

Expresión de MICA en el endometrio de mujeres infértiles

Constanza Ferrer,¹ Agustina Azpiroz,² Gisela Junovich,² Eugenia Incera,² Ana Iglesias,² Cecilia Pappalardo,² Agustin Pasqualini,² Gabriela Gutierrez¹⁻²

¹ Fundación REPRO, Buenos Aires, Argentina.

² Halitus Instituto Médico, Buenos Aires, Argentina.

Reproducción 2012;27:195-205

Resumen

Las células natural killer (NK) constituyen la principal población leucocitaria en el endometrio durante la implantación y el embarazo temprano. Existen dos subpoblaciones, la CD16+ o citotóxica, y la CD16- o angiogénica. Al momento de la implantación embrionaria debe existir un equilibrio entre ambos recuentos a favor de la vascularización endometrial. Las células NK expresan receptores que al unirse a la célula blanco desencadenan la actividad citolítica o producción de citoquinas inflamatorias (como IFN γ) o angiogénicas (VEGF). El receptor de activación NKG2D es capaz de unirse a MICA expresada en varios tejidos, incluyendo el endometrio. A pesar de su importancia, existe poca evidencia del rol de MICA en el campo de la reproducción. A partir de estos antecedentes, decidimos caracterizar los niveles endometriales de ARNm de MICA, IFN γ y VEGF para su posible aplicación como parámetros inmunológicos en el estudio de patologías reproductivas: aborto a repetición y fallas de implantación embrionaria. Los resultados obtenidos demuestran que mujeres abortadoras presentan un porcentaje de células NK endometriales y recuento de células NK angiogénicas significativamente menor respecto a las mujeres fértiles, existiendo una correlación positiva con la expresión de VEGF. Estas pacientes presentan, además, niveles significativamente aumentados de ARNm de MICA. Si bien no existen diferencias en los niveles de IFN γ , encontramos una correlación

positiva significativa entre IFN γ y MICA. Las pacientes con fallas de implantación no han mostrado valores alterados de MICA por lo que este parámetro podría ser considerado un estudio diagnóstico diferencial entre ambas patologías reproductivas.

Palabras claves. MICA, endometrio, NK, infertilidad, citoquinas.

Key words. MICA, endometrium, NK, infertility, cytokines.

Introducción

El embarazo es un estado único de regulación inmunológica que comprende un embrión semialogéneo inmerso en un sistema inmune materno activo. En condiciones normales no se inician mecanismos inmunológicos maternos de rechazo contra los tejidos fetales.¹ Sin embargo, cuando todas las causas más comunes de infertilidad han sido descartadas, la mayoría de los fracasos reproductivos podrían asociarse a una falla inmunológica.²

Existen diferentes parámetros que permiten estudiar el estado de regulación inmunológica feto-materna con gran evidencia científica y clínica sobre el rol que juegan en condiciones fisiológicas y en la etiología del aborto recurrente espontáneo. Entre ellas se incluyen tanto anomalías humorales (anticuerpos antifosfolipídicos, antitiroideos, antinucleares, antiespermáticos, etc) como celulares (células NK y células T supresoras). Estos factores pueden asociarse a una reacción citotóxica contra el endotelio de vasos sanguíneos endometriales y placentarios, y contra el trofoblasto, dañando al embrión y a la placenta, y conduciendo a la pérdida gestacional.³

Correspondencia: Gabriela Gutiérrez
Marcelo T. Alvear 2084
Teléfono: (54)11-52732094
E-mail: gabriela.gutierrez@halitus.com
gutierrez_gabrie@hotmail.com

Las células NK han sido la población celular más estudiada clínicamente en pérdidas recurrentes de embarazo. Conforman la mayor población leucocitaria en el endometrio al momento de la implantación embrionaria (5-9 días post-ovulación) y durante las primeras etapas del embarazo.⁴ Constituyen dos subpoblaciones según la expresión de sus marcadores de membrana y su funcionalidad: NK citotóxicas (CD56^{dim} CD16⁺) y NK angiogénicas (CD56^{bright} CD16^{dim/-}). Esta última subpoblación celular es específica del endometrio y la placenta, y deberá predominar sobre la citotóxica durante la segunda fase del ciclo menstrual y primeros meses del embarazo, colaborando en la inducción del estado de “tolerancia” inmunológica. Expresan en su superficie receptores de activación e inhibición de acuerdo a la función que lleven a cabo.⁵ Dependiendo del balance entre ambos tipos de receptores y de sus señales, puede desencadenarse la activación de las células NK hacia actividad citolítica o hacia la producción de citoquinas proinflamatorias (IFN γ) o angiogénicas (VEGF).⁶

En particular, el receptor de activación NKG2D es una glicoproteína de membrana perteneciente a la superfamilia de lectinas tipo C. Se encuentra expresado constitutivamente en distintas células efectoras del sistema inmune, principalmente células NK, NKT y linfocitos T CD8⁺, promoviendo la citotoxicidad y/o secreción de citoquinas tras la unión a su ligando específico.⁷ NKG2D se une a proteínas estructuralmente similares a las moléculas del complejo mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase I.⁸ Sus principales ligandos (NKG2D-L) son las proteínas MICA-B (MHC *class I chain-related genes A* y B) y las proteínas unidas a glucosfosfatidil inositol (GPI) pertenecientes a la familia ULBP1-3.⁹ MICA puede encontrarse en forma transmembrana, induciendo la activación de la célula NK al unirse a NKG2D, o bien en forma soluble.¹⁰ Esta última afecta la función del receptor NKG2D actuando como un inhibidor competitivo que bloquea el sitio de unión de MICA transmembrana a su receptor, impidiendo la activación de la célula NK.¹¹ Este último podría ser considerado como un nuevo mecanismo evasor del sistema inmune.

La expresión de MICA ha sido demostrada en diferentes tipos celulares, incluyendo células endometriales¹² y células trofoblásticas humanas.¹³

Se ha demostrado que citoquinas como la IL-15 y TNF α inducen la sobreexpresión del receptor NKG2D en linfocitos T y NK.¹⁴ Además, ambas citoquinas son producidas en grandes cantidades por células placentarias durante embarazos patológicos y aborto.¹⁵ Por lo tanto, estos factores podrían estar involucrados en la regulación de la expresión del receptor de activación NKG2D y de su ligando específico, MICA durante el proceso fisiopatológico reproductivo.

A pesar de que la expresión de las proteínas MIC ha sido ampliamente explorada en el campo de la oncología¹⁶⁻¹⁸ y la autoinmunidad,^{19,20} aún no se han investigado profundamente sus implicancias en esterilidad sin causa aparente y en abortos a repetición. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que los niveles de MICA soluble en el suero de mujeres infértiles con fallas de implantación es mayor al de mujeres fértiles. Más aún, niveles elevados de MICA soluble han sido asociados a una mayor tasa de abortos espontáneos.²¹

Como consecuencia de la activación de las células NK, producto de la interacción del receptor NKG2D con su ligando específico MICA, puede desencadenarse la citotoxicidad o la producción de citoquinas inflamatorias como IFN γ o angiogénicas como VEGF.

IFN γ es una citoquina inflamatoria involucrada en la inducción de cambios estructurales y remodelamiento de las arterias espiraladas, en la integridad decidual, en la regulación de la migración e invasión trofoblástica disminuyendo la expresión de metaloproteasas.²²⁻²⁴ Además, niveles exacerbados de IFN γ han sido asociados a complicaciones gestacionales en humanos, principalmente vinculado a enfermedades autoinmunes,²⁵ partos prematuros²⁶ y preeclampsia.²⁷⁻²⁸ Asimismo, se ha demostrado que IFN γ regula la angiogénesis modulando la producción de VEGF por las células estromales endometriales.²⁹

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es una citoquina angiogénica que juega un rol fundamental en el proceso de formación y función de vasos sanguíneos en el endometrio humano.³⁰ Las células NK CD16⁻ son una de las fuentes principales de VEGF en el endometrio, y se ha demostrado que niveles deficientes de esta citoquina podrían asociarse a fallas reproductivas.³¹

A partir de estos antecedentes planteamos como

objetivo evaluar la hipótesis de que la unión específica de MICA a su receptor NKG2D en células NK uterinas induciría su activación, aumentando la síntesis de IFN γ y provocando un ambiente pro-inflamatorio que estaría asociado a fallas reproductivas.

Materiales y métodos

I. Grupos de estudio

Se estudiaron un total de 27 mujeres que asistieron voluntariamente a Halitus Instituto Médico y que fueron reclutadas mediante consentimiento informado. Se establecieron tres grupos de estudio: 10 mujeres con dos o más pérdidas embrionarias de menos de 10 semanas (ARE), 8 mujeres con esterilidad sin causa aparente (ESCA) y 9 mujeres fértiles como grupo control. Los criterios de inclusión y exclusión utilizados se especifican en la Tabla 1.

II. Muestras de tejido endometrial

Las mujeres fueron monitoreadas ecográficamente durante un ciclo menstrual de estudio (sin medicación ni búsqueda de embarazo) con el fin de determinar la fecha de ovulación a través de la

presencia de al menos un folículo mayor a 16mm, y así determinar la ventana de implantación (5-9 días post-ovulación), momento durante el cual se realizó una biopsia de endometrio. La toma de la muestra de tejido endometrial fue realizada por médicos especialistas en Fertilidad de Halitus. Las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales para la inmunofenotipificación de las poblaciones de células NK o procesadas para la extracción del ARN total.

III. Inmunofenotipificación de células NK

Para la determinación de las subpoblaciones de células NK endometriales se utilizó citometría de flujo (FACSAria™ *cell sorter*, BD). De esta manera se determinó el porcentaje de células NK totales así como el recuento absoluto y proporción de ambas subpoblaciones celulares en endometrio (CD9+CD56+, CD9+CD56+CD16+ y CD9+CD56+CD16-).

IV. Determinación de parámetros angiogénicos mediante eco-doppler de arteriolas espiraladas endometriales.

El *eco-doppler* fue realizado por un especialista del instituto médico el mismo día y previo a la

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión de mujeres reclutadas.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	GRUPOS		
	Fértil	ESCA	ARE
Edad: 21-38 años	X	X	X
Cariotipo normal	X	X	X
Ciclo menstrual entre 24 y 35 días	X	X	X
Índice de Masa Corporal \leq 26	X	X	X
Cavidad uterina normal	X	X	X
Endocrinopatías ausentes o tratadas	X	X	X
Niveles hormonales normales (FSH<10; E<50pg/ml)	X	X	X
Serología negativa para VIH, VHB, VHC	X	X	X
Al menos un nacido vivo	X		
Ciclos de estimulación previos \leq 5	X		
Ovocitos totales en ciclos previos: 12-35	X		
2 o más abortos menores a semana 10			X
Material de aborto con cariotipo normal o no estudiado			X
Al menos un ciclo de estimulación \geq 5 ovocitos		X	
Transferencia de 3 embriones clase A- AB- B con beta – en dos ciclos de TRA		X	
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN			
Pacientes con un nacido vivo,		X	X
Que necesiten TRA,	X		X
Enfermedad sistémica moderada o severa.	X	X	X
Enfermedades autoinmunes: AR, LES.	X	X	X
Antecedentes de patología anatómica uterina	X	X	X
Endometritis, endometriosis o pólipos	X	X	X
Hidrosálpinx	X	X	X

toma de la muestra de tejido endometrial. El equipo utilizado fue un ecógrafo *Voluson Expert* de *General Electric* con transductor transvaginal de 7.5-10 MHz. Se midió el volumen endometrial con el programa VOCAL obteniéndose los índices endometriales y subendometriales de vascularización (IV) y de flujo (IF) mediante histograma de flujo.

V. Extracción de ARN total

La extracción del ARNm se realizó siguiendo el protocolo recomendado por Macherey-Nagel o mediante el protocolo convencional con *Trizol Reagent*[®] (Invitrogen, Argentina) recomendado por el fabricante. La digestión del ADN contaminante se realizó utilizando *RQ1 RNase-Free Dnase* (Promega, EE.UU.). La cuantificación del ARNm total y la determinación de su calidad se realizó mediante espectrofotometría a dos longitudes de onda: 260nm y 280nm (*Genesis 10uv*, *Thermo Scientific*). Las muestras de ARN fueron almacenadas a -70°C hasta el momento de la síntesis de ADN copia.

VI. Síntesis de ADN copia por transcripción reversa

Para la síntesis de ADN copia se utilizaron una mezcla de *Random Primers* N6, MgCl₂ (3mM), ImProm-IIITM 5X *Reaction Buffer* (1X), RNasin (1U) y agua bidestilada estéril. Por último, se agregó la enzima ImProm-IIITM *Reverse Transcriptase* y se incubó la mezcla final de reacción 50 min a 37°C y 15 min a 70°C. Las muestras fueron almacenadas a -20°C.

VII. Determinación de la expresión de MICA, IFN γ y VEGF

A partir del cDNA obtenido, se realizó una PCR absoluta en tiempo real de MICA y de las citoquinas VEGF e IFN γ en endometrio de cada uno de los grupos de estudio. Se utilizó control endógeno de la ribonucleoproteína 13A (RPL13A) debido a que se ha demostrado que su expresión no se ve modificada por la variación de los niveles hormonales durante el ciclo menstrual.³² Se utilizaron los siguientes cebadores: MICA (F: 5'-TAAATCCGGCGTAGTCCTG-3' y R:5'-GACGCCAGCTCAGTGTGATA-3'), EGF (F: 5'-GGCCTCCGAAACCATGAAC-3' y R:5'-CCACTTCGTGATGATTCTGCC-3'), IFN γ (F:5'-GAATGTCCAACGCAAAGCAATA-3'yR:5'-

GCTGCTGGCGACAGTTCA-3') y RPL13A (5'-CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA-3'y R:5'-GAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA-3').

VIII. Procesamiento de los datos y análisis estadístico

Para el estudio de la distribución de cada variable se utilizó el programa GraphPad Prism 5 (Graphics Software). Una vez determinada si la variable respondía a una distribución normal, se realizó el análisis estadístico para la comparación de las medias utilizando el test *Mann Withney* para distribuciones no paramétricas y el *t Student* para variables cuya distribución fuera normal. Se consideró como valor significativo *p<0.05 y **p<0.01.

Para calcular valores de corte de distintos parámetros que nos permitan separar poblaciones se realizaron curvas ROC (*Relative Operating Characteristic*) con el programa *MedCalc (Software, Broekstraat 52, 9030 Mariakerke, Bélgica, version 11.3.0)*. La curva de cada parámetro estudiado debía presentar un área bajo la curva (AUC) mayor a 0.6 y un p<0.05, para ser seleccionado como buen discriminador entre las poblaciones de estudio.

Los estudios de correlación se realizaron utilizando el programa *MedCalc* y se consideró significativa cuando el coeficiente de correlación (r) se acompañaba de un p<0.05.

El tamaño muestral necesario para ver diferencias en cada parámetro entre los diferentes grupos de estudio fue calculado mediante el programa *MedCalc*.

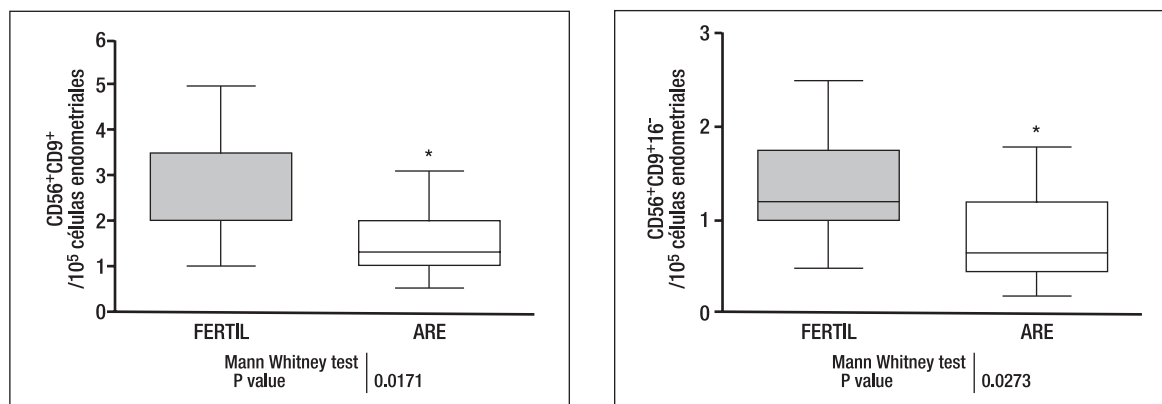
Resultados

I. Pacientes con pérdidas embrionarias repetidas (ARE)

a) Determinación de los niveles de células NK endometriales

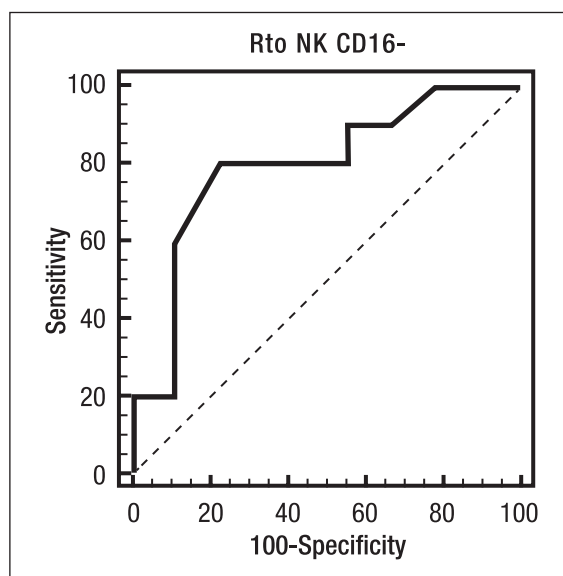
El recuento promedio de células NK y de la subpoblación CD16- en el grupo de pacientes con ARE está significativamente disminuido respecto de la población fértil (Figura 1a y b). Mediante análisis de curvas ROC se estableció un valor de corte para ambos parámetros endometriales que permite discernir entre un endometrio perteneciente a una mujer fértil del de una con abor-

Figura 1. a) Recuento de células NK totales. * $p=0.0171$ (Test de Mann Whitney). b) Recuento de células NK CD16-



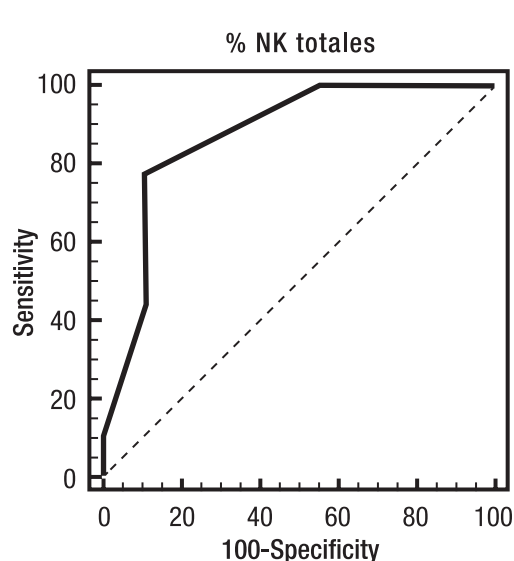
* $p=0.0273$ (Test de Mann Whitney).

Figura 2. Curva ROC del recuento de células NK CD16- endometriales.



AUC= Área bajo la curva; AUC = 0.794; * $p = 0.0082$; Sensibilidad = 80%; Especificidad = 77.8%.

Figura 3. Curva ROC del porcentaje de células NK totales endometriales



AUC = 0.,870; *** $p = 0.0001$; Sensibilidad = 77.8%; Especificidad = 88.9%

tos repetidos. El valor seleccionado fue aquel que mostró mayor sensibilidad y menor porcentaje de falsos positivos (Figura 2 y 3). No se observaron diferencias estadísticamente significativas tanto en el porcentaje de células NK ($^{ns}p=0.3661$) como en el recuento absoluto de células NK citotóxicas CD16+ ($^{ns}p=0.2753$) entre el grupo de estudio y el grupo control (datos no mostrados).

b) VEGF y su asociación con las células NK angiogénicas CD16-

Si bien no se encontraron diferencias en la media de ARNm de la citoquina VEGF entre mujeres ARE y mujeres fértiles, los resultados obtenidos demostraron una correlación lineal positiva estadísticamente significativa entre los niveles de

ARNm de VEGF y el recuento de células NK angiogénicas CD16- (Figura 4).

c) Parámetros ecográficos de vascularización endometrial

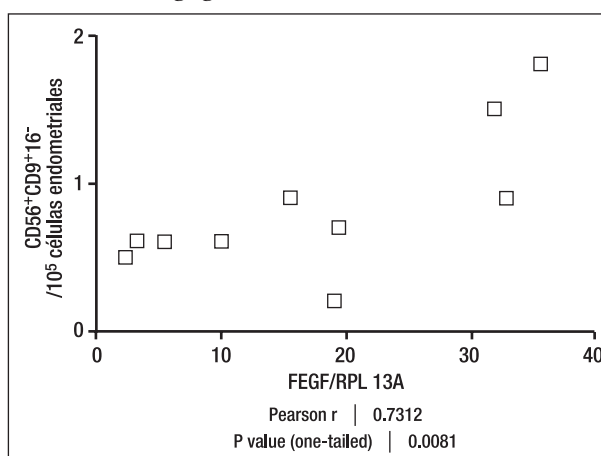
Como podemos observar en la Figura 5a, mujeres con abortos repetidos presentan una disminución significativa en el índice de flujo endometrial (IF) en comparación con el grupo control, aunque no se encontraron diferencias en el índice de vascularización endometrial (IV) ($^{ns}p>0.05$) (datos no mostrados). Más aún, existe una correlación lineal positiva no significativa entre el índice de flujo endometrial y el recuento de células NK angiogénicas CD16- (Figura 5b).

d) Parámetros bioquímicos relacionados con la activación y funcionalidad de células NK

Al estudiar los niveles de ARNm endometrial de MICA observamos que el grupo con abortos repetidos presenta niveles significativamente aumentados en comparación con el grupo fértil (Figura 6). Mediante el análisis por curvas ROC se determinó un valor de corte para ARNm de MICA que permite discriminar entre una mujer fértil y una abortadora, al mismo tiempo que separar la población de estudio según la expresión de MICA (Figura 7).

Por otro lado, se observó una correlación lineal positiva estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de ARNm de IFN γ y los de ARNm de MICA (Figura 8).

Figura 4. Correlación entre los niveles de VEGF y el recuento de células NK angiogénicas



CD16- ($r=-0.7312$; $^{**}p=0.0081$).

Figura 5. a) Valores de índice de flujo endometrial (IF) $^{*}p=0.0217$ (t-test). En el gráfico se observa la media y las barras se corresponden con el IC del 95%. b) Correlación entre IF y el recuento de células NK CD16- ($r=-0.4826$; $^{nsp}=0.0789$).

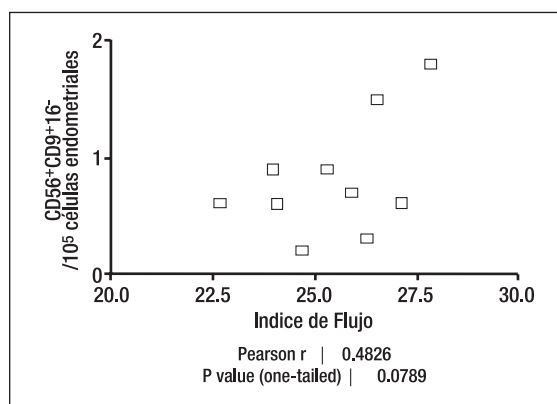
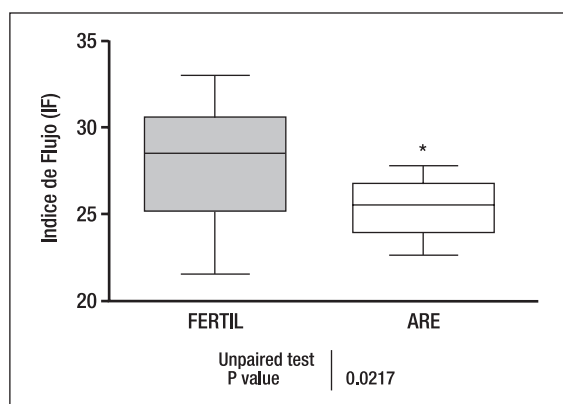
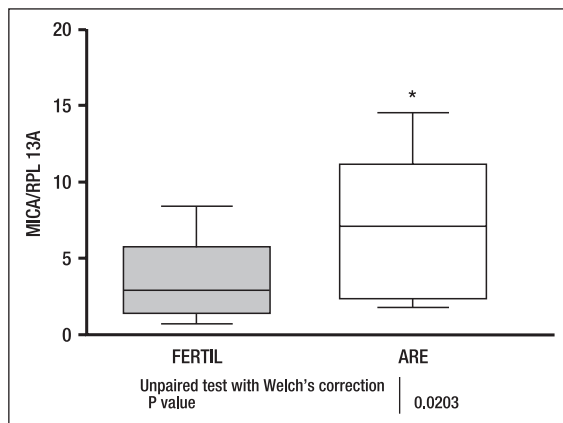
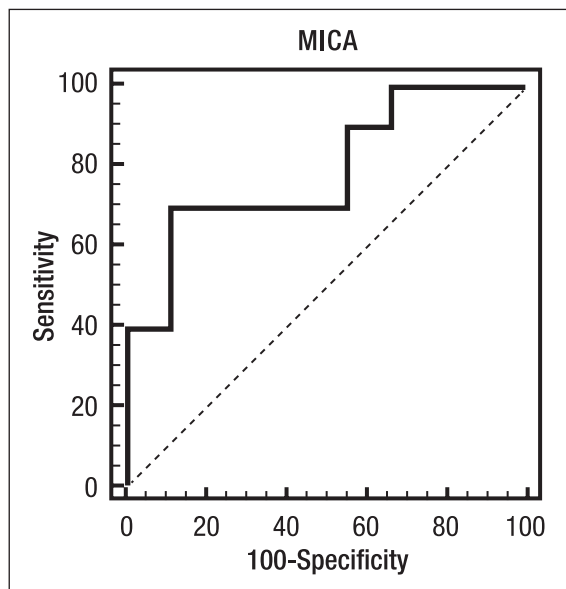


Figura 6. Niveles endometriales de ARNm de MICA.



*p=0.0203 (t-test con corrección de Welch's). En el gráfico se observa la media y las barras se corresponden con el IC del 95%.

Figura 7. Curva ROC de los niveles de ARNm de MICA



AUC = 0.789; **p = 0.0079; Sensibilidad = 70%; Especificidad = 81.1%.

II. Pacientes con esterilidad sin causa aparente

a) Parámetros bioquímicos relacionados con la activación y funcionalidad de células NK

A diferencia de lo hallado para el grupo de mujeres con ARE, las pacientes con esterilidad sin causa aparente (ESCA) no mostraron diferencias significativas en los niveles de ARNm de MICA endometrial (Figura 9). Tampoco pudieron observarse diferencias en la expresión de

ARNm de IFN γ endometrial, respecto del grupo fértil (Figura 10).

Sin embargo, estas pacientes mostraron una deficiencia significativa en los niveles de ARNm de la citoquina angiogénica VEGF (Figura 11).

Figura 8. Correlación entre MICA e IFN γ endometriales (r=-0.5662; *p=0.0347).

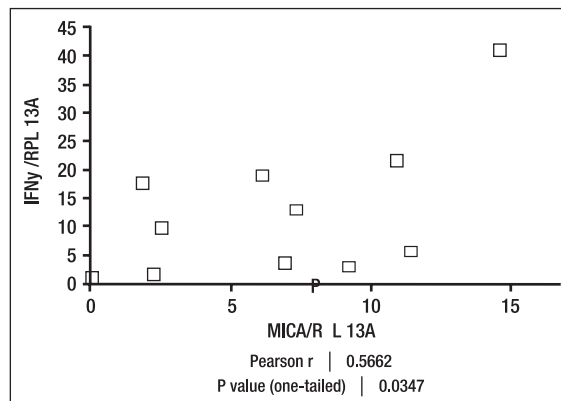
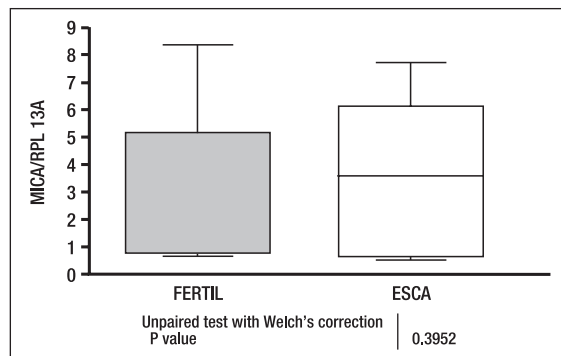


Figura 9. Niveles endometriales de ARNm de MICA.



^{ns}p=0.3952 (t-test con corrección de Welch's). En el gráfico se observa la media y las barras se corresponden con el IC del 95%.

Figura 10. Niveles endometriales de ARNm de IFN γ . ^{ns}p=0.0798 (t-test con corrección de Welch's). En el gráfico se observa la media y las barras se corresponden con el IC 95%.

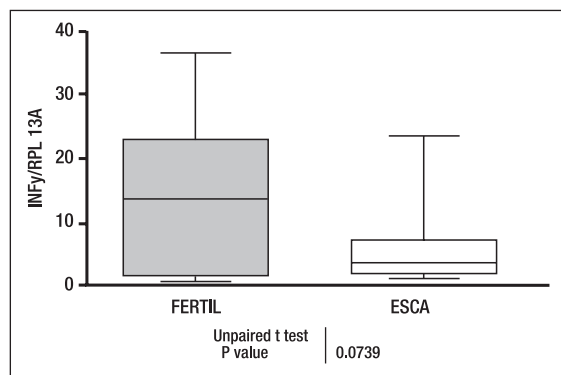
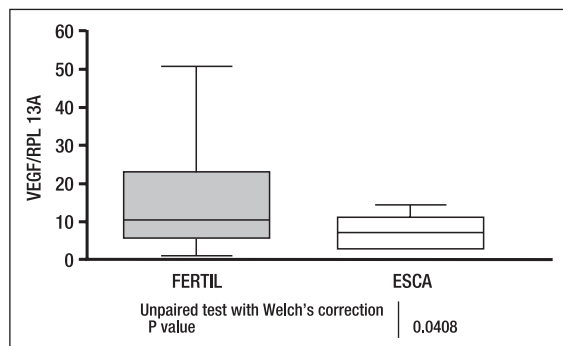


Figura 11. Niveles endometriales de ARNm de VEGF * $p=0.0423$ (t-test con corrección de Welch's). En el gráfico se observa la media y las barras se corresponden con el intervalo de confianza del 95% (IC 95%).



Discusión

El sistema inmune no sólo tiene un rol clave en la diferenciación entre lo propio y lo ajeno, sino que también cumple una función integradora con los demás sistemas que participan del éxito de la gestación. En este sentido, ha sido sugerido por varios autores que para el éxito del proceso reproductivo es necesaria una fina regulación del diálogo molecular entre células maternas y embrionarias, pero también entre células inmunes y células endoteliales.³³⁻³⁵ De este diálogo participan distintas células y moléculas inmunocompetentes que deben evitar un rechazo que dañe los vasos sanguíneos y embrión en formación, favoreciendo la implantación y futura placentación. Existen gran cantidad de factores externos e internos que podrían alterar el equilibrio inmunológico y asociarse a fallas reproductivas recurrentes como la falla de implantación y aborto a repetición.

Dentro de las células inmunes los linfocitos NK cobran especial relevancia clínica en cuanto a su número y función durante la implantación y embarazo.³⁶⁻³⁷ La mayoría de los trabajos científicos publicados hasta la fecha han caracterizado el recuento de estas células en sangre periférica, a pesar de que ha sido debatida su implicancia clínica respecto de los niveles locales.^{38,4} Sin embargo, existen algunos grupos que han caracterizado a las NK endometriales, pero lo han hecho mediante técnicas que no permiten cuantificar por separado las dos poblaciones presentes en el endometrio durante la ventana de implantación embrionaria.³⁸ Por otro lado, es necesario dispo-

ner de más trabajos científicos que proporcionen métodos para medir la funcionalidad de estas células, a fin de ser vinculados a su recuento. Entre los posibles marcadores de funcionalidad, las citoquinas permiten diferenciar una función inflamatoria de una angiogénica, y asociarse a un diagnóstico de fallas reproductivas. Esta falla podría estar relacionada con una deficiente vascularización endometrial y placentaria, más que con un rechazo inmunológico del embrión o un daño endotelial producido por una reacción inmunológica exacerbada.

Estas moléculas producidas por los linfocitos, y entre ellos por las células NK, modulan una gran variedad de funciones celulares tales como la proliferación y diferenciación celular durante la vascularización endometrial y la placentación, y desempeñan un papel importante en el control del proceso inflamatorio necesario para la implantación embrionaria. El presente trabajo de investigación se orientó entonces a buscar una asociación entre el recuento de células NK, la producción de citoquinas y la expresión de moléculas capaces de unirse a las células NK produciendo su activación. El objetivo es lograr caracterizar nuevas herramientas de diagnóstico molecular que puedan ser fácilmente utilizadas en el laboratorio de fertilidad para el diagnóstico de factor inmunológico en fallas reproductivas inexplicadas. Estos potenciales marcadores han sido caracterizados en el endometrio, ya que investigaciones previas postulan que un desbalance inmunológico que se asocie a un aborto temprano puede ser prematuramente detectado en la ventana de implantación de un ciclo anterior al embarazo. En este estudio, entonces, se ha estudiado la expresión local del ARNm del ligando del receptor de activación NKG2D (MICA) en mujeres fértiles e infértiles sin causa aparente. A pesar de que los niveles de MICA han sido ampliamente estudiados en el campo de la oncología y autoinmunidad, aún no se ha estudiado profundamente su papel en reproducción. Sin embargo, se ha demostrado que células endometriales expresan esta proteína y que niveles elevados de MICA soluble en suero estarían asociados a una mayor tasa de abortos espontáneos. Considerando que la unión de MICA a su receptor específico NKG2D en células NK uterinas induce la activación de las

mismas aumentando la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IFN γ ; y teniendo en cuenta que la sobreexpresión de esta citoquina se asocia a aborto, hemos decidido estudiar la expresión endometrial de ambos parámetros en nuestro grupo de mujeres abortadoras. Los resultados obtenidos demostraron una mayor expresión de MICA en el endometrio de mujeres con abortos recurrentes espontáneos. Más aún, MICA demostró ser un buen marcador diagnóstico a través del estudio por curvas ROC. Este valor permitió diferenciar el endometrio de una paciente que ha sufrido al menos dos abortos tempranos inexplicables del de una mujer con fertilidad comprobada. Nos permitió, además, separar al grupo de pacientes ARE estudiadas en dos subpoblaciones: aquella con valores normales y con MICA exacerbado. En esta prueba piloto, 7 de 10 mujeres con ARE mostraron niveles de ARNm de MICA por encima del valor de corte, y este valor correlaciona directamente con la expresión de ARNm de IFN γ endometrial.

Estos resultados preliminares nos permiten plantear la hipótesis según la cual mujeres con abortos repetidos pueden tener una sobreexpresión de MICA endometrial, favoreciendo la unión a las células NK a través del NKG2D, y provocando un aumento en la expresión de IFN γ que podría asociarse a un ambiente proinflamatorio inductor del aborto.

Es importante tener en cuenta que la proteína MICA puede encontrarse anclada a la membrana de las células blanco como las del endotelio vascular endometrial, o bien expresarse en forma soluble. Considerando que ambas formas cumplen funciones antagónicas, sería necesario poder diferenciarlas en pacientes y mujeres fértiles. Más aún, teniendo en cuenta que la enzima metaloproteasa 9 (MMP-9),³⁹⁻⁴⁰ cataliza el clivaje de MICA transmembrana, nuevas líneas de investigación en aborto recurrente deberían incluir además el estudio de los niveles de expresión y actividad de esta enzima.

Por otro lado, es importante destacar que varios estudios vinculan un recuento exacerbado de células NK CD16+ periféricas a las pérdidas recurrentes de embarazo.⁴¹ Podría esperarse entonces que el aumento en la expresión de MICA e IFN γ observado en este estudio estuviera asociado a un

aumento en el recuento de esta subpoblación citotóxica endometrial. Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran una disminución estadísticamente significativa en el recuento absoluto de células NK CD16- endometriales respecto al grupo control de mujeres fértiles. Teniendo en cuenta la función proangiogénica de estas células, evaluamos parámetros de vascularización endometrial obtenidos por VOCAL de arteriolas espiraladas endometriales, encontrando que el índice de flujo (IF) también se encuentra significativamente disminuido en las mismas pacientes, y que tanto el IF como los niveles de ARNm de VEGF correlacionan positiva y significativamente con el recuento de esta subpoblación angiogénica. A partir de estos datos podemos sugerir que no solo una respuesta inflamatoria exacerbada puede conducir a la pérdida temprana del embarazo, sino que un desbalance de NK en detrimento de la población angiogénica podría estar involucrado en la falta de éxito reproductivo.

Al igual que las mujeres con abortos recurrentes, un alto porcentaje de pacientes que presentan fallas de implantación sin causa aparente, muestran un desbalance inmunológico asociado a su esterilidad. Sin embargo, la causa inmunológica vinculada a su patología parecería ser distinta. El resultado más destacado de este estudio en este grupo de pacientes consiste en que, a diferencia del resultado hallado en el grupo de mujeres abortadoras, no se han encontrado valores alterados de MICA en comparación con el grupo control fértil. De confirmarse este resultado preliminar, este parámetro podría ser considerado un estudio diagnóstico diferencial entre ambas patologías reproductivas.

Como conclusión podríamos plantear que el recuento de células NK no sería suficiente a la hora de un diagnóstico inmunológico en fallas reproductivas. Sin embargo, el balance entre las dos subpoblaciones citotóxica y angiogénica, así como los niveles de expresión de MICA, podrían desencadenar una respuesta hacia el proceso de vascularización endometrial o hacia la citotoxicidad celular. Un exceso de MICA endometrial en aborto recurrente sería responsable de una sobreproducción de citoquinas inflamatorias como IFN γ que podrían disminuir los niveles de células NK angiogénicas CD16- y de VEGF pudiendo

repercutir en la irrigación endometrial y vascularización placentaria, conduciendo a una falla reproductiva.

Referencias

- Huang, S. The alteration of placental-derived soluble MHC class I chain-related protein A and B during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2011;90:802-807.
- McIntyre, J; Coulam, C; Faulk P. Recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 1989;21:100-104.
- Lachapelle, M. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. *J Immunol* 1996;156:4027-4034.
- Moffett-King, A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002;2(9):656-663.
- Zhang, J; Croy, A; Tian Z. Uterine Natural Killer Cells: Their Choices, Their Missions *Cellular & Molecular Immunology* 2005;2:123-129.
- Moretta, L; Ciccone, E; Mingani, C y col. Human NK cells: origin, clonality, specificity and receptor. *Adv Immunol* 1994;55:341-380.
- Gonzalez, S; Groh, V; Spies, T. Immunobiology of human NKG2D and its ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;298:121-138.
- Bahram, S; Bresnahan, M; Geraghty, E, y col. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:6259-6263.
- Raulet, D. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 2003;3:781-790.
- Zwirner, N; Fuertes, M. Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system. *Cytokine & Growth Factor* 2007;18:159-170.
- Groh, V; Wu, J; Yee, C, y col. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002;419:734-738.
- Basu, S; Pioli, P; Conejo-Garcia, J, y col. Estradiol regulates MICA expression in human endometrial cells. *Clin Immunol* 2008;129(2):325-332.
- Mincheva-Nilsson, L; Nagaeva, O; Chen, T, y col. Fetal survival novel immune escape mechanism for during human pregnancy: A possible peripheral blood mononuclear cells down-regulate NKG2D receptor on I Chain-Related molecules placenta-derived soluble MHC Class I. *Immunol* 2006;176:3585-3592.
- Groh, V; Bruhl, A; El-Gabalawy, y col. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9452-9457.
- Chegini, N; Robert, M; Williams, S, y col. Differential expression of interleukins (IL) IL-13 and IL-15 throughout the menstrual cycle in endometrium of normal fertile women and women with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol* 2002;56(1-2):93-110.
- Carbone, E; Neri, P; Mesuraca, M, y col.. HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. *Blood* 2005;105:251-258.
- Groh, V; Li, Q; Cioca, D, y col. Efficient cross-priming of tumor antigen-specific T cells by dendritic cells sensitized with diverse anti-MICA opsonized tumor cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:6461-6466.
- Groh, V; Steinle, A; Bauer, S, y col. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998;279:1737-1740.
- Hue, S; Mention, J; Monteiro, R, y col. A direct role for NKG2D/ MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 2004;21:367-377.
- Meresse, B; Chen, Z; Ciszewski, C, y col. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 2004;21:357-366.
- Porcu-Buisson, G; Lambert, M; Lyonnet, L, y col. Soluble MHC Class I chain-related molecule serum levels are predictive markers of implantation failure and successful term pregnancies following IVF. *Human Reproduction* 2007;22(8):2261-2266.
- Ashkar A. 2000. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine Natural Killer cell maturation during normal murine pregnancy. *JEM* 192: 259-270
- Hu Y. 2006. Decidual NK Cells Alter In Vitro First Trimester Extravillous Cytotrophoblast Migration: A Role for IFN- γ . *The Journal of Immunology* 177: 8522-8530.
- Lash G. 2006. IFN γ inhibits extravillous cytotrophoblast cell invasion by a mechanism that involved both changes in apoptosis and protease levels. *FASEB J* 20:2512-18
- Ostensen M, Forger F. 2006. Cytokines and pregnancy in rheumatic disease. *Ann N Y Acad Sci* 1069: 353-363.
- Veith G, Rice G. 1999. Interferon gamma expression during human pregnancy and labour. *Gynecol Obstet Invest* 48:163-167.
- Sargent I. 2006. NK cells and human pregnancy- an inflammatory view. *Trends Immunol* 27:399-404.
- Widmer M. Mapping the theories of preeclampsia and the role of angiogenic factor: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2007;109:168-180.
- Kawano Y, Matsui N. 2000. Effect of interferon gamma on secretion of endothelial growth factor by endometrial stromal cells. *Am J Reprod Immunol* 43:47-52.
- Sherer D, Abulafia O. 2001. Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development. *Placenta* 22(1):1-13
- Pasqualini A; Junovich G; Azpiroz A, y col. Immunological study of the quality of the endometrium in women with unexplained infertility and implantation failure. *American Society for Reproductive Medicine. 67th Annual Meeting. Fertil Steril* 2011;96(3):129.
- Sadek, H; Cagampang, R. Variation in stability of housekeeping genes in endometrium of healthy and polycystic ovarian syndrome women. *Hum Reprod* 2012;27(1):251-256.

33. Redecha, P; Rooijen, N; y col. Pravastatin prevents miscarriages in mice: role of tissue factor in placental and fetal injury. *Blood* 2009;113(17):4101-4109.
34. Clark, D; Chaouat, G; y col. Thinking outside the box: mechanisms of environmental selective pressures on the outcome of the materno-fetal relationship. *Am J Reprod Immunol.* 2002;47(5):275-282.
35. Mantovani, A; Dejana, E. Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunology Today* 1989;10(11):370-375.
36. Moffett A, Regan L, Braude P. Natural killer cells, miscarriage, and infertility. *BMJ* 2004; 329(7477):1283-1285.
37. Dosiou C, Giudice L. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr Rev* 2005;26(1):44-62.
38. Laird, M; Mariee N; y col. Measurements of CD56 cells in peripheral blood and endometrium by flow cytometry and immunohistochemical staining in situ. *Human Reproduction* 2011;0:1-7.
39. Shibahara, H; Suzuki, T; Kikuchi, K; y col. Serum matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase concentrations in infertile women achieved pregnancy following IVF-ET. *Am J Reprod Immunol* 2005;54:186-192.
40. Waldhauer, I. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res* 2006;66:2520-2526.
41. Kwak, J; Bearman, K; y col. Upregulated expression of CD56+, CD56/CD16+ and CD19+ in peripheral blood lymphocytes in woman with recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol* 1995;33:40-46.