

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

**Instituto Nacional de Perinatología Dr. Isidro Espinosa de
los Reyes
Subdirección de Medicina Reproductiva**

**Proporción de linfocitos T activados (CD3+/HLA
DR+) y células Natural Killer (CD56+/CD16+)
en mujeres con esterilidad, en comparación con
pacientes fértiles.**

TESIS

Que para obtener el Título de:

**ESPECIALISTA EN Biología de la Reproducción
Humana.**

PRESENTA

CATALINA VILLA JIMENEZ

**DR. GREGORIO PEREZ PALACIOS
DIRECTOR GENERAL**

**DR. FERNANDO GAVIÑO GAVIÑO
SUBDIRECCION DE MEDICINA REPRODUCTIVA**

**DR. CESAR ANGEL HERNANDEZ GERRERO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**

ASESORES



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.

“AUTORIZACION DE TESIS”

**Proporción de linfocitos T activados
(CD3+/HLA DR+) y células Natural Killer
(CD56+/CD16+) en mujeres con esterilidad
en comparación con pacientes fértiles.**

DR. RICARDO GARCÍA CAVAZOS
DIRECCION DE ENSEÑANZA

DR. GREGORIO PEREZ PALACIOS
DIRECTOR GENERAL

DR. FERNANDO GAVIÑO GAVIÑO
SUBDIRECCION DE MEDICINA REPRODUCTIVA

DR. CESAR ANGEL HERNANDEZ GERRERO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO
EN EL DEPARTAMENTO DE ESTERILIDAD
E INFERTILIDAD Y EN EL DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA CELULAR DEL INSTITUTO
NACIONAL DE PERINATOLOGÍA ISIDRO
ESPINOSA DE LOS REYES.**

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.**

DEDICATORIA

A Vítor, mi guía y eterno admirador, el que me ha enseñado a preguntar.

A Quica, mi gran apoyo, la que me ha enseñado a perseverar.

A Teban, mi amigo del pasado, el que me ha enseñado el secreto del silencio.

A Omega, parte de mi espacio no circunscrito, señal para continuar con mi leyenda personal, el que me ha enseñado a amar.

A Pedro Pablo: Gracias por escogerme, mi maestro, mi conexión entre lo factible y lo imposible, el que me ha enseñado a ser feliz.

AGRADECIMIENTOS

DR. FERNANDO GAVIÑO GAVIÑO

Gracias por haberme elegido para el curso y para este proyecto, no sabe el giro que le dio a mi vida.

DR. CESAR ANGEL HERNÁNDEZ GUERRERO

De una forma muy especial le agradezco su pasión, su paciencia y todas sus enseñanzas. Gracias a su ayuda, alcancé una de mis mas lejanas metas.

DR. ALVARO SANTIBAÑEZ MORALES

Gracias por todo lo compartido: las rotaciones, las clases, la tesis, las biopsias, las cirugías, las sesiones en andrología, los logros, el caféla residencia.

MC. JENNIFER MIER CABRERA

MC. PATRICIA BOUCHAN VALENCIA

DR. VICTOR VILLA MEJIA

DR. JULIO DE LA JARA

DR. OLIVER CRUZ

DRA. PATRICIA AGUAYO

DR. ROGER JOSE LARA RICALDE

DRA. NORMA VELAZQUEZ RAMIREZ

DR. CARLOS RAMOS PEREZ

ENF. MARIA ELENA GUEVARA REYES

ENF. BEATRIZ PEREZ ESTRADA

DR. JORGE ENRIQUE ALONZO SOSA

ENF. GLORIA GONZALEZ

SEC. ADRIANA HERNANDEZ

SEC. CLAUDIA ROSAS GARCIA

INDICE DE CONTENIDO

CAPITULO 1. INTRODUCCION.....	10
CAPITULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
CAPITULO 3. RESULTADOS.....	26
CAPITULO 4. DISCUSION.....	29
CAPITULO 5. CONCLUSIONES.....	31
CAPITULO 7. APENDICES.....	32
CAPITULO 6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	43
CAPITULO 7. CURRICULUM VITAE.....	45

RESUMEN

Objetivo: Comparar el número de células T activadas (CD3+/HLA DR+) y células Natural Killer (CD56+/CD16+) en sangre periférica y en endometrio en dos grupos de mujeres: fértiles y estériles.

Diseño: Estudio transversal retrospectivo de casos y controles.

Marco de referencia: Se ha evidenciado la actuación del sistema inmune en los fenómenos de implantación fallida en pacientes sometidas a FIVTE (Fertilización in Vitro) y en pérdida gestacional recurrente. Las conclusiones mencionadas en estos estudios hablan de un posible desequilibrio entre la respuesta Th1/Th2, con un aumento de la respuesta Th1, como factor de falla de implantación. En este estudio se plantea la medición de dos subpoblaciones celulares: Linfocitos T activados (CD3+/HLADR+) y Linfocitos NK (CD56+/CD16+) en dos compartimientos del grupo de pacientes estériles contra las fértiles; con el fin de establecer parámetros de referencia significativos que puedan ser de utilidad en el manejo de la esterilidad.

Pacientes: Se incluyeron 20 pacientes en el grupo de esterilidad primaria o secundaria, a las cuales se les descartó patología endocrino-ovárica, anatómica, auto inmune, e infecciosa, y que aceptaron participar en el protocolo. Y el grupo control se caracterizó por pacientes con el antecedente de fertilización tubaria definitiva en este hospital, e historia de uno o más hijos vivos y que presentaran ciclos menstruales regulares, e interrupción de la lactancia por lo menos seis meses antes de la inclusión.

Intervenciones: Se tomaron muestras de sangre periférica y endometrio del día 20 al 23 del ciclo menstrual, a las cuales se les midió con citometría de flujo el porcentaje de linfocitos NK y células T activadas, presentes en cada compartimiento. Se realizaron mediciones comparativas con T student y prueba de ANOVA, considerada $P < 0.05$.

Mediciones del desenlace principal. Se presentaron tres embarazos en el grupo de las pacientes estériles, lo que generó un nuevo grupo de estudio que fue comparado con los anteriores. Se compararon la población de células en endometrio y sangre periférica de cada grupo (por compartimientos). Y posteriormente entre los grupos.

Resultados: Se encontró diferencia significativa ($P=0.008$) en los linfocitos T activados de sangre periférica, en comparación con el endometrio de las pacientes fértiles. También una diferencia significativa ($P=0.004$) en la comparación de la medida de linfocitos T activados de la sangre periférica de las pacientes fértiles contra las estériles. Un aumento de la población de linfocitos NK en el endometrio ($P=0.042$) de las pacientes estériles, con una diferencia significativa con respecto a las fértiles. Un aumento en la población endometrial de linfocitos NK en la población de embarazadas, aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa.

Conclusiones: Los linfocitos estudiados podrían tener una participación importante en el fenómeno de implantación, probablemente como reguladores de la respuesta inmune Th2. Hacen falta experimentos conducentes a la medición de la actividad celular para determinar su papel activador o inhibidor de la inmunidad en la implantación. La elevación de los linfocitos T activados en la sangre periférica de las pacientes fértiles, se podría asociar a los hallazgos de otros grupos de investigación para ser utilizado en la formulación de un perfil inmunológico útil en la medición del valor predictivo de éxito de la implantación en pacientes que serán sometidas a técnicas de reproducción asistida.

CAPITULO 1. INTRODUCCION

La penetración de un material antigénico en un individuo sano induce en este una respuesta inmunitaria que puede ser inmediata e inespecífica o mediata y específica. La primera se caracteriza por el reconocimiento del material antigénico por ciertas células especializadas (macrófagos, células dendríticas y células NK) y la producción de interleucinas, citocinas o la activación de la vía del complemento; capaces de eliminar el antígeno de manera inmediata.

La inmunidad específica requiere de algunos días para ponerse de manifiesto e incluye la producción de anticuerpos y de linfocitos en un particular estado de activación; los linfocitos resultantes reconocen específicamente al antígeno inductor de su producción y termina con el desarrollo de mecanismos que median la función fisiológica de la respuesta, es decir, la eliminación del antígeno y la creación de una memoria específica contra este antígeno.

Así, la *respuesta inmunitaria específica* puede dividirse en: 1) Fase de reconocimiento, 2) Fase de activación y 3) Fase efectora.

Fase de reconocimiento. La fase de reconocimiento consiste en la unión de antígenos extraños a receptores específicos de linfocitos maduros, que están presentes antes de la exposición al antígeno. Los linfocitos B, células de la inmunidad humoral, expresan en su superficie moléculas de anticuerpos que pueden unirse a proteínas extrañas, polisacáridos, lípidos y otras sustancias extracelulares o unidas a células. Los linfocitos T, responsables de la inmunidad mediada por células expresan receptores que reconocen únicamente pequeñas secuencias peptídicas de antígenos proteicos.

Fase de Activación. Es la secuencia de acontecimientos inducidos en los linfocitos como consecuencia del reconocimiento de un antígeno específico. Todos los linfocitos sufren dos cambios principales como respuesta a los antígenos: primero proliferan, lo que provoca la expansión de clones específicos de linfocitos y la amplificación de la respuesta protectora; segundo, la progenie de los linfocitos estimulados por el antígeno se diferencia bien en células efectoras que eliminan el antígeno, o bien en células de memoria que recirculan preparadas para responder a una nueva exposición al antígeno (algunos linfocitos de la progenie estimuladas por el antígeno mueren a partir del reservorio de respuesta).

Una característica general de la activación de linfocitos es que requiere dos tipos de señales: la primera la proporciona el antígeno por si mismo; y la segunda las proporcionan otras células, que pueden ser células colaboradoras o células accesorias.

Hay dos aspectos importantes de la activación de los linfocitos que permiten que el pequeño número de células que responde a un antígeno pueda realizar la gran cantidad de funciones que llevan a su eliminación. En primer lugar, la inmunización y el reconocimiento del antígeno disparan numerosos mecanismos de amplificación de respuesta que aumentan rápidamente el

número de células que responde frente al antígeno. En segundo lugar, los linfocitos se dirigen eficientemente hacia los lugares de entrada de los antígenos y allí permanecen como efectores de una barrera protectora en contra de la invasión de los antígenos.

Fase efectora. La fase efectora de la respuesta inmunitaria es el estadio en el que los linfocitos, que han sido activados por los antígenos, desarrollan las funciones que conducen a la eliminación de estos.

Los linfocitos que actúan en la fase efectora de la respuesta inmunitaria reciben el nombre de células efectoras. Muchas de las funciones efectoras requieren la participación de otras células no linfoides (a menudo llamadas también “células efectoras”) y de mecanismos de defensa que son igualmente mediadores de la inmunidad innata o inespecífica

Los linfocitos T activados secretan unas hormonas proteicas llamadas citoquinas, que aumentan la actividad de los fagocitos y estimulan la respuesta inflamatoria. Los fagocitos, el complemento, los mastocitos, las citoquinas, y los leucocitos que median la inflamación son todos componentes de la inmunidad innata o inespecífica, ya que no reconocen específicamente ni distinguen entre diferentes antígenos extraños y todos están implicados en la defensa contra microorganismos, incluso sin respuesta inmunitaria específica. Por consiguiente, la fase efectora de la inmunidad específica ilustra un concepto fundamental que fue destacado anteriormente: que la respuesta inmunitaria específica sirve para amplificar y focalizar en los antígenos extraños varios mecanismos efectoras que son también funcionales en ausencia de activación linfocitaria (respuesta específica).

Las respuestas inmunitarias específicas están mediadas por linfocitos, que son las únicas células en el organismo capaces de reconocer específicamente y distinguir diferentes determinantes antigénicos.

Los *linfocitos T*, se subdividen en poblaciones funcionalmente distintas, siendo las mejor definidas las células T colaboradoras y las células T citotóxicas. Las principales funciones de los linfocitos T son regular todas las respuestas inmunitarias frente a antígenos proteicos y ayudar en su calidad de células efectoras en la eliminación de organismos intracelulares (tales como las partículas virales). Las células T no producen anticuerpos. Sus receptores para antígenos son moléculas de membrana diferentes, pero estructuralmente relacionados con los anticuerpos. Los linfocitos T cooperadores y citotóxicos muestran una especificidad poco común por los antígenos: reconocen solo antígenos peptídicos unidos a proteínas que están codificadas por genes del CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) y que se expresan sobre las superficies de otras células.

En respuesta a la estimulación antigénica, las células T cooperadoras secretan hormonas proteicas llamadas citocinas, cuya función es promover la proliferación y diferenciación de las células T así como de otras células, entre ellas las células B y los macrófagos. Las citoquinas también atraen y activan a los leucocitos inflamatorios, incluyendo macrófagos y granulocitos,

proporcionando importantes conexiones entre la inmunidad específica de las células T y los mecanismos efectores de la inmunidad natural e inespecífica. Un importante avance en la identificación y análisis de estas subpoblaciones de células T ha sido el descubrimiento de que las poblaciones funcionalmente diferentes expresan distintas proteínas de membrana. Estas proteínas sirven como marcadores fenotípicos de las diferentes poblaciones linfocitarias y dan origen a las tres principales clases de linfocitos: los T cooperadores, los T citotóxicos y los Natural Killer (NK). Por ejemplo, la mayoría de las células T cooperadoras expresan una proteína de superficie llamada CD4, y la mayoría de los linfocitos T citotóxicos expresan un marcador diferente llamado CD8.

La tercera clase relevante de linfocitos no expresa marcadores de células T ó B y, por lo tanto, se le llamó población de células nulas. Ahora parece que la mayoría de las células nulas son linfocitos grandes con numerosos gránulos citoplásmicos capaces de lisar diferentes células tumorales e infectadas por virus sin una estimulación antigénica clara. Como resultado, a estos linfocitos se les denomina linfocitos grandes granulares o células Natural Killer (NK).

Aunque parecen derivar de un precursor linfoide común, las células NK muestran varias diferencias con las células T citotóxicas (Tc):

- Son de talla mayor y muestran un citoplasma mas granular y rico en organelos.
- Son capaces de matar algunas células tumorales de manera no específica y no restringida por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
- No expresan en su superficie marcadores presentes en los otros linfocitos T, es decir, son TCR- y CD3-.
- Expresan en su superficie de membrana los marcadores CD16+ (o FcγR+) y por esto también pueden matar células sensibilizadas con anticuerpos IgG, y también expresan el marcador NK1.

Las células Natural Killer (NK) son linfocitos granulares que no son células T ni B. Expresan CD16 y CD56, pero no expresan CD3. La función de las células NK es destruir células infectadas por virus, por medio de la producción de citocinas a través de una respuesta rápida y relativamente inespecífica.

Como las células T citotóxicas, las células NK ejercen su efecto citotóxico a través de la producción de: Perforina, Citocinas como el Factor de Necrosis Tumoral Beta (TNFβ), el Factor Citotóxico de las células NK (NKCF) y el Óxido Nítrico. Estos mediadores causan la muerte de células blanco tanto por necrosis (destrucción celular) como por apoptosis (muerte celular programada). La actividad citotóxica de las células NK está regulada por receptores que pueden reconocer tanto determinantes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I clásicos (HLA-A , B y C) y no clásicos (HLA-G) como ligandos relacionados con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MIC, MHC class I related molecules).

Se han identificado dos familias de receptores presentes en la membrana de los NK: los receptores KIR, estructuralmente relacionados con las

inmunoglobulinas y los del tipo lectina también llamados NCR, dentro de los que están NKG2D, Ly49 y otros. Los receptores pueden ser activadores (como NKG2D) o inhibidores (como Ly49); los receptores activadores poseen regiones ITAM (inmunorreceptor tyrosine-based activation motif) mientras que los receptores inhibidores poseen secuencias ITIM (inmunorreceptor tyrosine-based inhibition motif) reclutadoras de fosfatasa.

Todas las células T maduras tienen, hasta donde se sabe, las moléculas TCR (receptor de células T), la molécula CD3 (complejo penta molecular asociado al TCR y relacionado al transductor de señales) y la molécula CD2 (un receptor de eritrocitos de carnero). Algunas células T expresan además, la molécula CD4, otras la molécula CD8 y otras ninguna de las dos, aunque siguen siendo TCR (+) y CD3 (+). Del 19 al 48% de las células T son CD8 (+); y del 50 al 65% son CD4 (+). La mayoría de las células T CD4+ y CD8+ portan receptores TCR con cadena alfa y beta (células T alfa y Beta) mientras que una minoría, usualmente CD4- y CD8-, tienen receptores TCR con cadenas gamma y delta (células T gamma delta). Dentro de las células T CD4+, existen varias subpoblaciones celulares claramente definidas en función de las moléculas (citoquinas) que producen y de su actividad predominante. Éstas son las células Th0, Th1, Th2, Th3 y Tr1, además de otras que todavía no están bien identificadas.

También dentro de las células T CD8+ se han encontrado subpoblaciones, siendo las más conocidas las células TCD8+ de tipo 1 y TCD8+ tipo 2.

Respuesta Th1 y Th2:

Las células Th1 y Th2 juegan un papel importante en la inmunidad celular y humoral, respectivamente, mientras que las Th3 y Tr1 ejercen un papel regulador de la respuesta inmune. Las células Th0 dan origen a las Th1 y Th2 o derivan de ellas.

Las células T CD8+ tipo 1 tienen actividad citotóxica y por esto también se conocen como células T citotóxicas; las células T CD8+ tipo 2 parecen tener un efecto regulador sobre las primeras.

Tejido linfoide y Útero

Uno de los fenómenos de mayor interés científico en los últimos días deriva del descubrimiento y descripción de las células del sistema inmune en el endometrio de las mujeres en edad fértil; estas mismas células tienen una respuesta inmunitaria y una población que al parecer varía de acuerdo a las fases hormonales del ciclo menstrual, porque se han observado receptores específicos en sus membranas para hormonas ováricas e hipofisarias. Estas células están distribuidas de forma ordenada en las diferentes regiones histológicas del endometrio, siendo los linfocitos T CD 8+ predominantes en la región basal, y los macrófagos, mastocitos y células NK se localizan en la en la decidua endometrial. Cercano a los vasos que nutren el endometrio, se encuentran los leucocitos T CD4+, CD8+ y B CD5+. ^{ii iii}

La principal función de estos leucocitos es la protección contra la invasión y colonización de DNA y RNA extraños, de aquí deriva la importancia que se le ha dado a estas células presentes en el endometrio ya que modifican su población y su actividad inmunitaria cuando detectan la presencia de un embarazo temprano y al parecer, participan activamente en el fenómeno de la implantación, lo que podría ser un riesgo en aquellas especies en que el embarazo es semiallogénico (en la que participan dos gametos con diferente información cromosómica que puede desencadenar una respuesta inmune específica e inespecífica) y el proceso de placentación es hemocorial (en la cual se presenta intercambio celular sanguíneo entre las células maternas y las del embrión), como en el humano, las ratas y el mono. En este tipo de placentación, las células trofoblásticas, derivadas de un gameto externo o masculino y los leucocitos maternos, se encuentran íntimamente en contacto, desencadenando así el ataque, por parte de los leucocitos maternos, a las células fetales, debido a la identificación de Complejos Mayores de Histocompatibilidad que el leucocito materno no reconoce como propio, desencadenando así la respuesta inmune específica. Sin embargo, de manera inexplicable, este fenómeno se encuentra regulado en el micro ambiente uterino, lo que nos hace pensar que estos leucocitos han recibido cierta modificación a su programación para destruir células extrañas^{iv}.

Esta dramática reprogramación ha sido reportada en varios estudios de las últimas dos décadas. Dichos estudios han 1) Mapeado la localización anatómica de las diferentes subpoblaciones de linfocitos; 2) Identificado cambios que ocurren en estas células durante el embarazo; 3) Determinado sus perfiles de secreción de citocinas; y 4) Definido los mecanismos regulatorios de su comportamiento.

Población linfocitaria presente en el endometrio durante el ciclo menstrual

Como ya se ha mencionado, el endometrio presenta células T y B, así como células CD3+, las cuales se han identificado por su importante actividad citotóxica, particularmente durante la fase proliferativa del ciclo menstrual^v.

También se han descrito macrófagos localizados en el estroma endometrial y en el tejido conectivo del miometrio y las células NK, en las cuales se ha descrito una participación importante en el fenómeno de la implantación así como en la fase secretora del ciclo menstrual.

La función específica que cumple cada subpoblación de leucocitos uterinos es aún desconocida. Las células T, los macrófagos y la NK en el endometrio humano al parecer sirven para proteger al útero de patógenos a través de una respuesta inmune mediada por células; las células B están en menor cantidad y al parecer son menos efectivas debido a que la respuesta humoral endometrial no es muy potente y los anticuerpos que allí se encuentran son provenientes de la sangre^{vi}.

Debido a que los macrófagos son los principales productores de citoquinas, factores de crecimiento y proteasas, se les asocia con la participación en la proliferación y destrucción cíclica del tejido endometrial. La fagocitosis también podría ser un mecanismo para remover las células extrañas y cumplir con la debridación cíclica del tejido endometrial. Al igual que los macrófagos y los eosinófilos, las NK tienen a aumentar en la "Ventana de Implantación", sugiriendo su importante función en la implantación del huevo fecundado.

En la fase secretoria del ciclo menstrual, el fenotipo de las NK cambia, la expresión de antígenos de activación como CD 69 y HLA-DR así como también las moléculas de función leucitaria asociadas a antígeno -1 que son CD-11 y CD-18 aumentan en la fase proliferativa y disminuyen gradualmente durante la menstruación^{vii}. Durante la fase secretora del endometrio y las etapas tempranas del embarazo existe una cantidad importante de células NK, comprendiendo el 75% de la población linfoide^{viii}.

En contraste con la mayoría de los leucocitos uterinos, los mastocitos tienen un rol muy especial en el ciclo menstrual: Estimados por el TNF α y la IL-1, éstos estimulan al estroma endometrial para que se produzcan metaloproteasas, especialmente MMP-3 y MMP-1 que son el estímulo que inicia la menstruación^{ix x}.

Cambios durante el embarazo

Una vez que la implantación ocurre y se identifica la presencia de la decidua, una serie de cambios en las células del sistema inmune comienzan a suceder: Los derivados proteicos producidos por las células T y B comienzan a desaparecer, así como también la población de linfocitos y eosinófilos se vuelve prácticamente irreconocible.

Las células uterinas NK se convierten las células inmunitarias predominantes en la decidua y comienzan a externar receptores de membrana como son α/β (señales de activación), γ/δ (señales de inhibición y citorregulación) y TcR, fenómeno estimulado por los estrógenos endógenos.^{xi}

El porcentaje de macrófagos en la decidua humana durante la gestación es de aproximadamente 10-15% de las células totales; estas células se localizan en el tejido conectivo miometrial y son predominantes en la serosa subyacente al epitelio de los vasos sanguíneos.

Perfil de secreción de citocinas de los linfocitos uterinos

Recientemente se han identificado citocinas importantes para el reclutamiento y diferenciación de los CD 56 periféricos; se han identificado 9 citocinas abundantes en el endometrio: proteína-3 quimiotáctica, eotaxina, fractalquina, proteína de inflamación de macrófago 1-B, 6 CKINE, IL-8, Citosina 1 y 4 y citocina derivada de macrófago; estas probablemente realicen el reclutamiento y la diferenciación se lleve a cabo por medio de factores deciduales o trofoblásticos como la prolactina y la IL-15^{xii xiii}.

También se han identificado genes de regulación inmune en el endometrio secretor los cuales presentan una actividad aumentada teniendo como función estimular la proliferación de células NK uterinas e inhibir el crecimiento de células T^{xiv}.

Mecanismos regulatorios del comportamiento de las células del sistema inmune

Se ha descrito que uno de los mecanismos implicado en la regulación negativa (down-regulation) de la respuesta inmune celular depende específicamente de la supresión de las células T cooperadoras (Th) 1 y T citotóxicas 1 (Tc), las cuales son productoras de Interleucina 2 (IL-2), Interferón gamma (IFN γ) y Factor de Necrosis Tumoral B (TNF β); en contraste, la estimulación (up-regulation) de los linfocitos T cooperadores 2 (Th2) y las células T citotóxicas 2 (Tc2), las cuales son productoras de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, y IL-13, debido a que la predominancia de la respuesta inmune Th2, termina en un embarazo exitoso, lo que no sucede cuando predomina la respuesta inmune Th1, como es el caso de las pacientes con pérdida gestacional recurrente.

En un estudio reciente, se trataron de establecer las células Th predominantes en la decidua basal, comparada con la parietal de pacientes con antecedentes de PGR (pérdida gestacional recurrente) encontrando un decremento en las células Th2 CD4+ y CD8+, y en los linfocitos CD3+; así como también, un incremento en la producción de IL-4 e IFN γ en la decidua basal de estas pacientes.^{xv}

Las hormonas ováricas tienen importantes efectos sobre los leucocitos que incluyen la de mantener la viabilidad (progesterona) y promover su migración al útero (estrógenos). En el útero de ratas y monos, los estrógenos incrementan la densidad de uNK, macrófagos y eosinófilos^{xvi xvii xviii}.

En humanos, ratas y monos la progesterona es absolutamente necesaria para la viabilidad de las NK uterinas, se cree que se estimula a través de receptores de fibronectina ($\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$)^{xix}. Además se ha visto una importante proliferación de estas células con el uso de antiprogestinas^{xx}.

La diferenciación de las uNK podría ser regulada por hormonas ováricas y placentarias, sin embargo, esto ha sido pobremente demostrado debido a que la viabilidad de estas células depende de la progesterona. En roedores, la diferenciación celular comprende la formación de gránulos citoplásmicos grandes con el aumento concomitante del tamaño celular. Estos gránulos están llenos de moléculas citotóxicas como perforina, serinas, esterases y TNF α ^{xxi xxii}
^{xxiii}.

Tanto en monos como en ratas, las uNK contienen una sintasa de óxido nítrico (iNOS), lo que las capacita para producir una potente citotoxina y modulador llamado óxido nítrico, otras sustancias como la interleucina 15 y la PLP-A (prolactin-like protein A) son productos de la uNK diferenciada lo que evidencia una posible comunicación entre estas células y la unidad feto placentaria.^{xxiv xxv}
^{xxvi}

Similarmente, durante la gestación, hay un decremento en la expresión de muchos marcadores de activación como el CD69 y el HLA-DR, las moléculas de función leucocitaria asociadas a antígeno-1 y el CD45RA, además, esta uNK comienza la expresión de antígenos con función inhibitoria en esta etapa del embarazo^{xxvii}.

El mecanismo por medio del cual se produce el reclutamiento uterino de las células uNK se puede describir de la siguiente manera: como reclutamiento de las células NK provenientes de la sangre periférica; y como proliferación de las NK ya existentes en el útero.

Los estudios en humanos han demostrado un rol muy importante de la proteína inflamatoria de los macrófagos (MIP-1 β) y el factor de crecimiento endotelial (VEGF), en el reclutamiento de las NK provenientes de la sangre periférica, siendo la progesterona la reguladora activa de este proceso^{xxviii}. También se ha demostrado que la progesterona es la hormona activadora de la diferenciación de las células NK uterinas, así como también estimula, a través de su unión al factor de crecimiento endotelial (VEGF) que se encuentra en las células endometriales y al parecer es el estimulador principal de la angiogénesis y la facilitación de la permeabilidad de los capilares del micro ambiente, al parecer para incrementar la migración leucocitaria^{xxix-xxx}.

Facilitación de la implantación

Los niveles elevados de interleucina 1 (citocinas de la inflamación) se asocian con implantación temprana, al parecer producida principalmente por los leucocitos; pero hay evidencias que otras citocinas son producidas por las células epiteliales uterinas como son TNF α , TGF- β , CSF-1 y GM-CSF al parecer por una respuesta inflamatoria natural como consecuencia del embarazo.

También se ha visto que el óxido nítrico derivado de las uNK es el estímulo principal para la diferenciación de la vasculatura materna, de hecho al parecer la ausencia de la musculatura circular arterial es una consecuencia atribuible a las uNK^{xxxi}. Por otro lado, el inadecuado desarrollo placentario, se debe a la inadecuada producción de óxido nítrico por estas células, lo que deriva en productos con datos de restricción del crecimiento intrauterino.

Se han demostrado células NK en el endometrio al momento de la implantación, en contacto estrecho con células del trofoblasto^{xxxii}.

En el embarazo inicial las células NK conforman cerca del 70% del estroma endometrial en el sitio de implantación en especial alrededor de las arterias espirales. Al final del embarazo casi no son detectables^{xxxiii}. Al parecer su función es regular el proceso de implantación, crecimiento, invasión y desarrollo placentario. Este proceso de regulación probablemente se lleve a cabo por medio de interacciones entre los receptores de superficie de las células NK y el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tipo 1 en las células del sinciotrofoblasto.

Existen dos tipos de líneas celulares del sinciotrofoblasto: la intravellosa, y la extravellosa. Estas poblaciones difieren dependiendo de su expresión del CMH. Estas dos líneas celulares forman tres diferentes interfases de contacto entre la madre y la placenta^{xxxiv xxxv xxxvi}.

1. Sinciotrofoblasto veloso, que se encuentran en contacto con las células inmunológicas maternas, no expresan ningún CMH clase 1, por lo que no tienen papel alguno en la respuesta inmunológica celular cooperadora. Estas células no inducen respuesta celular de las NK probablemente por una falta de ligandos activadores y por altos niveles de glicosilación en su superficie.
2. Trofoblasto endovascular, expresan el CMH clase 1 (C, G y E). Esta expresión le transfiere protección contra las células NK.
3. Trofoblasto intersticial, expresan CMH 1 (C, G y E); estas están en contacto directo con las células NK^{xxxvii xxxviii xxxix}.

A pesar de su nombre, no se ha encontrado evidencia que demuestre que las NK maten células trofoblásticas. Por el contrario, se ha demostrado que juegan un papel importante en la regulación de la invasión trofoblástica uterina^{xl}.

Control de la invasión del trofoblasto

Los linfocitos humanos uNK son capaces de ejercer citotoxicidad en contra de las células NK clásicas a pesar de encontrarse en número reducido^{xli xlii}. Las células trofoblásticas son resistentes a la lisis de las NK, a menos que, estas últimas hayan sido estimuladas por la IL-2^{xliii}. Sin embargo, no existe IL-2 en el endometrio de pacientes con un embarazo normal.

También, se ha visto que las células trofoblásticas endometriales se encuentran protegidas de la lisis por los NK a pesar de que se les bloquee el CMH clase I por anticuerpos, lo que se explica pensando que existen diferentes vías por medio de las cuales las uNK inhiben la respuesta citotóxica contra estas células^{xliv}.

Lo que evidencia que una de las funciones principales del linfocito uNK es la protección de las células trofoblásticas durante la etapa de invasión endometrial, a través de la inmunomodulación de la respuesta inmune en el micro ambiente uterino.

Fenotipo de células NK

Aproximadamente 10% de los leucocitos de la sangre periférica son NK. Éstos a su vez se dividen en dos poblaciones, que se diferencian por su expresión de un prototipo de antígenos de superficie: CD 56 y CD 16.

CD 16 es un receptor de poca afinidad a la IgG (FcRIII) y se expresa en la mayoría de los NK, así como también en pequeñas poblaciones de células T y algunos macrófagos activados. CD 16 es el receptor responsable de la citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente.

CD 56 es una isoforma de la molécula de adhesión de células neurales NCAM, que se expresa esencialmente en todas las células NK y también en algunos linfocitos T citotóxicos y tejidos de origen neural ^{xiv}.

Basados en la intensidad de la expresión del CD 56, las células NK se pueden dividir en dos poblaciones^{xvi}. La mayoría de ellas (90%) de los NK de sangre periférica expresan bajos niveles de CD56 y son (+) para CD16 por lo que se les nombra como CD56 dim. CD16⁺⁺, los cuales son más citotóxicos y expresan receptores de la familia KIR^{xvii}. El 10% restante se les nombra como CD56 bright CD16⁻ son menos citotóxicos y no expresan KIR^{xviii} y expresan altos niveles de CD94-NKG2; también tienen una alta afinidad para la IL2, IFN γ , FNT α , IL10 y IL13^{xlix}.

Se ha propuesto que esta población CD56 bright representa una etapa temprana de diferenciación de los CD56 dim.^l

Fenotipo de las células uNK

Las células uNK tienen diferencias funcionales y fenotípicas con respecto a las células NK periféricas. La principal diferencia fenotípica es que las uNK no expresan CD16 o CD57^{li}. Ellas expresan marcadores de células T tempranas como son CD-2 y CD7, integrinas como CD 11a y CD 18 e IL-2R β , CD 69 y un marcador de activación temprana (Tabla 1).

Se ha comparado la expresión genética de NK uterinas a la de NK periféricas revelando diferencias en 278 genes de 10000 estudiados, mostrando un incremento en la expresión de estos genes en las NK uterinas; con lo que se demuestra que estas células son notablemente diferentes y con funciones específicas para el embarazo^{lii}.

Linfocitos T

Las hormonas también pueden influenciar a las células NK a través de su efecto sobre otras células del sistema inmune que sirven como intermediarias, estas son los linfocitos T.

Los linfocitos T cooperadores (CD4⁺), pueden ser clasificados según su producción de citocinas y su función en Th 1 o Th2. ^{liii liv}. Las células Th1 producen predominantemente interferón gamma, IL-2, y factor de necrosis tumoral beta y están involucradas en la respuesta inmune mediada por células. Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, y IL-13 y se ocupan de la inmunidad humoral.

Se ha demostrado que la progesterona puede suprimir el desarrollo de la respuesta Th1 e incrementar la respuesta Th2. De tal forma, que las sustancias procesadas por las células Th2, son capaces de inhibir a las células NK, incluyendo su proliferación y diferenciación así como la producción de citocinas.^{lv lvi lvii} (Figura. 1).

NK periféricos en Pérdida Gestacional Recurrente (PGR)

Se han realizado varias investigaciones para evaluar el papel que estas células pudieran tener en el caso de la pérdida gestacional recurrente. Se cuentan con diversos estudios que han reportado un mayor porcentaje de células NK periféricas, así como también autores que encontraron aumento en el porcentaje de linfocitos uNK en biopsias endometriales, con lo que se sugiere la participación de estas células en el fenómeno de PGR. Tabla 2,3, 4 y 5.

Respuesta inmune Th1: Se ha presentado evidencia de que la respuesta inmune Th1 o mediada por células se encuentra deprimida en la etapa del embarazo temprano. Además, existe evidencia, in Vitro, que el 50% de las mujeres con PGR, tienen una respuesta sanguínea periférica exagerada a los antígenos trofoblásticos, con desarrollo de sustancias embriotóxicas, que afectan adversamente el crecimiento fetal, lo que no se observa en pacientes sanas^{lviii}.

Otro estudio demuestra que las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con antecedente de PGR, responden a antígenos trofoblásticos con la producción de TNF- α , IFN- γ y TNF- β , lo que no se observa en mujeres fértiles, en las cuales solo se observa producción de IL-10^{lix}.

Debido a estas observaciones se ha establecido que la respuesta inmunológica Th1 tiende a producir PGR (Krishnan et al., 1996^{lx}), mientras que la respuesta Th2, tiende a producir embarazos exitosos (Lin et al., 1993^{lxi}; Vives et al., 1999^{lxii}).

Mediciones de las Células linfoides como valor predictivo para la implantación

Estudios recientes se han enfocado en la medición de células NK CD56+, Linfocitos T y linfocitos B en sangre periférica con el fin de establecer parámetros útiles en el fenómeno de implantación de las pacientes que son sometidas a técnicas de reproducción asistida. Thum et al ^{lxiii} (2002) lo hizo en sangre periférica de pacientes sometidas a fertilización in Vitro (IVF), tomando la muestra el día de la captación de oocitos, comparando los grupos de las embarazadas contra las no embarazadas, sin encontrar diferencias significativas. Quenby et al (1999)^{lxiv} no encontró diferencias significativas en las células T presentes en el endometrio de pacientes fértiles contra las pacientes con pérdida gestacional recurrente. Además Vassiliadou y Bulmer (1998)^{lxv} obtuvo el mismo resultado comparando las células T en las deciduas del primer trimestre con las de aborto espontáneo. Sin embargo, Yamada et al (1994)^{lxvi} demostró que las células T periféricas de mujeres con abortos recurrentes son sensibles al trofoblasto in Vitro, produciendo factores embriotóxicos.

Es el mismo, Thump et al (2004), quien argumenta que la presencia de células NK CD56+ **dim.** CD 16+ CD 69+ en sangre periférica, puede servir como predictor de una pobre respuesta de las pacientes sometidas a IVF^{lxvii}.

Lo que es evidente es el papel determinante del sistema inmune en el control del ciclo menstrual y el embarazo temprano en la mujer en edad fértil. La participación de la fase efectora de la respuesta inmune específica, en el compartimiento endometrial puede hablar de una inmuno regulación, en la cual debe predominar la respuesta Th2, que incluye la participación activa de células T CD3+/HLADR + y de linfocitos NK CD 56+/CD16+, con su respectiva producción de interleucinas y citoquinas, como células predictoras de una adecuada implantación, que implica, la tolerancia inmunológica desarrollada ante la presencia de CMH no propios, el desarrollo de un micro ambiente vascular apto para la nutrición del embrión y finalmente la facilitación de la invasión trofoblástica en la decidua basal para el posterior desarrollo placentario adecuado que culmina en un embarazo exitoso.

-
- ⁱ Anne S. Devi W. Ayden A. Natural killer cells and reproductive failure. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005; 17: 237-241.
- ⁱⁱ Griffith JS, Jensen SM, Lunceford JK, Kahn MW, Zheng Y. Evidence for the genetic control estradiol-regulated responses. Implication for variation in normal and pathological hormone-dependent phenotypes. *Am J Pathol* 1997; 150: 2223-2230.
- ⁱⁱⁱ Katayama ML, Federico MH, Brentani RR, Brentani MM. Eosinophil accumulation in rat uterus following estradiol administration is modulated by laminin and its integrin receptors. *Cell Adhes Commun* 1998; 5: 409-424.
- ^{iv} Joan S, Margaret G, Petroff B, Tim B. Uterine Leukocytes: Key players in pregnancy. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 2000; 11: 127-137.
- ^v White H, Crassi K, Givan A, Stern J, González J, Memoli V, Green W, Wira C. CD3+ CD8+ CTL activity within the human female reproductive tract: influence of stage of the menstrual cycle and menopause. *J Immunol* 1997; 158:3017-3027.
- ^{vi} Parr MB, Parr EL. Immunoglobulin in the female genital tract, in the endocrinology of pregnancy. (Bazer FW, ed.). 1996 pp.275-308. Blackwell Science, Cambridge.
- ^{vii} Kodama T, Hara T, Okamoto E, Kusunoki Y, Ohama K. Characteristic changes of large granular lymphocytes that strongly express CD56 in endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. *Human Reprod* 1998; 13:1036-1043.
- ^{viii} Bulmer JN, Morrison I, Longfellow M, Ritson A, Pace D. Granulated Lymphocytes in human endometrium: Histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod* 1991; 6: 791-798.
- ^{ix} Salamonsen LA. Role of proteases in implantation. *Rev Reprod* 1999; 4: 11-22.
- ^x Zhang J, Nie G, Jian W, Woolley DE, Salamonsen LA. Mast cell regulation of human endometrial matrix metalloproteinases: a mechanism underlying menstruation. *Biol Reprod* 1998; 59: 693-703.
- ^{xi} Kimura M, Hanawa H, Watanabe H, Ogawa M, Abo T. Synchronous expansion of intermediate TcR cells in the liver and uterus during pregnancy. *Cell Immunol* 1995; 162: 16-25.
- ^{xii} Ain R, Tash JS, Soarez MJ. Prolactin-like protein-A is a functional modulator of Natural Killer Cells at the maternal-fetal interface. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 204:65-74.
- ^{xiii} Dunn CL, Critchley HO, Kelly RW. IL-15 Regulation in human endometrial stromal Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1898-1901.
- ^{xiv} Lobo SC, Huang SJ, Germeyer A, Et al. The immune environment in the human endometrium during de window of implantation. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52: 244-251.
- ^{xv} Shigeki S, Emi H, Mamoru M, Kazuya I, Ryutaro N, Reiko K, Kazunori O, Hisanori M, Hideto Y. No difference in natural Killer or Natural Killer T-cell population, but aberrant T-helper cell population in the endometrium of women with repeated miscarriage. *Human Reproduction* 2004; 19 (4):1018-1024.

-
- ^{xvi} Huang J, Roby KF, Pace JL, Hunt JS (1995) Localization and hormonal regulation of inducible nitric oxide synthase in cyclin Mouse uterus. *J Leukocyte Biol* 1995; 57: 27-35.
- ^{xvii} Kimura M, Hanawa H, Watanabe H, Ogawa M, Abo T. Synchronous expansion of intermediate TcR cells in the liver and uterus during pregnancy. *Cell Immunol* 1995; 162: 16-25.
- ^{xviii} Mincheva-Nilsson L, Kling M, Hammarstrom S, Nagaeva O, Sundqvist KG, Hammarstrom ML, Baranov V. Gamma delta T cells of human early pregnancy deciduas: evidence for local proliferation, phenotypic heterogeneity, and extrathymic differentiation. *J Immunol* 1997; 159: 3266-3277.
- ^{xix} King A, Burrows T, Verma S, Hiby S, Loke YW. Human uterine lymphocytes. *Human Reprod* 1998; 4: 480-485.
- ^{xx} Hasen KA, Opsahl MS, Nieman LK, Baker Jr JR, Klein TA. Natural Killer Cell activity from pregnant subjects in modulated by RU 486. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 87-90.
- ^{xxi} Whitelaw PF, Croy BA. Granulated lymphocytes of pregnancy. *Placenta* 1996; 17: 533-543.
- ^{xxii} Zheng LM, Ojctus DM, Liu CC, Kramer MD, Simon MM, Parr EL, Young JD. Immunogold labeling of perforin and serine esterases in granulated metrial land cells. *FASEB J* 1991; 5: 79-85.
- ^{xxiii} Parr EL, Chen HL, Parr MB, Hunt JS. Synthesis and granular localization of tumor necrosis factor –alpha in activated NK cells in the pregnant mouse uterus. *J Reprod Immunol* 1995; 28: 31-40.
- ^{xxiv} Hunt JS, Miller L, Vassmer D, Croy BA (1997) Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in mouse uterine leukocytes and potential relationships with uterine function during pregnancy. *Biol Reprod* 1997; 57: 827-836.
- ^{xxv} Ye W, Zheng LM, Young JD, Liu CC. The involvement of interleukin (IL)-15 in regulating the differentiation of granulated metrial gland cells in mouse pregnant uterus. *J Exp Med* 1996; 184: 2405-2410.
- ^{xxvi} Muller H, Liu B, Croy BA, Head J, Hunt JS, Dai G, Soares MJ. Uterine natural killer cells are targets for a trophoblast cell-specific cytokine, prolactin-like protein-A. *Endocrinol* 1999; 140: 2711-2720.
- ^{xxvii} Ponte M, Cantoni C, Biassoni R, Tradori-Cappai A, Bemtivoglio G, Vitale C, Bertone S, Moretta A, Mingari MC. Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decicua-associated natural Killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and aquire p49, and HLA-G1specific receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5674-5679.
- ^{xxviii} Kitaya K, Nakayama T, Okubo T, Kuroboshi H, Fushiki S, Honjo H. Expression of macrophage inflammatory protein 1-β in human endometrium: its role in endometrial recruitment of natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1809-1814.

-
- ^{xxix} Ancelin M, Buteau-Lozano H, Meduri G, Osborne-Pellegrin M, Sordello S, Perrot-Applanat M. A dynamic shift of VEGF isoforms with a transient and selective progesterone-induced expressions of VEGF189 regulates angiogenesis and vascular permeability in human uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6023-6028.
- ^{xxx} Popovici RM, Kao LC, Giudice LC. Discovery of new induction genes in in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology* 2000; 141: 3510-3513.
- ^{xxxi} Guimond MJ, Luross JA, Wang B, Terhost C, Danial S, Croy BA. Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. *Biol Reprod* 1997; 56: 169-179.
- ^{xxxii} King A, Burrows T, Verma S, et al. Human uterine Leukocytes. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 480-485.
- ^{xxxiii} Trundley A, Moffet A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 2004; 63: 1-12.
- ^{xxxiv} Loke YW, King A. *Human Implantation: cell biology and immunology*. Cambridge: Cambridge University Press; 1995.
- ^{xxxv} Ishitani A, Safeshima N, Lee N et al. Protein Expression and Peptide Binding Suggest Unique and Interacting Functional Roles for HLA F and G in Maternal-Placental Immune Recognition. *J Immunol* 2003; 171: 1376-84.
- ^{xxxvi} Blaschitz A, Hutter H, Dohr G. HLA class 1 Protein Expression in the Human Placenta. *Early Pregnancy* 2001; 5: 67-9.
- ^{xxxvii} King A, Burrows TD, Hiby SE, et al. Surface expression of HLA C antigen by human extravillous trophoblast. *Placenta* 2000; 21: 376-387.
- ^{xxxviii} Verma A, King A, Loke YW. Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine natural killer cells. *Eur J Immunol* 1997; 27: 979-983.
- ^{xxxix} King A, Allan DS, Bowen M. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1623-1631.
- ^{xl} Moffet A, Regan L, Fraude P. Natural Killer cells, miscarriage and infertility. *BMJ* 2004; 329: 1283-85.
- ^{xli} Ritson A, Bulmer JN. Isolation and functional studies of granulated lymphocytes in first trimester human decidua. *Clin Exp Immunol* 1989; 77: 263-268.
- ^{xlii} Manaseki S, Searle RF. Natural Killer (NK) cell activity of first trimester human deciduas. *Cell Immunol* 1989; 121: 166-173.
- ^{xliii} King A, Loke YW. Human trophoblast and JEP choriocarcinoma cells are sensitive to lyses by IL-2 stimulated decidual NK cells. *Cell Immunol* 1990; 129: 435-448.
- ^{xliv} Moffet-King A. Natural Killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 656-663.

-
- ^{xlv} Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural Killer cells. *J Immunol* 1989; 143: 3183-3191.
- ^{xlvi} Cooper MA, Fehninger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cells subsets. *Trends Immunol* 2001; 22: 633-640.
- ^{xlvii} Andre P, Espertini O, Guia S, et al. Modification of P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 with a Natural Killer Cell restricted sulfated lactosamine creates an alternate ligand for 1-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3400-5.
- ^{xlviii} Jacobs R, Hintzen G, Kemper A et al . CD56 Bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56DIM NK cells. *Eur J Immunol*. 2001; 31: 3121-7.
- ^{xlix} Cooper MA, Fehninger TA, Turner SC, et al. Human Natural Killer Cells: A unique innate immunoregulatory role of the CD56bright subset. *Blood* 2001; 97: 3146-3151.
- ^l Trundley A, Moffet A. human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 2004; 63: 1-12.
- ^{li} Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reproduction Immunol* 2000; 47: 87-103.
- ^{lii} Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov, et al. Human Decidual Natural Killer Cells are a unique NK subset with immuno modulatory potencial. *J Exp Med* 2003; 198: 1201-12.
- ^{liii} Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nar Rev Immunol* 2002; 2: 933-944.
- ^{liv} O´Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998; 8: 275-283.
- ^{lv} Seo N, Tokura Y, Furukawa F, Takigawa M. Down-regulation of tumoricidal NK and NK T cells activities by MHC Kb molecules expressed on Th2-type $\gamma\delta$ T and $\alpha\beta$ T cells co infiltrating in early B16 melanoma lesions. *J Immunol* 1998; 161: 4138-4145.
- ^{lvi} Deniz G, Akdis M, Aktas E, Blazer K, Akdis CA 2002 Human NK1 and NK2 subsets determined by purification of INF- γ -secreting and INF- γ -nonsecreting NK cells. *Eur J Immunol* 2002; 32: 879-884.
- ^{lvii} Loza MJ, Peters SP, Zangrilli JG, Perussia B. Distinction between IL-13+ and IFN γ + natural killer cells and regulation of their pool size by IL-4. *Eur J Immunol* 2002; 32: 413-423.
- ^{lviii} Yamada H, Polgar K, Hill JA. Cell-mediated immunity to trophoblast antigens in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1994. 170: 1339-1344.
- ^{lix} Hill YA, Polgar K, Anderson DJ. T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *JAMA* 1995; 273: 1933-1936.
- ^{lx} Krishnan L, Guilbert LJ, Wegman TG, Belosevic M, Mosmann TR. (1996) T helper 1 response against *Leishmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. *J Immunol* 1996; 156: 653-662.

-
- ^{lxi} Lim K, Odukoya OA; Ajian RA, Li TC and Weetman AP. The role of T-helper cytokines in human reproduction. *Fertil Steril* 2000; 73: 136-142.
- ^{lxii} Vives A, Balasch J, Yague J, Quinto L, Ordi J, Vanrell JA. Type-1 and Type-2 cytokines in human decidual tissue and trophoblasts from normal and abnormal pregnancies detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Am. J. Reprod. Immunol* 1999; 42: 361-368.
- ^{lxiii} Thum M, Bhaskaran S, Bansal A, Shehata H, Ford B, Sumar N, Abdalla H. (2005) Simple enumerations of peripheral blood natural killer (CD56+ NK) cells, B cells and T cells have no predictive value in IVF treatment outcome. *Human Reproduction* 2005K; 20 (5): 1272-1276.
- ^{lxiv} Quenby S, Bates M, Doig T, Brewster J, Lewis Jones D, Johnson P, Vince G. Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage . *Human Reprod* 1999; 14: 2386-2391.
- ^{lxv} Vassiliadou N, Bulmer J (1998) Characterization of endometrial T lymphocytes subpopulation in spontaneous early loss. *Human Reprod* 1998; 13: 44-47.
- ^{lxvi} Yamada H, Polgar K, Hill J. Cell-mediated immunity to trophoblast antigens in women with recurrent spontaneous abortion . *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 1339-1344.
- ^{lxvii} Thum M, Bhaskaran S, Abadía H, Ford B, Sumar N, Shehata H, Bansal A. An increase in the absolute count of CD56^{dim} CD16+ CD69 + NK cells in the peripheral blood is associated with poorer IVF treatment and pregnancy outcome. *Human Reprod* 2004; 19 (10): 2395-2400.

Universo:

Se tomaron a las pacientes que se presentaron a la consulta externa de infertilidad del Instituto Nacional de Perinatología de la ciudad de México, y al consultorio de planificación familiar; a las cuales se les propuso la realización de una biopsia endometrial y toma de sangre periférica en el día 21 al 23 del ciclo menstrual, la cual se realizó sólo cuando la paciente aceptó, bajo anestesia local, general o regional según lo ameritó cada caso y después de una extensa explicación y la firma de un consentimiento informado.

La toma de biopsia se realizó por los médicos participantes en el protocolo y la muestra fue procesada por el laboratorio de microscopía electrónica de la siguiente manera:

Universo de pacientes:

Pacientes Estériles: Pacientes que acudieron al servicio de esterilidad e infertilidad y Reproducción asistida, pertenecientes al servicio de Biología de la Reproducción Humana del Instituto Nacional de Perinatología, que se encontraron en edad reproductiva y que tuvieron como antecedente uno o más años de coito sexual sin protección y sin lograr embarazo, o aquellas pacientes que tuvieron como antecedente gineco-obstétrico un embarazo previo que terminó en parto eutócico, cesárea o aborto con o sin la realización de legrado, pero que su último evento gestósico sucedió por lo menos un año previo a la captación para el presente protocolo. Y que se encuentran en estudio para ingreso a técnicas de reproducción asistida.

A las pacientes captadas se les realizó estudio de infertilidad, el cual se caracterizó por la toma de muestras hormonales basales que incluyeron: hormonas gonadotróficas: LH y FSH; hipofisarias: Prolactina y TSH; hormonas ováricas: Estradiol y progesterona; Hormonas tiroideas: T3 y T4. Así como también, estudios cervicales: cultivo de exudado cérvico-vaginal, ureaplasma, y micoplasma, además de la detección de anticuerpos contra chlamidia en sangre periférica. El factor tubo-peritoneal fue evaluado con un estudio de Histerosalpingografía, así como histerosonografía en los casos en los que fue necesario conocer detalles específicos de la cavidad uterina. El factor uterino se evaluó con USG endovaginal realizado en la institución. El factor masculino fue evaluado con citometría seminal.

A las pacientes ya estudiadas y que requirieron una laparoscopia diagnóstica como parte del estudio de esterilidad, se les propuso la toma de muestra, previa a la cirugía e, inmediatamente después del procedimiento anestésico, siempre y cuando aceptara el procedimiento y firmaran el consentimiento informado para tal y cumpliesen con los criterios de inclusión.

Pacientes fértiles: Pacientes en edad fértil, con ciclos menstruales regulares, que tuvieron como antecedente la realización, en el Instituto Nacional de Perinatología, de cirugía para control definitivo de la fertilidad (salpingoclasia), por lo menos 6 meses antes de la captación de la paciente, misma que debió

haber suspendido la lactancia por lo menos dos meses antes de la toma de la muestra, que se tomó entre los días 21 al 23 del ciclo menstrual, así como también se tomó estudio citológico cervical y se firmó el consentimiento informado.

Pacientes Estériles Embarazadas: En el transcurso del estudio, del grupo de las pacientes estudiadas por esterilidad, surgieron tres pacientes que presentaron prueba inmunológica de embarazo positiva en sangre y saco gestacional confirmado por medio de ultrasonido. Por lo que se consideró prudente tomar a estas pacientes como un nuevo grupo de estudio.

Toma de la muestra: Una vez que la paciente se encontró en posición ginecológica, se colocaron valvas de Sims o espejo vaginal diagnóstico; previa asepsia, antisepsia y colocación de campos estériles, se localizó el cuello y se inmovilizó con pinza Pozzi fijada en el labio anterior del cervix, en caso que la paciente no se encontrara anestesiada, se aplicaron 6 ml. De Lidocaína simple paracervical hasta lograr la analgesia, se introdujo histerómetro y posteriormente cánula de Pipelle o de Novak, con toma dirigida de biopsia endometrial en dirección de las manecillas del reloj, hasta obtener suficiente muestra. La toma de sangre periférica se realizó en ese mismo momento. Para las pacientes del grupo de Fértiles, se les realizó citología cervical previa al procedimiento de biopsia endometrial.

Transporte de la muestra: El tejido endometrial fue transportado en solución Fisiológica adicionada con medio de cultivo RPMI-1640. La sangre periférica fue transportada en tres tubos, dos de ellos con anticoagulante, mismos que se entregarán al laboratorio de biología celular tan pronto como se haya tomado la muestra.

Procesamiento de la muestra

Variables:

1. *Embarazo:* Se consideró embarazo a toda paciente con retraso menstrual, presencia de Gonadotropina Coriónica cuantitativa en sangre y ultrasonido que evidenciara la presencia de saco gestacional. La evolución del embarazo no fue evaluada por el investigador.
2. *Esterilidad:* Toda mujer de los 19 a los 38 años que se asegure vida sexual activa por un año o más sin haber logrado el embarazo y que manifieste el deseo de embarazarse.
3. *Linfocitos CD3+/HLADR+:* Células T detectadas por citometría de flujo y que presentan estos marcadores de superficie.
4. *Linfocitos NK CD56+/CD16+:* Linfocitos que son detectados con estos marcadores.

Criterios de inclusión:

Se incluyeron a todas las pacientes en edad fértil que cumplieron criterio de esterilidad.

Que aceptaron participar en el protocolo.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes que padecieran una causa endocrino-ovárica que explique la esterilidad y que no haya sido corregida: Hipotiroidismo, Hipertiroidismo, Diabetes Mellitus, Intolerancia oral a los Carbohidratos, Hiperandrogenismo Funcional Ovárico, Hiperplasia suprarrenal congénita de inicio tardío, Síndrome de Ovarios Poliquísticos, Síndrome metabólico, Hiperprolactinemia o falla ovárica prematura.
2. Pacientes que no aceptaron participar en el estudio.
3. Malformaciones Mullerianas que impidan el embarazo.
4. Alteraciones cromosómicas: Hipogonadismo hipogonadotrófico, hipogonadismo hipergonadotrófico. Alteraciones genéticas del cariotipo cualquier gameto.
5. Paciente control que se encuentre en periodo de lactancia o con ciclos irregulares.
6. Pacientes que padezcan de enfermedades autoinmunes: Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoide.
7. Material insuficiente para la biopsia.

CAPITULO 3. RESULTADOS

Participaron en el estudio, en total, 28 mujeres; en el grupo de las pacientes estériles, se incluyeron 20, en el grupo de las fértiles se incluyeron 5 pacientes y para el tercer grupo –estériles embarazadas se incluyeron 3 pacientes. Las características demográficas de las mismas se enlistan en la tabla 6.

Linfocitos CD3+/HLADR+ por compartimientos

Se realiza un corte transversal a dos grupos poblacionales de estudio: estériles y fértiles, a los cuales se les mide la proporción de linfocitos T activados, marcados con CD3 y HLADR; y de los linfocitos NK, marcados con CD56 y CD16; presente en sangre periférica y en endometrio:

En el grupo de las estériles, se comparó el porcentaje de la población de linfocitos T activados CD3+/HLADR+ en la sangre periférica, con la presente en endometrio, se aplicó la prueba de Mann-Whitney, siendo la mediana para sangre periférica de 2.645 (25%=1.06; 75%=3.74); y para endometrio de 3.865 (25%=1.77; 75%=6.61). Resultando una $P=0.126$, por lo que el resultado no fue significativo. Tabla 6. Gráfica 1.

En el grupo de las fértiles, se comparó el porcentaje de la población de linfocitos T activados CD3+/HLADR+ en la sangre periférica, con la presente en endometrio, se aplicó la prueba de T-student siendo la media obtenida para sangre periférica de 13.386 (DE=4.904; IC=95%); y para endometrio de 4.084 (DE=3.241; IC=95%); obteniendo como resultado un valor de $P=0.008$, la cual es significativa. Tabla 7. Gráfica 1.

Para el grupo de las estériles, se comparó el porcentaje de la población de linfocitos NK CD56+/CD16+ en la sangre periférica, con la presente en endometrio, se aplicó la prueba de Mann-Whitney, siendo la mediana para sangre periférica de 11.165 (25%=6.90; 75%=16.59); y para endometrio de 17.400 (25%=7.56; 75%=25.72) Resultando una $P=0.100$, por lo que la medición no fue significativa. Tabla 8. Gráfica 2.

En el grupo de las fértiles, se comparó el porcentaje de la población de linfocitos NK CD56+/CD16+ en la sangre periférica, con la presente en endometrio, se aplicó la prueba de T-student, siendo la media obtenida para sangre periférica de 11.040 (DE= 10.93; IC=95%); y para endometrio de 6.420 (DE=4.33; IC=95%); obteniendo como resultado un valor de $P=0.405$, la cual no es significativa. Tabla 9. Gráfica 2.

En el transcurso del experimento, se presentaron tres embarazos en las pacientes estudiadas por esterilidad, por lo que se decide generar un nuevo grupo de estudio y realizar las mismas mediciones así:

Para el grupo de las pacientes estériles que lograron embarazo, se realiza una comparación del porcentaje de las células T activadas (CD3+/HLADR+) en el

endometrio en relación con el porcentaje en sangre periférica utilizando la prueba T-student siendo los valores obtenidos para endometrio: 5.890 (DE=2.54; IC95%) y para sangre periférica: 1.79 (DE=1.56; IC95%), por lo que la prueba se consideró no significativa. P=0.076. Tabla 10. Gráfica 1.

Para el grupo de las pacientes estériles que lograron embarazo, se realiza una medición del porcentaje de células NK (CD56+/CD16+) en el endometrio en relación con el porcentaje en sangre periférica utilizando la prueba de T-student, siendo los valores obtenidos para endometrio: 23.923 (DE=10.63; IC95%) y para sangre periférica: 15.037 (DE=5.75; IC95%), por lo que la prueba se consideró no significativa. P=0.272. Tabla 11. Gráfica 2.

Comparativo de Medición de células NK CD56+/CD16+ en sangre periférica de los tres grupos de pacientes.

Se realiza un comparativo entre los grupos estudiados, siendo evaluada la diferencia cuantificable del porcentaje de la población de CD56+/CD 16+ de la sangre periférica, se utilizó la prueba ANOVA entre los diferentes grupos de estudio, obteniendo los siguientes resultados:

En sangre periférica una media de 11.361 (DE=6.41; IC 95%) en el grupo de las Estériles; la medición de el grupo de las fértiles fue 11.040 (DE=10.931; IC=95%) y para las pacientes estériles embarazadas la media fue 15.037 (DE=5.75; IC 95%). Encontrando una diferencia no significativa entre estos grupos (P=0.703). Tabla 12. Gráfica 3.

Comparativo de Medición de células NK CD56+/CD16+ en endometrio de los tres grupos de pacientes.

Se realiza un comparativo entre los grupos estudiados, siendo evaluada la diferencia cuantificable del porcentaje de la población de CD56+/CD 16+ del endometrio, se utilizó la prueba ANOVA no paramétrico y el método de de Dunnett entre los diferentes grupos de estudio, obteniendo los siguientes resultados:

En endometrio, una media de 16.524 (DE=10.08; IC 95%) en el grupo de las Estériles; la medición de el grupo de las fértiles fue 6.420 (DE=4.33; IC=95%), y para las pacientes estériles embarazadas la media fue 23.923 (DE=10.63; IC 95%). Encontrando una diferencia significativa en estos grupos (P=0.042). Tabla 13. Gráfica 3.

Comparativo de Medición de células T activadas CD3+/HLADR+ en sangre periférica de los tres grupos de pacientes.

Se realiza un comparativo entre los grupos estudiados, siendo evaluada la diferencia cuantificable del porcentaje de la población de linfocitos T activados

(CD3+/HLADR+) en la sangre periférica, utilizando la prueba ANOVA no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis) entre los diferentes grupos de estudio y método de Dunnett, obteniendo los siguientes resultados:

En sangre periférica una mediana de 2.645 (25%=1.060; 75%=3.740) en el grupo de Estériles; la medición de el grupo de Fértiles fue 12.670 (25%=9.683; 75%=17.64) y para las pacientes Estériles Embarazadas la mediana fue 1.830 (25%=0.615; 75%=2.95) Encontrando una diferencia significativa entre estos grupos (P=0.004). Tabla 14. Gráfica 4.

Comparativo de Medición de células T activadas CD3+/HLADR+ en endometrio de los tres grupos de pacientes.

Se realiza un comparativo entre los grupos estudiados, siendo evaluada la diferencia cuantificable del porcentaje de la población de linfocitos T activados CD3+/HLADR+ en el endometrio, utilizando la prueba ANOVA entre los diferentes grupos de estudio, obteniendo los siguientes resultados:

En endometrio, una media de 4.606 (DE=3.77; IC 95%) en el grupo de Estériles; la medida para el grupo de Fértiles fue 4.084 (DE=3.24; IC=95%), y para las pacientes Estériles Embarazadas la media fue 5.890 (DE=2.54; IC 95%). Encontrando una diferencia no significativa entre estos grupos (P=0.789). Tabla 15. Gráfica 4.

CAPITULO 4. DISCUSION

El embarazo exitoso, visto desde una perspectiva inmunológica, es verdaderamente una paradoja en la que el producto de la concepción, portador de información genética semi-alogénica, representa un antígeno potente capaz de desencadenar cualquier tipo de respuesta inmune, sobretodo en un endometrio ocupado por células linfoides que participan activamente en la detección de antígenos para su inmediata eliminación.

Debido a que las células del sistema inmune parecieran presentar un patrón de comportamiento cíclico endometrial, (que puede obedecer a causas hormonales, debido a que se han evidenciado la presencia de receptores estrogénicos, progestacionales y de prolactina en la membrana de los uNK)^{i ii}ⁱⁱⁱ, surge entonces la teoría que en las pacientes con esterilidad, se presentara un patrón de comportamiento celular diferente, originándose una inadecuada fase secretoria preparatoria para la implantación.

En este estudio, se cuantificaron las proporciones de dos tipos diferentes de linfocitos en dos compartimientos celulares (endometrio y sangre periférica) de pacientes fértiles y estériles, con el fin encontrar diferencias entre estos grupos que amplíen los conocimientos actuales en cuanto al micro ambiente celular del endometrio y de la sangre periférica de las pacientes estériles.

Se han realizado mediciones previas de linfocitos NK tanto en sangre periférica como en el endometrio de pacientes con pérdida gestacional recurrente, en el caso de las mediciones de NK en sangre periférica, existen cuatro autores que encuentran elevación de esta subpoblación celular relacionada con PGR:

Aoki et al (1995)^{iv}, una elevación de estos linfocitos antes de la concepción, con un valor predictivo de aborto en el próximo embarazo (RR=3.5), Emmer et al (2000)^v reporta un porcentaje menor a 12% de NK necesario para lograr embarazo a término; y Ntrivalas et al (2001)^{vi} y Thump et al (2004)^{vii} reportan aumento en la expresión de CD69+ y disminución en el CD94, en las células NK de pacientes con PGR y aquellas con pobre respuesta en el In Vitro, respectivamente. Para el caso de este estudio, el hallazgo en sangre periférica de los linfocitos NK CD56+/CD16+ con respecto al endometrio de las pacientes con esterilidad no fue proporcionalmente mayor, (P=0.100); sin embargo, al realizar las mediciones de esta subpoblación en el endometrio de las pacientes estériles, y compararlas con el grupo de las pacientes fértiles, se encontró un aumento de la los linfocitos NK en el endometrio de las pacientes estériles, con una significancia estadística (P=0.042), hallazgos que coinciden con Emmer et al.,2002^{viii} y Clifford et al., 1999^x, quienes encontraron aumento de esta subpoblación celular en el endometrio de las pacientes con PGR. Otros dos autores encontraron CD 56^{dim} CD16+ en menor porcentaje en comparación con los NK CD56^{bright} CD16-; Lachapelle et al., 1996^x Quenby et al., 1999⁶⁷ hallazgos que nos orienta hacia el conocimiento de un predominio de células NK con actividad citotóxica, como factor determinante del fracaso del embarazo en las pacientes con pérdidas gestacionales recurrentes.

Debido a las evidencias mencionadas, en las que se observa un predominio en la respuesta citotóxica a nivel endometrial como un posible factor que participa en el fracaso de los embarazos de las pacientes con pérdida gestacional, y a que se ha reportado una posible pérdida del equilibrio en la respuesta Th1/Th2^{xi}, en la cual, el aumento en la respuesta Th1 estaría relacionada con el fracaso de la implantación en monos y en humanos^{xii-xiii-xiv-xv-xvi-xvii-xviii-xix-xx-xxi}, este estudio investigó la presencia de los linfocitos T activados, marcados como CD3+/HLADR+, con el fin de conocer su proporción tanto a nivel periférico como endometrial, y comparar los hallazgos en las pacientes estériles y las fértiles. Así como lo reporta Mishimata et al (2003)^{xxii}, quienes encontraron mayor población endometrial de linfocitos CD3+T, CD4+T y CD8+T en las pacientes control en comparación con las pacientes con aborto recurrente; en nuestro estudio encontramos elevación de linfocitos T activados en sangre periférica en las pacientes fértiles en comparación con las pacientes estériles (P=0.004).

Al comparar la sangre periférica con el endometrio de las pacientes fértiles, en la sangre periférica se encontró un aumento significativo de esta subpoblación (linfocitos T activados CD3+/HLADR+), (P=0.008); sugiriendo que los fenómenos de la inflamación, y la respuesta efectora a nivel endometrial no tienen relación con la migración de otras células pro-embarazo ni serían las causantes de la acumulación de células en pro de la respuesta Th2 para favorecerlo, ya que no son una población predominante en el endometrio de las pacientes fértiles. Sin embargo, los hallazgos de este estudio nos revelan una subpoblación celular predominante en sangre periférica de pacientes fértiles, siendo necesario una investigación más amplia en búsqueda una explicación fisiológica de este fenómeno, con medición de citocinas y factores de crecimiento, y que nos permitieran la formulación de un posible perfil celular inmunológico que tuviera valor predictivo para el manejo de la paciente con esterilidad, teniendo en cuenta que en estudios anteriores se han encontrado linfocitos NK CD56dim CD16+ CD69+, predominantes en la sangre periférica de pacientes con pobre respuesta a los programas de FIVTE^{xxiii} y que también se han reportado incremento en subpoblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+^{xxiv}, y recientemente se ha postulado un aumento en la población de linfocitos T CD4+/ CD25+ en sangre periférica en comparación con el endometrio de pacientes con aborto espontáneo que pudieran tener un rol negativo en el fenómeno de implantación.

En cuanto a la evidencia de un incremento en la celularidad de linfocitos NK en la fase secretoria del ciclo menstrual y a la participación de estas células en el embarazo, este estudio no encuentra una población celular aumentada de manera significativa de células NK en el endometrio en la fase secretora de ninguno de los grupos de estudio, aunque una de las limitantes del estudio es la no medición de linfocitos NK CD56^{dim} / CD16-, en el endometrio, ya que otros autores (Lachapelle et al., 1996^{xxv} y King et al., 1998^{xxvi}.) han encontrado una predominancia de este subtipo celular en el endometrio en fase secretora y no de los linfocitos NK CD56+/CD16+. Lo que si es notorio en el actual estudio es la presencia de una mayor subpoblación de linfocitos NK en las pacientes estériles embarazadas, que aunque no tuvo significancia estadística, nos orienta hacia la posible migración de células NK en el momento del embarazo y

a la participación crucial de esta célula en la implantación. Sería prudente realizar estudios con una muestra mayor, o ampliar el estudio actual para evaluar el fenómeno de una forma amplia y así tener resultados que evidencien lo ya publicado en artículos anteriores.

ⁱ Huang J, Roby KF, Pace JL, Hunt JS. Localization and hormonal regulation of inducible nitric oxide synthase in cyclin Mouse uterus. *J Leukocyte Biol* 1995; 57: 27-35.

ⁱⁱ Kimura M, Hanawa H, Watanabe H, Ogawa M, Abo T. Synchronous expansion of intermediate TcR cells in the liver and uterus during pregnancy. *Cell Immunol* 1995; 162: 16-25.

ⁱⁱⁱ Mincheva-Nilsson L, Kling M, Hammarstrom S, Nagaeva O, Sundqvist KG, Hammarstrom ML, Baranov V. Gamma delta T cells of human early pregnancy deciduas: evidence for local proliferation, phenotypic heterogeneity, and extrathymic differentiation. *J Immunol* 1997; 159: 3266-3277.

^{iv} Aoki k, Kajimura S, Matsumoto Y, Ogasawara M, Okada S, Yagami Y, Gleicher N. Preconceptional natural-Killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet* 1995; 345: 1340-1342.

^v Emmer PM, Nelen WL, Steegers EA, Hendriks JC, Veerhoek M, Joosten I. Peripheral natural Killer cytotoxicity and CD56(pos)CD16(pos) cells increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2000; 15: 1163-1169.

^{vi} Ntrivalas EI, Kwak-kim JY, Gilman-Sachs A, Chung-Bang H, Ng SC, Beaman KD, Mantouvalos HP, Beer AE. Status of peripheral blood natural Killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology. *Hum Reprod* 2001; 16: 855-861.

^{vii} Thum M, Bhaskaran S, Abadía H, Ford B, Sumar N, Shehata H, Bansal A. An increase in the absolute count of CD56^{dim} CD16⁺ CD69⁺ NK cells in the peripheral blood is associated with poorer IVF treatment and pregnancy outcome. *Human Reprod.* 2004; 19 (10): 2395-2400.

^{viii} Emmer PM, Steegers EA, Kerstens HM, Bulten J, Nelen WL, Boer K, Joosten I. Altered phenotype of HLA-G and decidual natural Killer Cells in pathological pregnancies. *Hum Reprod* 2002; 17: 1072-1080.

^{ix} Clifford K, Flanagan AM, Regan L. Endometrial CD56⁺ natural Killer cells in women with recurrent miscarriage: a histomorphometric study. *Hum Reprod* 1999; 14: 2727-2730.

-
- ^x Lachapelle MH, Miron P, Hemmings R, Roy DC. Endometrial T, B and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *J Immunol* 1996; 156: 4027-4034.
- ^{xi} Michimata T, Sakai M, Miyazaki S, Ogasawara M, Suzumori K, Auki K, Nagata K, Saito S. Decrease of T-helper 2 and T-cytotoxic 2 cells at implantation sites occurs in unexplained recurrent spontaneous abortion with normal chromosomal content. *Human Reprod* 2003; 18 (7): 1523-1528.
- ^{xii} Chaouat, G, Meliani AA, Martal J, Raghupathy R, Elliot J, Mosmann T and Wegman T. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBAXDBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of INF- γ . *J Immunol* 1995; 154: 4261-4268.
- ^{xiii} Hill JA; Polgar K and Anderson DJ. T-Helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *J. Am. Med. Assoc* 1995; 273: 1933-1036.
- ^{xiv} Krishnan L, Guilbert LJ, Wegman TG, Belosevic M, Mosmann TR. (1996) T helper 1 response against *Leishmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. *J Immunol* 1996; 156: 653-662.
- ^{xv} Shaarawy M, Nagui AR. Enhanced expression of cytokine may play a fundamental role in the mechanisms of immunologically mediated recurrent spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; 76: 205-211.
- ^{xvi} Vives A, Balasch J, Yague J, Quinto L, Ordi J, Vanrell JA. Type-1 and Type-2 cytokines in human decidual tissue and trophoblasts from normal and abnormal pregnancies detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Am. J. Reprod. Immunol* 1999; 42: 361-368.
- ^{xvii} Hayakawa S, Suzuki MK, Itoh T, Kanaeda T, Nagai N, Takahashi-Yamamoto N, Tochigi M, Chishima F, Fujii TK, Kitanaka S and Satoh K. Effects of paternal lymphocyte immunization of peripheral Th1/Th2 balance and TCR V β and V γ repertoire usage of patients with recurrent spontaneous abortions. *Am. J. Reprod. Immunol* 2000; 43: 107-115.
- ^{xviii} Jenkins C, Roberts J, Wilson R, Maclean MA, Shilito J and Walker JJ. Evidence of Th1 response associated with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2000; 73: 1206-1208.
- ^{xix} Lim K, Odukoya OA; Ajian RA, Li TC and Weetman AP. The role of T-helper cytokines in human reproduction. *Fertil Steril* 2000; 73: 136-142.
- ^{xx} Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, Omu A, Al-Shamali E, Ashkanani L. Th1 and Th2 cytokine profiles in recurrent abortions with successful pregnancy and subsequent abortions. *Hum Reprod* 2001; 16: 2219-2226.
- ^{xxi} Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M and Farhat R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2000; 15: 713-718.
- ^{xxii} Michimata T, Sakai M, Miyazaki S, Ogasawara M, Suzumori K, Auki K, Nagata K, Saito S. Decrease of T-helper 2 and T-cytotoxic 2 cells at implantation sites occurs in

unexplained recurrent spontaneous abortion with normal chromosomal content. Human Reprod 2003; 18(7): 1523-1528.

^{xxiii} Thum M, Bhaskaran S, Abadía H, Ford B, Sumar N, Shehata H, Bansal A. An increase in the absolute count of CD56^{dim} CD16⁺ CD69⁺ NK cells in the peripheral blood is associated with poorer IVF treatment and pregnancy outcome. Human Reprod 2004; 19 (10): 2395-2400.

^{xxiv} Michimata T, Sakai M, Miyazaki S, Ogasawara M, Suzumori K, Auki K, Nagata K, Saito S. Decrease of T-helper 2 and T-cytotoxic 2 cells at implantation sites occurs in unexplained recurrent spontaneous abortion with normal chromosomal content. Human Reprod. 2003; 18(7): 1523-1528.

^{xxv} Lachapelle MH, Miron P, Hemmings R, Roy DC. Endometrial T, B and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. J Immunol 1996; 156: 4027-4034.

^{xxvi} King A, Burrows T, Verma s, et al. Human uterine Leukocytes. Hum Reprod Update 1998; 4: 480-485.

CAPITULO 5. CONCLUSIONES

En el presente estudio se observó un perfil celular de linfocitos T activados y NK significativamente diferente entre las pacientes del grupo de esterilidad y las pacientes del grupo de fertilidad.

El grupo de esterilidad presentó una mayor proporción de células NK CD 56+/CD16+ en el endometrio en la fase secretora del ciclo menstrual, en relación con las pacientes fértiles para el mismo momento del ciclo. De la misma manera, se advierte un incremento de linfocitos T activados CD3+/HLADR+ en la sangre periférica de las pacientes fértiles en comparación con las estériles, con lo que se concluye que estas células podrían tener una participación importante en el fenómeno de implantación, probablemente como reguladores de la respuesta inmune Th2. Hacen falta experimentos conducentes a la medición de la actividad celular para determinar su papel activador o inhibidor de la inmunidad en la implantación.

Se encuentra elevación de los linfocitos T activados en la sangre periférica con relación al endometrio de las pacientes fértiles, fenómeno que se podría asociar a los hallazgos de otros grupos de investigación para ser utilizado en la formulación de un perfil inmunológico útil en la medición del valor predictivo de éxito de la implantación en pacientes que serán sometidas a técnicas de reproducción asistida.

- i Anne S, Devi W, Ayden A. Natural killer cells and reproductive failure. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005; 17: 237-241.
- ii Griffith JS, Jensen SM, Lunceford JK, Kahn MW, Zheng Y. Evidence for the genetic control estradiol-regulated responses. Implication for variation in normal and pathological hormone-dependent phenotypes. *Am J Pathol* 1997; 150: 2223-2230.
- iii Katayama ML, Federico MH, Brentani RR, Brentani MM. Eosinophil accumulation in rat uterus following estradiol administration is modulated by laminin and its integrin receptors. *Cell Adhes Commun* 1998; 5: 409-424.
- iv Joan S, Margaret G, Petroff B, Tim B. Uterine Leukocytes: Key players in pregnancy. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 2000; 11: 127-137.
- v White H, Crassi K, Givan A, Stern J, González J, Memoli V, Green W, Wira C. CD3+ CD8+ CTL activity within the human female reproductive tract: influence of stage of the menstrual cycle and menopause. *J Immunol* 1997; 158:3017-3027.
- vi Parr MB, Parr EL. Immunoglobulin in the female genital tract, in the endocrinology of pregnancy. (Bazer FW, ed.). 1996 pp.275-308. Blackwell Science, Cambridge.
- vii Kodama T, Hara T, Okamoto E, Kusunoki Y, Ohama K. Characteristic changes of large granular lymphocytes that strongly express CD56 in endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. *Human Reprod* 1998; 13:1036-1043.
- viii Bulmer JN, Morrison I, Longfellow M, Ritson A, Pace D. Granulated Lymphocytes in human endometrium: Histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod* 1991; 6: 791-798.
- ix Salamonsen LA. Role of proteases in implantation. *Rev Reprod* 1999; 4: 11-22.
- x Zhang J, Nie G, Jian W, Woolley DE, Salamonsen LA. Mast cell regulation of human endometrial matrix metalloproteinases: a mechanism underlying menstruation. *Biol Reprod* 1998; 59: 693-703.
- xi Kimura M, Hanawa H, Watanabe H, Ogawa M, Abo T. Synchronous expansion of intermediate TcR cells in the liver and uterus during pregnancy. *Cell Immunol* 1995; 162: 16-25.
- xii Ain R, Tash JS, Soares MJ. Prolactin-like protein-A is a functional modulator of Natural Killer Cells at the maternal-fetal interface. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 204:65-74.
- xiii Dunn CL, Critchley HO, Kelly RW. IL-15 Regulation in human endometrial stromal Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1898-1901.
- xiv Lobo SC, Huang SJ, Germeyer A, Et al. The immune environment in the human endometrium during de window of implantation. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52: 244-251.
- xv Shigeki S, Emi H, Mamoru M, Kazuya I, Ryutaro N, Reiko K, Kazunori O, Hisanori M, Hideto Y. No difference in natural Killer or Natural Killer T-cell population, but aberrant T-helper cell population in the endometrium of women with repeated miscarriage. *Human Reproduction* 2004; 19 (4):1018-1024.
- xvi Huang J, Roby KF, Pace JL, Hunt JS (1995) Localization and hormonal regulation of inducible nitric oxide synthase in cyclin Mouse uterus. *J Leukocyte Biol* 1995; 57: 27-35.
- xvii Kimura M, Hanawa H, Watanabe H, Ogawa M, _Abo T. Synchronous expansion of intermediate TcR cells in the liver and uterus during pregnancy. *Cell Immunol* 1995; 162: 16-25.
- xviii Mincheva-Nilsson L, Kling M, Hammarstrom S, Nagaeva O, Sundqvist KG, Hammarstrom ML, Baranov V. Gamma delta T cells of human early pregnancy deciduas: evidence for local proliferation, phenotypic heterogeneity, and extrathymic differentiation. *J Immunol* 1997; 159: 3266-3277.
- xix King A, Burrows T, Verma S, Hiby S, Loke YW. Human uterine lymphocytes. *Human Reprod* 1998; 4: 480-485.
- xx Hasen KA, Opsahl MS, Nieman LK, Baker Jr JR, Klein TA. Natural Killer Cell activity

from pregnant subjects in modulated by RU 486. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 87-90.

xxi Whitelaw PF, Croy BA. Granulated lymphocytes of pregnancy. *Placenta* 1996; 17: 533-543.

xxii Zheng LM, Ojctus DM, Liu CC, Kramer MD, Simon MM, Parr EL, Young JD. Immunogold labeling of perforin and serine esterases in granulated metrial land cells. *FASEB J* 1991; 5: 79-85.

x

xxiii Parr EL, Chen HL, Parr MB, Hunt JS. Synthesis and granullar localization of tumor necrosis factor –alpha in activated NK cells in the pregnant mouse uterus. *J Reprod Immunol* 1995; 28: 31-40.

xxiv Hunt JS, Miller L, Vassmer D, Croy BA (1997) Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in mouse uterine leukocytes and potential relationships with uterine function during pregnancy. *Biol Reprod* 1997; 57: 827-836.

xxv Ye W, Zheng LM, Young JD, Liu CC. The involvement of interleukin (IL)-15 in regulating the differentiation of granulated metrial gland cells in mouse pregnant uterus. *J Exp Med* 1996; 184: 2405-2410.

x

xxvi Muller H, Liu B, Croy BA, Head J, Hunt JS, Dai G, Soares MJ. Uterine natural killler cells are targets for a trophoblast cell-specific cytokine, prolactin-like protein-A. *Endocrinol* 1999; 140: 2711-2720.

xxvii Ponte M, Cantoni C, Biassoni R, Tradori-Cappai A, Bemtivoglio G, Vitale C, Bertone S, Moretta A, Mingari MC.

Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decicua-associated natural Killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and aquire p49, and HLAG1specific receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5674-5679.

xxviii Kitaya K, Nakayama T, Okubo T, Kuroboshi H, Fushiki S, Honjo H. Expression of macrophage inflammatory protein 1-₂ in human endometrium: its role in endometrial recruitment of natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1809-1814.

xxix Ancelin M, Buteau-Lozano H, Meduri G, Osborne-Pellegrin M, Sordello S, Perrot-Applanat M. A dynamic shift of VEGF isoforms with a transient and selective progesterone-induced expressions of VEGF189 regulates angiogenesis and vascular permeability in human uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6023-6028.

x

xx Popovici RM, Kao LC, Giudice LC. Discovery of new induction genes in in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology* 2000; 141: 3510-3513.

xxxi Guimond MJ, Luross JA, Wang B, Terhost C, Danial S, Croy BA. Abscence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. *Biol Reprod* 1997; 56: 169-179.

xxxii. King A Burrows T, Verma s, et al. Human uterine Leukocytes. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 480-485.

xxxiii Trundley A, Moffet A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 2004; 63: 1-12.

xxxiv Loke YW, King A. *Human Implantation: cell biology and immunolgy*. Cambridge: Cambridge University Press;1995.

xxxv Ishitani A, Safeshima N, Lee N et al. Protein Expresión and Peptide Binding Suggest Unique and Interacting Functional Roles for HLA F and G in Maternal-Placental Inmune Recognition. *J Immunol* 2003; 171: 1376-84.

xxxvi Blaschitz A, Hutter H, Dohr G. HLA class 1 Prorein Expression in the Human Placenta. *Early Pregnancy* 2001; 5: 67-9.

xxxvii King A, BurrowsTD, Hiby SE, et al. Surface expression of HLA C antigen by human extravillous trophoblast. *Placenta* 2000; 21; 376-387.

x

xxxviii Verma A, King A, Loke YW. Expression of killer cell inhibitory receptors on human

- uterine natural killer cells. *Eur J Immunol* 1997; 27: 979-983.
- xxxix King A, Allan DS, Bowen M. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1623-1631.
- xl Moffet A, Regan L, Fraude P. Natural Killer cells, miscarriage and infertility. *BMJ* 2004; 329: 1283-85.
- xli Ritson A, Bulmer JN. Isolation and functional studies of granulated lymphocytes in first trimester human decidua. *Clin Exp Immunol* 1989; 77: 263-268.
- x
- lii Manaseki S, Searle RF. Natural Killer (NK) cell activity of first trimester human deciduas. *Cell Immunol* 1989; 121: 166-173.
- xlili King A, Loke YW. Human trophoblast and JEP choriocarcinoma cells are sensitive to lyses by IL-2 stimulated decidual NK cells. *Cell Immunol* 1990; 129: 435-448.
- x
- liiv Moffet-King A. Natural Killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 656-663.
- xliv Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural Killer cells. *J Immunol* 1989; 143: 3183-3191.
- xlvi Cooper MA, Fehninger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cells subsets. *Trends Immunol* 2001; 22: 633-640.
- xlvii Andre P, Espertini O, Guia S, et al. Modification of P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 with a Natural Killer Cell restricted sulfated lactosamine creates an alternate ligand for 1-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3400-5.
- x
- lviii Jacobs R, Hintzen G, Kemper A et al . CD56 Bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56DIM NK cells. *Eur J Immunol*. 2001; 31: 3121-7.
- xliv Cooper MA, Fehninger TA, Turner SC, et al. Human Natural Killer Cells: A unique innate immunoregulatory role of the CD56bright subset. *Blood* 2001; 97: 3146-3151.
- i Trundley A, Moffet A. human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 2004; 63: 1-12.
- ii Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reproduction Immunol* 2000; 47: 87-103.
- iii Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov, et al. Human Decidual Natural Killer Cells are a unique NK subset with immuno modulatory potencial. *J Exp Med* 2003; 198: 1201-12.
- iiii Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nar Rev Immunol* 2002; 2: 933-944.
- liiv O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998; 8: 275-283.
- iv Seo N, Tokura Y, Furukawa F, Takigawa M. Down-regulation of tumoricidal NK and NK T cells activities by MHC Kb molecules expressed on Th2-type __ T and __T cells co infiltrating in early B16 melanoma lesions. *J Immunol* 1998; 161: 4138-4145.
- lvi Deniz G, Akdis M, Aktas E, Blazer K, Akdis CA 2002 Human NK1 and NK2 subsets determined by purification of INF-_-secreting and INF-_-nonsecreting NK cells. *Eur J Immunol* 2002; 32: 879-884.
- lvii Loza MJ, Peters SP, Zangrilli JG, Perussia B. Distinction between IL-13+ and IFN _+ natural killer cells and regulation of their pool size by IL-4. *Eur J Immunol* 2002; 32: 413-423.
- lviii Yamada H, Polgar K, Hill JA. Cell-mediated immunity to trophoblast antigens in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1994. 170: 1339-1344.
- lix Hill YA, Polgar K, Anderson DJ. T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *JAMA* 1995; 273: 1933-1936.
- ix Krishnan L, Guilbert LJ, Wegman TG, Belosevic M, Mosmann TR. (1996) T helper 1 response against *Leishmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation

failure and fetal resorptions. *J Immunol* 1996; 156: 653-662.

lxi Lim K, Odukoya OA; Ajian RA, Li TC and Weetman AP. The role of T-helper cytokines in human reproduction. *Fertil Steril* 2000; 73: 136-142.

lxii Vives A, Balasch J, Yague J, Quinto L, Ordi J, Vanrell JA. Type-1 and Type-2 cytokines in human decidual tissue and trophoblasts from normal and abnormal pregnancies detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Am. J. Reprod. Immunol* 1999; 42: 361-368.

lxiii Thum M, Bhaskaran S, Bansal A, Shehata H, Ford B, Sumar N, Abdalla H. (2005) Simple enumerations of peripheral blood natural killer (CD56+ NK) cells, B cells and T cells have no predictive value in IVF treatment outcome. *Human Reproduction* 2005K; 20 (5): 1272-1276.

lxiv Quenby S, Bates M, Doig T, Brewster J, Lewis Jones D, Johnson P, Vince G. Preimplantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage . *Human Reprod* 1999; 14: 2386-2391.

lxv Vassiliadou N, Bulmer J (1998) Characterization of endometrial T lymphocytes subpopulation in spontaneous early loss. *Human Reprod* 1998; 13: 44-47.

lxvi Yamada H, Polgar K, Hill J. Cell-mediated immunity to trophoblast antigens in women with recurrent spontaneous abortion . *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 1339-1344.

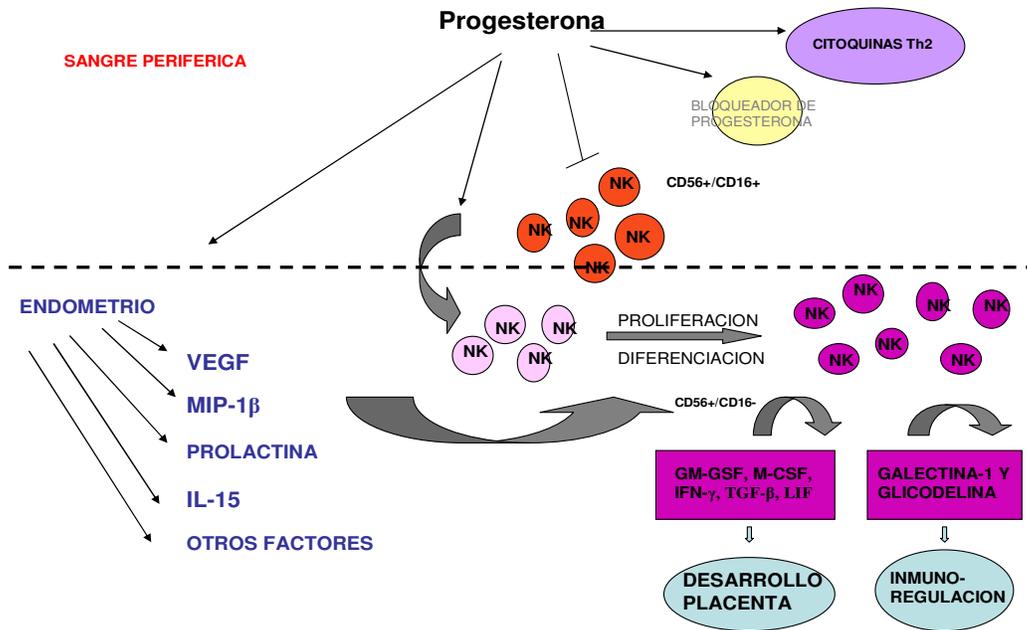
lxvii Thum M, Bhaskaran S, Abadía H, Ford B, Sumar N, Shehata H, Bansal A. An increase in the absolute count of CD56^{dim} CD16⁺ CD69⁺ NK cells in the peripheral blood is associated with poorer IVF treatment and pregnancy outcome. *Human Reprod* 2004; 19 (10): 2395-2400.

Tabla 1. Expresión de los antígenos de superficie de los linfocitos NK periféricos y uterinos. ⁱ

ⁱ Dosiou C and Giudice L. Natural Killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. Endocrine Reviews 2005; 26(1): 44-62.

ANTIGENOS	NK PERIFÉRICOS CD56^{DIM}	NK UTERINOS CD56^{BRIGHT}
CD2 (Marcador temprano de células T)	+	+
CD7 (Marcador temprano de células T)	+	+
CD18 (Integrina)	+	+
CD16 (Marcador NK)	+	-
CD45 (Células hematopoyéticas)	+	+
CD56 (Marcador NK)	+	+
CD57 (Marcador NK)	+	-
CD62L (Molécula de Adhesión)	±	-
CD69 (Marcador de activación)	-	+
KIR (Marcador NK)	+	+
c-kit (Receptor citoquina)	-	+
IL-2 R β (Receptor citoquina)	+	+

Figura 1. Modelo de regulación hormonal de las células NK durante la gestación.¹



En el embarazo temprano, la progesterona provoca una disminución de las células NK periféricas, existiendo una activación de la vía Th2 y la producción de bloqueador de progesterona (PIBF) que disminuye la actividad citotóxica de los linfocitos. Las células endometriales producen citoquinas que estimulan la migración hacia el endometrio de los linfocitos NK, quienes se proliferan y diferencian y comienzan a producir citoquinas que inducen el crecimiento placentario y su propia regulación.

Tabla 2. Estudios de NK periféricos en PGR en los que encontraron incremento de la actividad celular.

ESTUDIO	N	CRITERIOS DE INCLUSION	METODO	RESULTADOS
Aoki et al., 1995ⁱ	68	Dos AE consecutivos del primer trimestre, sin causa uterina, endocrina, genética o auto inmune.	Ensayo Cr release	Alta actividad pre concepcional de los NK en PGR. Valor predictivo de aborto (RR3.5) en la próxima gestación.
Emmer et al., 2000ⁱ	43	Dos o mas AE consecutivos <16 sem. Cariotipo y PFT NI. Sin OPQ, DM, AFL.	Citometría de flujo. Cr release	Células citotóxicas pre concepcionales similares en PGR y controles. NK<12% asociado a embarazo a término. CD56+/CD16+ con actividad citotóxica asociados con PGR.
Ntrivalas et al., 2001ⁱ	22	Dos o mas AE sin causas anatómicas, hormonales, infecciosas o auto inmunes	Citometría de flujo	Aumento en la expresión de NKCD69+ y disminución del CD94 en las pacientes con PGR. Comparada con controles.

AE: Aborto espontáneo, PFT: pruebas de función tiroideas, OPQ: Ovario poliquístico, DM: Diabetes mellitus, AFL: Anticuerpos antifosfolípidos, PGR: Pérdida gestacional recurrente.

Tabla 3. Estudios de NK periféricos en PGR en los que no encontraron incremento de la actividad celular.

ESTUDIO	N	CRITERIOS DE INCLUSION	METODO	RESULTADOS
Souza et al., 2002ⁱ		Dos o más AE consecutivos, cariotipo nl. US pélvico, HSG, EMBx, y endocrino nl.	Citometría de flujo y Cr. Release.	No diferencias entre NKCD56+/CD16+ entre PGR y controles.

AE: Aborto espontáneo, US: Ultrasonido, HSG: Histerosalpingografía, EMBX: Biopsia de endometrio.

Tabla 4. Estudios de uNK en PGR en los que encontraron incremento de la actividad celular.

ESTUDIO	N	CRITERIOS DE INCLUSION	ESPECIMEN	METODO	RESULTADOS
Lachapelle et al., 1996 ⁱ	20	Tres o más AE consecutivos del primer trimestre, HSG, cariotipo, EMBx, TSH, PRL y AFL nl.	EMBX 18-25	Citometría de flujo	Similar % de NK. Alto % de NK CD56 ^{dim} CD16+. Menor % de NK CD56 ^{bright} CD16-
Quenby et al., 1999 ⁶⁷	22	Tres o mas AE consecutivos. cariotipo y endocrino, AFL nl.	EMBX 19-22	Inmuno histoquímica	Alto % de CD16- y CD56+
Clifford et al., 1999 ⁱ	29	Historia de AE. Cariotipo, AFL y US nl.	EMBX 20-23	Inmuno histoquímica	Alto número de CD56+ en mujeres con pérdidas < 13 sem.
Emmer et al., 2002 ⁱ		Dos o mas AE antes 16 sem. Cariotipo y AFL nl.	Tejido de aborto o legrado.	Inmuno Histoquímica	Alta expresión de CD56/CD16

AE: Aborto espontáneo, PFT: pruebas de función tiroideas, OPQ: Ovario poliquístico, DM: Diabetes mellitus, AFL: Anticuerpos antifosfolípidos, PGR: Pérdida gestacional recurrente, US: ultrasonido, HSG: Histerosalpingografía, EMBX: biopsia de endometrio

Tabla 5. Estudios de uNK en PGR en los que no encontraron incremento de la actividad celular.

ESTUDIO	N	CRITERIOS DE INCLUSION	ESPECIMEN	METODO	RESULTADOS
Shimada et al., 2004 ⁱ	20	Dos o más AE consecutivos, cariotipo nl. US pélvico, HSG, EMBx nl.	EMBX fase lútea	Citometría de flujo.	No diferencias entre % NKCD56+, CD56+/CD16+ o CD56+/CD16-.
Michimata et al., 2002 ⁱ	17	Dos AE primer trimestre, cariotipo nl. US pélvico, HSG, EMBx, prolactina y PFT nl.	EMBX 18-21	Inmuno histoquímica	No diferencia en el número de CD56+ o CD16+.

AE: Aborto espontáneo, US: Ultrasonido, HSG: Histerosalpingografía, EMBX: Biopsia de endometrio. PFT: pruebas de función tiroidea.

Tabla 6. Medición de células T CD3+/HLADR+ en ambos compartimientos, pacientes Estériles.

GRUPO	N	MEDIANA	25%	75%
Endometrio	20	3.865	1.775	6.615
Sangre periférica	20	2.645	1.060	3.740

P=0.126

Tabla 7. Medición de células T CD3/HLADR+ en ambos compartimientos, pacientes Fértiles.

GRUPO	N	MEDIA	DE	SEM
Endometrio	5	4.084	3.241	1.449
Sangre periférica	5	13.386	4.904	2.193

*P=0.008**

Tabla 8. Medición de células NK CD56+/CD16+ en ambos compartimientos, pacientes Estériles.

GRUPO	N	MEDIANA	25%	75%
Endometrio	19	17.400	7.567	25.727
Sangre periférica	20	11.165	6.900	16.595

P=0.100

Tabla 9. Medición de células NK CD56+/CD16+ en ambos compartimientos, pacientes Fértiles.

GRUPO	N	MEDIA	DE	SEM
Endometrio	5	6.420	4.335	1.938
Sangre periférica	5	11.040	10.931	4.888

P=0.405

Tabla 10. Medición de células T CD3+/HLADR + en ambos compartimientos, pacientes Estériles-Embarazadas.

GRUPO	N	MEDIA	DE	SEM
Endometrio	3	5.890	2.545	0.901
Sangre periférica	3	1.790	1.560	1.469

P=0.076

Tabla 11. Medición de células NK CD56+/CD16+ en ambos compartimientos, pacientes Estériles Embarazadas.

GRUPO	N	MEDIA	DE	SEM
Endometrio	3	23.923	10.633	6.139
Sangre periférica	3	15.037	5.750	3.19

P=0.272

Tabla 12. Comparativo de Medición de células NK CD56+/CD16+ en sangre periférica de los tres grupos de pacientes.

GRUPO	N	MEDIA	DE	SEM
Estériles	20	11.361	6.41	1.43
Fértiles	5	11.040	10.93	4.88
Est. Embar	3	15.037	5.75	3.31

P=0.073

Tabla 13. Comparativo de Medición de células NK CD56+/CD16+ en endometrio de los tres grupos de pacientes.

GRUPO	N	MEDIA	DE	SEM
Estériles	20	16.524	10.08	2.31
Fértiles	5	6.42	4.33	1.93
Est. Embar	3	23.923	10.63	6.13

*P=0.042**

Tabla 14. Comparativo de Medición de células T activadas CD3+/HLADR+ en sangre periférica de los tres grupos de pacientes.

GRUPO	N	MEDIANA	25%	75%
Estériles	20	2.645	1.060	3.740
Fértiles	5	12.670	9.683	17.648
Est. Embar	3	1.830	0.615	2.955

*P=0.004**

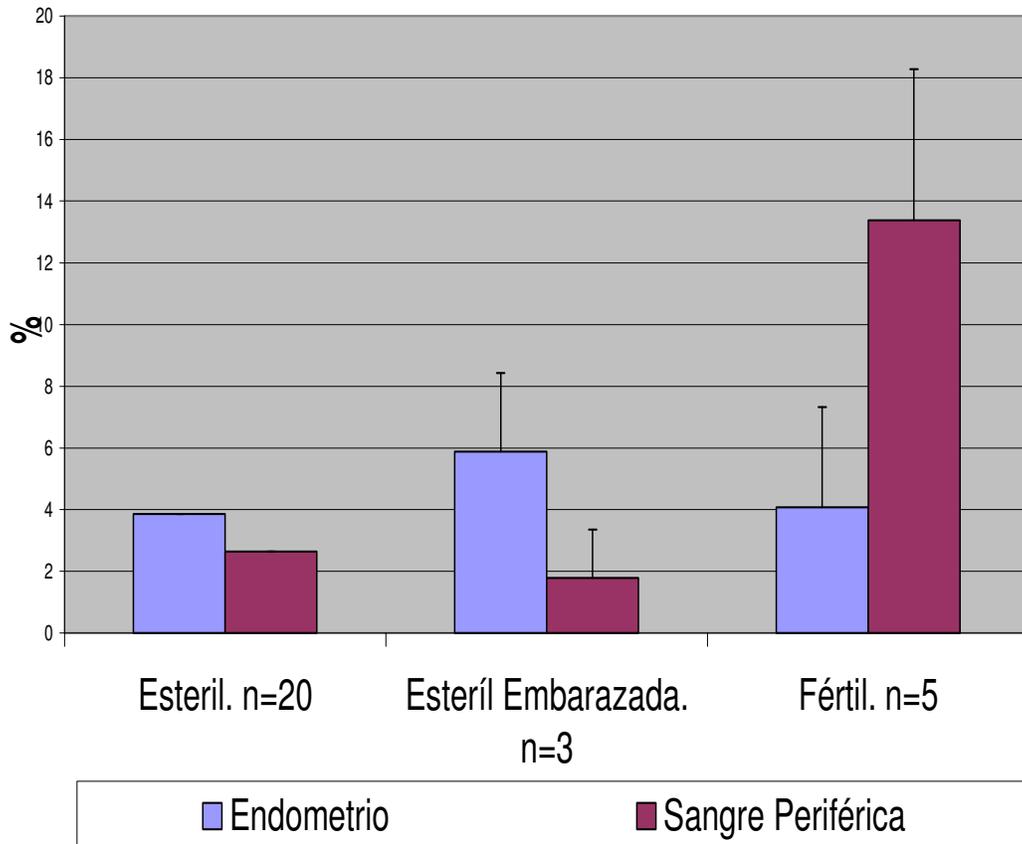
Tabla 15. Comparativo de Medición de células T activadas CD3+/HLADR+ en endometrio de los tres grupos de pacientes.

GRUPO	N	MEDIA	DE	SEM
Estériles	20	4.606	3.777	0.844
Fértiles	5	4.084	3.241	1.449
Est. Embar	3	5.890	2.545	1.469

P=0.789

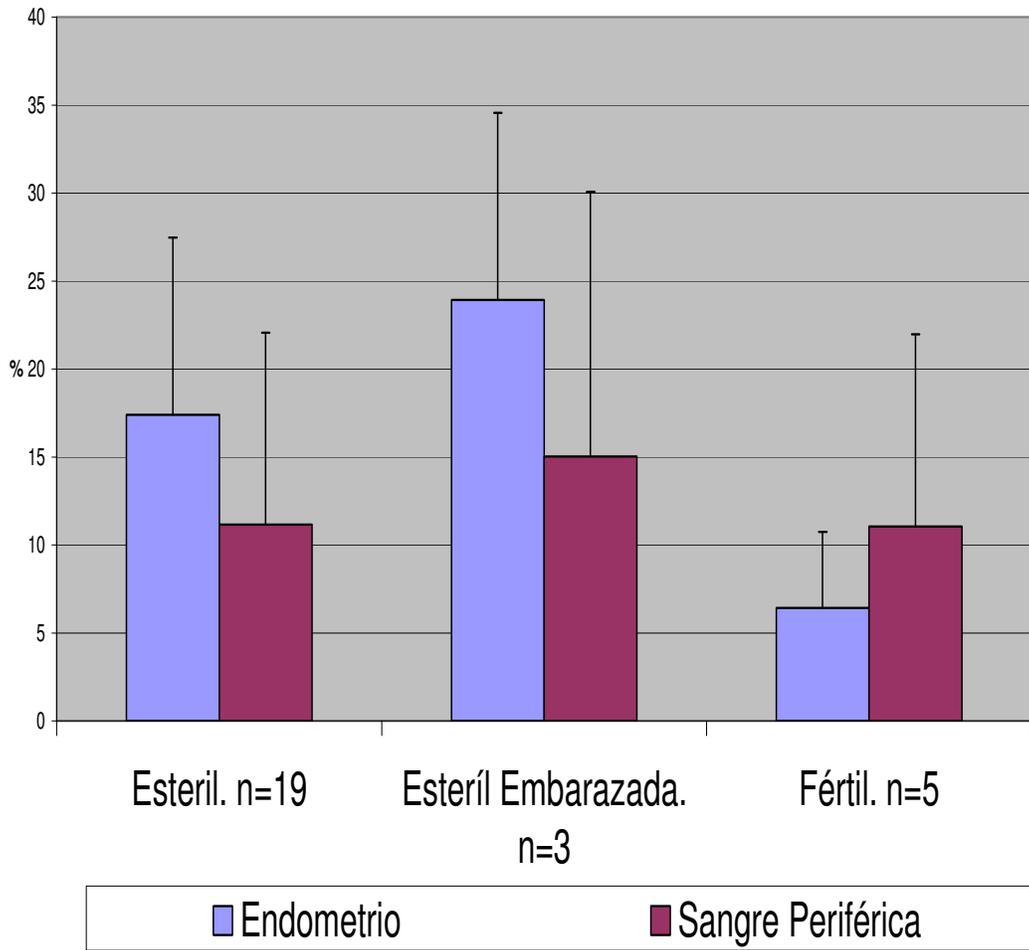
P=0.126

CD3+/HLADR+ Por compartimientos



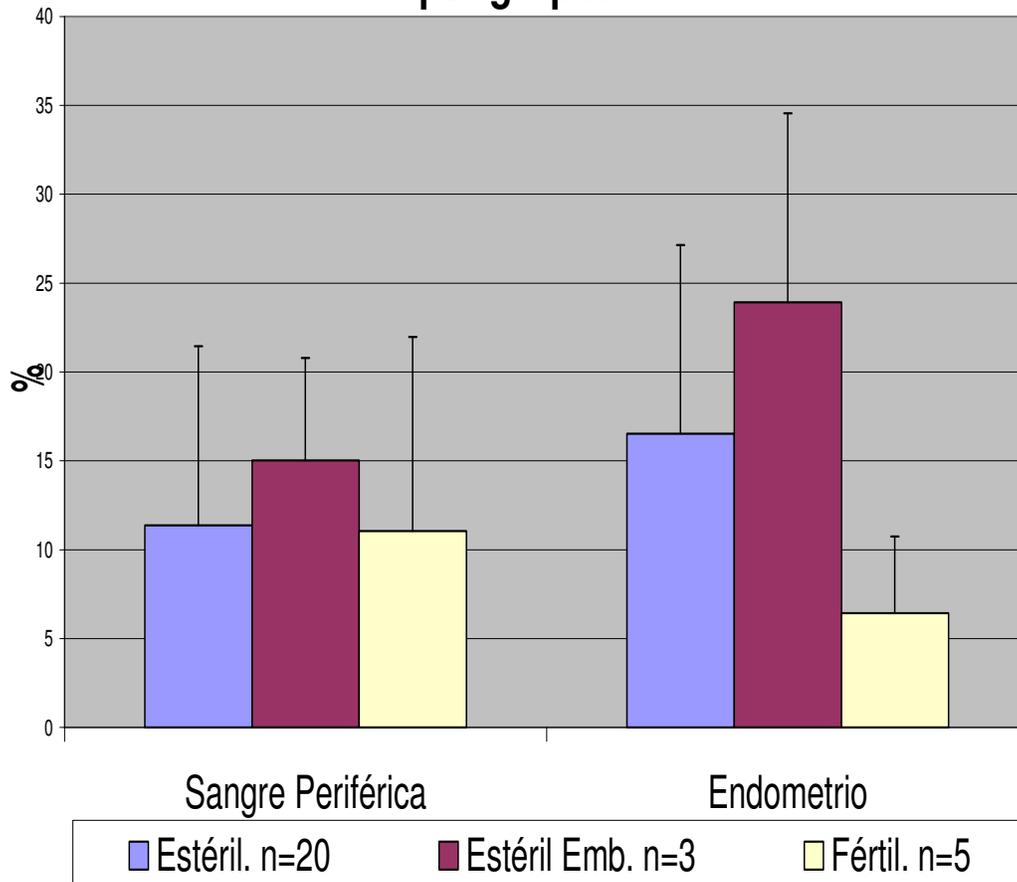
Gráfica 1. Se encuentra diferencia estadísticamente significativa en la población de linfocitos T CD3+HLADR+. (P=0.008).

Natural Killer por compartimientos



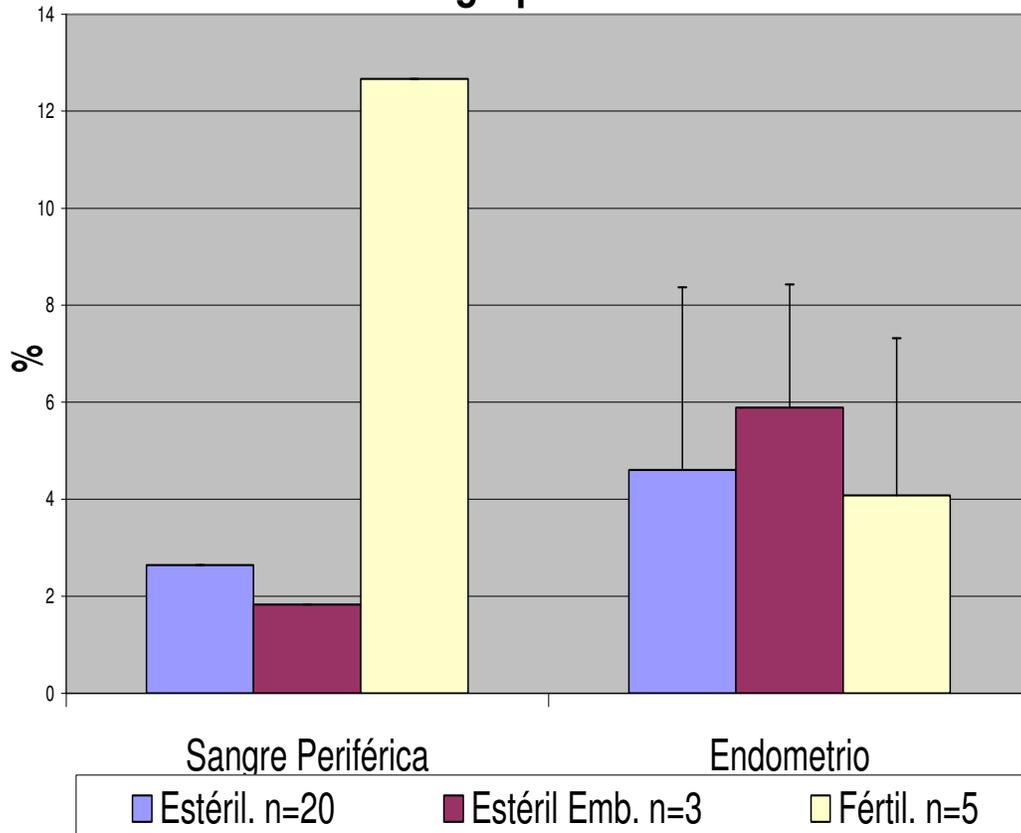
Gráfica 2. Comparativo de compartimientos celulares en tres grupos de pacientes.

Linfocitos NK CD56+/CD16+. Comparativo por grupos



Gráfica 3. Comparativo de Medición de células NK CD56+/CD16+ en el endometrio y en sangre periférica de los tres grupos de pacientes encontrando una diferencia estadística (P=0.042) para los tres grupos en el endometrio.

Linfocitos CD3+/HLADR+. Comparativo por grupos



Gráfica 4. Comparativo de Medición de células T activadas CD3+/HLADR+ en el endometrio y en sangre periférica de los tres grupos de pacientes encontrando una diferencia estadística (P=0.004) para los tres grupos en sangre periférica.