

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

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

**Cuantificación de linfocitos T CD3+/CD4+ y
CD3+/CD8+ en el endometrio y sangre periférica,
en pacientes fértiles y pacientes estériles.**

TESIS

Que para obtener el Título de:

ESPECIALISTA EN

Biología de la Reproducción Humana.

PRESENTA

ALVARO SANTIBAÑEZ MORALES

**DR. GREGORIO PEREZ PALACIOS
DIRECTOR GENERAL**

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

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



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.

A MIS PADRES POR SU INCONDICIONAL APOYO

AGRADECIMIENTOS

DR. FERNANDO GAVIÑO GAVIÑO

DR. CESAR ANGEL HERNÁNDEZ GUERRERO

DRA. CATALINA VILLA JIMÉNEZ

MC. JENNIFER MIER CABRERA

MC. PATRICIA BOUCHAN VALENCIA

DR. ROGER JOSE LARA RICALDE

DRA. NORMA VELAZQUEZ RAMIREZ

DR. CARLOS RAMOS PEREZ

ENF. MARIA ELENA GUEVARA REYES

ENF. BEATRIZ PEREZ ESTRADA

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

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.**

INDICE DE CONTENIDO

	pp.
INTRODUCCIÓN	8
MATERIAL Y METODOS	18
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	24
APENDICES	28
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

INDICE DE TABLAS GRÁFICAS O FIGURAS

	pp.
Figura 1	28
Figura 2	29
Figura 3	30
Figura 4	31

RESUMEN

OBJETIVO. Determinar la cantidad porcentual de células CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ en sangre periférica y endometrio de pacientes con esterilidad y compararlas con mujeres sanas, y así encontrar un factor pronóstico que pueda ayudarnos a estratificar a las pacientes estériles. **DISEÑO,** Estudio de cohorte observación al. **PACIENTES.** Se incluyeron a 23 pacientes estériles y 5 pacientes control a las cuales se les determinó en sangre periférica y endometrio CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ en día 21 del ciclo menstrual, **INTERVENCIONES** Toma de muestra sanguínea y biopsia de endometrio en día 21. **MEDICIONES DE DESENLACE PRINCIPAL** cuantificación porcentual de células CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ en sangre y tejido endometrial de pacientes estériles y fértiles **RESULTADOS.** Se subdividieron los resultados en 3 grupos ya que de las 23 pacientes estériles 3 se embarazaron, por lo que constituyeron un grupo separado de las estériles. Se encontró mayor cantidad de CD3+/CD4+ en sangre periférica en pacientes fértiles que en las estériles y las estériles embarazadas (ANOVA F= 5.486 P=0.011 con método de Dunnett's con P<0.050). En endometrio se observó mayor cantidad de CD3+/CD8+ de pacientes fértiles que en el grupo de estériles y estériles embarazadas (ANOVA F= 7.899 P=0.002 con método de Dunnett's con P<0.050) **CONCLUSIONES.** Con estos resultados podemos concluir que probablemente en sangre las CD3+/CD4+ tienen una función reguladora y que de cierta manera coordinen a las CD3+/CD8+ en endometrio creando un ambiente inmunológico que tiende hacia la respuesta Th2. Estos resultados no nos permiten concluir por el momento que se puedan utilizar estas mediciones como factores pronóstico.

CAPÍTULO 1 INTRODUCCION

OBJETIVO PRINCIPAL

Cuantificar porcentualmente las células CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ en sangre periférica y endometrio en etapa secretoria de pacientes fértiles e infértiles y establecer una comparación que pueda orientar y comprender el proceso de implantación y su relación con la respuesta inmune en pacientes sometidas a procedimientos de reproducción asistida.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Establecer la cantidad porcentual de células CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ presentes en el endometrio secretor y sangre periférica de pacientes infértiles.
2. Establecer la cantidad porcentual de células CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ presentes en el endometrio secretor y sangre periférica de pacientes con fertilidad comprobada.
3. Encontrar una relación entre las células CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ en pacientes con fertilidad comprobada y pacientes estériles.
4. Realizar una comparación entre las células CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ en sangre periférica y endometrio entre las pacientes fértiles y las estériles.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. La presencia de células CD3+/CD4+, CD3+/CD8+ en endometrio secretor crea un ambiente celular favorable para la implantación?
2. La presencia de células CD3+/CD4+, CD3+/CD8+ en sangre periférica guardan alguna relación con el ambiente celular endometrial?
3. La presencia de células CD3+/CD4+, CD3+/CD8+ en sangre periférica regula el ambiente celular endometrial?
4. Existe mayor cantidad de células CD3+/CD4+ ó CD3+/CD8+ en endometrio en las pacientes con fertilidad comprobada?

HIPÓTESIS

1. La presencia de células CD3+/CD4+, CD3+/CD8 en endometrio y sangre periférica regulan los procesos de implantación, placentación y mantenimiento del embarazo.

MARCO TEÓRICO

RESPUESTA INMUNE

Todas las respuestas inmunes se inician cuando se reconocen los antígenos extraños. Esto da como resultado la activación de los linfocitos que reconocen específicamente al antígeno y termina en el desarrollo de mecanismos que median la función fisiológica de la respuesta, es decir, la eliminación del antígeno. **Así la respuesta inmunitaria específica** puede dividirse en: 1 fase de reconocimiento, 2 fase de activación y 3 fase efectora.

1. 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. Además, los linfocitos T tienen la propiedad de reconocer y responder solo a antígenos peptídicos que se encuentran sobre la superficie de otras células.

2. Fase de Activación. Es la secuencia de acontecimientos inducidos en los linfocitos como consecuencia del reconocimiento de un antígeno específico, todos los linfocitos sufren 2 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 diferencian 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). Los diversos tipos de linfocitos se diferencian en distintas células efectoras. Tras la estimulación del antígeno específico los linfocitos B se diferencian en células secretoras de anticuerpos, y el anticuerpo secretado se une al antígeno y dispara los mecanismos que lo eliminan. Algunos linfocitos T se diferencian en células que activan fagocitos para matar organismos intracelulares, y otros lisan directamente las células que están produciendo los antígenos extraños, por ejemplo proteínas virales, la capacidad de las células T para reconocer antígenos asociados a células hace posible que la inmunidad mediada por células sea efectiva contra microorganismos intracelulares. Una característica general de la activación de linfocitos es que requiere 2 tipos de señales: la primera la proporciona el antígeno y la segunda otras células que pueden ser células colaboradoras o células accesorias.

3. 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.

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 constan de diferentes subgrupos que difieren en sus funciones y productos protéicos, aunque todos ellos parecen morfológicamente similares. Una clase de linfocitos son **los linfocitos B**, así llamados porque se observó en las aves que maduraban en un órgano llamado bolsa de Fabricio. Los linfocitos B son las únicas células capaces de producir anticuerpos. Los receptores para los antígenos en los linfocitos B son formas de anticuerpos unidos a la membrana. La interacción de los antígenos con estos anticuerpos de membrana inicia la secuencia de activación de la célula B, que termina en el desarrollo de células efectoras que secretan activamente anticuerpos. Dentro de los linfocitos B se han descrito 2 subpoblaciones, las células B-1(CD5+ IgM+) y las células B-2 (CD5-, IgM+). La segunda clase principal de linfocitos son **los linfocitos T**, cuyos precursores provienen de la médula ósea y después migran y maduran en el Timo. 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 y en la eliminación de organismos intracelulares. Las células T no producen anticuerpos. Sus receptores para antígenos son moléculas de membrana diferente pero estructuralmente relacionada 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 Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) las CMM de tipo I son proteínas de membrana existentes en todas las células del organismo excepto los glóbulos rojos. Las CHM de tipo II sólo están presentes en las células del timo o en las células T que han sido activadas por exposición a un antígeno y que se expresan sobre las superficies de otras células.

En respuesta a la estimulación antigénica las células T cooperadoras secretan citoquinas, cuya función es promover la proliferación y diferenciación de las células T así como de otras células. 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 efectoras de la inmunidad natural. 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. 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 llamo 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 Natural Killers NK.

Aunque parecen derivar de un precursor linfoide común, las células NK muestran varias diferencias con las células Tc: a. son de talla mayor y muestran un citoplasma más granular y rico en organelos, b. son capaces de matar algunas células tumorales de manera no específica y no restringida por el CMH, c. son TCR- y CD3-, d. son CD16+ (o FcγR+) y por esto también pueden matar células sensibilizadas con anticuerpos IgG, y expresan el marcador NK1.1. Como las células Tc, las células NK ejercen su efecto citotóxico a través de la producción de: a perforina, citocinas como la linfotóxina Fnt beta, y el factor citotóxico de las células NK NKCF y óxido nítrico. Estos mediadores causan la muerte de células blancas tanto por necrosis como por apoptosis. La actividad citotóxica de las NK está regulada por receptores que pueden reconocer tanto determinantes del CMH clase I clásicos (HLA-A, B y C) y no clásicos (HLA-G) como ligandos relacionados con CMH (MIC, MHC class I related molecules).

Todas las células T maduras tienen, hasta donde se sabe, las moléculas TCR (receptor de células T) la molécula CD3 (complejo pentamolecular 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 2, aunque siguen siendo TCR (+) y CD3 (+). El 19 a 48% de las células T son CD8 (+) y el 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. Estas 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.

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. Las células Th0 dan origen a las Th1 y Th2 o derivan de ellas.

Las células TCD8 tipo 1 tienen actividad citotóxica y por esto también se conocen como células Tc; las células TCD8+ tipo 2 parecen tener un efecto regulador sobre las primeras.

Las células T solo reconocen antígenos sobre la superficie de células accesorias en asociación a los productos de los genes del CMH propio. Los linfocitos T cooperadores CD4+ reconocen antígenos asociados a los

productos de los genes del CMH clase II y los linfocitos Tc Cd8+ reconocen antígenos asociados a los productos de los genes del CMH clase I.

La presentación del antígeno a las células T activa varias respuestas funcionales que implican la proliferación y la diferenciación en células efectoras. Cuando se activan la células T colaboradoras CD4+ expresan nuevas moléculas entre ellas proteínas de la superficie celular y citoquinas secretadas, cuya función es favorecer el crecimiento autocrino y paracrino de la célula T, la producción de anticuerpos por la célula B y la activación de células del sistema de la inmunidad innata .

Las Células T CD4+ pueden diferenciarse en células efectoras especializadas TH1 que secretan interferón Gamma y LT, lo que favorece la inmunidad mediada por fagocitos, o en células TH2 que secretan IL-4 y IL-5, lo que favorece la inmunidad mediada por eosinófilos e IgE. En el patrón de diferenciación pueden influir citoquinas producidas en la respuesta inmunitaria innata o de forma precoz en la respuesta inmunitaria específica. Las subpoblaciones Th1 y TH2 de las células T efectoras se desarrollan a partir del mismo precursor, que es un linfocito T colaborador CD4+ virgen. La vía de diferenciación esta determinada por el tipo de estimulación, especialmente por el tipo de citoquinas producidas en el momento del reconocimiento del antígeno. Además, una vez que se desarrolla una subpoblación, produce citoquinas que inhiben la diferenciación hacia la otra subpoblación lo que aumenta la polarización de la respuesta inmune. profesionales.

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.

Las células T solo reconocen antígenos sobre la superficie de células accesorias en asociación a los productos de los genes del CMH propio. Los linfocitos T cooperadores CD4+ reconocen antígenos asociados a los productos de los genes del CMH clase II y los linfocitos T citotóxicos CD8+ reconocen antígenos asociados a los productos de los genes del CMH clase I.

UTERO LEUCOCITOS Y EMBARAZO

Normalmente se esperaría que los leucocitos maternos reconocieran a las células fetales como extrañas y armaran una defensa contra estas células. Sin embargo inesperadamente los dos tejidos tan diferentes genéticamente conviven durante todo el embarazo, lo cual nos indica que la programación de los leucocitos de destruir lo extraño durante esta fase se ha modificado sustancialmente. El endometrio humano es un tejido único ya que posee la habilidad de desarrollar una remodelación rápida y extensa¹. Siendo una mucosa; el endometrio debe de proporcionar defensa contra infecciones y poseer un sistema inmunológico capaz de permitir la implantación de un tejido semialogénico y prevenir el rechazo inmunológico de este. Durante el ciclo menstrual el endometrio regenera y prolifera rápidamente, diferenciándose para proveer un ambiente amistoso para la implantación del embrión; ó descamarse y volver a regenerarse en un ciclo no fértil. Aunque estos cambios están gobernados principalmente por funciones hormonales, existe evidencia que sugiere que la regulación tiene lugar de manera paracrina. Uno de los candidatos para la regulación son las células inmunes que infiltran este tejido.

Durante la fase secretora hay un aumento en los leucocitos, comprendiendo hasta el 40% del total de las células endometriales y estromalesⁱⁱ. Durante la fase perimenstrual hay un aumento dramático de leucocitos inflamatorios, neutrófilos, eosinófilos y macrófagosⁱⁱⁱ.

La primera función de los leucocitos es proteger contra la invasión y colonización de DNA extraño. El tipo de placentación en el humano es llevado a cabo por células del trofoblasto derivados del blastocisto las cuales se encuentran en estrecho contacto con leucocitos maternos. Existen 2 tipos de líneas celulares del sinciotrofoblasto: la intravellosa, y la extravellosa. Estas poblaciones difieren dependiendo de su expresión del CMH. Estas líneas celulares forman 3 diferentes interfases de contacto entre la madre y la placenta^{iv, v, vi}.

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 C, G y E; estas están en contacto directo con las células NK^{vii, viii, ix}.

En respuesta a la progesterona, las células T gamma/delta producen el factor bloqueador inducido por la progesterona PIBF el cual ha demostrado inhibir a los NK y tener un efecto antiabortivo^x. Últimamente, el PIBF ha sido clonado, y ha demostrado que aumenta la producción de IL-10 y suprime la producción de IL-12 por los linfocitos periféricos, así como la inhibición de la citotoxicidad de las células NK in Vitro.^{xi}

Una vez que se logra la concepción, en el endometrio comienzan a suceder una serie de cambios dramáticos, en los leucocitos uterinos. Los linfocitos T y B desaparecen o se diferencian y los mastocitos y eosinófilos se vuelven difíciles de reconocer. Aparecen los NK uterinos y los macrófagos como las células predominantes con marcadores extratímicos (CD4-/CD8-), demostrando otros receptores: α/β y X/δ y TcR. A pesar de su nombre no se ha encontrado evidencia que demuestre que las NK maten células trofoblásticas. Se ha demostrado que juegan un papel importante en la regulación de la invasión trofoblástica uterina^{xii}.

En el útero de humanos los leucocitos están distribuidos homogéneamente. En el endometrio se observa tejido linfoide conteniendo células T y B. Las células T CD3+ muestran una actividad citolítica particularmente durante la fase proliferativa del ciclo menstrual^{xiii}; y en la capa basal se acumulan CD8+^{xiv}. Sin embargo Vassiliadous ha cuestionado la relevancia de la célula T en la implantación y el mantenimiento del embarazo al determinar que significativamente menos células T se detectan en endometrio durante el embarazo temprano al compararlo con endometrio no gestante^{xv}.

Los leucocitos placentarios se han postulado desde hace algún tiempo como participantes directos al realizar funciones que permitan o impidan el desarrollo de un embarazo. En particular se ha estudiado su relación con células trofoblásticas^{xvi}. Todos los leucocitos mencionados, células T, B y NK, están presentes en el endometrio humano y en contacto con células trofoblásticas; todas ellas capaces de iniciar una respuesta inmune. Se ha demostrado que los trofoblastos pueden estimular células mononucleares de sangre periférica para proliferar e iniciar la producción de factores embriotóxicos que lleven a un aborto^{xvii}. Otros autores han postulado que las células T, macrófagos, NK y monocitos pueden producir factores tóxicos que lleven a una pérdida gestacional^{xviii}. Otros estudios incluyen al compartimiento sanguíneo donde se han encontrado aumentos en sangre periférica de células T asociándose a pérdidas gestacionales^{xix}.

Varios estudios han concluido que para que se lleve a cabo una implantación exitosa; existe un cambio de la respuesta inmune celular T de Th1 a TH2. Miembros de la respuesta Th1 son el factor de necrosis tumoral, IL-2, IL-12 e interferon gamma. Se ha demostrado que el factor de necrosis tumoral inhibe la invasión del trofoblasto fetal al disminuir la movilidad del trofoblasto^{xx}. El interferon Gamma es un regulador a la alta de antígenos de expresión del CMH 1 y 2 en células del trofoblasto^{xxi}. En contraste citoquinas de la familia TH2 como son IL4, IL6, IL10 y IL13 exhiben propiedades inmunosupresoras, que son consideradas de crucial importancia para la supervivencia fetal^{xxii}. Se ha visto que los leucocitos uterinos y células del trofoblasto producen factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, el cual se ha visto en ratas que disminuye el riesgo de abortos por lo que se cree que ayuda a mantener la implantación^{xxiii}. La producción de citoquinas por células inmunológicas decíduales puede estar regulada por el tipo de CMH que exhibe el trofoblasto, Rieger demostro en cultivo de endometrio gestante una supresión de la respuesta inmune Th1, por parte del CMH-G expresado por el trofoblasto^{xxiv}.

Otro estudio evaluó la asociación de células periféricas Nk (CD56+, CD56 dim), células T, células B en porcentajes y éxito de implantación en mujeres sometidas a Fertilización in Vitro; encontrando que no existe relación alguna en la tasa de implantación y las células inmunológicas circulando^{xxv}. En otro estudio el grupo de Sasaki^{xxvi}, determinó células CD4+ CD25+ en endometrio gestante de pacientes con abortos inducidos y abortos espontáneos. Sus resultados demuestran una mayor cantidad de CD4+CD25+ en endometrio de mujeres con abortos inducidos al compararlo con el endometrio de mujeres con abortos espontáneos. También demuestran producción aumentada de CD152(CTLA-4), citoquina inhibitoria la cual regula la proliferación células T por estimulación del CD3, en las pacientes con aborto inducido versus las pacientes con aborto espontáneo. Llevando a la conclusión que las células T deben de tener una función reguladora primordial en el endometrio, permitiendo una interacción entre el trofoblasto y las células inmunes maternas. Tilburgs^{xxvii} determinó en sangre periférica, decidua parietal y decidua basal, subpoblaciones de leucocitos T y CD4+ y CD8+. Encontrando mayor cantidad de estos en endometrio que en sangre periférica, concluyendo

que deben de jugar un importante papel en el proceso de implantación y placentación.

Recientemente se han cuantificado leucocitos, CD3+/CD4+/CD25+ llamadas T reguladoras (Treg), en endometrio de mujeres con infertilidad primaria y falla en 3 ciclos de Fertilización In Vitro y se compararon contra biopsias de mujeres fértiles. Encontrando que las mujeres con infertilidad primaria tienen disminución en la codificación de RNA mensajero de una proteína denominada Foxp3 la cual tiene como función regular la diferenciación de las células T en células Treg^{xxviii}. Concluyendo que esta deficiencia de diferenciación puede ser la responsable de la alterada capacidad de implantación de las mujeres con infertilidad primaria, lo que sugiere un papel primordial por parte de las células T en la regulación de la respuesta inmune local.

Los leucocitos T pueden tener en su superficie un receptor gamma/delta, este subtipo de células no expresan receptor Alfa/beta, estos leucocitos pueden reconocer formas del antígeno diferentes a las de las células T alfa/beta, entre las que se incluyen péptidos asociados a moléculas no polimórficas tipo MHC, proteínas no procesadas y pequeñas moléculas no peptídicas.

En la interface materno fetal, los gamma-delta, fueron identificados desde 1992 por Heyborne. En este estudio se demuestra su presencia en el endometrio de ratones gestantes y se observa 3 a 4 veces más cantidad en endometrio que en bazo, y 1 a 2 veces más que en endometrio de ratones no gestantes. También se observa que en endometrio gestante se encuentran activados por medio de un receptor IL-2 y que existen 6 diferentes subtipos de gamma-delta siendo el más común el V gamma delta 1^{xxix}. Posteriormente se ha demostrado en sangre periférica que 97% de los leucocitos gamma delta poseen receptores de progesterona; y que el bloquear este receptor se inhibe la producción de IL-10 pero incrementa la actividad de NK y la expresión de IL-12^{xxx}.

Esta información se ha complementado en otras investigaciones donde se concluyó que mujeres con un aborto y mujeres con infertilidad con ciclos de In Vitro fallidos presentaban células NK periféricas aumentadas en un 12% al compararlas con mujeres fértiles^{xxxi}. Chao demostró en endometrio de embarazos anembrionicos menor proporción de células NK CD3- /CD16- /CD56+ con KIR's activados al compararlos con endometrios de mujeres con abortos inducidos. En el mismo estudio observó una mayor actividad de leucocitos CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ en los endometrios de mujeres con embarazos anembrionicos que en endometrios de mujeres con abortos inducidos^{xxxii}. Concluyendo que la sobreactivación de los leucocitos T durante un embarazo anembrionico puede contribuir a la incrementada actividad citotóxica de las células NK.

Los niveles elevados de interleucina 1 (citoquinas de la inflamación) se asocian con implantación temprana, al parecer producida principalmente por los leucocitos; pero hay evidencias que otras citoquinas son producidas por las

células epiteliales uterinas como son TNF α , TGF- β , CSF-1 y GM-CSF lo que evidencia 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 debida a las NK^{xxxiii} Se ha observado una estrecha relación entre las uNK y el desarrollo placentario, demostrando que inadecuada producción de óxido nítrico por estas células produce placentas pequeñas que derivan en productos con datos de restricción del crecimiento intrauterino. También se han demostrado células NK en el endometrio al momento de la implantación; Y que estas células se encuentran en contacto estrecho con células del trofoblasto^{xxxiv}. Este reconocimiento inmunitario del embarazo es necesario para el mantenimiento de la gestación. El citotrofoblasto extraveloso expresa CMH G clase Ib este es reconocido por los leucocitos gamma/delta. Estos leucocitos también pueden reconocer antígenos no procesados sin CMH. EN el endometrio leucocitos T gamma/delta/TCR+ incrementan durante el embarazo y la gran mayoría expresan receptores de activación. Posterior al reconocimiento de antígenos fetales el sistema inmune reacciona y lleva a cabo diversas respuestas como mecanismos protectores. Se ha visto que el embarazo confiere una alterada respuesta Th1 y Th2, en el cual el endometrio se vuelve parcial y lleva su respuesta hacia la respuesta humoral. En el embarazo normal inicial las células NK conforman cerca del 30% del estroma endometrial en el sitio de implantación en especial alrededor de las arterias espirales. En sangre periférica las células NK demuestran una actividad disminuida. Al final del embarazo casi no son detectables^{xxxv} 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. En los humanos y roedores las Nk están bajo control hormonal. Se ha sugerido que parte de la acción reguladora de los leucocitos es mediada por acción de la progesterona, ya que se ha visto un aumento en la producción de receptores de progesterona por estimulación de antígenos fetales. Estos leucocitos al estar en presencia de progesterona producen un mediador PIBF que altera el balance de producción de citoquinas y disminuye la acción de las células NK ejerciendo una acción protectora en ratones^{xxxvi}

Toda esta información nos lleva a pensar que uno de los pilares del bienestar de un embarazo se basa en el ambiente celular local y de alguna manera a distancia. En vista de estos antecedentes es probable que estas subpoblaciones de células estén involucradas de manera muy importante en la regulación de la creación de un ambiente inmunológico celular que favorezca la implantación y el desarrollo normal de un embarazo. Siendo esto una manera indirecta para poder estratificar a las pacientes estériles y tener un probable factor pronóstico.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

Universo:

Se invitó a las pacientes que se presenten 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 en caso tal que la paciente aceptara, bajo anestesia local, general o regional según lo amerite 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 se procesó 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 encontraban en edad reproductiva y que tuvieran el antecedente de uno o más años de coito sexual sin protección y sin lograr embarazo, o aquellas pacientes que tuviesen como antecedente ginecoobstétrico un embarazo previo que hubiese terminado en parto eutócico, cesárea o aborto con o sin la realización de legrado, pero que su último evento gestósico haya sucedido por lo menos un año previo a la captación para el presente protocolo.

A las pacientes captadas se les realizó el protocolo de infertilidad, el cual se caracteriza por la toma de muestras hormonales basales que incluyen: 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, así como la detección de anticuerpos contra chlamidia en sangre periférica. El factor tuboperitoneal se evaluó con un estudio de Histerosalpingografía, así como histerosonografía en los casos en los que sea necesario conocer detalles específicos de la cavidad uterina. El factor uterino se evaluó con USG endovaginal realizado en la institución. El factor masculino se evaluó con citometría seminal.

A las pacientes ya estudiadas y que requirieran 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 acepten el procedimiento y firmen el consentimiento informado para tal y cumplan con los criterios de inclusión.

Pacientes fértiles: Pacientes en edad fértil, con ciclos menstruales regulares, que ingresaran al Instituto Nacional de Perinatología con la intención de realizarse salpingoclasia por paridad satisfecha. Se explicó las pacientes la necesidad de introducir cánula de Cohen en caso de realizar la salpingolcasis laparoscópica o movilizador uterino en caso de minilaparotomía. Se firmó consentimiento informando los riesgos del procedimiento. La toma de muestra

se realizó en el día 21 de su ciclo previo al procedimiento quirúrgico bajo anestesia general. Además se tomó estudio citológico cervical.

Pacientes Estériles Embarazadas: Serán aquellas pacientes que se incluyeron en el protocolo de esterilidad y que después de la toma de muestra se les confirmó la variable embarazo, por lo que se les agrupó de manera diferente, realizándoseles una prueba inmunológica de embarazo en sangre, y un ultrasonido transvaginal realizado en el Instituto, pasando posteriormente al servicio de obstetricia para el control del embarazo.

Toma de la muestra: Una vez que la paciente se encuentre en posición ginecológica, se colocaron valvas de Sims o espejo vaginal diagnóstico; previa asepsia, antisepsia y colocación de campos estériles, se localizó el cuello uterino y se inmovilizará con pinza Pozzi fijada en el labio anterior del cervix, en caso que la paciente no se encuentre anestesiada, se aplicarán 6 ml. De Lidocaína simple paracervical hasta lograr la analgesia, se introducirá 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: Los linfocitos endometriales fueron obtenidos mediante disgregación suave del tejido, empleando medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco BRL) y un pedazo con la intención de separar el estroma de las células mononucleares. El fluido obtenido fue centrifugado a 2,500 r.p.m durante 10 minutos, recuperado el paquete celular y resuspendido en 1 ml de RPMI-1640 (Gibco BRL). En la muestra obtenida se determinó el número y la viabilidad celular empleando la exclusión de un colorante vital (azul tripan al 0.1%). Aquellas muestras con una viabilidad mayor al 90% y un número mínimo de 1000,000, fueron empleadas para la inmunotipificación.

La sangre periférica se transportó en 3 tubos, dos de ellos con anticoagulante, mismos que se entregaron al laboratorio de biología celular inmediatamente.

Procesamiento de la muestra:

II) Tinción:

1.- Se colocaron 100,000 células provenientes de endometrio, y 100 µl de sangre periférica anticoagulada, para lo que se empleó EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, Gibco, BRL), a una concentración de 1 a 2 mg/ml de sangre. A cada tubo se adicionaron 20 µl de los anticuerpos monoclonales CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+, dejándose en incubación durante 30 minutos a 4 °C en oscuridad.

2.- Al término de la incubación, se adicionaron 2 ml de solución de lisis (Becton Dickinson Co.), con la intención de eliminar las células hemáticas presentes, permitiéndole actuar a la solución durante 10 minutos.

3.- Una vez transcurrida la incubación, las muestras se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 2 ml de solución PBS (descrita en punto 1), Con la intención de eliminar en su totalidad la solución de lisis, el lavado se realizó tres veces.

4.- Al paquete celular obtenido en la última centrifugación, se le agregó 500 µl de paraformaldehído (Fisher Co.) al 1 % disuelto en solución PBS, con la intención de fijar las células. La adquisición y análisis de la muestras se realizó en un citómetro de flujo (Facs Calibur, Becton Dickinson Co.), en un lapso no mayor a 48 horas, utilizando el paquete WinMdi 2.8. Utilizando las variables FSC (Forward scatter channel) *versus* SSC (Side scatter channel), se definió la región de linfocitos, a partir de la que se determinó los porcentajes de subpoblaciones de linfocitos, al determinarse la fluorescencia mostrada por dicha región en el canal 1 (variable X) *versus* el canal 2 (variable Y). Los resultados fueron reportados en porcentajes.

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 será evaluada por el investigador.
2. Linfocitos CD3+/CD4+
3. Linfocitos CD3+/CD8+
4. 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.

Criterios de inclusión:

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

Que aceptaron participar en el protocolo.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes que padezcan 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. Muestra insuficiente de la biopsia endometrial o sangre periférica

Pacientes que padezcan de enfermedades autoinmunes: Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoide.

CAPÍTULO 3 RESULTADOS

Durante el periodo de Septiembre 2005 a Julio 2006 se incluyeron en el estudio a 28 pacientes, 23 pacientes estériles y 5 controles fértiles. De las 23 pacientes estériles en 3 se corroboró embarazo por Fracción Beta de hormona gonadotropina corionica humana y ultrasonido transvaginal durante el periodo de estudio y se estudiaron como un grupo diferente a las estériles. Entre los 3 grupos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a sus variables demográficas. En la tabla 1 se encuentran los resultados de cuantificación celular expresado en porcentaje de las células CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ en sangre periférica y endometrio de acuerdo a los diferentes grupos de pacientes.

Grupo	Media %	Mediana %	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
CD3+/CD4+ Sangre Periférico					
Fértil	54.90	55.95	8.9	40.9	64.95
Estéril	46.67	44.02	11.3	32.18	74.49
Estéril Embarazada	29.37	27.05	5.62	25.28	35.79
CD3+/CD4+ Endometrio					
Fértil	39.42	39.56	8.11	27.35	47.23
Estéril	28.52	19.58	15.42	13.33	58.52
Estéril Embarazada	18.06	16.10	3.72	15.72	22.36
CD3+/CD8+ Sangre Periférico					
Fértil	31.23	35.02	8.44	21.37	39.27
Estéril	27.77	27.04	9.48	12.81	49.7
Estéril Embarazada	36.27	37.18	4.04	31.86	39.79
CD3+/CD8+ Endometrio					
Fértil	44.76	42.49	14.48	32.2	68.43
Estéril	21.45	20.19	11.12	0	38.5
Estéril Embarazada	23.93	26.7	11.64	11.15	33.95

Tabla 1. Cuantificación de CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+, media, mediana, desviación estandar valor mínimo y valor máxima en sangre periférica y endometrio en los diferentes grupos de pacientes. Fértil n=5, Estéril n=20, Estéril embarazada n=3. Resultados expresados en porciento.

En la figura 1 y 2 se graficó la cuantificación porcentual y relación de células CD3+/CD4+ CD3+/CD8+ en sangre periférica y en endometrio por grupo de pacientes. En la figura 3 y 4 se muestran las cuantificaciones CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ por grupo de pacientes y se comparó con análisis de varianza ANOVA por compartimiento celular encontrando diferencias estadísticamente significativas en el grupo de CD3+/CD4+ en sangre periférica (ANOVA F= 5.486 P=0.011 con método de Dunnett's con P<0.050) al comparar los grupos de esteriles Vs el de fértiles. También se encontró diferencia en la cuantificación de CD3+/CD8+ en endometrio (ANOVA F= 7.899 P=0-002 con método de Dunnett's con P<0.050) al realizar la misma comparación.

CAPÍTULO 4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Un embarazo exitoso depende de la protección, o mejor dicho regulación, de las potencialmente dañinas respuestas inmunitarias maternas que evitarían el desarrollo normal de tejido placentario en la interface uteroplacentaria^{xxxvii}. Se ha postulado que los mecanismos inmunológicos maternos son los responsables de los abortos recurrentes, infertilidad inexplicable y falla de implantación en ciclos de reproducción asistida^{xxxviii}. Aun cuando se cree que la implantación, el desarrollo y mantenimiento del tejido placentario es un proceso local, es interesante evaluar si cambios inmunológicos sistémicos pueden observarse en el ámbito periférico. Mas que asociarse con el efecto de implantación uterina; y estos pudiesen alterar para bien o para mal la implantación, la placentación o el producto de la concepción.

Sin embargo, es difícil llevar a cabo la evaluación del ambiente inmunológico local en el sitio de implantación. Obviamente una biopsia de endometrio no puede realizarse, durante o alrededor del momento de la implantación del embrión; así como no puede realizarse previo a la transferencia del embrión en los ciclos de fertilización in-vitro. Por otro lado una biopsia de endometrio en ciclos menstruales previo a un embarazo o ciclo de In-Vitro puede no reflejar las condiciones durante la implantación. Por lo que es difícil evaluar el ambiente inmunológico local en esta situación. El objetivo del estudio fue evaluar las variaciones porcentuales de 2 series de leucocitos CD3+/CD4+ y CD3/CD8+ en sangre periférica y en endometrio y las diferencias o relación entre pacientes fértiles, pacientes estériles y pacientes estériles embarazadas.

Los resultados de este estudio muestran que se mantiene una relación muy parecida al cuantificar en sangre periférica y endometrio los CD3+/CD4+ de los tres grupos de pacientes formando una imagen casi en espejo. También observamos una mayor cantidad de CD3+/CD4+ en sangre periférica y endometrio de las pacientes fértiles, al compararlos con los otros 2 grupos lo cual nos muestra que la relación se mantiene y que en los 2 grupos estériles es menor el número de CD3+/CD4+; esta diferencia no fue significativa estadísticamente. Esa relación nos llevaría a pensar que los CD3+/CD4+ tienen un papel preponderante en los procesos de implantación y placentación, probablemente jugando un papel regulador. Esto coincide con los hallazgos de Jasper^{xxxix} en un estudio que realizó en donde cuantificaron la diferenciación de células T en células T reguladoras y lograron demostrar una disminución en la diferenciación de células T en Treguladoras en pacientes con infertilidad primaria.

También en el estudio de Sasaki^{xi} en el cual cuantificaron CD4+/CD25+ en el endometrio de mujeres con abortos inducidos versus endometrio de mujeres con abortos espontáneos, encontrando mayor cantidad de estas células en el endometrio de mujeres con abortos inducidos lo que sugiere una función probablemente reguladora. En contraste; en el estudio de Tilburgs^{xii} encontraron la relación invertida al determinar células CD4+ y células CD8+ obteniendo que existe mayor cantidad de CD4+ en endometrio que en sangre

periférica. Ellos agregaron un marcador al CD4+; el CD25+. Esto podría haber causado que en nuestro estudio en sangre periférica hubiese menor porcentaje celular y en endometrio mayor cantidad.

En cuanto a las células CD3+/CD8+, encontramos que la relación que habíamos observado con respecto a los CD3+/CD4+ está invertida en las pacientes fértiles. Siendo mayor la cantidad de CD3+/CD8+ en endometrio que en sangre periférica, y que esta relación también está invertida al compararlo con los CD3+/CD8+ en el grupo de estériles y de estériles embarazadas. Este resultado coincide con los hallazgos de Tilburgs donde hay mayor cantidad de CD3+/CD8+ en endometrio que en sangre periférica en pacientes fértiles. En ese estudio, Tilburgs, concluye que los CD3+/CD8+ tienen una función probablemente inhibitoria específica local en el endometrio humano. A diferencia de nuestro estudio ellos hacen una división del tejido endometrial en decidua basal y decidua parietal, pero solo encontraron diferencias significativas entre sangre periférica y endometrio en general.

Al realizar la comparación de CD3+/CD8+ en endometrio entre los 3 grupos de pacientes observamos una diferencia estadísticamente significativa al comparar los CD3+/CD8+ de endometrio de las pacientes fértiles contra las estériles embarazadas y las estériles. En donde se observa claramente que las pacientes fértiles tienen mayor cantidad porcentual de células CD4+/CD8+ que los fértiles y los fértiles embarazados; y aunque es poca la diferencia las estériles embarazadas también muestran mayor cantidad de CD3+/CD8+ que las estériles. Esto nos podría llevar a concluir que deben de ejercer algún tipo de función que facilita la implantación y el embarazo, probablemente la función de estas células es regulatoria y tengan un papel fundamental en las interacciones celulares del trofoblasto extraveloso con todas las células inmunes maternas.

Esto es fundamentado por un estudio en prensa: Scaife y cols^{xiii} en un estudio muy elaborado, caracterizaron el perfil de citoquinas y la capacidad de invasión placentaria por parte de CD3+/CD8+ en endometrio de embarazos de 7 a 14 semanas de gestación. Cuantificaron la capacidad de respuesta a estímulos de los CD3+/CD8+ observando aumentada producción de interferón gamma y IL-8 y muy baja producción de factor estimulante de granulocitos, IL1B, IL2, IL6, IL10, IL12 y factor de necrosis tumoral. También observaron que los CD3+/CD8+ incrementaron la capacidad de invasión del trofoblasto simulando la invasión con Matrigel. Concluyendo que los CD3+/CD8+ endometriales pueden desempeñar una actividad citolítica, pero que inducen un ambiente de citoquinas tipo TH2 en endometrio y que probablemente estén involucradas en la regulación de la invasión del trofoblasto extraveloso al útero.

Apoyando la idea de un aumento de la respuesta humoral y por ende mayor cantidad de CD4+/CD8+ en endometrio se encuentra lo reportado por Szekeres-Bartho, donde infiere un alterado balance de la respuesta Th1 y Th2 en el endometrio; a favor de la respuesta Th2 (IL-4, IL-10) Esto favorece la implantación y el mantenimiento del embarazo al regular la actividad de las células NK uterinas. También demuestran una función inmunomoduladora por medio de regulación de las células Nk por parte de los leucocitos gamma/delta.

Así como una regulación hormonal parácrina por progesterona en todos los leucocitos T que expresen receptores de progesterona^{xliii}.

Apoyando esta idea, Sehmsdorf^{xliiv} realiza un estudio en mujeres con abortos espontáneos, donde cuantifican porcentajes en sangre periférica y endometrio de CD4+, CD8+ CD26+ y CD56+, así como su perfil de citoquinas tipo Th1 (Interferon gamma y factor de necrosis tumoral), Th2 (IL-4, IL-10) y Th3 (factor de crecimiento Beta). Encontrando que los porcentajes de células CD26+ y el número de células Th1 están estadísticamente aumentados en los ratones que abortan al compararlo con los que cursan con abortos inducidos. Infiriendo un mecanismo de acción local por citoquinas abortivas sintetizadas y liberadas por estas células, coincidiendo con investigaciones previas del mismo grupo realizado en ratones.

Clark^{xliv} hace un estudio en ratones donde plantea que los abortos espontáneos se presentan en ambientes endometriales con factor de necrosis tumoral alfa e interferón gamma (Th1) producidos por NK y células T (Vgamma1.1delta6.3). A los que se ha visto que invaden el endometrio durante el día 6.5 de gestación (periodo perimplantación). Una segunda oleada de células Vgamma1.1 delta6.3 llegan el día 8.5 las cuales producen citoquinas como IL-10, y factor de crecimiento beta-2 (Th2). En este estudio concluyen que hay células gamma/delta con presencia de un marcador denominado GM1 los cuales producen un ambiente de citoquinas con tendencia a Th1 el cual induce abortos espontáneos.

Estas conclusiones corroboran los resultados de Arck^{xlvi}, en un estudio en ratones, donde observa que existen 2 tipos de leucocitos T Vgamma1.1+/delta6.3+, una población que migra tempranamente aproximadamente a las 6.5 semanas y otra que lo realiza aproximadamente a las 8.5 semanas. La primera produce un ambiente abortivo con tendencia a una respuesta Th1 y la segunda que favorece la implantación y el embarazo Th2/3.

Estos resultados han sido corroborados por Michimata^{xlvii} en donde cuantifica la respuesta Th2 y Th1 en endometrio de pacientes con abortos espontáneos con genotipo normal y anormal, comparándolo con endometrio de pacientes que con aborto inducido. En este estudio observan en la decidua basal en abortos inducidos la presencia de células Th2 y Tc2. Estas poblaciones celulares se encuentran disminuidas significativamente en endometrio de pacientes con abortos espontáneos, lo cual lo lleva a concluir que son necesarias para la adecuada implantación y embarazo.

Los procesos celulares implicados en la implantación, placentación y mantenimiento del embarazo son muy complejos. Actualmente se ha iniciado el conocimiento y se han abierto algunas posibilidades que nos expliquen parte de las alteraciones que llevan al aborto recurrente, a la esterilidad y a las pérdidas espontáneas. Los resultados descritos en este estudio, en cuanto a la presencia de CD3+/CD4+ y CD3+/CD3+/CD8+ en sangre periférica y endometrio están de acuerdo con lo reportado en la literatura.

Coincidiendo con lo dicho en estudios previos, encontramos que un factor determinante para la implantación, placentación y embarazo es la presencia de un ambiente celular/citoquinas que favorezca la respuesta Th2. No logramos establecer una relación exacta entre sangre periférica y endometrio; pero observamos una cierta tendencia en sangre periférica por parte de los CD3+/CD4+ probablemente involucrados en la regulación celular y secreción de citoquinas.

En cuanto al endometrio la cuantificación de CD3+/CD8+ nos hace inferir que la regulación de las reacciones inmunológica en la interface materno fetal es llevada a cabo en gran parte por estas células. Debido a que hasta la fecha todavía se están tipificando las diferentes subpoblaciones de leucocitos involucrados en este proceso no es posible actualmente que se utilice la medición de CD3+/CD4+ o CD8+ como un factor pronóstico para poder estratificar a las pacientes con esterilidad.

CAPÍTULO 6

APÉNDICES

FIGURAS

CD3+/CD4+ en Sangre Periférica y Endometrio por Grupo de Paciente

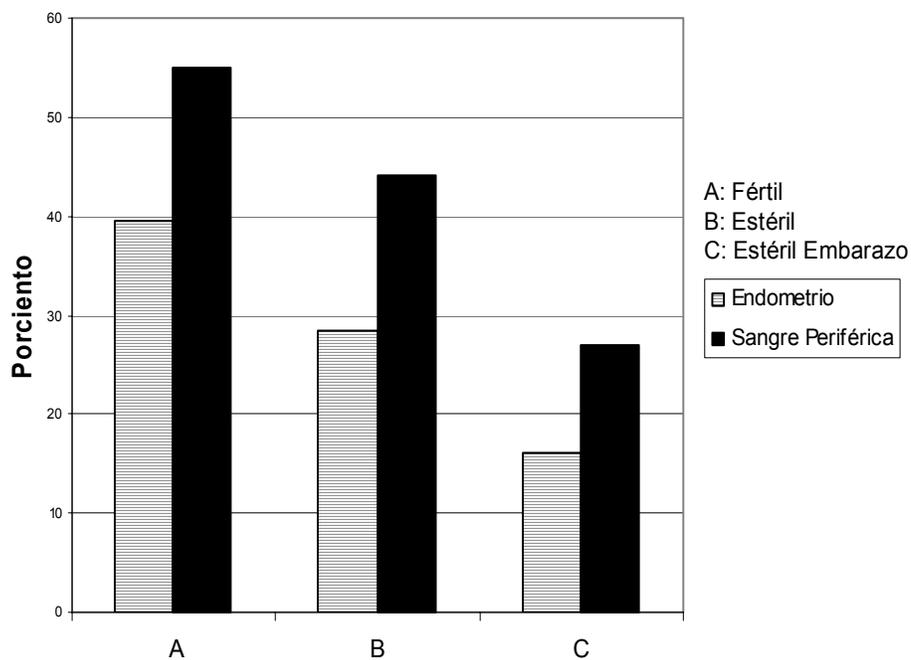


Figura 1. Cuantificación porcentual CD3+/CD4+ en sangre periférica y endometrio por grupo de pacientes. A: Fértil n=5, B: Estéril n=20, C: Estéril embarazada n=3.

CD3+/CD8+ en Sangre Periférica y Endometrio por Grupo de Paciente

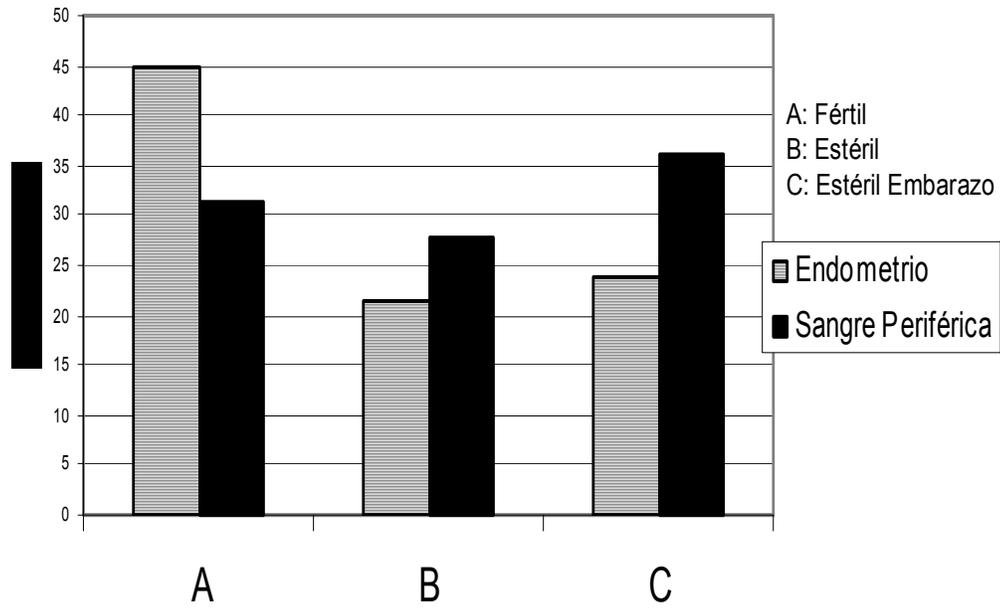


Figura 2. Gráfica 2. Cuantificación CD3+/CD8+ en sangre periférica y endometrio por grupo de pacientes. Fértil n=5, Estéril n=20, Estéril embarazada n=3.

CD3+/CD4+ en Endometrio y Sangre Periférica por Grupos de Pacientes

A: Fértil
B: Estéril
C: Estéril Embarazo

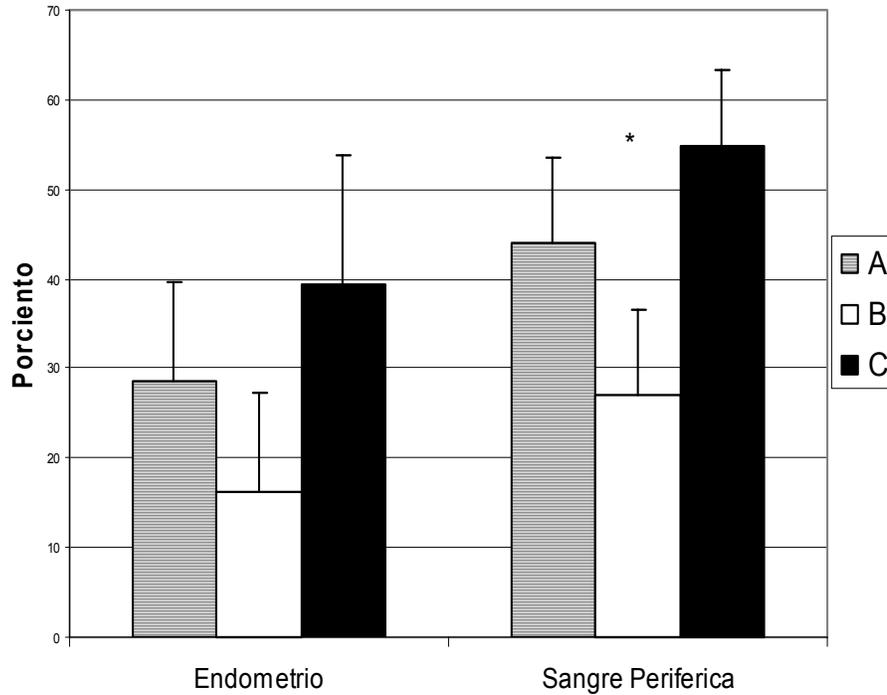


Figura 3. Determinación de CD3+/CD4 en endometrio y sangre periférica por grupos de pacientes. A= Estériles n=20, B= Estériles embarazadas n=3; C= Fértiles n=5. *=Análisis de varianza por ANOVA F=7.89, P=0.002, comparación múltiple con método de Dunnett's con p<0.050.

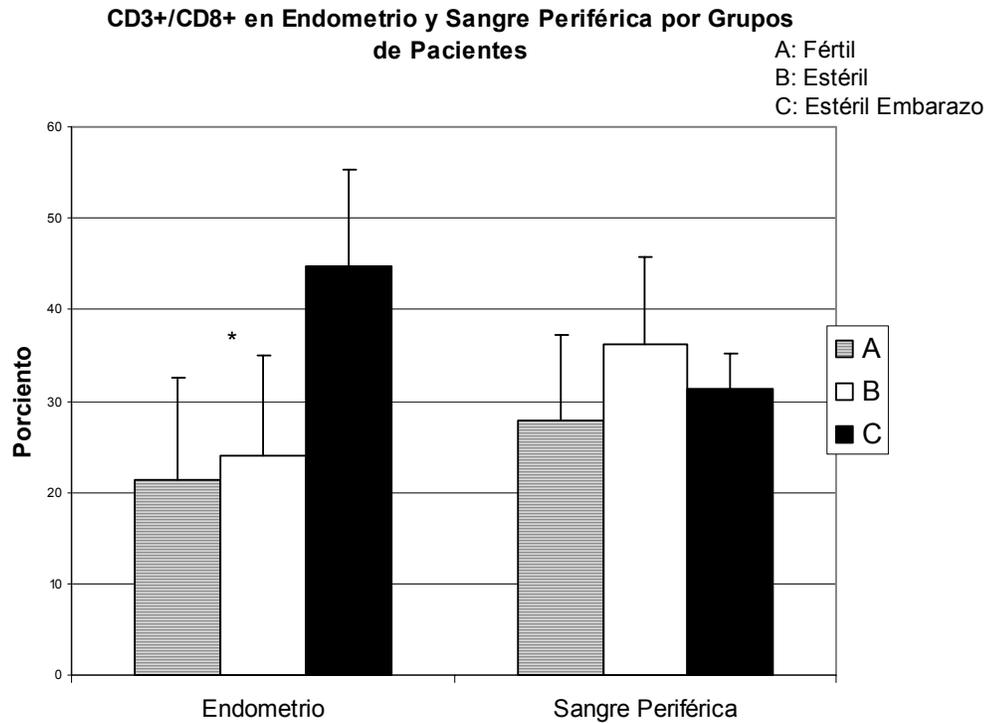


Figura 4. Determinación de CD3+/CD8+ en endometrio y sangre periférica por grupos de pacientes. A= Estériles n=20, B= Estéril embarazada n=3, C= Fértil n=5.
* = Análisis de varianza por ANOVA F=5.48, P=0.011, comparación múltiple con método de Dunnett's con p<0.050.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

PROTOCOLO DE INVESTIGACION PRESENCIA DE CELULAS NATURAL HILLER EN ENDOMETRIO DE PACIENTES EN EDAD FERTIL.

“Estudio Controlado, aleatorizado, que mide la presencia de células NK en el endometrio de las pacientes en edad fértil”.

Institución: Instituto Nacional de Perinatología.
Investigador principal: Dr. Fernando Gaviño Gaviño.
Nombre del paciente:
Registro:
Dirección y teléfono:

Debido al reciente descubrimiento de la presencia de ciertas células encargadas de la defensa en contra de los virus y en cáncer en el endometrio de las pacientes que se encuentra en edad fértil y a la tesis de que las alteraciones en su número probablemente estén relacionadas con la falta de embarazos y/o abortos espontáneos en pacientes que padecen de esterilidad; este instituto está desarrollando un protocolo de investigación en el cual se realizan mediciones de estas células en el endometrio de mujeres sanas para establecer un parámetro de normalidad y así poder comparar las diferencias en las mujeres que padecen de esterilidad o infertilidad.

Dada la trascendencia de establecer este conocimiento, se le esta invitando a participar en este estudio de investigación, en el cual se le realizarán mediciones de estas células que se obtendrán a través de una muestra de sangre periférica y de biopsia de endometrio que se tomarán unos minutos antes de su cirugía (oclusión tubaria bilateral) y siempre bajo efecto anestésico para que usted no presente ninguna molestia durante ni después del procedimiento. La biopsia será un procedimiento realizado siempre por gineco obstetras que participan en el estudio y solo se le realizará en una ocasión.

Si bien las complicaciones por este procedimiento son muy raras, en particular cuando se realiza por profesionales expertos, se ha reportado que existe riesgo de perforación uterina, infección pélvica y excepcionalmente lesión intestinal, vascular o de alguna estructura pélvica.

Usted está en absoluta libertad de decidir participar o no en este estudio o retirarse de el en cualquier momento sin detrimento alguno de su atención médica presente o futura.

Su nombre no será revelado a ninguna persona, respetando en forma absoluta su confidencialidad.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Declaro que he sido informada a mi entera satisfacción sobre el estudio arriba mencionado. Al firmar, doy mi libre consentimiento para participar en el. Estoy conciente de los riesgos que conlleva. Sé que puedo retirar este consentimiento en cualquier momento.

México D.F. a _____ de _____ del _____

Nombre del paciente

Firma del paciente

Nombre del investigador

Firma del investigador que aplica el consentimiento

Nombre del testigo

Firma del testigo

CAPÍTULO 6

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ⁱ Salamonsen LA, Jones RL. 2003 Endometrial remodeling. Enciclopedia of hormones. Oxford, UK; Elsevier Science; 504-512.
- ⁱⁱ Loke YW, King A. 1995 Human implantation: cell biology and immunology. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- ⁱⁱⁱ Salamonsen LA, Lathbury LJ. Endometrial leukocytes and menstruation. Hum Reprod Update 6:616-27.
- ^{iv} Loke YW, King A. Human Implantation: cell biology and immunology. Cambridge: Cambridge University Press; 1995.
- ^v 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.
- ^{vi} Blaschitz A, Hutter H, Dohr G. HLA class I Protein Expression in the Human Placenta. Early Pregnancy 2001;5:67-9.
- ^{vii} King A, Burrows TD, Hiby SE, et al. Surface expression of HLA C antigen by human extravillous trophoblast. Placenta 2000;21:376-387.
- ^{viii} 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.
- ^{ix} 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
- ^x Szekeres-Bartho J, Par G, Dombay G, Smart YC, Volgyi Z 1997 The antiabortive effect of progesterone-induced blocking factor in mice is manifested by modulating NK activity. Cell Immunol 177:194-199.
- ^{xi} Polgar B, Kispal G, Lachmann M, Para G, Nagy E, Csere P, Miko E, Szereday L, Varga P, Szekeres-Bartho J Molecular cloning and immunologic characterization of a novel cDNA coding for progesterone-induced blocking factor. J Immunol 2003; 171:5956-5963.
- ^{xii} Moffet A, Regan L, Fraude P. Natural Killer cells, miscarriage and infertility. BMJ 2004;329:1283-85.
- ^{xiii} White HD, Crassi KM, Givan AL. CD3+ CD8+ CTL activity within the human female reproductive tract: influence of stage of the menstrual cycle and menopause. J Immunol 158:3017-3027
- ^{xiv} Yeaman GR, Guyre PM, Fanger MW. Unique CD8+ T cell-rich lymphoid aggregates in human uterine endometrium. J Leukoc Biol 6:427-435.
- ^{xv} Vassiliadou N, Bulmer JN. Quantitative analysis of T lymphocyte subsets in pregnant and nonpregnant human endometrium. Biol Reprod 55:1017-1022.
- ^{xvi} Hunt J, Petroff M, Burnett T. Uterine leukocytes: key players in pregnancy. In Seminars of Cell Developmental Biology. 11-127-137.
- ^{xvii} Yamada H, Polgar K, Hill JA. Cell mediated immunity to trophoblast antigens in women with recurrent spontaneous abortion. Am J Obstet Gynecol 170:1339-1344.
- ^{xviii} Baines MG, Gendron RL. Are both endogenous and exogenous factor involved in spontaneous foetal abortion? Res Immunol 141, 154-158.
- ^{xix} Yamamoto T, Takahashi Y, Kase N. Proportion of CD56+ T cells in decidual and peripheral lymphocytes of normal pregnancy and spontaneous abortion with and without history of recurrent abortion. Am J Reprod Immunol 42:355-360.
- ^{xx} Todt JC, Yang Y, Lei J. Effects of tumor necrosis factor-alpha on human trophoblast cell adhesion and motility. Am J Reprod Immunol. 36:65-71
- ^{xxi} Grabowska A, Chumbley G, Carter n. Interferon-gamma enhances mRNA and surface expression of class I antigen on human extravillous trophoblast. Placenta 11:301-308.
- ^{xxii} Wegmann TG, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? Immunol Today. 14:353-356.
- ^{xxiii} Clark DA, Chaout G, Mogil R. Prevention of spontaneous abortion in DBA/2 mated CBA/J mice by GM-CSF involves CD8+ T cell-dependent suppression of natural effector cell cytotoxicity against trophoblast target cells. Cell Immunol. 154:143-52.
- ^{xxiv} Rieger L, Hofmeister V, Probe C. Th1 and Th2 like cytokine production by first trimester decidual large granular lymphocytes is influenced by HLA-G and HLA-E. Mol Hum Reprod. 8:255-61.

-
- ^{xxv} Thum MY, Bhaskaram S, Bansal AS. Simple enumeration of peripheral blood natural killer (CD56+NK) cells, B cells and T cells have no predictive value in IVF treatment outcome. *Hum Reprod.*20;5:1272-1276.
- ^{xxvi} Sasaki Y, Sakai M, Miyazadi S. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod*10;5:347-53
- ^{xxvii} Tilburgs T, Roelen DL, Van der Mast BJ. Differential distribution of CD4+ CD25 bright and CD8+ CD28- T cells in deciduas and maternal blood during human pregnancy. *Placenta* 27,SupplA: S47-53.
- ^{xxviii} Jasper MJ, Tremellen KP, Robertson SA. Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Mol Hum Reprod.*12;5:301-8.
- ^{xxix} Heyborne KD, Cranfill RL, Carding SR. Characterization of gamma delta lymphocytes at the maternal-fetal interface. *J Immunol.*1:2872-78.
- ^{xxx} Polgar B, Barakonvi A, Xynos I. The role of gamma/delta T cell receptor positive in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 41:239-44.
- ^{xxxi} Coulam CB, Goodman C, Roussev RG. Systemic CD56+ cells can predict pregnancy outcome. *Am J Reprod Immunol* 33:40-46.
- ^{xxxii} Chao KH, Wu My, Chen CD. The expression of killer cell inhibitory receptors on natural killer cells and activation status of CD4+ and CD8+ T cells in the deciduas of normal and abnormal early pregnancies. *Hum Immunol* 60:791-97.
- ^{xxxiii} Guimond MJ, Luross JA, Wang B, Terhost C, Danial S, Croy BA (1997) Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. *Biol Reprod* 56: 169-179
- ^{xxxiv} King A Burrows T, Verma s, et al. Human uterine Leukocytes. *Hum Reprod Update* 1998;4:480-485.
- ^{xxxv} Trundley A, Moffet A. human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 2004;63:1-12
- ^{xxxvi} Szekeres-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol.*21:471-95
- ^{xxxvii} King A, Loke YW, Chaouat G. NK cells and reproduction. *Trend Immunol Today* 18:64-65.
- ^{xxxviii} Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *New Engl J Med* 345:1400-1408
- ^{xxxix} Jasper MJ, Tremellen KP, Robertson SA. Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Mol Hum Reprod.*12;5:301-8.
- ^{xl} Sasaki Y, Sakai M, Miyazadi S. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod*10;5:347-53
- ^{xli} Tilburgs T, Roelen DL, Van der Mast BJ. Differential distribution of CD4+ CD25 bright and CD8+ CD28- T cells in deciduas and maternal blood during human pregnancy. *Placenta* 27,SupplA: S47-53
- ^{xlii} Scaife PJ, Bulmer JN, Robson SC. Effector activity of decidual CD8+ T Lymphocytes in Early human Pregnancy. *Biol Reprod.* 2006 Jul in Press.
- ^{xliii} Szekeres-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol.*21:471-95
- ^{xliv} Sehmsdorf US, Zenclussen AC, Arck P. Human miscarriage is associated with increased number of CD26 decidual lymphocytes. *Scand J Immunol.*4:400-7.
- ^{xliv} Clark Da, Croitoru K. TH1/TH2,3 imbalance is due to cytokine-producing NK gamma delta T and NK gamma delta T cells in murine pregnancy decidua in success or failure of pregnancy. *Em J Reprod Immunol.* 45:257-65.
- ^{xlvi} Arck Pc, Ferrick DA, Steele-Norwood D. Murine T cell determination of pregnancy outcome. *Cell Immunol.* 15:71-9
- ^{xlvi} Michimata T, Sakai M, Miyazaki. Decrease of T-helper 2 and T-cytotoxic 2 cells at the implantation sites occurs in unexplained recurrent spontaneous abortion with normal chromosomal content. *Hum Reprod.* 18:1523-8.