarecer si es independiente o no de un proceso inflamatorio que lo precede. Teniendo en cuenta que se ha demostrado que el tratamiento *in vitro* con Vitamina E es capaz de disminuir la producción de citoquinas inflamatorias como la IL-12 y el IFN- γ ⁽²⁷⁾, hemos evaluado el efecto del tratamiento sobre los niveles de producción de IL-6 en el modelo abortador murino. Los resultados obtenidos fueron dependientes de la dosis y de la etapa de la gestación a la que la vitamina fue administrada, y mostraron un efecto preventivo sobre el aborto de más de un 90% para la dosis de 15mg/día administrados desde el inicio de la gestación y hasta el momento en que los eventos que conducen a la vascularización placentaria culminan (día 8,5-12,5). Este efecto es acompañado de un incremento en la síntesis *in vivo* de IL-6 placentaria.

Se ha demostrado además que la Vitamina E es capaz de inducir la síntesis del factor de transcripción inducible de hipoxia HIF 1- α , capaz de activar la transcripción del factor de crecimiento del endotelio vascular

VEGF frente a una situación de hipoxia o de estrés oxidativo ⁽²⁸⁾. Es importante tener en cuenta que este factor de crecimiento endotelial es un mitógeno específico del endotelio que promueve la angiogénesis de la vasculatura placentaria ⁽²⁹⁾, y su expresión se encuentra alterada en el aborto recurrente ⁽³⁰⁾. A partir de esto, evaluamos los niveles de expresión de VEGF en las placentas de las hembras abortadoras, y el posible efecto del tratamiento con Vitamina E sobre su síntesis. Los resultados obtenidos demuestran que al igual que ocurre para IL-6, existe una deficiencia en la producción de VEGF por las placentas de la cruce abortadora. Este hecho sugiere que la deficiencia de esta citoquina angiogénica podría estar vinculada a la etiología de la muerte fetal, que ocurre en el momento que se produciría la transición de la suplementación de oxígeno al feto mediante difusión, hacia una circulación placentaria definida. Por otra parte, demostramos que el tratamiento con Vitamina E también fue capaz de incrementar los niveles de VEGF.

Siguiendo con esta línea de estudio, investigamos si el tratamiento anticoagulante y preventivo del aborto con enoxaparina, tendría también algún efecto sobre la producción de esta citoquina angiogénica. Los datos obtenidos demostraron que, al igual que ocurre con el tratamiento con Vitamina E, la inoculación post-implantación de enoxaparina es capaz de incrementar significativamente los valores de VEGF, con respecto a los animales abortadores no tratados. Estos resultados permiten concluir que, tanto el tratamiento anticoagulante con enoxaparina como el antioxidante con Vitamina E, tendrían un efecto preventivo del aborto acompañado de una acción inmunomoduladora similar.

Este resultado es de potencial importancia en su posible aplicación clínica, ya que podría plantearse una alternativa terapéutica para el tratamiento del aborto recurrente en aquellas pacientes donde la terapia anticoagulante no está indicada.

A partir de estos datos hemos postulado que la IL-6, en nuestro modelo de estudio, estaría regulando el final del predominio inflamatorio de la ventana implantatoria para favorecer la angiogénesis placentaria.

IL-6 y su rol en la modulación de la respuesta mediada por anticuerpos

Durante la preñez el feto alogéneo no representa un material inerte. La madre es capaz de montar una respuesta inmune directa contra los antígenos paternos presentados por la progenie. Sin embargo, en circunstancias normales, no ocurre ningún daño inmunológico en la unidad materno-fetal. Entre los variados mecanismos a través de los cuales se induce una tolerancia temporal materna, podría mencionarse la síntesis

de factores supresores placentarios capaces de inducir la producción de anticuerpos protectores del antígeno. Más aun, se ha demostrado que luego de la implantación la madre produce estos anticuerpos bloqueantes, los cuales son esenciales para prevenir el rechazo inmune del feto. Fallas en esta respuesta podrían causar aborto recurrente en el primer trimestre ⁽³¹⁾. Entre estas moléculas, hemos descrito el rol de los anticuerpos asimétricos durante la gestación ⁽³²⁾. Estos anticuerpos se encuentran en el suero y placenta de mujeres embarazadas, y gran parte de ellos son específicos contra antígenos paternos ⁽³³⁾. Las moléculas IgG asimétricas son funcionalmente univalentes, debido a la presencia de un hidrato de carbono en uno de los paratopes, que provoca un impedimento estérico y su correcta interacción con el epítopo antigénico. Por lo tanto, son capaces de unirse al antígeno, pero no desencadenan respuesta citotóxica. De allí su clasificación como bloqueantes. Cuanto mayor sea su proporción respecto del mismo anticuerpo con actividad anti-paterna, mayor será el efecto protector.

Considerando que la IL-6 es una citoquina capaz de inducir la síntesis de inmunoglobulinas, y que está implicada en la glicosilación de IgG, hemos estudiado su rol en la producción de estos anticuerpos durante la preñez ⁽³⁴⁾. Demostramos que la IL-6 producida por la placenta humana es capaz de incrementar la proporción de IgG asimétrica monoclonal secretada *in vitro* ⁽³⁵⁾, y que ratones knock-out para IL-6 presentan una disminución significativa en los niveles séricos de IgG asimétrica, la cual va acompañada de un aumento en el índice de aborto. Considerando que 2500U de rIL-6h inoculadas post-implantación en la gestación de hembras abortadoras CBA/J x DBA/2, corrige la deficiencia placentaria en la producción de esta citoquina, evaluamos la síntesis de asimétricos en este modelo murino. De acuerdo con lo esperado, el tratamiento fue capaz de incrementar significativamente la proporción de estas moléculas protectoras del antígeno, pero únicamente en hembras multíparas. De hecho, en primeras preñeces, no existen diferencias significativas en la producción de asimétricos entre la preñez de la crua abortadora y la normal, tanto a nivel sérico como local. Es importante analizar este hecho, ya que probablemente por dificultad en las técnicas de detección, la expresión de anticuerpos con actividad anti-antígenos paternos sólo ha sido posible demostrarla en multíparas ⁽³³⁾. Sucesivas exposiciones del sistema inmune materno a la presencia de alo-antígenos paternos expresados por el feto, podría ser el motivo por el cual el grado de paridad aumenta la expresión de anticuerpos bloqueantes y reduce el índice de pérdidas fetales ⁽³⁶⁾.

IL-6 y respuesta a infecciones bacterianas durante la gestación

Recientemente se ha demostrado que entre los factores que contribuyen al elevado índice de aborto asociado a un estado pro- inflamatorio de la crua abortadora CBA/J x DBA/2, el lipopolisacárido bacteriano (LPS) ambiental tendría un rol fundamental ⁽³⁷⁾. Las citoquinas del tipo Th1 incrementan la sensibilidad a las infecciones bacterianas, y los niveles de endotoxinas como el LPS incrementan el nivel de pérdidas fetales ⁽³⁷⁾. El tratamiento de hembras abortadoras preñadas con bajas dosis de LPS provoca una tolerancia en la respuesta a dosis abortogénicas de la toxina. Estudios previos han demostrado que el tratamiento *in vivo* con bajas dosis de LPS (subletales y no abortogénicas) es capaz de reducir la respuesta de los macrófagos a una segunda estimulación con esta molécula. Este mecanismo es mediado por la inactivación de la vía $\text{NF}\kappa\beta$, que se produce por la disminución de la expresión del receptor a LPS tipo Toll Tlr4 de la respuesta innata en la superficie de estas células ⁽³⁸⁾. Entre las citoquinas que ven reducida su síntesis en macrófagos tolerizados se encuentra la IL-6. Teniendo en cuenta que estas células constituyen la principal fuente de esta citoquina placentaria luego de los trofoblastos, decidimos analizar los niveles de producción de IL-6 en cultivos de suspensiones celulares obtenidas del bazo y de la placenta de las hembras tratadas con LPS, en comparación de las no tratadas. Los resultados obtenidos demostraron que una dosis de tolerización de $1\mu\text{g}/\text{día}$ de LPS fue capaz de prevenir el aumento a niveles exacerbados de IL-6, que están asociados a la inducción de pérdidas fetales mediante el desafío con una dosis alta y abortogénica del lipopolisacárido ⁽³⁹⁾. Este efecto podría ser explicado por la disminución de la expresión del Tlr4, provocado por la inducción de tolerancia a LPS que lleva a la inactivación del factor de transducción $\text{NF}\kappa\beta$, responsable de la síntesis de IL-6 ⁽³⁸⁾.

Conclusión

Por todo lo expuesto, podemos postular que la IL-6 es una citoquina esencial para la regulación de la respuesta inmune durante la gestación, ya que regularía la transición de la respuesta inflamatoria necesaria para que la implantación embrionaria se produzca, hacia una respuesta anti-inflamatoria y angiogénica, fundamental para la vascularización placentaria.

El efecto preventivo del aborto ejercido por el protocolo de reemplazo de IL-6, el tratamiento antioxidante con Vitamina E y el tratamiento anticoagulante con enoxaparina, estarían acompañados por un efecto inmunomodulador similar, mediado por IL-6.

El incremento en la síntesis de VEGF podría estar vinculado a un diálogo molecular en la producción de ambas citoquinas, bajo el estímulo del factor de transcripción HIF-1 α . Tanto el tratamiento con Vitamina E, enoxaparina o la terapia de reemplazo de la IL-6 durante la gestación, estarían compensando directa o indirectamente la acción de este factor inducible por hipoxia, en una situación de aborto recurrente. Mayores estudios están siendo llevados a cabo con la técnica de interferencia de ARN, para comprobar esta hipótesis.

Por otra parte, podemos concluir que la IL-6 estaría regulando, además, la calidad de la respuesta inmune mediada por anticuerpos durante la gestación, favoreciendo un incremento en la producción de anticuerpos bloqueantes, del tipo asimétricos.

Más aún, de acuerdo con los resultados obtenidos en el modelo de tolerización al LPS, la interleuquina 6 sería uno de los factores mediadores de la transición de la respuesta inmune innata a la adaptativa, durante la gestación.

Referencias

- Clark D, Chaouat G, Arck P, Mittrucker H, Levy G. Cytokine-dependent abortion in CBAxDBA/2 mice is mediated by the procogulant fgl2 prothrombinase. *J Immunol* 1998;160:545-9
- Clark D, Gorzynsky R. Thinking outside the box: mechanism of environmental selective pressures on the outcome of materno-fetal relationship. *Am J Reprod Immunol* 2002;47(5):275-82
- Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, Martal J. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *Am J Reprod Immunol* 2002; 53:241-56
- Chaouat G, Ledée-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. TH1/TH2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the TH1/TH2 paradigm. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004 Jun;134(2):93-119
- Kaplansky G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnier C. IL-6 a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends in Immunol* 2003;24:25-9
- Xing Z, Gaudie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei X, Achong M. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammation responses. *J Clin Invest* 1998;101:311-20
- Zenclussen A, Kortebani G, Mazzoli A, MArgni R, Malan Borel I. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor serum levels in recurrent spontaneous abortion women immunized with paternal white cells. *Am J Reprod Immunol* 2000; 44:22-9
- Smith S, Charnock-Jones D, Sharkey A. The role of Leukemia inhibitory factor and interleukin-6 in human reproduction. *Hum Reprod* 1998;13(3):237-43
- Jasper M, Tremellen K, Robertson S. Reduced expression of IL-6 and IL-1 alpha mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol* 2007;73(1):74-84
- Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*. 2005;175(6):3463-8
- Jauniaux E, Gulbis B, Schandene L, Collette J, Hustin J. Distribution of interleukin-6 in maternal and embryonic tissues during the first trimester. *Mol Hum Reprod* 1996;2(4):239-43
- Diehl S, Rincón M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol*. 2002;39(9):531-6
- Bischof P, Meisser A, Campana A. Mechanism of endometrial control of trophoblast invasion. *J Reprod Fertil Suppl* 2000;55:65-71
- Agarwal R, Loganath A, Roy A, Wong Y, Lindoff C, Ng S. Increased expression of interleukin 6 in term compared to the first trimester human placental villi. *Horm Metab Res* 2000;32(5):164-8
- Zoumakis E, Margioris A, Stournaras C, Dermitzaki E, Angelakis E, Makrigiannakis A, Koumantakis E, Granavis A. Corticotrophin-releasing hormone interacts with inflammatory prostaglandins and interleukin and affects decidualization of human endometrial stroma. *Mol Hum Reprod* 2000;6(4):344-51
- Athanassakis I, Farmakiotis V, Papadimitriou L. Uterine cytokine production during menstrual cycle and preimplantation stages in mice. *Dev Immunol* 1999;7(1):33-42
- Deb S, Tessier G, Prigent-Tessier A, Barkai U, Ferguson-Gotschall S, Srivastava R, Faliszek J, Gibori G. The expression of interleukin-6 (IL-6), IL-6 receptor, and gp130-kilodalton glycoprotein in the rat decidua and a decidual cell line: regulation by 17beta-estradiol and prolactin. *Endocrinology* 1999;140(10):4442-50
- Kameda T, Matsuzaki N, Sawai K, Okada T, Saji F, Matsuda T, Hirando T, Kishimoto T, Tanizawa O. Production of Interleukin-6 by normal human trophoblast. *Placenta* 1990;11:205-13
- Lim K, Odukoya O, Ajjan R, Li T, Weetman A, Cooke I. The role of T-helper cytokines in human reproduction. *Fertil Steril* 2000; 73(1):136-42
- Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Hassan N, Al-Azemi M, Al-Shamali E. Maternal Th1 and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human

- pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. *Cell Immunol* 1999;196(2):122-30
21. Clark D, MacDermott M, Szewczuk M. Impairment of host-versus-graft reaction in pregnant mice. II. Selective suppression of cytotoxic T-cell generation correlates with soluble suppressor activity and with successful allogeneic pregnancy. *Cell Immunol* 1980;52:106-18
 22. Gutiérrez G, Sarto A, Berod L, Canellada A, Gentile T, Pasqualini S, Margni R. Regulation of interleukin-6 fetoplacental levels could be involved in the protective effect of low-molecular weight heparin treatment on murine spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 2004;51:160-5
 23. Brenner B, Hoffman R, Blumenfeld Z, Younis JS. Gestational outcome in thrombophilic women with recurrent pregnancy loss treated by enoxaparin. *Thromb Haemost* 2000;83:693-7
 24. Sarto A, Rocha M, Geller M, Company C, Martinez M, Quintains C, Donaldson M, Pasqualini S. Treatment with enoxaparin adapted to the fertility program in women with early recurrent pregnancy loss and thrombophilia. *Medicina* 2001;61:406-12
 25. Clark D, Ding J, Chaouat G, Coulam C, August C, Levi G. The emerging role of immunoregulation of fibrinogen-related procoagulant fgl2 in the success or spontaneous abortion of early pregnancy in mice and humans. *Am J Reprod Immunol* 1999;42:37-43
 26. Jauniaux E, Gulbis B, Shandene L, Collete J, Hustin. Distribution of interleukin-6 in maternal and embryonic tissues during the first trimester. *J Mol Hum Reprod* 1996;2(4):239-43
 27. Tan PH, Sagoo P, Chan C, Yates JB, Campbell J, Beutelspacher SC, Foxwell BM, Lombardi G, George AJ. Inhibition of NF-kappa B and oxidative pathways in human dendritic cells by antioxidative vitamins generates regulatory T cells. *J Immunol* 2005;174(12):7633-44
 28. Zhang B, Tanaka J, Yang L, Yang L, Sakanaka M, Hata R, Maeda N, Mitsuda N. Protective effect of vitamin E against focal brain ischemia and neuronal death through induction of target genes of hypoxia-inducible factor-1. *Neuroscience* 2004;126(2):433-40
 29. Rodrigo R, Parra M, Bosco C, Fernandez V, Barja P, Guajardo J, Messina R. Pathophysiological basis for the prophylaxis of preeclampsia through early supplementation with antioxidant vitamins. *Pharmacol Ther* 2005;107(2):177-97
 30. Vuorela P, Carpen O, Tulppala M, Halmesmaki. VEGF, its receptor and the tie receptors in recurrent miscarriage. *Molec Hum Reprod* 2000;6(2):276-82
 31. Sin autores. Maternal blocking antibodies, the fetal allograft, and recurrent abortion. *Lancet* 1983;2:1175-6
 - Gutiérrez G, Gerntile T, Miranda S, Margni R. Asymmetric Antibodies A Protective Arm in Pregnancy. In: Markert U, eds. *Immunology of pregnancy*. Vol 89. Alemania: Jena, 2005: pp158-68
 31. Margni RA, Malan Borel I. Paradoxical behavior of asymmetric IgG antibodies. *Immunol Rev* 1998;163:77-8
 32. Miranda S, Malan Borel I, Menezes Freire S, Binaghi R, Margni RA. Influence of mouse placental factors on in vitro antibody synthesis. *J Reprod Immunol* 1996;30:151-71
 33. Gutiérrez G, Malan Borel I, Margni RA. The placental regulatory factor involved in the asymmetric IgG antibody síntesis responds to IL-6 features. *J Reprod Immunol* 2001;49:21-32
 34. Chavez DJ, McIntyre JA, Colliver JA, Faulk WP. Allogeneic matings and immunization have different effects on nulliparous and multiparous mice. *J Immunol* 1987;139:85-8
 35. Clark DA, Chaouat G, Gorczynski R. Thinking outside the box: mechanism of environmental selective pressures on the outcome of the materno-fetal relationship. *Am J Reprod Immunol* 2002;47:275-82
 36. Normura F, Akashi S, Sakako Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K, Akira S. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface Toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000;164:3476-9
 37. Dubinsky V, Junovich G, Gutiérrez G. La respuesta Inmune innata los factores ambientales y el aborto: modelo de tolerancia al lipopolisacarido durante la gestación. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 2006;40(1):71-6