

11204



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

"IDENTIFICACION DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS EN SANGRE PERIFERICA Y ENDOMETRIO EN PACIENTES CANDIDATAS A FERTILIZACION IN VITRO."

SUBDIVISION DE ESPECIALIZACION  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA  
U.N.A.M.

T E S I S

QUE PRESENTA  
PARA OBTENER EL TITULO DE  
ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA DE LA  
REPRODUCCION HUMANA  
PRESENTA:

DR. FELIX MANZUR NAVARRETE

R.A.A.

PROFESOR TITULAR: DR. FERNANDO GAVINO GAVINO

ASESOR: DR. CESAR HERNANDEZ GUERRERO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

MEXICO, D. F.

2004



DIRECCION DE ENSEÑANZA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Dedico este trabajo a mi familia y mis  
Amigos*

## *INDICE*

1. INTRODUCCIÓN
  - 1.1. IMPLANTACIÓN
  - 1.2. CELULAS ASESINAS NATURALES (NK)
  - 1.3. LEUCOCITOS ENDOMETRIALES IMPORTANTES PARA  
LA IMPLANTACION
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
3. OBJETIVO
4. HIPOTESIS
5. MATERIAL Y METODOS
6. RESULTADOS
7. DISCUSION
8. CONCLUSIONES
9. BLIBLIOGRAFIA

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO  
EN EL DEPARTAMENTO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA  
Y EN EL DEPARTAMENTO  
DE ULTRAMICROSCOPIA DEL INSTITUTO  
NACIONAL DE PERINATOLOGÍA.**

**Agradecimientos:**

**Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), por el apoyo recibido a través del soporte financiero: Fondo Sectorial en Salud-2002-C01-7615/A-1.**

**“IDENTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS EN SANGRE  
PERIFÉRICA Y ENDOMETRIO EN PACIENTES CANDIDATAS A  
FERTILIZACIÓN IN VITRO.”**

## INTRODUCCIÓN.

El proceso de implantación implica múltiples mecanismos que se relacionan para tener un medio adecuado y lograr con éxito la implantación embrionaria.

La preparación del útero para la implantación de un embrión es programada por las hormonas esteroideas ováricas que actúan en forma directa sobre el endometrio, miometrio y en forma indirecta a través de la intermediación de distintos factores de crecimiento y citocinas (1).

El endometrio esta poblado por células inmunes que producen citocinas reguladoras y permiten que el embrión sea aceptado por la madre (2).

El endometrio sufre cambios constantes durante todo el ciclo menstrual, para estar en condiciones de estar listo para el momento de la implantación.

En estos cambios juegan un papel importante la población de células inmunes, el estroma esta enriquecido con células linfoides y mieloides durante todo el ciclo, el 10 al 15% de las células endometriales son leucocitos (3).

Estas células se distribuyen solas o en agregados y se localizan sobre todo en la capa basal.

Predominan las células T supresoras, también se presentan las T helper, este patrón distingue al sistema linfóide endometrial debido a su población grande de células supresoras-citotóxicas y sus pocas células B plasmáticas.

En el endometrio se encuentran linfocitos granulados que son células redondas que tienen como característica núcleos bilobulados o indentados y un citoplasma pálido que contiene gránulos ácido filis.

Los linfocitos granulados parecen constituir un subgrupo especializado de células sobre la base de su expresión de los antígenos de la superficie celular (CD3, CD16, CD56). cuando la interleucina 2 los activa in vitro, los linfocitos granulados se tornan competentes para destruir células malignas y algunas de las normales a través de la liberación de proteínas citotóxicas que incluyen las esterasas perforina y serina.

Los linfocitos granulados se acumulan en el endometrio durante la fase luteínica y persisten en la decidua durante el primer trimestre, cuando componen el 70% de la población de leucocitos deciduales. en un ciclo no fértil los leucocitos granulados se acumulan durante la fase secretora presenta apoptosis.

Se propuso que los linfocitos granulados desempeñan un papel en la modulación de la invasión del trofoblasto durante la implantación y la placentación.

Algunos estudios in vitro documentan la actividad destructora de los linfocitos granulados activados por citocinas, existen pocos indicios para la destrucción del trofoblasto in vivo.

Por lo tanto, toda la actividad limitadora que ejerzan los linfocitos granulados sobre las células invasoras del trofoblasto parece producirse a través de un mecanismo no citotóxico que puede comprender las citocinas secretadas que incluyen el factor estimulador de colonias 1 (CSF-1), Il-1 y factor inhibidor de la leucemia (LIF).

La aparente resistencia de las células del trofoblasto a la destrucción tanto in vitro como in vivo puede explicarse porque las células del trofoblasto expresan un antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de la clase I, HLA-G, y la supresión de la actividad destructora por las células del estroma endometrial (4).

La población relativamente grande de linfocitos t en el endometrio también puede influir en gran medida sobre la función de las células del estroma y epiteliales a través de la liberación de citocinas para las cuales estas células tienen receptores.

Las citocinas son producidas por las células T activadas y existen buenas razones para creer que las endometriales se activan in situ.

## **IMPLANTACIÓN.**

La implantación apropiada del embrión es esencial para la supervivencia y crecimiento de un embarazo normal.

Esta se produce poco después de que el blastocisto eclosiona de la zona pelucida, en donde muchos componentes del sistema inmune están relacionados (5).

En el proceso de la implantación, se reclutan células inflamatorias, desarrollándose la invasión transepitelial del trofoblasto en el endometrio, acoplada con apoptosis.

La interleucina 1, es producida por el trofoblasto e induce marcadores de diferenciación de los mismos, incluyendo actividad de aromatasa.(6).

Los factores de crecimiento y citocinas podrían mediar en forma autocrina las funciones proliferativas y secretoras de los esteroides durante la preparación de la receptividad endometrial, actuar sobre el embrión, e influir en la aceptación inmunológica del producto de la concepción, además las citocinas endometriales pueden promover el desarrollo del trofoblasto (7).

## **CÉLULAS ASESINAS NATURALES (NK)**

Estos linfocitos granulares se cree que reconocen estructuras en las glucoproteínas de alto peso molecular que aparecen en la superficie de células infectadas por virus y que permiten diferenciarlas de las células normales, este reconocimiento ocurre probablemente a través de receptores del tipo lectínico (es decir, que se unen a

carbohidratos) en la superficie de las células que lo enfrenta con precisión a la célula diana con su destructor sigue la activación de la célula NK y los gránulos se polarizan entre el núcleo y la diana en pocos minutos y su contenido se libera hacia el espacio extracelular entre las dos células.

Parece ser que el componente mas importante sea una perforina o citolisina que posee una cierta homología estructural con el factor de complemento-9 (C9).

Mientras que la lisis celular inducida por C9 se consigue mediante la lesión de la membrana externa, seguida mas adelante por alteraciones nucleares, las células NK destruyen por la activación de la apoptosis, mecanismo presente en todas las células que lleva a la autoinmolación.

En mujeres que han experimentado falla en la implantación se han encontrado porcentajes elevados de CD 56+ en la circulación (>12%). Coulman (8) pudo demostrar un aumento en la tasa de embarazo en mujeres que presentaban una mayor concentración de células NK (CD56+) circulantes, después de administrar inmunoglobulina (Ig) intravenosa, con la intención de disminuir el porcentaje y actividad de este grupo celular. Y aunque el mecanismo mediante el cual la Ig promueve tales modificaciones en las células NK, el autor observó un aumento estadísticamente significativo en las mujeres que recibieron el anticuerpo, en comparación con aquellas que no lo recibieron.

Dicha evidencia señala la participación fundamental que tiene este grupo celular en los mecanismos de implantación en el humano ya que en mujeres estudiadas en una fase previa para un programa de FIVTE, se ha analizado la expresión de NK, identificando un incremento de la citotoxicidad de las células NK en sangre periférica, en contra de una línea celular blanco en estudios in vitro.

Esta actividad citotóxica por parte de células NK, se ha postula puede afectar los resultados terapéuticos de FIVTE (9).

Como las modificaciones a nivel periférico, parecen correlacionar con los cambios en el microambiente endometrial, desde el punto de vista clínico, la enumeración de las células NK, puede ser un marcador capaz de predecir el éxito de embarazo en un procedimiento de reproducción asistida.

Es así que se ha propuesto que la activación de marcadores como CD69+ y CD161+ en la expresión de NK así como la citotoxicidad de dichas células, representa el denominado factor inmunológico en la falla en la implantación.(10).

El sistema inmunológico está representando por factores que intervienen en múltiples eventos en la economía del cuerpo humano, y la desregulación de las citocinas a nivel local tendrían una respuesta negativa sobre la implantación del embrión en el endometrio (11), al activar a grupos celulares efectores como linfocitos t citotóxicos, células NK y macrófagos.

La importancia de las células NK se ve documentada en estudios entre mujeres embarazadas y no embarazadas, donde los hallazgos de estas células en las primeras es elevado comparado con las no embarazadas. (12).

## LEUCOCITOS ENDOMETRIALES IMPORTANTES PARA LA IMPLANTACIÓN.

Los leucocitos representan un porcentaje importante de las células que componen el endometrio humano, constituyen aproximadamente el 7% de las células estromales en el endometrio proliferativo y este porcentaje aumenta a más del 30% durante la fase temprana del embarazo, este último porcentaje es característico de un tejido inmunológicamente activo. Sin embargo, la organización del sistema linfático endometrial es atípica en varios aspectos: no se observan células B intraepiteliales y el estroma contiene solo algunas células B identificables, además, en el endometrio normal no se detectan células plásticas.

La población leucocitaria endometrial está compuesta principalmente por macrófagos, células T y linfocitos granulados (13).

Los macrófagos están presentes en el endometrio de la mujer no embarazada y aumentan en cantidad en la fase premenstrual en la decidua basal y la decidua parietal. Durante la gestación los macrófagos producen citocinas y factores de crecimiento que podrían cumplir una función en el crecimiento placentario (14).

Los linfocitos T varían muy poco en cantidad y distribución durante el ciclo menstrual y la fase temprana del embarazo. A diferencia de las células T de sangre periférica, la mayoría de las células T endometriales expresan el marcador del subgrupo CD8 citotóxico.

Los linfocitos granulares grandes son una forma de células NK, representan la mayor parte de la población celular linfática en el endometrio humano durante la fase lútea tardía y la fase temprana del embarazo.

Se desconoce con precisión el papel desempeñado por estas células in vitro, aunque las evidencias antes señaladas las presentan como células activas en el proceso que permite la implantación embrionaria o mediando diversas funciones a través de la liberación de citocinas, interferones y factores de crecimiento, que actuando en forma autocrina modulan las funciones proliferativas y secretoras de los esteroides durante la preparación de la receptividad endometrial actuando sobre el embrión, podrían mediar la implantación y la invasión trofoblástica, o a través del reclutamiento de macrófagos y linfocitos del endometrio y la decidua, mediar la aceptación inmunológica (tolerancia) del producto de la concepción.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

El sistema inmune juega un papel importante en la implantación del embrión en el endometrio, sin conocer hasta la fecha las características principales de la respuesta inmunológica de dicho ambiente.

El abordaje en la identificación de las células presentes en el microambiente endometrial, puede permitir entender de mejor forma la participación del brazo inmune en el éxito o fracaso del FIVTE.

## **OBJETIVO.**

Describir los porcentajes de los linfocitos efectores y reguladores de la respuesta inmunológica en el ambiente endometrial y periférico.

## **HIPÓTESIS.**

Las subpoblaciones de linfocitos presentes en el ambiente endometrial son diferentes con respecto al ambiente periférico.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

**TIPO DE ESTUDIO.-** El estudio realizado fue de tipo observacional, transversal, analítico, y retrospectivo.

**GRUPO DE ESTUDIO.-** El estudio incluyó 18 pacientes candidatas al programa de fertilización in vitro, siguiendo el protocolo establecido en el departamento de Reproducción Asistida del Instituto Nacional de Perinatología. Para el manejo y selección de pacientes, las mujeres incluidas, fueron reclutadas en el período comprendido entre los meses de mayo a julio del año 2004. Las pacientes en este estudio tenían cavidad uterina normal, realizando el diagnóstico por histeroscopia de consultorio.

**OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO.-** Se obtuvieron células mononucleares por biopsia de endometrio, utilizando cánula de novak, tomada en fase secretora del ciclo. La biopsia fue transportada al laboratorio en medio de cultivo (RPMI-1640, pH 7.4 sin rojo de fenol, In Vitro, San José Ca. USA), para mantener en condiciones óptimas las células linfoides de interés, una vez en el laboratorio el tejido fue disgregado en forma mecánica, en presencia solución fisiológica adicionada de ácido etileno-diamino tetraacético (EDTA, Gybco, BRL, Maryland, USA) 5mM, y mantenida en agitación durante 20 min. a temperatura ambiente, con la intención de promover la mayor disgregación del tejido.

Al cabo de la incubación se retiró el estroma y detritus celular, recuperándose mediante filtración el sobrenadante, las células mononucleares presentes en el sobrenadante fueron separadas mediante el empleo de gradiente de densidad, empleando lymphoprep (Nycomed, Oslo, Noruega) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Una vez terminada la separación celular, se recuperaron y lavaron las células mononucleares presentes. Un mínimo de 1,000,000 de células fueron requeridas para

realizar los experimentos de cotillearía de flujo, así como una viabilidad mayor al 90% en las células obtenidas, evaluadas mediante un colorante vital (azul tripano).

Al momento de tomar la biopsia de endometrio, se obtuvo una muestra de sangre periférica anticoagulada, de donde se determinaron las subpoblaciones de linfocitos. Se colocan 100  $\mu$ l de sangre total heparinizada y se continuó con la técnica de inmunoidentificación descrita más adelante, en todos los casos se pidió una carta de consentimiento informado a las mujeres participantes, después de explicarles los alcances e intereses del estudio.

**DETERMINACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.-** La identificación de las subpoblaciones de linfocitos se llevó a cabo mediante citometría de flujo, empleando anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas de superficie (CDs) conjugados con fluorocromos más adelante descritos.

Una vez colectado el tejido endometrial, se transportó al laboratorio y fue procesado en forma inmediata, el volumen obtenido se centrifugó a 300 x g durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se fraccionó en alícuotas de 500  $\mu$ l y se almacenó a -20°C. Al mismo tiempo, se adicionó medio RPMI-1640, adicionado de albúmina sérica bovina al 2%, a la pastilla celular de la biopsia endometrial se le adicionó medio de cultivo para alcanzar un volumen de 700  $\mu$ l. Las muestras que contenían como mínimo un millón de células por mililitro, y una viabilidad mayor al 90%, se emplearon para realizar la identificación por citometría de flujo.

Para llevar a cabo la identificación de subpoblaciones de linfocitos en el compartimiento endometrial, se colocaron alrededor de 100,000 células provenientes de líquido peritoneal 20  $\mu$ l de sangre periférica, las cuales se pusieron en contacto con 4  $\mu$ l de los anticuerpos monoclonales específicos para cada subpoblación celular, durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

Al término de la incubación, se adicionaron 250  $\mu$ l de solución de lisis (FACS lysing solution, Becton Dickinson, San Jose Ca. USA), con la intención de eliminar las células hemáticas presentes, permitiendo actuar a la solución durante 15 minutos, posteriormente se llevó a cabo la adquisición y análisis de las muestras, empleando un citómetro de flujo coulter epics altra (Coulter-Beckam,, Miami, FL. USA), en un lapso no mayor a 48 horas

## **RESULTADOS.**

**MUJERES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO.-** A partir del grupo de mujeres incluidas en el estudio se presentó una deserción de 10 de ellas, argumentando el factor económico como la principal causa.

De las ocho mujeres restantes, tres tenían diagnóstico de infertilidad primaria y el resto presentaban infertilidad secundaria, tres de ellas tenían antecedentes de embarazo ectópico y dos con aborto incompleto, sometidas a legrado uterino. Siendo el factor tuboperitoneal la principal causa de infertilidad, dos de estas pacientes presentaron hiperprolactinemia, una de ellas con microadenoma hipofisiario, ambas en tratamiento con bromocriptina en dosis que las llevaron a la normalidad. Dos tenían diagnóstico de hipotiroidismo en tratamiento con levotiroxina.

La edad promedio de las mujeres incluidas en el estudio fue de 34.75 con máximo y mínimo de 28 a 39.

Del número de mujeres incluidas en el estudio ( $n= 8$ ), solamente cuatro de ellas entraron a ciclo de fertilización in vitro, sin lograr embarazo alguno.

**IDENTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS POR CITOMETRIA DE FLUJO.-** Los resultados obtenidos de las subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica y a partir de la biopsia de endometrio, se muestran en la tabla número uno. No fue posible identificar diferencias entre el porcentaje de linfocitos T totales y NK, entre el ámbito endometrial y circulatorio, para el caso de los linfocitos B (CD19+), se identificó un menor porcentaje de este grupo celular en las muestras de endometrio ( $p < 0.001$ , mann-witney rank sum test) en comparación con los valores de sangre periférica.

| No Control | CD3+  | CD19+ | CD16/56+ |
|------------|-------|-------|----------|
| 1          | 43.54 | 22.46 | 10.77    |
| 2          | 60.37 | 12.5  | 5.28     |
| 3          | 54.81 | 15.91 | 3.65     |
| 4          | 12.77 | 12.77 | 3.42     |
| 5          | 12.32 | 12.32 | 12.3     |
| 6          | 32.35 | 25.29 | 0.79     |
| 7          | 73.69 | 7.55  | 0.29     |
| 8          | 59.48 | 6.74  | 4.24     |

**Tabla 1.-** Porcentajes de subpoblaciones de linfocitos identificados en sangre periférica (SP) por paciente incluido en el estudio. Linfocitos T totales (CD3+), linfocitos B (CD19+), células NK (CD16/56+).

| No Control | CD3+  | CD19+ | CD16/56+ |
|------------|-------|-------|----------|
| 1          | 52.07 | 0     | 1.42     |
| 2          | 14.68 | 2.03  | 17.93    |
| 3          | 50.6  | 1.13  | 15.96    |
| 4          | 20.3  | 0     | 0.82     |
| 5          | 25.3  | 0     | 2.4      |
| 6          | 73.68 | 0     | 6.31     |
| 7          | 57.41 | 3.53  | 4.11     |
| 8          | 18.97 | 0     | 1.64     |

**Tabla 2.-** Porcentajes de subpoblaciones de linfocitos identificados en biopsia de endometrio, por paciente incluido en el estudio. Linfocitos T totales (CD3+), linfocitos B (CD19+), células NK (CD16/56+).

| Subpoblación<br>analizada | N | Media  | Desviación<br>estándar | Máximo | Mínimo | Comparación |
|---------------------------|---|--------|------------------------|--------|--------|-------------|
| <i>CD3+ SP</i>            | 8 | 41.337 | 21.112                 | 73.69  | 11.31  | NS          |
| <i>CD19+ SP</i>           | 8 | 12.579 | 6.306                  | 25.29  | 3.64   | P = 0.001   |
| <i>NK+ SP</i>             | 8 | 4.016  | 3.933                  | 12.30  | 0.29   | NS          |
| <i>CD3+ BE</i>            | 8 | 39.126 | 21.964                 | 73.68  | 14.68  | --          |
| <i>CD19+ BE</i>           | 8 | 0.836  | 1.324                  | 3.53   | 0      | --          |
| <i>CD16/56+ BE</i>        | 8 | 6.324  | 6.805                  | 17.93  | 0.82   | --          |

**Tabla 3.-** Porcentajes de subpoblaciones de linfocitos identificados en sangre periférica (SP) y en biopsia de endometrio (BE). Datos presentados en porcentajes. Linfocitos T totales (CD3+), linfocitos B (CD19+), células NK (CD16/56+). Cada subpoblación de linfocitos fue comparada entre el compartimiento periférico y el endometrial (Mann-Whitney, Rank Sum Test,  $p < 0.05$ ). NS, diferencia estadística no significativa.

## DISCUSIÓN.

El presente trabajo aborda las características inmunológicas del microambiente endometrial en mujeres de la clínica de reproducción asistida, un ciclo menstrual antes del ingreso a la estimulación ovárica.

El trabajo tuvo como objetivo el enumerar las subpoblaciones de linfocitos más importantes en cuanto a la regulación de la respuesta inmunológica, en el ámbito periférico y endometrial de dichas mujeres. Los resultados obtenidos en el ámbito periférico no mostraron diferencia alguna en comparación con los valores reportados como normales para mujeres sanas, o con aquellos reportados en la literatura (15-17). Asimismo, los resultados no mostraron diferencia alguna en cuanto al porcentaje de linfocitos T totales y células NK, entre ambos compartimentos.

Una explicación al respecto sería que ambos compartimentos son similares en cuanto a los valores de este grupo celular, o que el número de muestras incluido no nos permite observar diferencias estadísticas, ya que existen reportes que sí identifican diferencias en el porcentaje de células NK, entre mujeres que logran embarazo en comparación de las que no logran (18-20).

Esta aseveración la esgrimimos, ya que fue posible identificar un amplio margen de valores en los resultados obtenidos del endometrio, pues se identificaron valores entre 0.3 y 18 %. Por otro lado, sabemos que el número de células es un indicador parcial del estado inmunológico, que guarda cierto ambiente, ya que el grado de activación que presentan las células puede ser distinto.

Existiendo la posibilidad de tener actividades antagónicas, pues un grupo de linfocitos puede haber iniciado su fase efectora (producción de citocinas, duplicación, regulación inmunológica, etc.) mientras que otro grupo, puede presentar una activación nula al recibir señales que lo condicionen a entrar en un estado anérgico o apoptótico. De aquí que sería conveniente iniciar la exploración de la capacidad de respuesta por parte de estas células, como la proliferación, secreción de citocinas, funciones citolíticas, etc. Para tener una idea más cercana al verdadero estado inmunológico que presentan.

Esta aseveración resulta importante ya que pudimos apreciar variaciones importantes en el porcentaje de células NK, entre la sangre periférica y el endometrio al analizar los valores en cada paciente. Es decir, que a nuestro juicio el ambiente endometrial pudiera no estar representado por el ambiente periférico. Y aunque no es posible observar diferencia estadísticas al analizar los valores en un solo grupo, quizá el porcentaje específico de células que presente cada mujer, deba ser evaluado y correlacionado en forma individual con el éxito de embarazo que presente.

Esto resulta imperante ya que estudios previos (8-10), correlacionan la subpoblación de células NK en sangre periférica con la tasa de embarazo, que presentan pacientes sometidas a fertilización In vitro. Los autores logran identificar en el ambiente periférico un mayor porcentaje de células NK en las mujeres que no se embarazaron, en comparación con aquellas que si logran dicho objetivo, y que presentaban una diferencia estadística significativa en el porcentaje de células NK periféricas. Coulam (8) inicio un estudio de intervención en el que suplementó con inmunoglobulina humana intravenosa (IgIV), mujeres participantes en el programa de reproducción asistida, las cuales presentaban altos valores de células NK periféricas. Observando que aquellas que recibieron la IgIV, presentaron una mayor tasa de embarazo, con respecto a las que recibieron placebo (39% vs 9%, p 0 0.001). Identificando en las mujeres suplementadas una disminución de las células NK, casi a valores que muestran las mujeres del mismo programa que logran embarazo.

Los estudios antes señalados indican de manera directa la participación de las células efectoras y reguladoras en los mecanismos de implantación embrionario. Sin embargo el conocimiento de los mecanismos moleculares imperantes se desconocen. Se asume que la presencia de células NK participa de alguna forma inhibiendo alguna de las fases de implantación en el endometrio, aunque su participación puede ser en el ámbito de la regulación inmunológica, ya que estas células son capaces de participar en dichos fenómenos.

Sin duda resulta muy atractivo realizar un estudio más amplio, donde puedan incluirse un mayor número de pacientes que lleguen al final del procedimiento, en las que se pueda

asociar un número de terminado de células NK en sangre periférica y biopsia endometrial, con el embarazo obtenido o no obtenido.

La utilización de un marcador biológico en las pacientes candidatas a fertilización in vitro, que permita asignar una mayor probabilidad de éxito, abre un área de gran interés para su aplicación por la parte clínica, ya que muchas veces los indicadores morfológicos empleados son aceptables, y se tiene una baja tasa de embarazo.

De aquí que la búsqueda de indicadores que permitan predecir cuando es más factible realizar el procedimiento, podría ayudar a elegir con mayor especificidad a las mujeres candidatas a la reproducción asistida, así como proponer bajo un mejor entendimiento del proceso inmunológico implantatorio, nuevas estrategias profilácticas y terapéuticas.

## CONCLUSIONES

- 1.- No existe diferencia estadística en el ambiente endometrial y el de sangre periférica entre linfocitos T totales y células NK en mujer estudiadas.
- 2.- Se observó una menor concentración de linfocitos B (CD19+) en el ambiente endometrial de las mujeres estudiadas, en comparación con la sangre periférica

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Schmidt CM, ORR HT. Maternal/fetal interactions: The role of MHC. Crit. Rev. 13:207, 1993.
- 2.- Kamat BR, Isaacson PG, The Immunocyt chemical distribution of leukocytic subpopulation in human endometrium. Am J Pathol. 127:66.1987.
- 3.- Hunt JS. Immunologically relevant cells in the uterus. Biol. Reprod. 50:461.1994.
- 4.- Strauss J., Coutifaris CH. Endometrio y Míometrio: Regulación y disfunción. Yen S., Jaffe R., Barbieri R. (eds). Endocrinología de la reproducción. 4ª. Edición, 200 Buenos Aires, Argentina. Ed. Panamericana.
- 5.- Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta. Key pieces of the development puzzle. Science 266:1508.1994.
- 6.- Nestler JE, Interleukin 1 stimulates the aromatasa activity of human placental cytotrophoblasts. Endocrinology 132:566,1993.
- 7.- Lea RG, Clark DA. Macrophages and migratory cells in endometrium relevant to implantation. Clin Obst Gynecology.5:25-29,1991.
- 8.- Coulam CB, Goodman C. Increased pregnancy rates after IVF/ET with intravenous immunoglobulin treatment in women with elevated circulating C56+ cells.Early Pregnancy Apr;4(2) 90-8, 2000.
- 9.- Fukui A, Fujii S, Yamaguchi E and col.Natural killer cell subpopulations and cytotoxicity for infertile patients undergoing in vitro fertilization. Am J Reprod Immunol. Jun; 41(6):413-22.1999.

- 10.- Coulam CB, Roussev RG. Correlation of NK cell activation and inhibition markers with NK cytotoxicity among women experiencing immunologic implantation failure after in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet.* Feb;20(2):58-62. 2003.
- 11.- Ledee-Bataille N, Durbanchet S, Coulomb L, and col. A new role for natural killer cells, interleukin (IL)-12 and IL -18 in repeated implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril*,81(1):59-65, Jan, 2004.
- 12.- Fujino Y, Nakamura Y, Ueda K and col. Effects of serum from pregnant versus non-pregnant women on natural killer cell activity. *Am J Reprod Immunol.* 37(5):365-7. May 1997.
- 13.- Bulmer JN, Sunderland CA. Immunohistological characterisation of lymphoid cell populations in the early human placenta. *Immunology* 52. 349-357.1984.
- 14.- Tsoukatos D, Skapelis G. placenta specific growth factor production by splenic cells during pregnancy. *Immunology* 15:467-476.1994.
- 15.- Ntrivalas EI, Kwak-Kim JY, Gilman-Sachs A, and col.. Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology. *Human Reprod* 2001;16:855-861-
- 16.- Raghupathy R. The type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today.* 1997;18:478-482.
- 17.- Kaider AS, Kaider BD.. Immunologic evaluation in women with reproductive failure. *Am J Reprod Immunol* 1996;35:415-420.
- 18.- Kane KL, Ashton FA. Determinations of natural killer cell function by flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3:295-300.

19.- Beer AE,Kwak JY,Ruiz JE. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles. *Am J Reprod Immunol* 1996;35:376-382.

20.- Lachapalle MH,Miron . Endometrial T, B and NK cells in patients with recurrent abortion:Altered profile and pregnancy outcome. *J Immunol* 1996;156:4227-4234.