

## Determinación de células *natural killer* (NK CD56+CD16+) mediante anticuerpos monoclonales en el endometrio de pacientes con aborto recurrente de origen desconocido

Jesús Antonio López Navarrete,<sup>1</sup> Alonso Chávez Olivares,<sup>2</sup> Samuel Ríos Monzón,<sup>1</sup> Pedro Ramos Salazar,<sup>3</sup> Janeth Cubillo<sup>4</sup>

### RESUMEN

**Objetivo:** determinar la concentración de células *natural killer* (NK) CD56+CD16+ por medio de anticuerpos monoclonales en el endometrio de pacientes con aborto recurrente de origen desconocido.

**Pacientes y método:** estudio prospectivo, longitudinal y descriptivo que incluyó 20 pacientes con pérdida gestacional recurrente de origen desconocido, a quienes se realizó biopsia endometrial los días 21 a 26 del ciclo menstrual para evaluar la concentración de células NK CD56+CD16+ por medio de anticuerpos monoclonales. Los resultados se compararon con estándares normales reportados en biopsias de mujeres fértiles. El análisis estadístico incluyó medidas de tendencia central, media y proporciones.

**Resultados:** de 20 pacientes estudiadas, en ocho (40%) se encontró elevación de células NK; en tres (15%) las concentraciones eran altamente positivas y en 12 (60%) eran normales.

**Conclusiones:** este estudio proporciona información esencial de la importancia y frecuencia de las células NK CD56+CD16+ en pacientes con pérdida recurrente de la gestación de origen desconocido, ya que a la luz de los conocimientos actuales se sabe que juegan un papel clave en el proceso del aborto. En este trabajo, se encontró que 40% de las mujeres con pérdida recurrente de la gestación tenían, en mayor o menor grado, estas células en el endometrio.

**Palabras clave:** células NK, endometrio, aborto recurrente, infertilidad, gestacional.

### ABSTRACT

**Objective:** To determine concentrations of natural killer (NK) cells CD56+CD16+ by monoclonal antibodies in the endometrium of patients with unexplained recurrent abortion.

**Patients and method:** A prospective, longitudinal and descriptive study was done in which 20 patients with recurrent pregnancy loss of unknown origin were included. Endometrial biopsy was performed on day 21 to 26 of the menstrual cycle to assess the concentration of NK cells CD56+CD16+ by monoclonal antibodies. The results were compared with normal standards biopsies reported in fertile women. Statistical analysis included measures of central tendency, mean and proportions.

**Results:** Of 20 patients studied, 8 (40%) had elevated NK cells. In 3 (15%) levels were highly positive. In 12 (60%) levels were normal.

**Conclusions:** This study provides essential information about the importance and frequency of NK cells CD56+16+ in patients with recurrent pregnancy loss of unknown origin, and that in light of current knowledge are known to play a key role in the process of abortion. In this study we found that 40% of women with recurrent pregnancy loss had, in greater or lesser degree, these endometrial cells level.

**Key words:** NK cells, endometrium, recurrent abortion, infertility, gestational.

<sup>1</sup> Ginecología y obstetricia, Biomedicina reproductiva.

<sup>2</sup> Embriología y genética reproductiva.

<sup>3</sup> Centro Mexicano de Fertilidad, Culiacán, Sinaloa (CEMEF).

<sup>4</sup> Médico citopatólogo.

<sup>4</sup> Inmunología de la reproducción. Asociados en Reproducción Humana, Bogotá, Colombia, Sudamérica.

Hospital de Especialidades núm. 1, Centro Médico Nacional del Noroeste, IMSS. Laboratorio Ramos, Ciudad Obregón, Sonora.

Correspondencia: Dr. Jesús Antonio López Navarrete. Blvd. Anaya 2136-A, colonia Prolongación Chapultepec, CP 80040, Culiacán, Sinaloa, México.

Correo electrónico: jalnmx@gmail.com

Recibido: junio 2013.

Aceptado: agosto 2013.

Este artículo debe citarse como: López-Navarrete JA, Chávez-Olivares A, Ríos-Monzón S, Ramos-Salazar P, Cubillo J. Determinación de células *natural killer* (NK CD56+CD16+) mediante anticuerpos monoclonales en el endometrio de pacientes con aborto recurrente de origen desconocido. Reproducción (México) 2013;6:3-8.

[www.nietoeditores.com.mx](http://www.nietoeditores.com.mx)

La pérdida recurrente de la gestación es uno de los eventos obstétricos más impactantes para la pareja desde el punto de vista psicológico y funcional, sobre todo cuando no hay una explicación clara y precisa de la causa real.<sup>1,2</sup> El aborto espontáneo puede ocurrir en 10 a 20% de todos los embarazos.<sup>3</sup> Su origen muchas veces es incierto y es probable que sea diverso. Se han implicado factores genéticos, anatómicos, endocrinos e infecciosos, pero en una gran proporción de los casos la causa es desconocida.<sup>4,5</sup>

La paciente típica con pérdida recurrente de la gestación de origen desconocido tiene, en promedio, 36 a 38 años de edad, ha sufrido dos o más pérdidas consecutivas tempranas y está cerca del final de su vida reproductiva. Normalmente acuden en busca de una opinión profesional que les ayude a entender su problema, ya que la mayor parte de sus estudios ha arrojado resultados normales. Las alteraciones del sistema inmunitario son la causa de 60% de los abortos recurrentes de origen incierto o desconocido.<sup>6,7</sup>

En varios estudios se ha demostrado que estas pacientes tienen elevados números de células NK y de su actividad en la periferia<sup>8-11</sup> y en el endometrio.<sup>12,13</sup>

Los estudios en este campo demuestran que las células NK pueden jugar un papel clave en el embarazo. El bloqueo de estas células aumenta los embarazos y su estimulación resulta en tasas reducidas de gestación.<sup>14,15</sup> Se ha demostrado un incremento de células NK en el estroma endometrial a finales de la etapa lútea del ciclo menstrual, y un aumento adicional en el embarazo temprano.<sup>16</sup> Se distinguen, principalmente, por contener gran cantidad de gránulos eosinófilos en el citoplasma; se han llamado linfocitos eosinófilos granulares o EGL por sus siglas en inglés.<sup>16,17</sup> Estas células expresan en su membrana un fenotipo inusual llamado CD56, pero no los fenotipos CD57 y CD16 clásicos de las células NK periféricas.<sup>18-21</sup>

El incremento de los linfocitos eosinófilos granulares en los últimos días de la fase secretora y el embarazo temprano sugiere su participación en el embarazo normal; sin embargo, su fenotipo antigénico y granularidad citoplasmática han dado pie a la posibilidad de que sean un tipo especial de células NK.

Las células NK tienen funciones diversas. Aparte de matar directamente células blanco extrañas, pueden pro-

ducir citocinas que estimulan o activan a otras células del sistema inmunitario. Una de estas citocinas se designa factor de necrosis tumoral (TNF); es una molécula de quimioterapia que está implicada en la eliminación de células cancerosas.<sup>22</sup>

Las células NK poseen en su membrana celular moléculas de adhesión o antígenos de superficie llamados CD (del inglés *cluster of differentiation*) que permiten tipificarlas.<sup>23,24</sup>

Las células NK producidas localmente en la decidua uterina carecen de la molécula CD16 (CD56+CD16-) y, al parecer, no son embriotóxicas. Si por alguna razón estas moléculas se activan (CD56+CD16+) localmente, destruyen las células placentarias y las células fetales, ya que generan grandes cantidades de TNF, y es frecuente que estén elevadas en mujeres con infertilidad y aborto recurrente.<sup>25</sup>

En diversos estudios se ha demostrado un incremento de células NK CD56+CD16+ en pacientes con aborto recurrente de causa desconocida.<sup>26-28</sup>

Estas células pueden identificarse tratando el tejido decidual con anticuerpos monoclonales específicos especiales para marcado CD56+CD16+, y también pueden contarse y evaluarse por medio de citometría de flujo.<sup>29-32</sup>

El origen de las células NK CD56+CD16+ y otros subtipos como CD57+ no está bien definido, se piensa que provienen de la sangre materna; sin embargo, independientemente de su origen, se sabe que su existencia en el endometrio es indeseable y nociva para la implantación embrionaria, ya que estas células normalmente no se observan en úteros de mujeres fértiles.<sup>33</sup>

Las mujeres con alto riesgo de tener títulos elevados de células NK CD56+CD16+ en el tejido uterino son:

1. Mujeres con padecimientos autoinmunitarios, como: fibromialgias, lupus, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, tiroiditis, síndrome de fatiga crónica, enfermedad de Raynaud, enfermedad mixta del tejido conectivo y colitis ulcerosa.
2. Mujeres infértiles con endometriosis.
3. Mujeres con abortos espontáneos recurrentes.
4. Mujeres con falla en los programas de fertilización *in vitro*.
5. Mujeres con datos de inflamación pélvica crónica que experimentan dolor punzante intenso

durante una inseminación o transferencia embrionaria.<sup>6</sup>

Toda mujer con alguno de estos antecedentes, con dos o más pérdidas consecutivas de la gestación o con falla en los programas de fertilización *in vitro* debe ser evaluada desde el punto de vista inmunológico.

Deberán realizarse los siguientes estudios para investigar la causa de la pérdida gestacional recurrente.

#### Perfil inmunológico reproductivo

1. Detección de anticuerpos antifosfolípidicos.
2. Detección de anticuerpos antinucleares.
3. Detección de anticoagulante lúpico.
4. Detección de anticuerpos antiespermatozoides.
5. Detección de anticuerpos contra leucocitos paternos.
6. Titulación de células NK en sangre.
7. Biopsia endometrial para titulación de células NK CD56+CD16+ y CD57.

La inmunoterapia reproductiva está indicada en mujeres en quienes se detecta un problema inmunológico.

El objetivo de este estudio fue evaluar la concentración de células NK CD56+CD6+ en el tejido endometrial de pacientes con pérdida recurrente de la gestación.

## PACIENTES Y MÉTODO

Estudio prospectivo, longitudinal y descriptivo efectuado en los departamentos de Biología de la Reproducción e Inmunología Reproductiva del Centro Mexicano de Fertilidad (CEMEF), en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México, de enero de 2009 a enero de 2012. Se incluyeron 20 pacientes con diagnóstico de pérdida gestacional recurrente de origen desconocido.

La pérdida recurrente de la gestación de origen desconocido se definió como la pérdida de dos o más embarazos cuya causa no pudo determinarse por medio de estudios previos, como: análisis citogenético, ultrasonido pélvico, perfiles hormonales y detección de infecciones.<sup>34</sup>

Se excluyeron las pacientes mayores de 40 años y quienes tenían escasa reserva ovárica, definida como una concentración de hormona foliculo-estimulante mayor de 12 mUI/mL en el tercer día del ciclo menstrual.

Se hizo un perfil inmunológico reproductivo a todas las pacientes, que incluyó detección de: anticuerpos antifosfolípidicos, anticuerpos antinucleares, anticoagulante lúpico, anticuerpos antiespermatozoides y anticuerpos contra leucocitos paternos. Titulación de células NK en sangre y biopsia endometrial para titulación de células NK.

#### Biopsia endometrial

En todos los casos se realizó una biopsia endometrial en la etapa lútea tardía. El autor principal llevó a cabo todos los procedimientos. La muestra de tejido se tomó a través de una cánula estéril y desechable de 4 mm para aspiración manual endouterina (kit de AMEU) en los días 21 a 26 del ciclo menstrual. Para hacerlo, se introduce la cánula dentro de la cavidad uterina, se aspira el tejido endometrial y se deposita en un tubo estéril que contiene formol amortiguado al 10% con solución fisiológica y agua bidestilada; posteriormente, se envía al departamento de patología, donde la muestra es embebida en parafina para la datación histológica de acuerdo con los criterios definidos por Noyes y su grupo.<sup>35</sup> Una vez que han sido fijadas, se hacen cortes histológicos, que se colocan en laminillas, se aplica una solución inhibidora para disminuir la actividad de la peroxidasa endógena y se incuba durante cuatro minutos a 37°C; después, se lavan las laminillas y se aplica el anticuerpo primario CD56+CD16+; se incuba durante 30 minutos a 37°C. Se enjuaga el tejido y se aplica el anticuerpo secundario biotinilado por ocho minutos a 37°C, se lavan las laminillas, se aplica el conjugado avidina-streptavidina-enzima y se incuba por ocho minutos a 37°C; entonces se lavan las laminillas, se aplica un sustrato enzimático cromógeno y se incuba de nuevo a 37°C. Las laminillas se deshidratan, se aclaran en xilol y se montan en cubreobjetos. Se visualiza con microscopio de luz a 400 X y se contabiliza la concentración de las células marcadas con el anticuerpo CD 56+CD16+.

Los resultados obtenidos se compararon con los valores normales estandarizados en el kit de anticuerpos monoclonales específicos para CD56.

Los estándares normales se toman de biopsias de mujeres fértiles en las que se ha demostrado que las células NK CD 56+CD16+ y CD57+ no existen.<sup>36</sup> Se considera elevación leve una cantidad menor de 10 células por

campo de 400x, moderada de 10 a 20 y severa de más de 20 células por campo de 400x.<sup>37</sup> Las imágenes se tomaron con una cámara Sony de alta resolución adaptada al microscopio con el que se realizaron las observaciones de las biopsias.

El análisis estadístico incluyó medidas de tendencia central, media y proporciones.

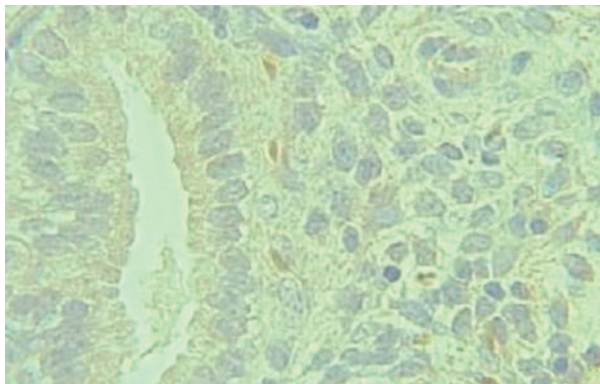
## RESULTADOS

Se estudiaron 20 pacientes que sufrían aborto recurrente de origen desconocido, con edad media de 27 años (límites: 22 y 40 años). El promedio de pérdidas gestacionales fue de 2.6 (límites: 2 y 3).

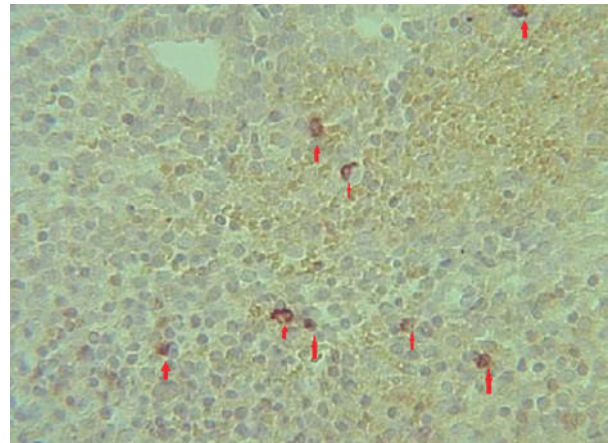
En 12 pacientes (60%), las biopsias se reportaron negativas para células NK CD56+CD16+ y se consideraron normales (Figura 1). En ocho mujeres (40%), las biopsias se reportaron positivas para células NK CD56+CD16+; de ellas, dos (10%) tuvieron elevación leve (menos de 10 células por campo de 400x, Figura 2); tres (15%) tuvieron elevación moderada (10 a 20 células por campo de 400x) y tres (15%), cifras altamente positivas mayores de 20 células por campo de 400x. Una de estas pacientes tenía células incontables marcadas por el anticuerpo monoclonal CD56+CD16+ (Figura 3).

## DISCUSIÓN

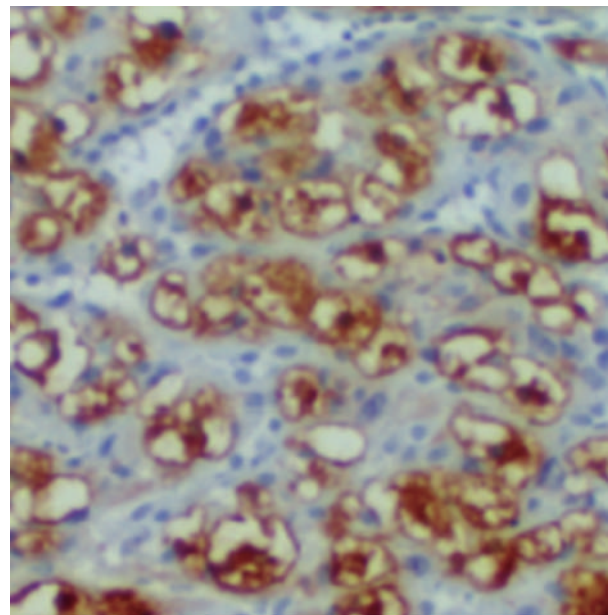
La biopsia endometrial para detectar linfocitos deciduales en mujeres que sufren pérdida recurrente de la gestación puede orientar algunos puntos de vista sobre aspectos inmunopatológicos e, incluso, dar luz sobre el origen. Además,



**Figura 1.** Endometrio normal.



**Figura 2.** Infiltrado de células NK CD56+CD16+.



**Figura 3.** Infiltrado de células NK CD56+CD16+ altamente positivo.

este tipo de investigación puede promover la comprensión de los mecanismos inmunológicos que determinan el mantenimiento del embarazo normal, en particular la función de las poblaciones de leucocitos deciduales y la subpoblación especial representada por las células NK.

En este estudio se analizaron biopsias endometriales de 20 pacientes con pérdida recurrente de la gestación, y se encontró que un número significativamente alto de células NK CD56+CD16+ puede estar vinculado



con la falla reproductiva, ya que en 40% de los casos las biopsias fueron positivas para esta línea celular. Estas células producen grandes cantidades de factor de necrosis tumoral (TNF), que pudiera estar implicado en el daño de las células trofoblásticas y del embrión. La administración de TNF a ratones produce abortos,<sup>38</sup> sin embargo, no hay que olvidar que el proceso de implantación embrionario es sumamente complejo y que participan gran cantidad de citocinas, factores de crecimiento y factores de adhesión, lo que explica por qué algunas mujeres, aunque tengan un aumento leve de estas células, pueden terminar en falla reproductiva por agotamiento o elevación de algunas de estas citocinas, como se demostró en este grupo que no fue homogéneo, ya que dos pacientes tenían pocas células NK (< 10); tres, un número moderado (10 a 20); y tres, una gran cantidad (> 20).

## CONCLUSIONES

Aún se sabe poco de los mecanismos inmunológicos que contribuyen al mantenimiento del embarazo normal y que en muchos casos determinan la falla reproductiva.

El estudio de las poblaciones celulares dentro de la decidua de mujeres fértiles y con abortos espontáneos ayudará a definir los factores críticos que determinan el resultado del embarazo.

Este estudio proporcionó información esencial de la importancia y frecuencia de las células NK CD56+CD16+ en pacientes con pérdida recurrente de la gestación de origen inexplicable o desconocido, ya que a la luz de los conocimientos actuales se sabe que juegan un papel clave en el proceso del aborto. En este trabajo se encontraron en mayor o menor grado estas células en el endometrio de 40% de las mujeres con pérdida recurrente de la gestación. En el futuro se tendrá que investigar la expresión de marcadores de activación y citocinas de estas células para conocer más su mecanismo de acción y su función real en la pérdida espontánea del embarazo temprano.

## REFERENCIAS

1. American Society for Reproductive Medicine. Recurrent pregnancy loss. Patient's fact sheet. Disponible en: [http://www.asrm.org/Patients/FactSheets/recurrent\\_preg\\_loss.pdf](http://www.asrm.org/Patients/FactSheets/recurrent_preg_loss.pdf) Obtenido el 30 de marzo de 2009.
2. Frequently asked questions about infertility. American Society for Reproductive Medicine, 2006.
3. Warburton D, Fraser FC. Spontaneous abortion risk in women data from reproductive histories collected in a medical genetics unit. *Am J Hum Genet* 1964;16:1-25.
4. Boue A, Boue J, Cropp A. Cytogenetics of pregnancy wastage. *Adv Hum Genet* 1985;14:1-57.
5. Hill JA, Polgar K, Harlow BL, Anderson DJ. Evidence of embryo- and trophoblast-toxic cellular immune response(s) in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:1044-1052.
6. Beer AE. Is your body baby-friendly. Unexplained infertility miscarriage and IVF failure. Chicago: AJR Publishing, 2006.
7. Stern J, Coulam C. Current status of immunologic recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 1993;5:252-259.
8. Aoki K, Kajiura S, Matsumoto Y, Ogasawara M, et al. Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet* 1995;345:1340-1342.
9. Beer AE, Kwak JY, Ruiz JE. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed *in vitro* fertilization cycles. *Am J Reprod Immunol* 1996;35:376-382.
10. Shakhhar K, Ben-Eliahu S, Loewenthal R, Rosenne E, Carp H. Differences in number and activity of peripheral natural killer cells in primary *versus* secondary recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2003;80:368-375.
11. Yamada H, Morikawa M, Kato EH, Shimada S, et al. Preconceptional natural killer cell activity and percentage as predictors of biochemical pregnancy and spontaneous abortion with normal chromosome karyotype. *Am J Reprod Immunol* 2003;50:351-354.
12. Clifford K, Flanagan AM, Regan L. Endometrial CD56+ natural killer cells in women with recurrent miscarriage: a histomorphometric study. *Hum Reprod* 1999;14:2727-2730.
13. Quenby S, Bates M, Doig T, Brewster J, et al. Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 1999;14:2386-2391.
14. de Fougères AR, Barnes MG. Modulation of the natural killer cell activity in pregnant mice alters the spontaneous abortion rate. *J Reprod Immunol* 1987;11:147-153.
15. Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, et al. Granulated lymphocytes in human endometrium. histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod* 1991;6:791-798.
16. Bulmer JN, Hollings D, Ritson A. Immunohistochemical evidence that endometrial stromal granulocytes are granulated lymphocytes. *J Pathol* 1987;153:281-288.
17. King A, Balendran N, Wooding P, et al. CD3-leukocytes present in the human uterus during early placentation phenotypic and morphologic characterization of the CD56+ population. *Dev Immunol* 1991;1:169-190.
18. Bulmer JN, Sunderland CA. Immunohistological characterization of lymphoid cell populations in the early human placental bed. *Immunology* 1984;52:349-357.
19. Ritson A, Bulmer JN. Endometrial granulocytes in human decidua react with a natural-killer (NK) cell marker, NKH1. *Immunology* 1987;62:329-331.

20. Starkey PM, Sargent IL, Redman CWG. Cell populations in human early pregnancy decidua. Characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. *Immunology* 1988;65:129-134.
21. Kwak-Kim JY, Chung-Bang HS, Ng SC, Ntrivalas EI, et al. Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failures after IVF. *Human Reprod* 2003;18:767-773.
22. Beer AE, Kwak JY, Ruiz JE. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed *in vitro* fertilization cycles. *Am J Reprod Immunol* 1996;35:376-382.
23. Prado-Drayer A, Teppa J, Sánchez P, Camejo MI. Immunophenotype of peripheral T lymphocytes, NK cells and expression of CD69 activation marker in patients with recurrent spontaneous abortions, during the mid-luteal phase. *Am J Reprod Immunol* 2008;60:66-74.
24. Aoki K, Kajiura S, Matsumoto Y, Ogasawara M, et al. Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet* 1995;345:1340-1342.
25. Ntrivalas E, Kwak J, Gilman-sachs A, Chung-Bang H, et al. Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology. *Hum Reprod* 2001;16:855-861.
26. Makida R, Minami M, Takamizawa M, Juji T, Mizuma M. Natural killer cell activity and immunotherapy for recurrent spontaneous abortion. *Lancet* 1991;338:579-580.
27. Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002;2:656-663.
28. Rai R, Sacks G, Trew G. Natural killer cells and reproductive failure theory, practice and prejudice. *Hum Reprod* 2005;20:1123-1126.
29. Hiby SE, Regan L, Lo W, Farrell L, et al. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLAC genotypes with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2008;23:972-976.
30. Hong Y, Wang X, Lu P, Song Y, Lin Q. Killer immunoglobulin-like receptor repertoire on uterine natural killer cell subsets in women with recurrent spontaneous abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;140:218-223.
31. Winger EE. CD57+ cells and recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 2007;58:311-314.
32. Beer A, Kwak J, Gilman-Sachs A, Beaman K. New horizons in the evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss. In: Hunt J, editor. *Immunobiology of reproduction*. Boston, 1994.
33. Winger EE, Reed JL, Ashoush S, Sapna A, et al. Treatment with adalimumab (Humira) and intravenous immunoglobulin (IVIG) improves pregnancy rates in women undergoing IVF. *Am J Reprod Immunol* 2009;61:113-120.
34. Guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento del aborto espontáneo y recurrente. IMSS-088-08.
35. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 1975;122:262-263.
36. Vassiliadou N, Bulmer JN. Immunohistochemical evidence for increased numbers of "classic" CD57+ natural killer cells in the endometrium of women suffering spontaneous early pregnancy loss. *Human Reprod* 1996;11:1569-1574.
37. Lédée N, Dubanchet S, Coulomb A, Durand, et al. A new role for natural killer cells interleukin (IL)-12, and IL-18 in repeated implantation failure after *in vitro* fertilization. *Fertility paradigm of a complex interaction. Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:181-188.