

**EVALUACIÓN DE PRUEBAS FUNCIONALES
DE CITOTOXICIDAD:
NATURAL KILLER EN PATOLOGÍA
GRAVÍDICA**

Sara González López
Director: Dr. Marcos López-Hoyos

Máster en Biomedicina y Biología Molecular. Universidad de Cantabria

2022

AGRADECIMIENTOS

A mi director Marcos López Hoyos, por su comprensión, sus ánimos y entusiasmo, pero sobre todo por su apoyo y por acogerme y darme la oportunidad de trabajar con un grupo de laboratorio tan especial y generoso.

Alejandra, gracias por tus consejos, por tu ayuda siempre en todo lo que he necesitado a lo largo de este proyecto y por tu infinita paciencia con mis preguntas.

A Carolina, María y las chicas del laboratorio de inmunología del Hospital de Marqués de Valdecilla gracias por vuestras charlas, por dejarme acompañaros y seguirlos a todas partes y por hacer del laboratorio un lugar tan agradable y divertido.

A Laura, Inés, Pablo y Yaiza, por vuestro apoyo incondicional, las conversaciones interminables y esos empujones extra que a veces son tan necesarios.

A Gabi y mis chicas, gracias por hacerme tan fácil poder realizar este proyecto, por todo el cariño que me habéis demostrado y por estar ahí siempre, demostrándome que, si se quiere, se puede.

Gracias a mi familia por ayudarme a llegar hasta donde estoy, por vuestras palabras y motivación, lo difícil se hizo más fácil y este proyecto se hizo una realidad.

ÍNDICE

ABSTRACT	5
RESUMEN	6
OBJETIVOS	7
INTRODUCCIÓN	8
SISTEMA INMUNITARIO INNATO Y ADAPTATIVO	8
CÉLULAS LINFOIDES INNATAS EN EL SII	9
CÉLULAS NATURAL KILLER	10
Receptores de las células NK	10
Subpoblaciones de células Natural Killer y sus diferencias funcionales	11
PATOLOGÍA GRAVÍDICA	13
Inmunología en el embarazo	13
Fallo reproductivo recurrente: abortos de repetición y fallos de implantación	14
Etiología de los abortos de repetición y los fallos de implantación recurrentes	15
Papel de las NK periféricas y uterinas en el fallo reproductivo recurrente	15
COMPARACIÓN DE MÉTODOS FUNCIONALES DE MEDICIÓN DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS NK	16
Marcaje con yoduro de propidio	17
Desgranulación CD107a	17
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Población de estudio	19
Parámetros de estudio clínicos y demográficos	19
Evaluación de la citotoxicidad de células NK	19
Instrumentación	19
Materiales	20
Líneas celulares	20
Anticuerpos monoclonales	20
Métodos	21
Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica	21
Cultivo y preparación de la muestra de PBMCs	21
Recuento celular y viabilidad	22
Citometría de flujo	23
Análisis estadístico	24
RESULTADOS	24

Características demográficas y obstétricas de los pacientes AR y FIR	24
Parámetros de laboratorio en pacientes AR y FI	25
Estudio funcional de citotoxicidad células NK	26
DISCUSIÓN	28
BIBLIOGRAFÍA	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de la invasión del blastocisto y la estimulación del reclutamiento y reprogramación de las células pNK	16
Figura 2. Representación esquemática de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos	18
Figura 3. Representación gráfica de la técnica de la citometría de flujo	24
Figura 4. . Dot plots que muestran el estudio funcional de citotoxicidad de células NK	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en la prueba funcional de citotoxicidad de células NK.	21
Tabla 2. Características demográficas de las pacientes AR y FIR.	25
Tabla 3. Variables de laboratorio recogidas en las pacientes con AR y FIR.	26

ABSTRACT

Natural killer (NK) cells play an essential role in the proper development of pregnancy. They are involved in key functions of regulation both invasion of the trophoblast into the uterine wall and in the remodeling of the spiral arteries so that a successful placentation occurs. The functions of NK cells in the uterus are modulated by interactions between the MHC class I proper molecules and their inhibitory and activating receptors. Uterine NK cells (uNK), have a lower cytotoxicity than peripheral blood NK cells (pNK), however, an altered or excessive cytotoxicity has been described as the cause of both recurrent miscarriages (RM) and implantation failure (RIF).

In this work, on the one hand, an evaluation of the functional technique of blood NK cell cytotoxicity using the K562 cell line in patients with RM (n=94) and RIF (n=37) was carried out and, on the other hand, a series of immunological parameters were collected (percentage of NK cells, presence of antiphospholipid antibodies, antithyroid antibodies, antinuclear antibodies and C3 and C4 levels) and biochemical parameters (vitamin D, TSH and T4) from the medical records of these patients, from the Gravidic Pathology Unit of the Marqués de Valdecilla University Hospital (HUMV). No significant differences were observed in the variables studied between the two groups. This could suggest that despite being two clinically well-differentiated entities, NK cells in peripheral blood do not seem to have a discriminatory role that helps differentiate these pathologies.

KEY WORDS: Natural Killer cell (NK), cytotoxicity, recurrent pregnancy loss (PRR), CD107a.

RESUMEN

Las células natural killer (NK) tienen un papel esencial en el correcto desarrollo del embarazo. Intervienen en funciones clave de regulación tanto de la invasión del trofoblasto en la pared uterina como en la remodelación de las arterias espirales para que se produzca una placentación adecuada. Las funciones de las células NK en el útero están moduladas por las interacciones entre las moléculas propias del MHC de clase I y sus receptores inhibidores y activadores. Las células NK uterinas (uNK), presentan una citotoxicidad menor que las células NK en sangre periférica, sin embargo, una citotoxicidad alterada o excesiva se ha descrito como causa tanto de abortos de repetición (AR) como de fallos de implantación (FIR).

En este trabajo se ha realizado por un lado, una evaluación de la técnica funcional de citotoxicidad de células NK sanguíneas utilizando la línea celular K562 en pacientes con AR (n=94) y FIR (n=37) y por otro se han recogido una serie de parámetros inmunológicos (porcentaje de células NK, presencia de anticuerpos antifosfolípido, anticuerpos antitiroideos, anticuerpos antinucleares y niveles de C3 y C4) y bioquímicos (vitamina D, TSH y T4) en las historias clínicas de estas pacientes, procedentes de la Unidad de Patología Gravídica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). No se han observado diferencias significativas en las variables estudiadas entre los dos grupos. Esto podría sugerir que, a pesar de ser dos entidades clínicamente bien diferenciadas, las células NK en sangre periférica no parecen tener un papel discriminatorio que ayude a diferenciar estas patologías.

PALABRAS CLAVE: Células natural killer (NK), citotoxicidad células NK, abortos de repetición, línea celular K562, CD107a.

OBJETIVOS

- Evaluación de la prueba funcional de citotoxicidad en células NK basada en la desgranulación de CD107a medida por citometría de flujo multiparamétrica.
- Estudio comparativo de parámetros inmunológicos entre pacientes con abortos de repetición (AR) y fallos de implantación (FIR)

INTRODUCCIÓN

SISTEMA INMUNITARIO INNATO Y ADAPTATIVO

La defensa inmunitaria de los vertebrados se puede dividir en inmunidad innata (natural o no específica) y adquirida (adaptativa o específica). Estos dos procesos de inmunidad conviven para lograr la máxima efectividad de protección (Netea et al., 2011). El sistema inmunitario innato (SII) tiene la capacidad de reconocer patrones moleculares que caracterizan a ciertos grupos de patógenos o daño celular y atacarlos con el fin de prevenir o eliminar la infección en una primera línea de defensa del organismo. Es altamente eficaz, distingue lo ajeno de lo propio e impide la mayoría de las infecciones (Jenthó & Weis, 2021). La segunda rama del sistema inmunitario, el sistema inmunitario adaptativo (SIA), actúa sobre aquellos patógenos capaces de evadir el SII generando una respuesta dirigida y con mayor precisión frente al patógeno, además, tiene la capacidad de almacenar los mecanismos empleados en forma de memoria inmunológica (Netea et al., 2011). Hasta hace relativamente poco se le adjudicaba al SII el adjetivo de “primitivo” por no poder “recordar” los patógenos, pero se está comprobando que existe un cierto tipo de memoria para estas células innatas y que son capaces de generar una memoria inmunológica, denominada inmunidad entrenada (Punt et al., 2020).

La inmunidad innata, mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR) reconoce patrones moleculares asociados a patógenos y a daño (PAMPs y DAMPs respectivamente), mediante sensores moleculares codificados en la línea germinal. Estos PRR, que se expresan principalmente en células dendríticas, macrófagos, monocitos, neutrófilos y células epiteliales, se unen a las estructuras moleculares expresadas en las superficies celulares. La reacción de unión de los PRR con estos PAMPs y DAMPs es altamente eficaz y específica (Jenthó & Weis, 2021; Punt et al., 2020).

El concepto de inmunidad entrenada se ha convertido en una de las ideas más interesantes y clínicamente relevantes de la inmunología actual. La inmunidad entrenada es la capacidad del sistema inmunitario innato de mejorar su respuesta o intensificar la misma frente a una infección secundaria por el mismo patógeno u otra estimulación diferente de una forma menos específica que el SIA y, por lo tanto, proporcionando una protección cruzada frente a otros patógenos (Netea et al., 2011). La exposición de las células inmunitarias innatas a un estímulo a través de los PRR promueve una serie de modificaciones a largo plazo induciendo un fenotipo proinflamatorio que implica la reestructuración y adaptación del metabolismo celular y la reprogramación epigenética que facilita el reconocimiento y la respuesta por parte de NK y macrófagos (Municio & Criado, 2021).

En función del tipo y la concentración de PAMP/DAMP, esta situación inmunológica puede conducir a dos resultados opuestos: inmunidad innata entrenada o tolerancia inmunitaria innata. En el caso de la inmunidad entrenada, como ya se ha mencionado anteriormente, se genera una mayor respuesta a un segundo estímulo, mientras que la tolerancia inmunitaria innata tiene como objetivo atenuar o reducir esta respuesta. Sin embargo, es fundamental que exista un equilibrio entre las respuestas proinflamatorias y antiinflamatorias

para evitar situaciones de inflamación crónica o un aumento de la sensibilidad a posibles infecciones secundarias. Las estrategias que puedan desarrollarse para potenciar la tolerancia inmunitaria pueden resultar de gran utilidad en la regulación de procesos fisiológicos para evitar reacciones perjudiciales a los alérgenos, la microbiota o la inflamación autoinmune (Municio & Criado, 2021; Vetvicka et al., 2021).

CÉLULAS LINFOIDES INNATAS EN EL SII

Las células linfoides innatas (ILCs, por sus siglas en inglés) son células efectoras inmunitarias involucradas entre las primeras líneas de defensa contra patógenos y tumores, en la remodelación de tejidos y angiogénesis, en la organogénesis linfoide y en la remodelación de órganos linfoides secundarios después del nacimiento. Residen en los tejidos, aunque mayoritariamente se localizan en superficies mucosas como el intestino, pulmones, piel y útero (o decidua durante el embarazo). A diferencia de los linfocitos T y B, las ILCs no expresan diversos receptores de antígenos y tienen la capacidad de responder rápidamente a las células alteradas e infectadas por virus (Vivier et al., 2018).

Las ILCs han sido clasificadas en función de su perfil de citocinas y factores de transcripción y se dividen en dos principales grupos: ILCs citotóxicas e ILCs auxiliares o ayudantes. Las células NK representan el grupo de ILCs citotóxicas, mientras que dentro de las ILCs auxiliares encontramos los subconjuntos ILC1, ILC2 e ILC3, aunque recientemente todas las ILCs han sido clasificadas en cinco categorías ILC1, ILC2, ILC3, LTi y NK (Clottu et al., 2021; Vacca et al., 2018).

Las NK fueron la primera población de células linfoides innatas descrita con capacidad citotóxica para eliminar células transformadas, infectadas por virus o tumorales y liberar quimiocinas y citocinas proinflamatorias, como IFN- γ . Detectan alteraciones no específicas de las células propias causadas por estrés celular, infecciones o transformación maligna y su funcionalidad está regulada por receptores inhibidores y receptores activadores que se describen posteriormente con mayor detalle (Vacca et al., 2018).

Las ILCs auxiliares se clasifican además en tres subconjuntos principales (ILC1/ILC2/ILC3). Las ILC1 secretan citocinas de tipo 1, principalmente IFN γ , factor de necrosis tumoral (TNF- α) y factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). En humanos, se han descrito dos subconjuntos diferentes de ILC1 en el intestino y presentan un papel importante en la defensa contra agentes patógenos externos o microorganismos peligrosos. Las ILC2 expresan el factor de transcripción GATA3, secretan principalmente citocinas de tipo 2, como IL-5, IL-13 e IL-4, contribuyendo a las respuestas inmunitarias de tipo 2. Por último, las ILC3 es un subconjunto heterogéneo, sus citocinas características están representadas por IL-17 e IL-22. Las ILC3 se identificaron por primera vez en el feto y se definieron originalmente como células inductoras del tejido linfoide (LTi) debido a su papel clave en la organogénesis linfoide. Durante la embriogénesis, las células LTi interactúan con las células del estroma e inducen la regulación positiva de las moléculas de adhesión, lo que promueve el desarrollo de la estructura de los ganglios linfáticos. Después del nacimiento, las ILC3 se localizan principalmente en los órganos linfoides secundarios (SLO), las amígdalas,

la decidua y la lámina propia intestinal donde contribuyen a las defensas del huésped contra patógenos extracelulares y se definen como células similares a LT_i. En humanos, las células similares a LT_i/LT_i son negativas para el linaje (CD3/CD19/CD14/CD56) y expresan CD127 y CD117; secretan principalmente IL-17 y TNF α . La IL-22 derivada de ILC3 actúa sobre las células epiteliales intestinales e induce la producción de péptidos antimicrobianos además de la migración de células epiteliales y la cicatrización de heridas. Igualmente, ILC3 promueve la reparación de tejidos y la remodelación de órganos linfoides secundarios dañados por procesos inflamatorios (Miller et al., 2018; Vacca et al., 2018).

CÉLULAS NATURAL KILLER

Las células natural killer (NK) pertenecen al sistema inmunitario innato y muestran una actividad citotóxica espontánea frente a células tumorales o infectadas por virus. Desempeñan funciones esenciales como primera línea de defensa debido a su actividad citotóxica y la producción de citocinas. Son una subpoblación de linfocitos no T (CD3 negativos) y no B (CD19 negativos), que se definen por la expresión de los marcadores de superficie CD56 y CD16, y, se caracterizan morfológicamente por su gran tamaño y apariencia granular debida a la presencia de gránulos citoplasmáticos. Se generan en la médula ósea a partir de células hematopoyéticas progenitoras CD34⁺ y comparten progenitor común con los linfocitos T. Se encuentran principalmente en los nódulos linfoides y la sangre, pero también están ampliamente distribuidas en otros órganos y tejidos, como la piel, el intestino, el hígado, los pulmones y el útero (Kumar et al., 2011; Vacca et al., 2018). La actividad de las células NK está regulada por el equilibrio entre las señales inhibitorias y activadoras mediadas por varios receptores presentes en la superficie celular que reconocen ligandos expresados principalmente en tumores o células infectadas por virus. Eliminan las células diana que han perdido o disminuido su expresión de moléculas HLA de clase I, como es el caso de tumores o células infectadas por virus (Subedi et al., 2022).

Aproximadamente el 90% de las células NK circulantes presentan la molécula de adhesión que media la adhesión homotípica CD56^{dim} (de baja expresión), mientras que el resto son CD56^{bright} (de alta expresión). Las células CD56^{bright} poseen actividad citotóxica limitada y elevada capacidad de producción de citocinas proinflamatorias, como IFN- γ , TNF- α , IL-12 o IL-15, además de factores de reclutamiento de macrófagos y monocitos; mientras que las células CD56^{dim} tienen una potente actividad citotóxica y citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) con menor producción de citocinas. Las NK fenotípicamente caracterizadas como CD56^{bright} están presentes de manera predominante en los tejidos (Subedi et al., 2022).

Receptores de las células NK

Las células NK poseen una gran variedad de receptores activadores o inhibidores en su superficie celular. Los receptores inhibidores tienen motivos de inhibición basados en tirosina citoplásmica (ITIM) y reconocen moléculas propias del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC I) expresadas por la mayoría de las células nucleadas. Sin embargo, los receptores activadores reconocen los ligandos

exhibidos por las células patológicas e interactúan con las vías de señalización celular para iniciar su actividad efectora (Kirwan & Burshtyn, 2007). Las células NK generan inmunidad contra las células tumorales e infectadas por patógenos. Normalmente, las células tumorales regulan a la baja su MHC-I para escapar de las células T citotóxicas. Sin embargo, la menor expresión de MHC-I hace que las células tumorales sean susceptibles a la lisis por parte de las células NK (Kirwan & Burshtyn, 2007). Los cambios moleculares en la superficie celular debido a una infección viral o a la formación de un tumor pueden estimular los receptores activadores y, tras la activación, las células NK liberan granzimas, perforinas, moléculas efectoras de la familia TNF y ligando Fas para inducir la apoptosis de las células diana. Además, las células NK sintetizan y liberan otras citocinas y quimiocinas como IL-10, IFN- γ o GM-CSF para reclutar otras células efectoras inmunitarias (como células dendríticas o macrófagos) en la diana (Y. Yang et al., 2021).

Dentro de los receptores que poseen las células NK se pueden reconocer diferentes tipos: receptores tipo toll (TLR), receptores lectina tipo C (CLR), receptores tipo NOD (NLR), receptores tipo RIG (RLR), detectores citosólicos de ADN (CDS), receptores de citotoxicidad natural (NCR) y receptores “scavenger” (SR) (Punt et al., 2020). Los receptores de citotoxicidad natural (NCR) incluyen los receptores activadores NKp30, NKp44 y NKp46, expresados exclusivamente por las células NK y NKT. Los receptores de la familia de las inmunoglobulinas, llamados “killer inhibitory receptors” (KIR) pueden actuar como activadores o inhibidores y reconocen la disminución en la expresión de las moléculas de HLA de clase I. El receptor CD16, el receptor Fc de baja afinidad para la IgG (Fc γ RIIIA), interviene en el reconocimiento de células opsonizadas con anticuerpos IgG (Subedi et al., 2022).

Los diferentes receptores de células NK de activación incluyen receptores de la familia KIR, molécula similar a lectina tipo C tipo II (NKG2D), receptores heterodiméricos NKG2C, DNAM-1 (CD226), glicoproteína transmembrana similar a la nectina de la superfamilia de las inmunoglobulinas, y receptores pertenecientes a la familia de receptores citotóxicos naturales (NCR, por sus siglas en inglés) como NKp46, NKp30 y NKp44. Estos receptores actúan junto con diferentes proteínas adaptadoras para iniciar la activación de las células NK; sin embargo, la señalización combinada a través de receptores inhibidores y de activación determina el resultado funcional final (Poli et al., 2009; Subedi et al., 2022).

Las subpoblaciones CD56^{bright} y CD56^{dim} difieren en su expresión de receptores KIR y CD94/NKG2A. A diferencia de las NK CD56^{bright}, las células CD56^{dim} expresan receptores similares a inmunoglobulina de células asesinas (KIR) como CD158a, CD158b y NKB1. Sin embargo, los receptores tipo lectina tipo c (KLR) CD94/NKG2 y CD161 están presentes en ambos subconjuntos. La capacidad de formar conjugados con dianas susceptibles es aproximadamente dos veces superior en las células NK CD56^{dim} que en las células NK CD56^{bright} (Jacobs et al., 2001; Moretta & Moretta, 2004; Poli et al., 2009).

Subpoblaciones de células Natural Killer y sus diferencias funcionales

Las células NK se pueden subdividir en poblaciones diferentes en función de la expresión de sus marcadores de superficie, lo que les confiere características diferentes. Las células que se encuentran en el torrente

sanguíneo se denominan NK periféricas (pNK). El principal subconjunto de pNK es NK CD56^{dim} CD16⁺, con potente actividad citotóxica y menor producción de citocinas como se ha mencionado anteriormente, representando al menos el 90% de todas las células NK en sangre periférica (Poli et al., 2009). Aunque las células NK son relativamente abundantes en la sangre periférica, realizan su función principalmente en los tejidos y órganos linfoides secundarios, donde migran de forma temprana en respuesta a factores liberados durante la respuesta inflamatoria. Su capacidad funcional puede verse alterada por las interacciones de célula-célula, su microambiente, las citocinas y otros mediadores. Por ejemplo, las células pNK recién aisladas pierden rápidamente su capacidad citotóxica además de su competencia para liberar IFN- γ y TNF- α cuando se exponen a citocinas como IL4 o IL18 (Khan et al., 2020).

La subpoblación de células NK CD56^{bright} tiene una mayor expresión de CCR7 y de CD62L (receptor de quimiocinas y L-selectina, respectivamente), lo que les permite migrar con facilidad a nódulos linfoides. Han sido clasificadas por algunos autores como células NK reguladoras, debido a su capacidad para potenciar la respuesta de células dendríticas y, de esta manera, favorecer la respuesta de los linfocitos T (Jacobs et al., 2001; Subedi et al., 2022).

Por lo tanto, las células NK CD56^{bright} carecen casi por completo de KIR, pero expresan altos niveles de CD94/NKG2A. Por el contrario, la mayoría de las células NK CD56^{dim} son KIR⁺ y expresan niveles bajos de CD94/NKG2A (Subedi et al., 2022).

Por último, los gránulos de las células CD56^{dim} contienen aproximadamente diez veces más perforina y granzima A, lo que permite una citólisis potencialmente más eficaz en comparación con las células NK CD56^{bright}. Las células CD56^{bright} son células NK especializadas que regulan los mecanismos de respuesta inmunológica mediante el suministro de citocinas. La baja capacidad citolítica de las células NK CD56^{bright} puede explicarse por la débil capacidad para formar conjugados con las células diana y el bajo contenido de perforina y granzima A en sus gránulos (Cooper et al., 2001; Poli et al., 2009).

La mayoría de las células linfoides presentes en la interfaz materno-fetal durante el primer trimestre del embarazo son células NK (uNK), representadas por el fenotipo predominante CD56^{bright} CD16⁻ no citotóxico y aunque están presentes en todas las etapas del embarazo su presencia es más relevante en los primeros estadios (Jabrane-Ferrat & Siewiera, 2014). Las pNK (CD56^{dim} CD16⁺) presentan mayor actividad citotóxica y son fenotípica y funcionalmente diferentes de las uNK (Toth et al., 2019). En este ambiente las uNK, con menor potencial citotóxico, contribuyen al mantenimiento de la homeostasis del microambiente de la decidua, por ejemplo, modulando la invasión del trofoblasto, regulando la tolerancia inmunológica y promoviendo el desarrollo del feto, además de intervenir en los procesos de construcción y remodelación de tejidos y en la formación de nuevos vasos debido a la liberación de IL-8, factores de crecimiento entre ellos el factor endotelial vascular VEGF e IFN- γ (Guo et al., 2021; Mahajan et al., 2022). Las uNK pueden deber su perfil antiinflamatorio y menos citotóxico a la estimulación por IL15 y TGF- β secretados por el trofoblasto (Mor et al., 2017).

Las células uNK participan en la mejora de la placentación en embarazos repetidos, una subpoblación de uNK parece estar un poco más especializada y presenta un cierto tipo de entrenamiento hacia el embarazo. Poseen un transcriptoma y una reprogramación epigenética única caracterizada por una mayor expresión de los receptores NKG2C (que al heterodimerización CD94 actúa como activador) y LILRB1 (receptor inhibitor con unión preferencial a HLA-G) y un aumento en la secreción de $IFN\gamma$ y $VEGF\alpha$ (Gamliel et al., 2018). La interacción entre HLA-E y el receptor CD94/NKG2A provoca la inhibición de la citotoxicidad de las uNK (Sfakianoudis et al., 2021).

PATOLOGÍA GRAVÍDICA

Inmunología en el embarazo

El embarazo es un proceso inmunológico único. El embarazo presenta distintas etapas con tres estados inmunológicos diferentes: la implantación y placentación (etapa proinflamatoria), crecimiento fetal (etapa antiinflamatoria) y el parto (segunda etapa proinflamatoria que da inicio al parto), y cada una de ellas requiere de un entorno inmunitario único (Mor et al., 2017). Para lograr un embarazo a término se requiere un desarrollo apropiado de la placenta una vez que el blastocisto se ha implantado. La decidua es la membrana mucosa del útero grávido (el endometrio que se decidualiza gradualmente bajo la estimulación de hormonas ováricas) y se caracteriza por la tolerancia inmunológica hacia el feto semiallogénico y el mantenimiento de las defensas del huésped contra posibles patógenos. La decidua está formada por células deciduales secretoras que se originan a partir de células endometriales diferenciadas al principio del embarazo y encierra al feto, el cordón umbilical y la placenta, este proceso de diferenciación implica el equilibrio entre las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. De acuerdo con la relación anatómica entre la decidua y el blastocisto, la decidua se puede dividir en diferentes partes: decidua basal, parietal y capsular. La decidua basal se transforma a partir del endometrio del sitio de implantación del embrión y cubre la placa basal de la placenta, la decidua basal recubre las membranas fetales y, por último, la decidua capsular cubre al embrión (Li et al., 2022; F. Yang et al., 2019).

Tras la fecundación y el desarrollo del blastocisto, éste se implanta en la cavidad uterina. Para ello el trofoblasto invade el endometrio y miometrio uterinos para comenzar la implantación. Esta invasión por parte de las células trofoblásticas penetra a través del epitelio basal para alcanzar la membrana basal y extenderse hacia el estroma, donde el sincitiotrofoblasto comienza su invasión hasta alcanzar las arterias espirales. En el sitio de implantación, la inflamación se caracteriza por la presencia de IL-6, IL-8, IL-15, GM-CSF, ligando 1 de quimiocina CXC (CXCL1), ligando 4 de quimiocina (CCL4) y TNF. Este ambiente inflamatorio es fundamental para la eliminación de la capa de mucinas presente en la superficie luminal del útero y que se pueda llevar a cabo la adhesión del blastocisto, el trofoblasto participa activamente en este proceso secretando citocinas como CXCL12, CXCL8, $TGF-\beta$ y CCL2 para la adhesión del blastocisto y reclutamiento de monocitos, neutrófilos, células NK, células T y T_{Reg} (Figura 1). Posteriormente, se

reorganizan las moléculas de adhesión garantizando el éxito de la unión del blastocisto (Mor et al., 2017). Dado que el feto es semialogénico se requiere un equilibrio altamente regulado entre la activación inmunológica y la tolerancia al antígeno embrionario, conservando la capacidad de defenderse localmente de patógenos (Eikmans et al., 2020; F. Yang et al., 2019; Zhang & Wei, 2021). Una vez se ha llevado a cabo la implantación y placentación con éxito, en la etapa de crecimiento fetal, la respuesta predominante es antiinflamatoria (respuesta tipo Th2). En esta etapa señales proinflamatorias pueden conllevar al aborto espontáneo o parto prematuro. Las células uNK, macrófagos y T_{Reg} intervienen en este proceso manteniendo un ambiente antiinflamatorio mediante la secreción de citocinas antiinflamatorias, eliminación de células del trofoblasto que han perdido la funcionalidad y evitando que se genere una respuesta contra los antígenos paternos expresados por el feto, respectivamente. Para el inicio del parto es necesaria la activación de la vía de señalización del factor nuclear proinflamatorio κB (NF- κB), la entrada de células inmunitarias en el miometrio promueve las contracciones uterinas y la separación de la placenta (Mor et al., 2017).

Las interacciones entre las moléculas HLA-C expresadas por las células trofoblásticas fetales y los receptores KIR activadores (2DS1) e inhibidores (2DL1) en las células uNK maternas, influyen en el proceso de placentación (Hiby et al., 2010). Cuando el trofoblasto expresa HLA-C2 y las células uNK expresan solo receptores inhibidores, la combinación se asocia con una mayor incidencia de aborto recurrente, restricción del crecimiento fetal y preeclampsia (Hiby et al., 2010; Piekarska et al., 2021).

Fallo reproductivo recurrente: abortos de repetición y fallos de implantación

El fallo reproductivo recurrente (FRR) engloba dos patologías clínicamente bien diferenciadas: los abortos de repetición (AR) y el fallo de implantación recurrente (FIR). Las últimas guías publicadas por la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) definen los AR como la pérdida de dos o más gestaciones antes de las 24 semanas de gestación, incluyendo aquellas no visualizadas por ecografía, es decir, los abortos bioquímicos (Bender-Atik, R. et al., ESHRE guideline: Recurrent pregnancy loss, 2018). La Sociedad Española de Fertilidad (SEF) en sus últimas recomendaciones, también define el AR como la pérdida de dos o más gestaciones clínicas (Grupo de Trabajo de Fracaso Reproductivo, 2019)

En cuanto a su prevalencia, se estima que los AR afectan entre un 2 y un 5% de las parejas. (elHachem et al., 2017; “Evaluation and Treatment of Recurrent Pregnancy Loss: A Committee Opinion,” 2012).

No existe una única definición aceptada de fallo de implantación recurrente (FIR). La definición propuesta por la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) (Guía de Asistencia Práctica* Revista Oficial de La Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2018) define los FIR como la no consecución del embarazo en mujeres menores de 40 años, tras haber transferido al menos 4 embriones de buena calidad, en estadio de células, repartidos en un mínimo 3 transferencias.

Estudios recientemente publicados concluyen que la tasa de implantación por transferencia en una técnica de reproducción asistida es de aproximadamente un 30% mientras que se estima que la incidencia de FIR puede ser de alrededor de un 10% (Cimadomo et al., 2021).

Etiología de los abortos de repetición y los fallos de implantación recurrentes

A lo largo de los últimos años se han descrito una serie de causas que están asociadas tanto a AR como a FIR. Dentro de ellas, los factores genéticos son la causa más frecuente de aborto espontáneo temprano (Garrido-Gimenez & Alijotas-Reig, 2015). Otro factor causal son las alteraciones anatómicas uterinas, así como los trastornos endocrinos como la diabetes y disfunción tiroidea, los factores ambientales o demográficos como el tabaquismo, la obesidad, alcoholismo o cafeína también se asocian con un mayor riesgo de AR (Pillarisetty & Mahdy, 2021).

Otra causa de AR o FIR son las trombofilias, que se clasifican en hereditarias y adquiridas. Dentro de las trombofilias adquiridas, se encuentra el síndrome antifosfolípido (SAF). El SAF es una enfermedad autoinmune sistémica mediada por autoanticuerpos que actúan directamente sobre los fosfolípidos unidos a proteínas, conocidos como anticuerpos antifosfolípidos (aFL). Este síndrome puede dividirse en dos entidades clínicas: la que produce una patología predominantemente vascular y otra cuya clínica es principalmente obstétrica, y se conoce como SAF obstétrico (SAFO). Esta última se caracteriza por eventos vasculares e inflamatorios adversos en la interfase materno fetal, conduciendo a una morbilidad obstétrica, que incluye abortos, incluidos dentro de sus criterios clínicos de clasificación (Miyakis et al., 2006). Sin embargo, aún no se ha conseguido establecer una relación directa entre SAF y FIR a pesar de que estudios recientes recomiendan testar los aFL en aquellas pacientes que siguen un tratamiento con TRA y son diagnosticadas de FIR (Jarne-Borràs et al., 2022).

Papel de las NK periféricas y uterinas en el fallo reproductivo recurrente

La relación causal entre las células NK y el fallo reproductivo recurrente aún es controvertida. Se ha descrito ampliamente en los últimos años que un aumento en la frecuencia de células NK podría tener un papel en esta patología (Shigeru et al., 2008). Estudios recientes ponen de manifiesto como una mayor proporción de células con fenotipo CD56^{dim}, es decir, con un perfil más citotóxico, se ha observado en pacientes con FIR, cuando se compara con controles sanos (Sfakianoudis et al., 2021).

En el caso de pacientes con diagnóstico de AR, dentro de la población de células NK uterinas existe un desequilibrio entre las concentraciones de las subpoblaciones fenotípicas de estas células. Las células uNK con fenotipo CD56^{dim} CD16⁺ (asociado a la citotoxicidad) aparecen en mayor concentración y en una concentración más reducida se encuentra el fenotipo CD56^{bright} CD16⁻, asociado a la producción de citocinas como GM-CSF como ya se ha mencionado anteriormente, por lo tanto, la intensa citotoxicidad y la falta de señal de citocinas puede ser la causa de la pérdida fetal (Sfakianoudis et al., 2021).

Los casos de FRR poseen un elevado porcentaje de $CD56^{dim} CD16^{+}$ y un bajo porcentaje de $CD56^{bright} CD16^{-}$ en la fase secretora del ciclo, además, una descompensación en la relación de las distintas subpoblaciones de NK puede tener una relación directa con AR (Shigeru et al., 2008).

Respecto a la citotoxicidad, las células pNK de pacientes con FIR presentan una mayor proporción del fenotipo $CD56^{dim}$ y expresan los marcadores de superficie CD69, CD94 y CD161 en mayor medida que en pacientes control (Sfakianoudis et al., 2021). Las células uNK en FRR se caracterizan por tener un fenotipo $CD56^{dim} CD16^{+}$, por lo tanto, la pérdida de embarazo puede estar causada por la actividad citotóxica más intensa (Sfakianoudis et al., 2021). Por otro lado, la elevación de la proporción de las células NKT en sangre se ha relacionado con las citocinas proinflamatorias y FRR (Khalaf et al., 2021).

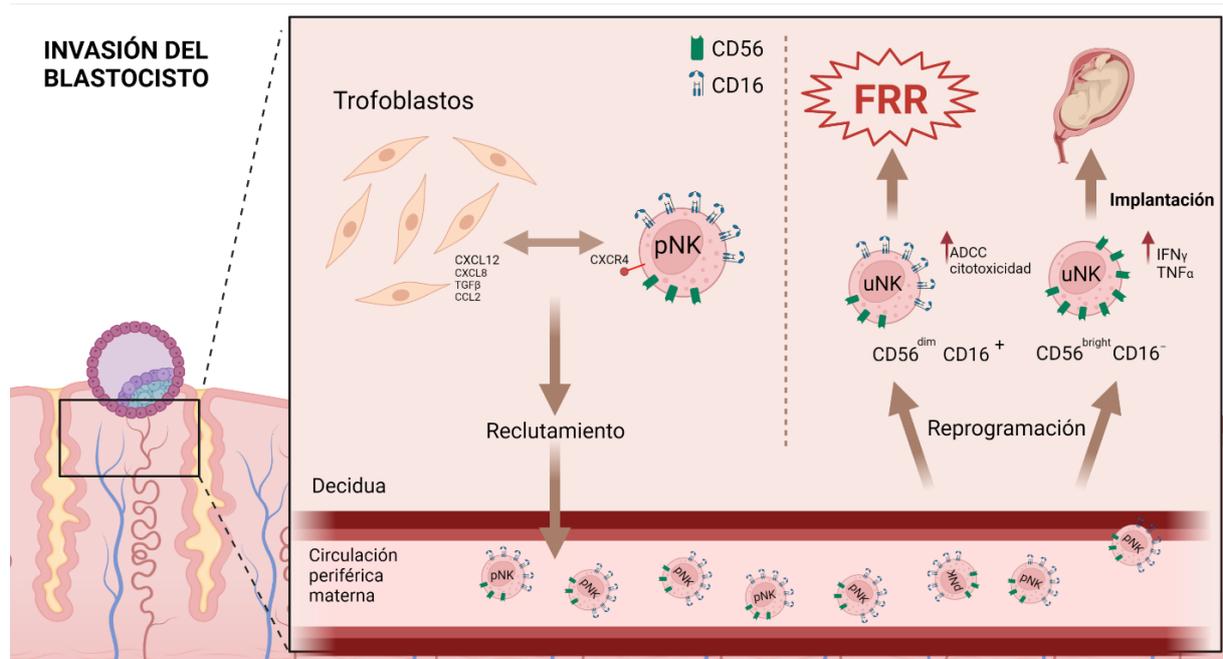


Figura 1. Representación gráfica de la invasión del blastocisto y la estimulación del reclutamiento y reprogramación de las células pNK. Las células del trofoblasto, mediante la secreción de CXCL12, atraen a las células pNK que expresan CXCR4 e inducen su reprogramación a células uNK. La reprogramación conlleva que las uNK realicen sus funciones, favorecen la invasión del trofoblasto y la remodelación de las arterias espirales, con un perfil más inmunomodulador. Un desajuste de las poblaciones de uNK, con mayor presencia de $CD56^{dim}CD16^{+}$ puede provocar FRR. Adaptación de (Tao et al., 2021). Creado con BioRender.com.

COMPARACIÓN DE MÉTODOS FUNCIONALES DE MEDICIÓN DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS NK

En general, las células NK pueden ser activadas por una disminución de la expresión de HLA-I en la superficie de la célula diana, lo que reduce las señales inhibitorias recibidas a través de los receptores KIR;

por el reconocimiento de moléculas expresadas en células anormales reconocidas por los NCR; por células que presentan anticuerpos IgG unidos a su membrana plasmática, mediante ADCC (por CD16) o, también, puede ser dependiente de contacto, donde participan receptores como NKp30, TRAIL y CD94-NKG2A (Kirwan & Burshtyn, 2007; Poli et al., 2009). Sin embargo, para que las NK se activen se requieren al menos dos señales provenientes de los diferentes receptores que expresan. No solo basta la disminución en la expresión de HLA-I para inducir su activación, será necesaria alguna señal de otro receptor (Kirwan & Burshtyn, 2007). Para llevar a cabo su actividad lítica y destruir la célula diana, las células NK deben formar una conexión muy estrecha con la diana para evitar el daño a otras células circundantes, esta región recibe el nombre de sinapsis inmunológica. En un primer momento se produce el reconocimiento de la diana y se inicia la unión mediante receptores y moléculas de adhesión de la membrana, como CD2, para llevar a cabo una activación precisa y dirigida de los orgánulos citolíticos. En los linfocitos citotóxicos, los gránulos líticos son lisosomas secretores que contienen un núcleo denso que incluye varias proteínas que participan en la función citotóxica (perforina, granzimas, etc.). Los receptores KIR junto con el grupo inhibidor supramolecular (sMIC) son los que evitan el reclutamiento de receptores activadores e impiden la citólisis (Bryceson et al., 2005; Orange, 2008).

Una vez que se ha producido la activación, al integrar las señales de los receptores activadores e inhibidores en la superficie de las NK, se movilizan los gránulos citoplasmáticos de su interior hacia la sinapsis inmunológica para inducir la muerte de la célula diana (Orange, 2008). Estos lisosomas están rodeados por una bicapa lipídica que contiene glicoproteínas de membrana asociadas a lisosomas (LAMP) y ligando Fas. En la superficie de estos gránulos citolíticos (lisosomas) se encuentra la proteína 1 de membrana asociada a lisosomas (LAMP-1 o CD107a), que actúa como un marcador de exocitosis de gránulos citolíticos en las células NK. La expresión de esta proteína de membrana (CD107a) marca la desgranulación en las células NK y se correlaciona con la secreción de citocinas y la lisis de la célula diana (Alter et al., 2004; Bryceson et al., 2005).

Marcaje con yoduro de propidio

El yoduro de propidio (PI) es un agente intercalante con propiedades de fluorescencia muy útil para el marcaje celular. Anteriormente, en el laboratorio de Inmunología, se utilizaba para marcar las líneas celulares, pero ya no se utiliza por ser un agente potencialmente tóxico y cancerígeno. Las células K562 se cultivan con PI para evaluar la viabilidad y citotoxicidad mediante citometría de flujo, se utiliza para evaluar la permeabilidad de las membranas puesto que las células devuelven fluorescencia roja cuando la membrana pierde su integridad (Feehan et al., 2022).

Desgranulación CD107a

Una vez que se ha producido la activación, al integrar las señales de los receptores activadores e inhibidores en la superficie de las NK, se movilizan los gránulos citoplasmáticos de su interior hacia la sinapsis

inmunológica para inducir la muerte de la célula diana (Orange, 2008), (Figura 2). Estos lisosomas están rodeados por una bicapa lipídica que contiene glicoproteínas de membrana asociadas a lisosomas (LAMP) y ligando Fas. En la superficie de estos gránulos citolíticos (lisosomas) se encuentra la proteína 1 de membrana asociada a lisosomas (LAMP-1 o CD107a), que actúa como un marcador de exocitosis de gránulos citolíticos en las células NK. La expresión de esta proteína de membrana (CD107a) marca la desgranulación en las células NK en reposo y se correlaciona con la secreción de citocinas y la lisis de la célula diana por parte de las mismas (Alter et al., 2004; Bryceson et al., 2005). Además, su expresión superficial es mayor en células transformadas de alto potencial metastásico y células embrionarias (Bryceson et al., 2005). La desgranulación por parte de las células T citotóxicas da como resultado la aparición de CD107a (LAMP-1) en la superficie celular y el agotamiento de la perforina intracelular (Bryceson et al., 2005; Cohnen et al., 2013).

La desgranulación es necesaria para la citotoxicidad natural inducida en las células NK en reposo y la citotoxicidad dependiente del receptor Fc (Cohnen et al., 2013). CD107a, aunque se internaliza una vez llevada a cabo la liberación de los orgánulos citolíticos, es un buen marcador, mediante su tinción, para comprobar que las células NK han sufrido desgranulación, y, por tanto, medir su funcionalidad (Alter et al., 2004).

Citotoxicidad NK: Desgranulación CD107a

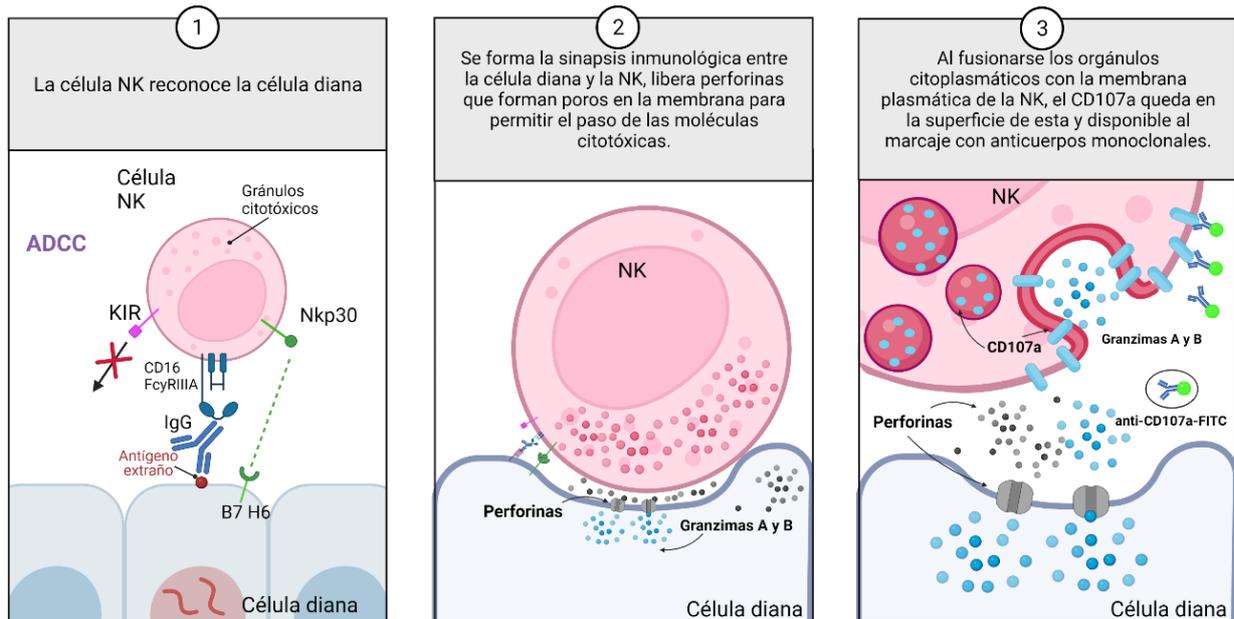


Figura 2. Representación esquemática de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos en la que participa el receptor CD16 (FcyRIIIA) uniéndose a la región Fc de la Inmunoglobulina G unida al antígeno (1). La activación se lleva a cabo si el receptor KIR de la NK no detecta al MHC de clase I de la célula diana, bien por carecer de éste o por la baja expresión del mismo. Si el receptor KIR interacciona con MHC se inhibe la activación de la NK como mecanismo protector mientras que el receptor NKp30 al unirse a B7H6 complementa el proceso de activación de la NK. (2) Una

vez unidas NK y diana se comienzan a polarizar los orgánulos internos de la NK hacia la zona de contacto con la célula diana. Estos orgánulos que llevan en su superficie la proteína CD107a, al fusionarse con la membrana plasmática de la NK liberan las perforinas y granzimas hacia la célula diana, en un evento de citotoxicidad dirigida y CD107a queda ligado a la membrana plasmática de la NK. (3) Las perforinas forman agregados en la superficie celular de la diana y forman poros, permitiendo la permeabilización de la membrana, a través de los cuales van a circular las granzimas. Mediante el marcaje del anticuerpo anti-CD107a-FITC se puede evaluar la desgranulación de las NK y, por tanto, su funcionalidad y capacidad citotóxica. Imagen creada con BioRender.com.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Se evaluaron 131 mujeres no embarazadas con fallo reproductivo recurrente, 94 de ellas cumplían los criterios diagnósticos de AR y 37 de FIR, procedentes de la Unidad de Patología Gravídica el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV) entre noviembre de 2017 y abril de 2022. A todas ellas se les realizó un examen completo que incluía parámetros clínicos y de laboratorio, como parte de la práctica clínica habitual.

Parámetros de estudio clínicos y demográficos

Se evaluaron los siguientes parámetros clínicos: porcentaje y número absoluto de células NK (pNK, NK total) y de células NKT (pNKT, NKTtotal), citotoxicidad de células NK, anticuerpos antifosfolípido (anticuerpos anti-cardiolipina IgG e IgM y anticuerpos anti- β 2 glicoproteína I, IgG e IgM), anticuerpos anti-tiroideos (ACAT), dentro de los cuales se evaluaron los anticuerpos anti-tiroglobulina (TG) y anticuerpos anti-peroxidasa (TPO), anticuerpos antinucleares (ANA), factores del complemento C3 y C4, inmunoglobulinas totales (IgG, IgA y IgM, hormona estimulante tiroidea (TSH), tiroxina (T4) y niveles de vitamina D (Vit D).

Los parámetros demográficos recogidos incluyen la historia obstétrica de la paciente, índice de masa corporal (IMC), edad y hábito tabáquico.

Evaluación de la citotoxicidad de células NK

Para garantizar la esterilidad del proceso, éste se realiza en campana de extracción de flujo laminar. El protocolo se realiza en dos días consecutivos para respetar los tiempos de incubación de las células.

Instrumentación

- Campana de flujo laminar (Telstar).
- Centrífuga 5810R (Eppendorf)

- Estufa de incubación a 37°C con 5% de CO₂ (Thermo Scientific).
- Citómetro de flujo Navios EX (Beckmann Coulter).
- Microscopio
- Cámara de Neubauer

Materiales

- Pipetas Pasteur estériles
- Pipetas (Thermo Scientific) 0´5-10µl, 5-50µl, 20-200µl, 100-1000µl
- Puntas pipetas
- Tubos 15ml estériles (Falcon™)
- Tubos 50 ml estériles (Falcon™)
- Frasco estéril de cultivo 25ml (T25 Flask, Thermo Fisher Scientific)
- Tubos de citometría

Líneas celulares

Línea celular K562 (ATCC, CCL-243): línea celular derivada de un paciente con leucemia mieloide crónica. La línea celular K-562 se usa ampliamente como un objetivo *in vitro* altamente sensible para el ensayo funcional de células NK.

Línea celular P815 (ATCC, TIB-64): línea celular de mastocitoma de ratón utilizada como células diana para las células NK de los pacientes. Tienen una activación permanente del receptor c-kit como cinasa, no necesitando factor de crecimiento de células germinales (SCF) para su desarrollo celular ni para su supervivencia.

Anticuerpos monoclonales

En la tabla 1 se especifican los anticuerpos utilizados para el marcaje de las células NK en la prueba funcional de citotoxicidad.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en la prueba funcional de citotoxicidad de células NK. Se muestra los clones, el isotipo y la casa comercial de los anticuerpos empleados.

Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Isotipo	Casa comercial
CD3	EDC	UCHT1	IgG1	Beckman Coulter
CD16	-	3G8	IgG1	Beckman Coulter
CD56	PE	N901	IgG1	Beckman Coulter
CD107a	FITC	H4A3	IgG1	Biolegend

Métodos

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Se han aislado células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) a partir de sangre anticoagulada con heparina de sodio en 131 mujeres.

En la primera parte del protocolo se procede a aislar las células mononucleares (PBMCs) de las pacientes mediante un gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque. Brevemente, se añaden 4mL de sangre de la paciente utilizando una pipeta Pasteur estéril sobre 2 mL de Ficoll en un tubo Falcon™ de 15 mL, sin mezclar ambas fases, y se centrifuga a 1500 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente, sin freno. Una vez centrifugada la muestra, se aprecian cuatro bandas de abajo hacia arriba: eritrocitos (granulocitos), Ficoll, células mononucleares (linfocitos y monocitos) y plasma. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se recoge la banda de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y se transfieren a un nuevo tubo Falcon™ de 15mL. Para lavar la muestra se añaden 3mL de medio PBS y se centrifuga de nuevo a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C para, posteriormente, eliminar el sobrenadante.

Cultivo y preparación de la muestra de PBMCs

Se añaden 8ml de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) al Falcon con las PBMC tras eliminar el sobrenadante y se transfiere a un frasco estéril de cultivo de 25ml (T25 Flask, Thermo Fisher Scientific). El frasco de cultivo se incuba a 37°C y 5% CO₂ durante 24 horas.

Las células K562 se mantienen en cultivo en un frasco T25 con medio de cultivo específico para este tipo de líneas celulares de alta densidad, medio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, ATCC, 30-2005) en estufa a 37°C y 5% CO₂. El medio de cultivo es sustituido cada dos días para mantener el cultivo de forma óptima.

En el segundo día de protocolo, coger el frasco de cultivo con las PBMCs del paciente del incubador y, con ayuda de una pipeta Pasteur se recoge todo el contenido para pasarlo a un tubo Falcon™ de 15mL.

Las poblaciones de K562 en cultivo se trasladan a otro tubo Falcon™ y se enrasa con medio IMDM hasta obtener el mismo volumen que el tubo con PBMCs del paciente. Se centrifugan ambos tubos a 1500rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet con el medio de cultivo correspondiente, RPMI para las PBMC y IMDM para las K562., hasta alcanzar un volumen final de 1 mL.

Recuento celular y viabilidad

EL conteo tanto de las PBMC de la paciente como de las K562 se realiza con cámara de Neubauer utilizando una dilución inicial 1:20 en un tubo Eppendorf™ (10 µL de muestra + 190 µL de ISOFLOW™).

Se recogen 10 µL de la dilución 1:20 de la muestra y se añade a la cámara de Neubauer 40x, se realiza el recuento de al menos dos cuadrantes en diagonal y se calcula el número de células por ml que tenemos en el Falcon™.

$$N^{\circ} \text{ células/ml} = \frac{N^{\circ} \text{ cél. observadas} \cdot 10^4 \cdot \text{Factor de dilución}}{N^{\circ} \text{ cuadrantes}}$$

$$N^{\circ} \text{ células/ml} = \frac{N^{\circ} \text{ cél. observadas} \cdot 10^4 \cdot 20}{N^{\circ} \text{ cuadrantes}}$$

Se necesitan 1 x10⁶células/mL, tanto de las PCMC, de las K562 como de las P815, de manera que, según lo obtenido en el recuento, debemos diluir para ajustar la concentración y pasar al siguiente paso.

Tras la obtención de la concentración final de 1 x10⁶células/ml se procede a dispensar las células en tubos estériles (Falcon™) siguiendo las siguientes condiciones:

Medio RPMI	K562	P815	CD16 Puro
100µL medio + 100µL muestra	100µL K562 + 100µL muestra	100µL P815 + 100µL muestra	2µL CD16 puro + 100µL P815 + 100µL muestra

Centrifugar los tubos a 500rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Incubación durante 2 horas en estufa a 37°C y 5% CO₂.

Tras las dos horas de incubación, se prepara una mix de los anticuerpos de superficie que se van a utilizar en el marcaje: CD3 ECD (1µL), CD56 PE (1 µL), CD107aFITC (1µL) por tubo con la solución de dilución (PBS+5%FBS+2µL EDTA).

Se extraen los tubos de la estufa y se añade 50µL del mix de anticuerpos en cada uno de los tubos. Se incuban durante 30 minutos a 4°C (nevera) en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se centrifugan los tubos a 2000rpm durante 3 minutos a 4°C. Se decanta el sobrenadante y se añaden 100µL de solución de tinción a cada pocillo.

Finalmente, los tubos se pasan por el citómetro Navios EX (Beckman Coulter, CA, USA) de tres láser (azul, rojo y violeta).

Citometría de flujo

La citometría de flujo es una tecnología que permite analizar células o partículas en una suspensión celular que circula por el sistema de fluidos del citómetro hasta la cámara de flujo donde se irán disponiendo en fila hasta el punto donde incide el láser. En un primer momento el detector de tamaño capta la dispersión frontal del láser y el detector de complejidad situado a 90° detecta la señal desviada por las partículas intracelulares, obteniéndose así los parámetros de tamaño y complejidad de las células. Además, añadiendo anticuerpos monoclonales conjugados a distintos fluorocromos permite detectar antígenos específicos tanto en el interior celular como en su superficie. Cuando el láser incide en las células marcadas con los anticuerpos los fluorocromos se excitan a su paso emitiendo una longitud de onda mayor que va a ser detectada. Dentro del instrumento tenemos un sistema óptico compuesto por distintos filtros y espejos que dirigen las distintas longitudes de onda hacia detectores específicos de esa longitud de onda. Todas las señales recogidas serán interpretadas por un sistema electrónico y se pueden visualizar en el software del citómetro para posteriormente analizar los resultados como se puede ver en la Figura 3.

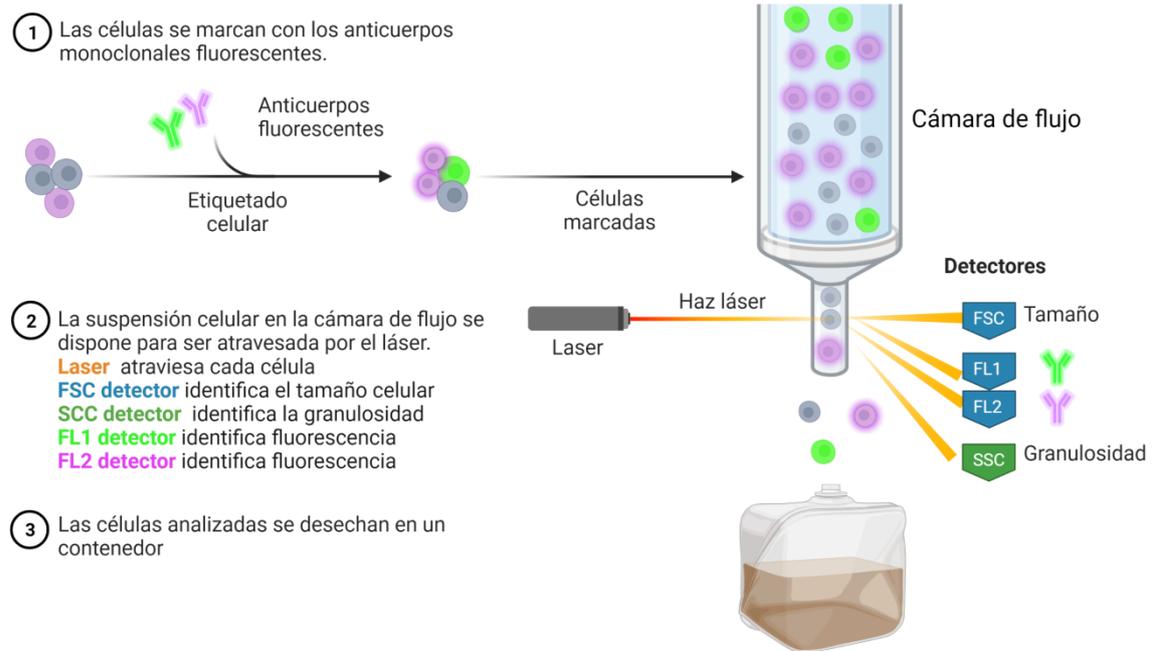


Figura 3. Representación gráfica de la técnica de la citometría de flujo llevada a cabo para el análisis de células NK marcadas con anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes fluorocromos. Creado y adaptado de BioRender.com.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha realizado utilizando el software SPSS (versión 24.0, SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU). Los datos descriptivos se presentan como mediana y rango intercuartílico (IQR) cuando los datos no siguen una distribución normal y como media \pm desviación estándar cuando siguen una distribución normal. La normalidad de la distribución de los valores de los datos se evaluó con la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Los datos no paramétricos se analizaron utilizando el test U de Mann-Whitney, y para datos paramétricos, prueba t de Student, con la corrección de Welch. La prueba Chi cuadrado se ha utilizado para el análisis de las variables cualitativas. La significación estadística se determinó como $p < 0,05$.

RESULTADOS

Características demográficas y obstétricas de los pacientes AR y FIR

Los datos demográficos y obstétricos recogidos se encuentran: edad, índice de masa corporal (IMC), hábito tabáquico e historia obstétrica. Las características demográficas de las pacientes se muestran en la Tabla 2. No se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la edad y el IMC, entre ambas patologías. Las pacientes AR han sufrido significativamente ($p < 0,001$) un mayor número de abortos que los pacientes FIR

($2,89 \pm 1,59$ vs $0,09 \pm 0,28$, respectivamente) mientras que las pacientes FIR experimentaron un mayor número de ciclos de FIV ($p < 0,001$).

Tabla 2. Características demográficas de las pacientes AR y FIR. Los datos se representan como media \pm desviación estándar y frecuencia (%), según corresponda. Las pruebas estadísticas utilizadas son t de Student para datos paramétricos y Chi cuadrado para variables cualitativas.

	FRR n=131		P valor
	AR n=94	FIR n=37	
Edad	$36,91 \pm 3,98$	$36,73 \pm 3,41$	0,804
IMC	$25,07 \pm 4,06$	$24,04 \pm 4,65$	0,225
N_abortos	$2,89 \pm 1,59$	$0,09 \pm 0,28$	$< 0,001$
N_FIV	$0,82 \pm 1,01$	$2,28 \pm 0,94$	$< 0,001$
Tabaquismo ^a	12 (12,76)	6 (16,21)	0,559

. a- Expresado en número absoluto y el porcentaje entre paréntesis.

Parámetros de laboratorio en pacientes AR y FI

Los parámetros de laboratorio incluidos en el estudio se detallan en la Tabla 3, clasificándose en:

- Inmunológicos: Porcentaje y valor absoluto de NK y NKT (pNK, NKtotal, pNKT y NKTtotal); citotoxicidad de NK (CitotoxicidadNK); niveles de complemento C3 y C4 (C3, C4); inmunoglobulinas (Ig) IgG, IgA e IgM; anticuerpos antifosfolípidos (anticuerpos anti-cardiolipina (IgG e IgM) y anticuerpos anti- $\beta 2$ glicoproteína I (IgG e IgM); anticuerpos antitiroideos (anti-tiroperoxidasa y anti-tiroglobulina) y anticuerpos antinucleares (ANA).
- Bioquímicos: Vitamina D (VitD), hormona estimulante tiroidea (TSH) y hormona tiroxina (T4).

Los anticuerpos antifosfolípidos se representan como presencia o ausencia de síndrome antifosfolipídico (SAF), al igual que presencia o ausencia de enfermedad tiroidea autoinmune (AC_AT) y de ANA (Tabla 3).

No se han observado diferencias significativas en los parámetros de laboratorio recogidos entre los grupos de estudio (Tabla 3).

Tabla 3. Variables de laboratorio recogidas en las pacientes con AR y FIR. Los datos se representan como media \pm desviación estándar y frecuencia (%), según corresponda. Las pruebas estadísticas utilizadas son t de Student para datos paramétricos y Chi cuadrado para variables cualitativas.

Parámetros	Valores referencia	FRR n=131		Sig.
		AR n=94	FIR n=37	
Inmunológicos				
pNK	3,6-20	15,07 \pm 6,97	15,31 \pm 5,28	0,866
NKtotal		296,23 \pm 153,27	307,8 \pm 143,23	0,719
pNKT		5,20 \pm 3,99	4,68 \pm 2,26	0,500
NKTtotal		109,29 \pm 109,67	94,03 \pm 55,95	0,469
Citotoxicidad NK	16-52	16,96 \pm 11,59	14,31 \pm 16,34	0,403
C3	77-203	111,77 \pm 23,93	111,96 \pm 30,50	0,986
C4	7,7-50,5	22,53 \pm 5,33	24,63 \pm 8,75	0,412
IgG	734-1486	1035,78 \pm 200,50	1120,03 \pm 184,26	0,227
IgA	49-401	240,99 \pm 82,92	263,20 \pm 89,95	0,517
IgM	41-201	182,23 \pm 93,95	179,76 \pm 114,58	0,944
SAF ^a		13/61 (21,31)	1/16 (6,25)	0,118
AC_AT ^a		4/17 (23,53)	3/7 (42,86)	0,262
ANA ^a		5 (5,32)	1 (2,70)	0,489
Bioquímicos				
Vit D	20-50	24,86 \pm 9,59	26,05 \pm 7,27	0,631
TSH	0,55-4,78	1,96 \pm 2,17	1,78 \pm 1,13	0,751
T4	0,89-1,76	1,41 \pm 0,48	1,32 \pm 0,26	0,729

a- Expresado en número absoluto y el porcentaje entre paréntesis.

Estudio funcional de citotoxicidad células NK

En la Figura 4 se representa el análisis por citometría de flujo de la prueba funcional de citotoxicidad NK llevado a cabo en las pacientes del estudio.

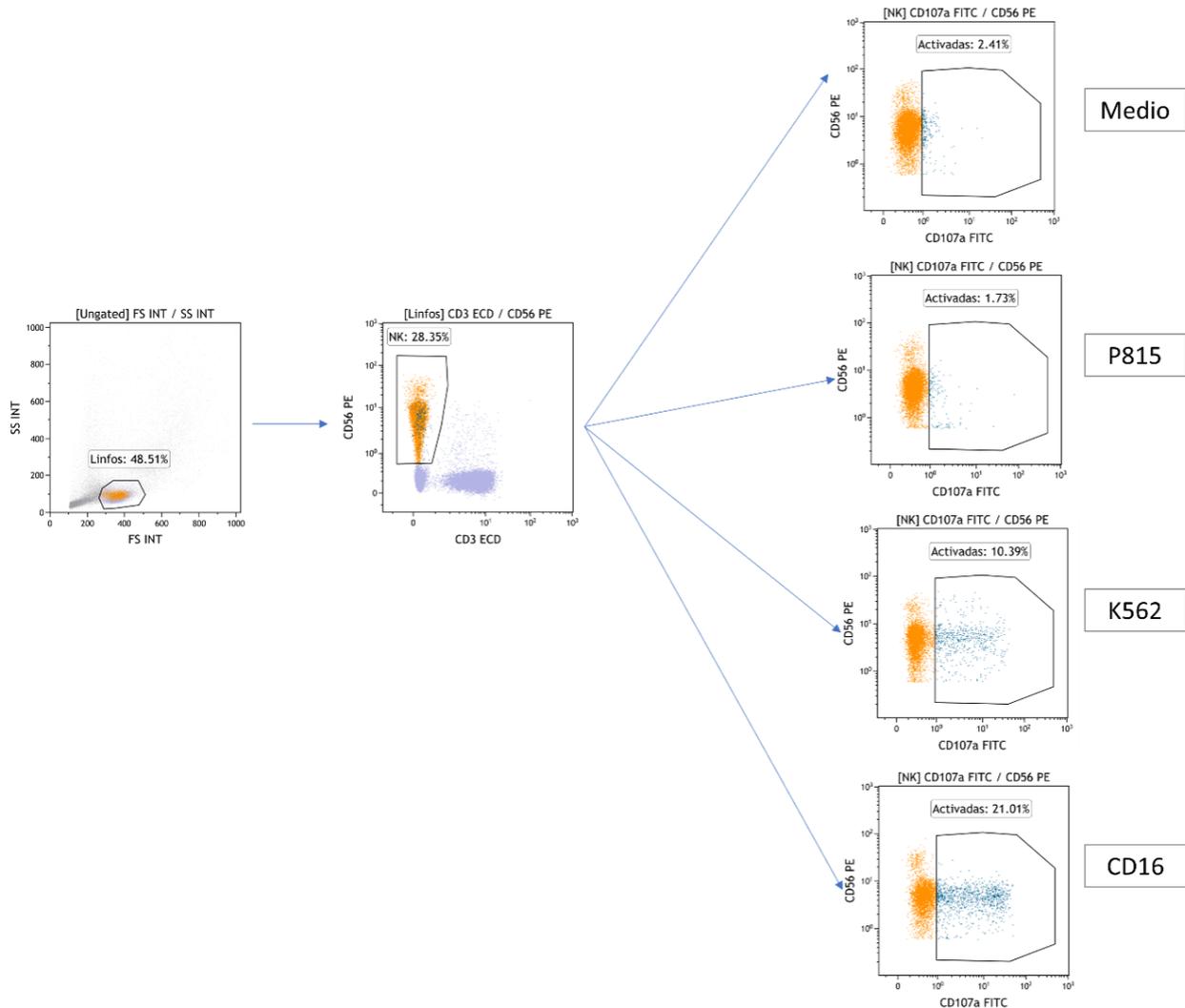


Figura 4. Dot plots que muestran el estudio funcional de citotoxicidad de células NK en una paciente con AR. En los ejes de abscisas y ordenadas aparecen los distintos marcadores que han sido utilizados para identificar las poblaciones celulares y en cada recuadro del dot plot se representa la población estudiada.

En la primera gráfica (izquierda) están representados los linfocitos presentes en la muestra de la paciente. Se han seleccionado mediante el parámetro SS (“Side Scatter”) que nos proporciona información sobre la granulosidad de las células y representa la luz que es reflejada por las estructuras internas o de superficie celulares, y el parámetro FS (“Forward Scatter”) que relaciona directamente la dispersión de la luz con el tamaño celular, por lo que nos informa sobre el tamaño relativo de las células, a mayor dispersión mayor tamaño.

Por lo que con la gráfica obtenida se observan gateados los linfocitos, que representan en esta paciente un 48,51% de la muestra. En la gráfica intermedia, dentro del recuadro están representadas las células NK (CD56+CD3-), representando el 28,35% de la muestra de linfocitos. En las gráficas de la derecha se representa el porcentaje de activación medido como expresión de CD107a (que nos indica desgranulación de los gránulos citoplasmáticos) en tres condiciones diferentes. En la gráfica superior derecha, se muestra el porcentaje de activación en la condición “Medio”, es decir, en aquella en la que únicamente se ha incluido

las células PBMC de la paciente y medio de cultivo RPMI, que sería nuestro control negativo (2,41%). En la siguiente gráfica se representa la activación en la condición “P815”, en la que tampoco se observa activación en forma de desgranulación ya que las células NK no son capaces de reconocerlas y atacarlas porque mantienen su expresión de moléculas de MHC de clase I (MHC-I) por lo que también actúan como un control negativo. En la siguiente gráfica se muestra la condición “K562” en la que se observa que la activación de las células NK es mayor que en las condiciones anteriores (10,39%) ya que las células NK reconocen estas células K562 como diana debido a que no expresan MHC-I, desencadenando la liberación de gránulos y destruyéndolas. Finalmente, en la gráfica “CD16” se representa el nivel de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos tras el marcaje con CD16 (21,01%).

DISCUSIÓN

El estudio comparativo de los parámetros inmunológicos entre pacientes con abortos de repetición (AR) y fallos de implantación (FIR) no ha reflejado diferencias significativas que puedan establecer un perfil inmunológico diferente entre estas dos patologías en nuestro grupo de estudio.

No se han observado diferencias significativas en cuanto a las variables demográficas estudiadas (edad, índice de masa corporal) entre ambas patologías. En el caso de las variables clínicas incluidas en la historia obstétrica tanto el número de abortos y el número de ciclos de FIV han sido estadísticamente significativos. En los criterios clasificatorios de SAF se incluyen los AR como criterio clasificatorio clínico. En cambio, en el caso de los fallos de implantación no están incluidos dentro de los criterios de SAF. En los últimos años se ha estudiado más extensamente si los anticuerpos antifosfolípidos podrían jugar un papel en esta patología. Un trabajo publicado recientemente (Jarne-Borràs et al., 2022) sugiere que la determinación de anticuerpos antifosfolípidos puede ser un indicador del riesgo de FIR en mujeres que se someten a técnicas de reproducción asistida. En nuestra cohorte, se observa un mayor porcentaje de mujeres dentro del grupo AR con SAF que en el grupo FIR, hecho que puede ser debido a que no se pide esta determinación en todas las pacientes FIR en el momento de la primera consulta. Además, los niveles de anticuerpos positivos aislados fueron con mayor frecuencia los pertenecientes a la clase de Inmunoglobulina M, tanto para cardiolipina como para β -2 glicoproteína. No se han encontrado diferencias significativas entre ambos grupos. Este hallazgo está en concordancia por lo descrito en trabajos previos que comparaban diferentes parámetros inmunológicos sin encontrar diferencias significativas en la presencia de SAF en ambas patologías (Vomstein et al., 2020).

Respecto a los anticuerpos antinucleares (ANA), Vomstein y colaboradores, observaron títulos de ANA más elevados en pacientes con AR que en pacientes FIR y, aunque su papel en estas patologías no está claro, proponen la hipótesis de que su presencia indica que un perfil inmunológico diferente entre ambas patologías debidas a una inducción de un estado inmunológico crónico de la madre al estar en contacto con células fetales en AR. En nuestro estudio, la frecuencia de pacientes ANA positivo fue mayor en el grupo AR (n=5, 5,32%) que en el FIR (n=1, 2,70%), sin encontrarse diferencias significativas entre ambos.

El análisis de los anticuerpos antitiroideos no reflejó diferencias significativas entre AR y FIR, sin embargo, los datos disponibles eran muy escasos debido a que en las pacientes con AR solamente 17 de las 94 pacientes tenían determinación de anticuerpos antitiroideos, siendo 4 de ellas positivas (23,53%) y en el caso de FIR, la determinación se realizó en 7 de las 37 pacientes, siendo en 3 pacientes el resultado positivo (42,86%). Según las últimas guías publicadas por la ESHRE, la evaluación de los anticuerpos antitiroideos está recomendada en pacientes con AR. (Bender-Atik, R. et al., ESHRE guideline: Recurrent pregnancy loss 2018). El resultado positivo de estos anticuerpos puede asociarse con valores elevados de TSH que puede ocasionar complicaciones durante el embarazo (Vomstein et al., 2020).

La población total de células NKT no presenta diferencias significativas entre ambas patologías. En estudios previos observaron un aumento en la población de células NKT que podría estar relacionado tanto con AR como FIR, como plantean en su hipótesis que estos niveles elevados están directamente relacionados con el FRR (Khalaf et al., 2021).

El objetivo principal de este trabajo es la evaluación de la citotoxicidad de las células NK en pacientes con FRR para estudiar si existe una diferencia entre AR y FIR, sin embargo, no se han observado diferencias significativas entre ambos grupos ($16,96 \pm 11,59$ y $14,31 \pm 16,34$; respectivamente).

Debido a la gran disparidad en los diversos estudios realizados en estas patologías reproductivas no hay conclusiones claramente establecidas que puedan atribuir que la interrupción del establecimiento de la implantación del embrión sea debido a un mecanismo molecular involucrado en el papel desempeñado por las células uNK. Es necesario establecer unos valores de referencia durante este periodo de implantación para las NK en AR y FIR, puesto que la desregulación de estas células en las diferentes etapas del embarazo puede ocasionar efectos diversos (Sfakianoudis et al., 2021).

BIBLIOGRAFÍA

1. Alter, G., Malenfant, J. M., & Altfeld, M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of Immunological Methods*, 294(1–2), 15–22. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2004.08.008>
2. Bender Atik, R., Christiansen, O. B., Elson, J., Kolte, A. M., Lewis, S., Middeldorp, S., Nelen, W., Peramo, B., Quenby, S., Vermeulen, N., & Goddijn, M. (2018). Eshre guideline: Recurrent pregnancy loss. *Human Reproduction Open*, 2018(2). <https://doi.org/10.1093/hropen/hoy004>
3. Bryceson, Y. T., March, M. E., Barber, D. F., Ljunggren, H. G., & Long, E. O. (2005). Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *Journal of Experimental Medicine*, 202(7), 1001–1012. <https://doi.org/10.1084/JEM.20051143>
4. Cimadomo, D., Craciunas, L., Vermeulen, N., Vomstein, K., & Toth, B. (2021). Definition, diagnostic and therapeutic options in recurrent implantation failure: an international survey of clinicians and embryologists. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 36(2), 305–317. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEAA317>
5. Clottu, A. S., Humbel, M., Fluder, N., Karampetsou, M. P., & Comte, D. (2021). Innate Lymphoid Cells in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.789788>
6. Cohnen, A., Chiang, S. C., Stojanovic, A., Schmidt, H., Claus, M., Saftig, P., Janßen, O., Cerwenka, A., Bryceson, Y. T., & Watzl, C. (2013). Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood*, 122(8), 1411–1418. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2012-07-441832>
7. Cooper, M. A., Fehniger, T. A., & Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*, 22(11), 633–640. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02060-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02060-9)
8. Eikmans, M., van der Zwan, A., Claas, F. H. J., van der Hoorn, M. L., & Heidt, S. (2020). Got your mother in a whirl: The role of maternal T cells and myeloid cells in pregnancy. *HLA*, 96(5), 561–579. <https://doi.org/10.1111/TAN.14055>
9. el Hachem, H., Crepaux, V., May-Panloup, P., Descamps, P., Legendre, G., & Bouet, P. E. (2017). Recurrent pregnancy loss: current perspectives. *International Journal of Women's Health*, 9, 331–345. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S100817>
10. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. (2012). *Fertility and Sterility*, 98(5), 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2012.06.048>
11. Feehan, D. D., Jamil, K., Polyak, M. J., Ogbomo, H., Hasell, M., Li, S. S., Xiang, R. F., Parkins, M., Trapani, J. A., Harrison, J. J., & Mody, C. H. (2022). Natural killer cells kill extracellular

- Pseudomonas aeruginosa* using contact-dependent release of granzymes B and H. *PLoS Pathogens*, 18(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1010325>
12. Garrido-Gimenez, C., & Alijotas-Reig, J. (2015). Recurrent miscarriage: causes, evaluation and management. *Postgraduate Medical Journal*, 91(1073), 151–162. <https://doi.org/10.1136/POSTGRADMEDJ-2014-132672>
 13. Grupo de Trabajo de Fracaso Reproductivo. (2019). Recomendaciones para el manejo del aborto recurrente (AR). *Sociedad Española de Fertilidad*.
 14. *Guía de Asistencia Práctica* Revista Oficial de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia*. (n.d.). <https://doi.org/10.20960/j.pog.00106>
 15. Guo, C., Cai, P., Jin, L., Sha, Q., Yu, Q., Zhang, W., Jiang, C., Liu, Q., Zong, D., Li, K., Fang, J., Lu, F., Wang, Y., Li, D., Lin, J., Li, L., Zeng, Z., Tong, X., Wei, H., & Qu, K. (2021). Single-cell profiling of the human decidual immune microenvironment in patients with recurrent pregnancy loss. *Cell Discovery* 2020 7:1, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00236-z>
 16. Hiby, S. E., Apps, R., Sharkey, A. M., Farrell, L. E., Gardner, L., Mulder, A., Claas, F. H., Walker, J. J., Redman, C. C., Morgan, L., Tower, C., Regan, L., Moore, G. E., Carrington, M., & Moffett, A. (2010). Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 4102. <https://doi.org/10.1172/JCI43998>
 17. Jabrane-Ferrat, N., & Siewiera, J. (2014). The up side of decidual natural killer cells: new developments in immunology of pregnancy. *Immunology*, 141(4), 490–497. <https://doi.org/10.1111/IMM.12218>
 18. Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K.-W., & Schmidt, R. E. (2001). CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *European Journal of Immunology*, 31(10), 3121–3126. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200110\)31:10<3121::AID-IMMU3121>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200110)31:10<3121::AID-IMMU3121>3.0.CO;2-4)
 19. Jarne-Borràs, M., Miró-Mur, F., Anunciación-Llunell, A., & Alijotas-Reig, J. (2022). Antiphospholipid antibodies in women with recurrent embryo implantation failure: A systematic review and meta-analysis. *Autoimmunity Reviews*, 21(6), 103101. <https://doi.org/10.1016/J.AUTREV.2022.103101>
 20. Jentho, E., & Weis, S. (2021). DAMPs and Innate Immune Training. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.699563>
 21. Khalaf, W. S., Mahmoud, M. R. A., Elkhatib, W. F., Hashem, H. R., & Soliman, W. E. (2021). Phenotypic characterization of NKT-like cells and evaluation of specifically related cytokines for the prediction of unexplained recurrent miscarriage. *Heliyon*, 7(11), e08409. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08409>

22. Khan, M., Arooj, S., & Wang, H. (2020). NK Cell-Based Immune Checkpoint Inhibition. *Frontiers in Immunology*, *11*, 167. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00167/BIBTEX>
23. Kirwan, S. E., & Burshtyn, D. N. (2007). Regulation of natural killer cell activity. *Current Opinion in Immunology*, *19*(1), 46–54. <https://doi.org/10.1016/J.COI.2006.11.012>
24. Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, *30*(1), 16–34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>
25. Li, J., Wang, L., Ding, J., Cheng, Y., Diao, L., Li, L., Zhang, Y., & Yin, T. (2022). Multiomics Studies Investigating Recurrent Pregnancy Loss: An Effective Tool for Mechanism Exploration. *Frontiers in Immunology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.826198>
26. Mahajan, D., Sharma, N. R., Kancharla, S., Kolli, P., Tripathy, A., Sharma, A. K., Singh, S., Kumar, S., Mohanty, A. K., & Jena, M. K. (2022). Role of Natural Killer Cells during Pregnancy and Related Complications. *Biomolecules*, *12*(1). <https://doi.org/10.3390/BIOM12010068>
27. Miller, D., Motomura, K., Garcia-Flores, V., Romero, R., & Gomez-Lopez, N. (2018). Innate lymphoid cells in the maternal and fetal compartments. *Frontiers in Immunology*, *9*(OCT). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.02396/FULL>
28. Miyakis, S., Lockshin, M. D., Atsumi, T., Branch, D. W., Brey, R. L., Cervera, R., Derkesen, R. H. W. M., de Groot, P. G., Koike, T., Meroni, P. L., Reber, G., Shoenfeld, Y., Tincani, A., Vlachoyiannopoulos, P. G., & Krilis, S. A. (2006). International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, *4*(2), 295–306. <https://doi.org/10.1111/J.1538-7836.2006.01753.X>
29. Mor, G., Aldo, P., & Alvero, A. B. (2017). The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nature Reviews. Immunology*, *17*(8), 469–482. <https://doi.org/10.1038/NRI.2017.64>
30. Moretta, L., & Moretta, A. (2004). Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *The EMBO Journal*, *23*(2), 255. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7600019>
31. Municio, C., & Criado, G. (2021). Therapies Targeting Trained Immune Cells in Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.631743>
32. Netea, M. G., Quintin, J., & van der Meer, J. W. M. (2011). Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host & Microbe*, *9*(5), 355–361. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2011.04.006>
33. Orange, J. S. (2008). Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nature Reviews Immunology* *2008 8:9*, *8*(9), 713–725. <https://doi.org/10.1038/nri2381>

34. Piekarska, K., Radwan, P., Tarnowska, A., Wiśniewski, A., Radwan, M., Wilczyński, J. R., Malinowski, A., & Nowak, I. (2021). ERAP, KIR, and HLA-C Profile in Recurrent Implantation Failure. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.755624/FULL>
35. Pillarisetty, L. S., & Mahdy, H. (2021). Recurrent Pregnancy Loss. *Evidence-Based Obstetrics and Gynecology*, 131–144. <https://doi.org/10.1002/9781119072980.ch13>
36. Poli, A., Michel, T., Thérésine, M., Andrès, E., Hentges, F., & Zimmer, J. (2009). CD56bright natural killer (NK) cells: An important NK cell subset. *Immunology*, 126(4), 458–465. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2567.2008.03027.X>
37. Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., Owen, J. A., & Kuby, J. (2020). *Kuby Inmunología*. (8ª Edición). Mc Graw Hill Panamericana.
38. SEGO Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. Estudio del fallo repetido de implantación y sus posibles alternativas terapéuticas (2017). *Prog Obstet Ginecol* 2018;61(3):297-311. DOI: 10.20960/j.pog.00106
39. Sfakianoudis, K., Rapani, A., Grigoriadis, S., Pantou, A., Maziotis, E., Kokkini, G., Tsirligkani, C., Bolaris, S., Nikolettos, K., Chronopoulou, M., Pantos, K., & Simopoulou, M. (2021). The Role of Uterine Natural Killer Cells on Recurrent Miscarriage and Recurrent Implantation Failure: From Pathophysiology to Treatment. *Biomedicines*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9101425>
40. Shigeru, S., Akitoshi, N., Subaru, M. H., & Shiozaki, A. (2008). The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*, 77(1), 14–22. <https://doi.org/10.1016/J.JRI.2007.04.007>
41. Subedi, N., Verhagen, L. P., Bosman, E. M., van Roessel, I., & Tel, J. (2022). Understanding natural killer cell biology from a single cell perspective. *Cellular Immunology*, 373, 104497. <https://doi.org/10.1016/J.CELLIMM.2022.104497>
42. Tao, Y., Li, Y., Zhang, D., Xu, L., Chen, J., Sang, Y., Piao, H., Jing, X., Yu, M., Fu, Q., Zhou, S., Li, D., & Du, M. (2021). Decidual CXCR4 + CD56 bright NK cells as a novel NK subset in maternal-foetal immune tolerance to alleviate early pregnancy failure. *Clinical and Translational Medicine*, 11(10). <https://doi.org/10.1002/CTM2.540>
43. Toth, B., Vomstein, K., Togawa, R., Böttcher, B., Hudalla, H., Strowitzki, T., Daniel, V., & Kuon, R. J. (2019). The impact of previous live births on peripheral and uterine natural killer cells in patients with recurrent miscarriage. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S12958-019-0514-7/TABLES/3>
44. Vacca, P., Vitale, C., Munari, E., Cassatella, M. A., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2018). Human innate lymphoid cells: Their functional and cellular interactions in decidua. *Frontiers in Immunology*, 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01897/FULL>

45. Vetrivcka, V., Sima, P., & Vannucci, L. (2021). Trained Immunity as an Adaptive Branch of Innate Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19). <https://doi.org/10.3390/IJMS221910684>
46. Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., di Santo, J. P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R. M., McKenzie, A. N. J., Mebius, R. E., Powrie, F., & Spits, H. (2018). Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*, 174(5), 1054–1066. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.07.017>
47. Vomstein, K., Voss, P., Molnar, K., Ainsworth, A., Daniel, V., Strowitzki, T., Toth, B., & Kuon, R. J. (2020). Two of a kind? Immunological and clinical risk factors differ between recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Journal of Reproductive Immunology*, 141. <https://doi.org/10.1016/J.JRI.2020.103166>
48. Yang, F., Zheng, Q., & Jin, L. (2019). Dynamic Function and Composition Changes of Immune Cells During Normal and Pathological Pregnancy at the Maternal-Fetal Interface. *Frontiers in Immunology*, 10, 2317. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02317>
49. Yang, Y., Day, J., Souza-Fonseca Guimaraes, F., Wicks, I. P., & Louis, C. (2021). Natural killer cells in inflammatory autoimmune diseases. *Clinical & Translational Immunology*, 10(2), e1250. <https://doi.org/10.1002/CTI2.1250>
50. Zhang, X., & Wei, H. (2021). Role of Decidual Natural Killer Cells in Human Pregnancy and Related Pregnancy Complications. *Frontiers in Immunology*, 12, 3421. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.728291/BIBTEX>