

UNIVERSIDAD EUROPEA DE MADRID



**TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA
APLICADA A LA REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS
PRODUCIDOS POR EL SISTEMA
INMUNITARIO SOBRE EL FALLO DE
IMPLANTACIÓN Y PÉRDIDAS RECURRENTE
DE EMBARAZO**

AUTOR:

MARIA E. LÓPEZ NARANJO

TUTOR:

MANUELA ALONSO NIETO

Alcobendas, 2021-2022

ÍNDICE

1. Resumen/Abstract	6
2. Palabras clave.	7
3. Hipótesis.	7
4. Objetivos.	7
5. Materiales y métodos	7
5.1 Estrategia de búsqueda.....	7
5.2 Criterios de selección (Inclusión y exclusión).....	8
6. Introducción	8
7. Sistema inmune adaptativo y el embarazo	9
7.1 Linfocitos T reguladores.....	9
7.2 Linfocitos T.....	12
7.3 Relación Th1/Th2 y niveles de TNF- α	13
7.4 Linfocitos B reguladores.....	13
8. Hormonas circulantes	15
8.1 Gonadotropina coriónica humana (hCG).....	15
8.2 Estrógenos.....	16
8.3 Progesterona P4.....	17
8.4 Kisspeptinas.....	18
8.5 Citoquinas e interfeones.....	20
9. Respuesta inmune innata	21
9.1 Natural killers: periféricos y uterinos.....	22
10. Enfermedades inmunológicas y su implicación en el embarazo	25
10.1 Autoanticuerpos.....	25
10.2 Obesidad y diabetes.....	26
10.3 Trombofilia hereditaria.....	27
11. Posibles implicaciones de tratamiento	27
12. Discusión	34
13. Conclusiones.	36
14. Bibliografía	38

ABREVIATURAS

- ACA: anticuerpos anticardiolipinas
- ADCC: células citotóxicas dependientes de anticuerpo
- AMPC: Adenosín monofosfato cíclico
- aPL: anticuerpos antifosfolípidos
- APS: síndrome antifosfolípido
- AR: Aborto de repetición
- Breg: células B reguladoras
- CCR8: receptor 8 de quimiocinas
- CPR: “clinical pregnancy rate” tasa de embarazo clínico
- CREB: del inglés “CAMP responsive element binding protein 1”
- CTLA-4: de sus siglas en inglés “Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4”
- DC: células dendríticas
- DM1: diabetes tipo I
- DN: doble negativa
- DP: doble positiva
- E2: estradiol
- FI: Fallo de Implantación
- Foxp3: Forkhead box p3
- G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos
- GF: factor de granulocitos
- GITR: receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glicocortidos
- GR: receptor de glucocorticoides
- hCG: hormona gonadotropina coriónica humana
- HCQ: Hydroxychloroquine
- IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa

- iFI: fallo de implantación inducido
- IFN- γ : interferón alfa 2B
- IGIV: inmunoglobulina intravenosa
- IL: interleucina
- iRPL: pérdida recurrente de embarazo inducida
- ITIM: motivo inhibidor inmunorreceptor a base de tirosina
- iTreg: T reguladoras inducidas
- IU: infusión intrauterina
- KIR: del inglés “killer immunoglobulin-like receptors”
- LAC: anticoagulante lúpico
- LBR: tasa de recién nacido vivo
- LES: lupus eritema sistémico
- LHCGR: receptor de la hormona luteinizante/ coriogonadotropina
- LIF: factor inhibidor de la leucemia
- mRNA: ácido ribonucleico mensajero
- MTHFR: metilentetrahidrofolato reductasa
- mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero
- NCR: receptores naturales de citotoxicidad
- NCR1: receptor 1 desencadenante de citotoxicidad natural
- NCR3: receptor 3 desencadenante de citotoxicidad natural
- NK: natural killer
- P4: progesterona
- PBMCs: células mononucleares en sangre periférica
- PD1: proteína de muerte celular programada 1
- PDL1: Ligando 1 de muerte programada
- PGT-A: test genético preimplantacional de aneuploidías
- PIBF: factor de unión inducido por progesterona

- PKA: proteína kinasa A
- PLR: pérdidas recurrentes de embarazo
- PR-A: receptor de progesterona A
- PR-B: receptor de progesterona B
- PRP: plasma autólogo rico en plaquetas
- RCT: receptor T
- ROR γ t: receptor nuclear huérfano gamma relacionado con los receptores de ácido retínico
- RORC: “RAR-related orphan receptor C”
- SHP: fosfotirosina fosfatasa
- SP: simple positiva
- Tconv: células T CD4⁺ maduras convencionales
- TE: transferencia de embrión
- Th1: linfocitos T helpers 1
- Th2: linfocitos T helpers 2
- TH17: linfocitos T helpers 17
- TIGIT: del inglés T-cell Immunoglobulin and ITIM domain Receptor
- TIM3: dominio mucina-3, receptor de la superficie celular
- TNF- α : factor de necrosis tumoral
- TNFR2: Receptor del factor de necrosis tumoral-2
- Treg: linfocitos T reguladores
- uNK: NK uterinas
- VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

1. RESUMEN/ ABSTRACT

Durante estos últimos años, los factores inmunológicos han adquirido un papel crítico para la obtención del embarazo. Para evitar la activación del sistema inmune celular contra los antígenos presentes en el embrión semialogénico, se debe crear tolerancia entre este y el sistema inmune materno. Cualquier tipo de desbalance en el sistema inmune materno conduce a fallo de implantación o aborto. El fallo de implantación afecta a más de un 10% de los pacientes que precisan de las técnicas de fecundación in vitro, siendo el factor más recientemente incluido en el estudio de la esterilidad

Este tipo de fallos indican la necesidad de conocer el papel fundamental del sistema inmune durante el embarazo, así como la obtención de tratamientos inmunoterapéuticos para prevenir o intentar minimizar estas reacciones nocivas sobre el feto.

In recent years, immunological factors have acquired a critical role during pregnancy. To avoid the activation of the cellular immune system against the antigens present in the semi-allogeneic embryo, tolerance must be created between it and the maternal immune system. Any type of imbalance in the maternal immune system leads to implantation failure or abortion. Implantation failure affects more than 10% of patients who require in vitro fertilization techniques, being the most recent factor included in the study of sterility.

These types of failures indicate the need to know the fundamental role of the immune system during pregnancy, as well as obtaining immunotherapeutic treatments to prevent or try to minimize these harmful reactions on the fetus.

2. PALABRAS CLAVE.

Fallo de implantación, aborto recurrente, sistema inmune, células T reguladoras, tolerancia fetomaterna, tratamientos inmunológicos para FIV (Fecundación in vitro).

3. HIPÓTESIS.

El sistema inmune puede ser regulado en casos de pacientes con aborto de repetición (AR) y/o fallo de implantación (FI) para obtener mayores tasas de implantación, de embarazo clínico, y de recién nacido vivo, en casos en los que el paciente presente alguna alteración inmunológica.

4. OBJETIVOS.

Objetivo principal:

-Caracterizar el fallo de implantación y los abortos recurrentes debidos a la desregulación del sistema inmune.

Objetivos secundarios:

-Determinar el papel de las células T reguladoras en la tolerancia inmune fetomaterna.

-Determinar de qué manera influye el resto del sistema inmune en las células T reguladoras.

-Identificar otros factores de riesgo y biomarcadores predictivos asociados al fallo de implantación recurrente.

-Determinar posibles tratamientos inmunoterapéuticos para pacientes con FI o AR.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA

Los estudios seleccionados para esta revisión fueron aquellos en los que se documentaba la relación de las células y hormonas del sistema inmune con el embarazo, fallo de implantación o aborto de recurrente. Se hizo búsqueda exhaustiva en plataforma de datos como Pubmed/Medline, Google Scholar y Springer Link, en los que se buscó las

siguientes palabras clave: “Treg and recurrent implantation failure”, “Immunotherapies and pregnancy” “immune system and recurrent implantation failure or recurrent miscarriage” “pregnancy hormones” .

5.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN (INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN)

Los estudios incluidos en esta revisión fueron tanto estudios de cohorte, retrospectivos, casos-control, revisiones bibliográficas así como tesis doctorales, en los que exponían información del sistema inmune y/o el fallo de implantación o aborto recurrente. Otros estudios como cartas al editor, estudios con experimentación en animales o estudios no citados o con pocas citas fueron excluidos.

6. INTRODUCCIÓN

El fallo de implantación recurrente (FI) se define como un desorden caracterizado por embarazos no exitosos tras mínimo 3 transferencias embrionarias de alta calidad. FI puede ocurrir por multitud de factores tales como estrés, factores inmunológicos, endometrio desestructurado, endometriosis y autoanticuerpos (1). Por otro lado, el aborto de repetición (AR) se define como aquellas pérdidas de embarazo antes de la semana 20 de gestación (2). A pesar de años de investigación, la etiología no está establecida en el 50% de los casos.

La implantación es la etapa del embarazo en la que el blastocisto competente se adhiere al revestimiento del endometrio receptivo para continuar su crecimiento (3). Para una exitosa implantación se necesita una interacción entre estos dos que únicamente ocurre durante la ventana de implantación, que justamente corresponde con la fase lútea en la cual se incrementan las secreciones por el cuerpo lúteo de hormonas esteroides maternas. Las hormonas maternas se encuentran involucradas “activando” al blastocisto para poder así adherirse e invadir el endometrio. Una vez adherido, el útero cambia su morfología gracias a hormonas esteroides del ovario como el estradiol (E2) y la progesterona (P4) (3). Este cambio se conoce como decidualización, donde E2 estimula y diferencia las células epiteliales uterinas; mientras que P4 (producida inicialmente por el cuerpo lúteo, sostenido por la hormona gonadotropina coriónica humana, (hCG); hasta finalmente ser producida por la placenta) estimula la proliferación de las células del estroma. Por lo que

como vemos, estos eventos son extremadamente críticos en el embarazo temprano, hasta la semana 7-9 en donde la placenta ya asume completamente estas funciones (4).

El sistema inmunitario de la madre durante el embarazo también debe acomodarse para proteger tanto al feto, desde la concepción, con la implantación y desarrollo de la placenta, y a lo largo de la gestación, como a la madre. El primer trimestre del desarrollo fetal y placentario es crítico (4).

Para crear un ambiente favorable de implantación, se debe crear una homeostasis y balance entre las células Th1/ Th2/TH17/Treg (linfocitos T helpers 1; linfocitos T helpers 2; linfocitos T helpers 17; y linfocitos T reguladores, respectivamente). Normalmente, el embrión escapa al rechazo inmunitario de la madre gracias sobre todo al papel de los linfocitos T reguladores (Treg), ya que controlan la sobre activación de los linfocitos T; mientras que los TH17, así como las citoquinas secretadas por estos tienen un efecto adverso en el embarazo. (5)

7. SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO Y EL EMBARAZO

7.1 LINFOCITOS T REGULADORES.

Las células T reguladoras (Treg) son un subconjunto de linfocitos T derivadas del timo. El timo es el órgano linfoide primario y especializado en el sistema inmunitario, encargado de la diferenciación y maduración de linfocitos T. Cuando se originan células T a partir de una célula madre pluripotencial derivada de la médula ósea, estas migran al timo, donde van pasando por distintos estadios de diferenciación en los cuales se encuentran involucrados más tipos de células como mesenquimales y epiteliales tímicas, macrófagos y células dendríticas, las cuales proveen a las células T de estímulos y citocinas (como la interleucina IL-7), para alcanzar la maduración. Entre los eventos de este proceso se encuentra la recombinación somática y la expresión de genes para los receptores de los linfocitos T: c-Kit, CD44, CD25, CD4, CD8 y CD3, que son los que definen los diferentes estados de maduración de las células T: pro-T, pre-T o doble negativa (DN) CD4-/CD8-, cortical o doble positiva (DP) CD4+/CD8+, T inmadura o simple positiva (SP) CD4+ o CD8+ y T madura que es la que finalmente emerge a la sangre periférica y posteriormente va a poblar los órganos linfoides periféricos (Fig. 1) (6)

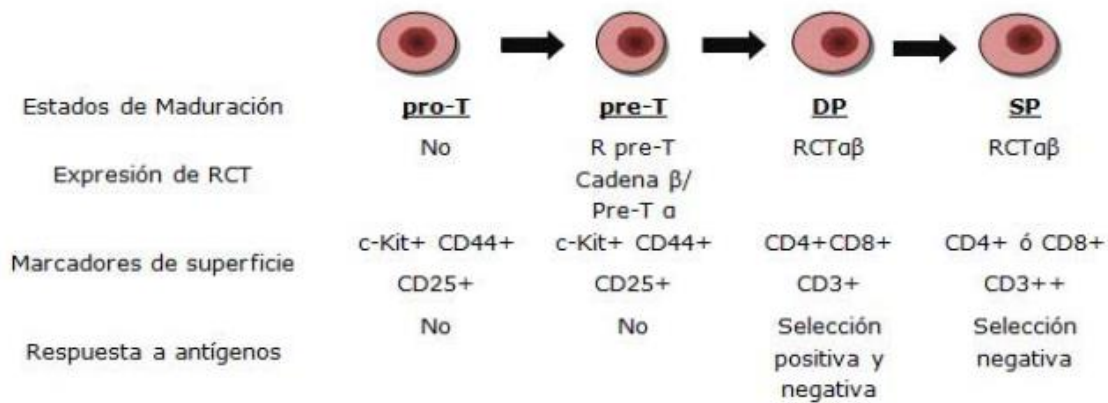


Fig. 1. Distintos estados de maduración de las células T. R: receptor, RCT: receptor de célula T, DP: doble positivo; SP: simple positivo (Marsán Suárez, V et al., 2013)

La expresión de su receptor T (RCT) tiene lugar en la población de timocitos DP, justo antes o durante la migración de los timocitos desde la corteza a la médula y es precedido de la inducción de Forkhead box p3, Foxp3. En la primera etapa de selección (selección positiva) únicamente sobreviven aquellos cuyos receptores se unen con baja afinidad a las moléculas SHP (fosfotirosina fosfatasa) de las células epiteliales. Por lo tanto, se promueve la supervivencia de las DP, y se promueve su desarrollo a SP, las cuales serán, CD4+ (si contactan con ellos células de clase I) o CD8+ (con células de clase II). La segunda etapa es selección negativa, es decir, si alguna célula es capaz de reconocer por alta afinidad algún antígeno propio, es destruida por ser células T potencialmente autorreactivas, produciéndose así la tolerancia central (6). Las células tímicas reguladoras Treg expresan las moléculas CD4+/CD25+, además de Foxp3, GITR (receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glicocorticoides) mRNA (ácido ribonucleico mensajero), moléculas de membrana CCR8 (receptor 8 de quimiocinas) y TNFR2 (Receptor del factor de necrosis tumoral-2) y proteína citoplasmática CTLA-4 (de sus siglas en inglés “Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4”) (6). Además, los linfocitos Treg pueden desarrollarse mediante la conversión de células T CD4+ maduras convencionales (Tconv) inducidas periféricamente, con la aparición adicional del marcador CD25+ (Fig.2) (3).

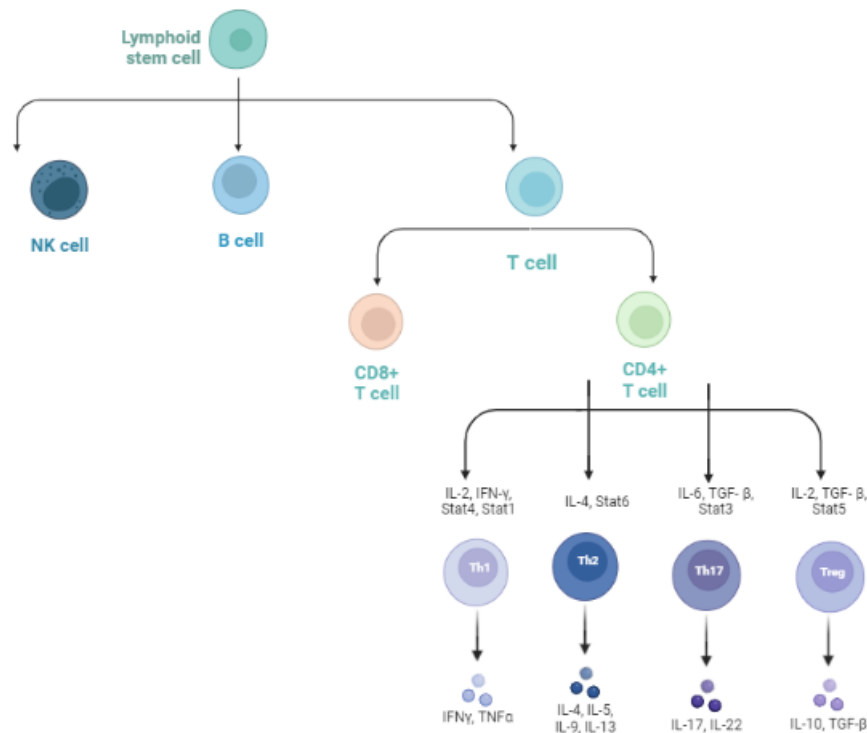


Fig. 2 Linaje células linfoides, concretando el linaje de las células T y las citocinas asociadas al desarrollo de cada una.

Varios estudios han demostrado que las células Treg tienen un papel clave en el establecimiento de la tolerancia fetal en el microambiente decidual durante el embarazo, al promover la supresión del ataque inmunológico al embrión durante la implantación y la invasión placentaria inicial de los tejidos maternos, actuando como mediadores esenciales de la tolerancia al embarazo (3). Estos Treg tienen capacidad de suprimir las células T CD4+, las células dendríticas (DC), las células T CD8+, las natural killer (NK), los macrófagos/monocitos, las células B, los mastocitos, los basófilos, los eosinófilos y los osteoblastos.

En un embarazo evolutivo encontramos una alta concentración de linfocitos T reguladores, con los mismos marcadores (Treg periferia= Treg uterinos), en la periferia y endometrio; mientras que, en mujeres con fallos de implantación o abortos de repetición, esta concentración está disminuida (3). Respecto a la concentración de Treg en sangre periférica, Sauerbrun-Cutler, M.-T et al., (2021) realizó un estudio con diferentes medidas en mujeres en distintos puntos temporales: en fase folicular, día de transferencia de embrión (TE) y día de la prueba de embarazo, donde se determinan los niveles de la hormona β -hCG. Separaron en grupos aquellas mujeres que se quedaron finalmente

embarazadas y a las que no, y se comparó la concentración de células T reguladoras en cada fase. Se vio que no había diferencias entre mujeres con futuro embarazo y no embarazo en la fase folicular (fase predominante de estrógenos), ni en el día de TE (fase predominante de progesterona). No obstante, en el grupo de las embarazadas, los Treg en sangre periférica se elevaron el día de la β -hCG cuando lo compararon con el grupo de las no embarazadas; por lo que vemos, que el nivel de T reguladores aumenta en el punto del embarazo (7).

Respecto a los marcadores de las células Treg, Forkhead box p3 (Foxp3) se conoce como el mayor regulador de estas células, proporcionándoles a esta actividad antiinflamatoria y el papel de mantener la tolerancia frente al embrión mediante la supresión o secretando citoquinas antiinflamatorias. Se ha demostrado que la expresión disminuida de Foxp3 en Treg da lugar a abortos recurrentes (5).

Se sabe que la expresión de CD279/PD1 disminuye la actividad supresora de Tregs. PD1 (proteína de muerte celular programada 1) es un marcador de “agotamiento” que hace que disminuye la actividad de estos linfocitos reguladores inhibiendo su activación y proliferación, además de alterar su producción de citoquinas antiinflamatorias e induciendo la apoptosis. Estas Treg, llamadas Treg “agotadas” sin el marcador FOXP3, $CD45RA^-$ $FOXP3^{low}$, si aumentan la concentración aumenta la probabilidad de fallo de implantación; mientras que Treg Foxp3 activadas con actividad supresora, $CD45RA^-$ $Foxp3^{hi}$, al aumentar en sangre periférica es de buen pronóstico de embarazo.

Por tanto, tanto PD1-Treg como FOXP3 pueden ser buenos biomarcadores para determinar el fallo de implantación o el buen desarrollo (respectivamente) (3). Como vemos, la disfunción de estos linfocitos Treg se ha asociado con trastornos frecuentes del embarazo humano, como infertilidad y complicaciones relacionadas con el embarazo, como preeclampsia y abortos espontáneos repetidos.

7.2 LINFOCITOS T

Los linfocitos T CD8+ son linfocitos citotóxicos encargados de la respuesta inmune celular. T CD8+ si expresan los marcadores PD1 y TIM3 (dominio mucina-3, receptor de la superficie celular), marcadores de “agotamiento”, suprimen su actividad citotóxica. Se sabe que, expresando ambos marcadores, la presencia de CD8+ agotados en decidua

favorece el embarazo normal, y que, en mujeres que han sufrido FI su concentración es menos abundante (3)

Por otro lado, los linfocitos Th17 se encuentran involucrados en procesos inmunofisiopatológicos, como los desórdenes en el embarazo. Estos linfocitos expresando ROR γ t (receptor nuclear huérfano gamma relacionado con los receptores de ácido retínico), tienen un papel crítico en el desarrollo de la autoinmunidad produciendo IL-17, una citoquina proinflamatoria. Se ha demostrado como estos linfocitos Th17 contribuyen al rechazo del embrión así como a los mecanismos del fallo de implantación. De acuerdo con estudios previos, el balance entre Th17 y Treg puede ser importante para la implantación así como el mantenimiento del embarazo temprano (3).

7.3 RELACIÓN TH1/TH2 Y NIVELES DE TNF- α

Como antes hemos comentado, estudios demuestran como Treg son los encargados de inhibir la actividad efectora de células T helper: Th17 y Th1.

Existe un acuerdo en que los niveles elevados de células Th1 están asociados con el rechazo del embrión, mientras que los niveles elevados de células Th2 están asociados con el embarazo. La concentración de estas células Th se mide por su producción de citocinas. Las células Th1 producen citoquinas como TNF- α (factor de necrosis tumoral), induciendo inflamación, provocando trombosis en los vasos sanguíneos uterinos maternos, y suprimiendo el crecimiento trofoblástico dando lugar a complicaciones en la implantación; mientras que, las citoquinas producidas por las Th2 como las interleuquinas IL-4, IL-6 e IL-10 inhiben el factor tisular que es inducido por las células Th1 y monocitos. Por tanto, desequilibrios en la acción de los linfocitos Treg, producen niveles elevados de citoquinas Th1 (con respecto a los niveles de Th2) están relacionados con una mayor tasa de fallos de implantación (1).

7.4 LINFOCITOS B REGULADORES

Los linfocitos B son el mayor componente del sistema inmune con funciones como producción de anticuerpos y citoquinas inmunomoduladoras, además de ser células presentadoras de antígenos. Dentro de los linfocitos B, nos encontramos con las células B reguladoras, Breg, con funciones más específicas como modular enfermedades autoinmunes, cáncer o infecciones crónicas.

Ciertamente, las funciones, ni los mecanismos de activación de los linfocitos B reguladores (Breg C19+ CD5+ CD1d+) en el embarazo, no se encuentran tan bien documentados. Hay especulaciones acerca de la posible interacción de Breg mediante sus receptores con hormonas primarias del embarazo: hCG y estradiol (E2) (8).

Una de las funciones que se conoce que los Breg es la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10, controlando de esta manera las adaptaciones inmunológicas de los mamíferos en el embarazo. Durante el embarazo, IL-10 abunda en la placenta y útero para contrarrestar la respuesta proinflamatoria del inicio del embarazo inhibiendo citoquinas proinflamatorias como TNF α y las células T, y para prevenir inflamación por los antígenos paternos. Por lo que, en mujeres que cursan un embarazo normal, nos podremos encontrar sobre todo en el primer trimestre de gestación una alta concentración de linfocitos Breg C19+ CD5+ CD1d+ produciendo IL-10 en sangre periférica; mientras que aquellas con tendencia a abortos o no embarazadas, la cantidad de Breg se encuentra disminuida (8).

Cómo hemos visto, tienen función antiinflamatoria por los antígenos paternos, esto es, que algunas células B, producen anticuerpos para encubrir los antígenos paternos. Estos anticuerpos se llaman Ac. asimétricos y se encuentran formados por la unión de alta afinidad de algunas IgC específicas y de antígenos, pero incapaces de formar complejos antígeno-anticuerpo, por lo que no activa a los efectores del sistema inmune (8).

Además, los linfocitos Breg inducen y mantienen la activación de los T reguladores (Treg) mediante las citoquinas IL-10 y TGF β (factor de crecimiento transformante beta), y a las células dendríticas (DC) en la decidua, que, además, se mantienen inmaduros para mantener la tolerancia materno-fetal. Tanto DC como los Treg también son capaces de producir IL-10 y TGF β . Además de inducir la activación de estas células, eliminan directamente a las células T efectoras, mediante la restricción de su diferenciación, ligando fas-fas... Por otra parte, el estradiol induce la expresión de PDL1 (ligando 1 de muerte programada) en Breg, haciendo a estas capaces de provocar la apoptosis de las células T efectoras (8).

8. HORMONAS CIRCULANTES

Hay numerosas evidencias que demuestran como el sistema endocrino se encuentra involucrado y contribuye a crear un microambiente de tolerancia hacia el feto. Hormonas como la gonadotropina coriónica humana (hCG), hormonas esteroides (estradiol, E2, y progesterona, P4), así como recientemente las kisspeptinas, se han convertido en diana de estudio esenciales para un embarazo exitoso.

8.1 GONADOTROPINA CORIÓNICA HUMANA (HCG).

Una de las hormonas responsables de la tolerancia materno-fetal es la gonadotropina coriónica humana (hCG). La hormona hCG es secretada por el blastocisto. Esta hormona se une al receptor uterino LHCGR (receptor de la hormona luteinizante/coriogonadotropina) y, al hacerlo, estimula la producción de LIF (factor inhibidor de la leucemia) e inhibe la producción de IL-6, favoreciendo así la implantación del blastocisto. Además, la hCG participa en acciones angiogénicas e inmunomoduladoras, ya que promueve la secreción de VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), y tiene efectos sobre las células NK, T reguladoras y B uterinas (9).

Se ha demostrado que las dosis de hCG son necesarias para la tolerancia materna al feto. Se ha confirmado que la hormona hCG induce tanto la activación de linfocitos Breg como Treg a través de sus respectivos receptores; promueve la invasión del trofoblasto, la proliferación intersticial de las células Teca y se encuentra involucrada en la producción de leptina a través de las vías AMPc (Adenosín monofosfato cíclico) y la proteína p38 en el sincitiotrofoblasto (9).

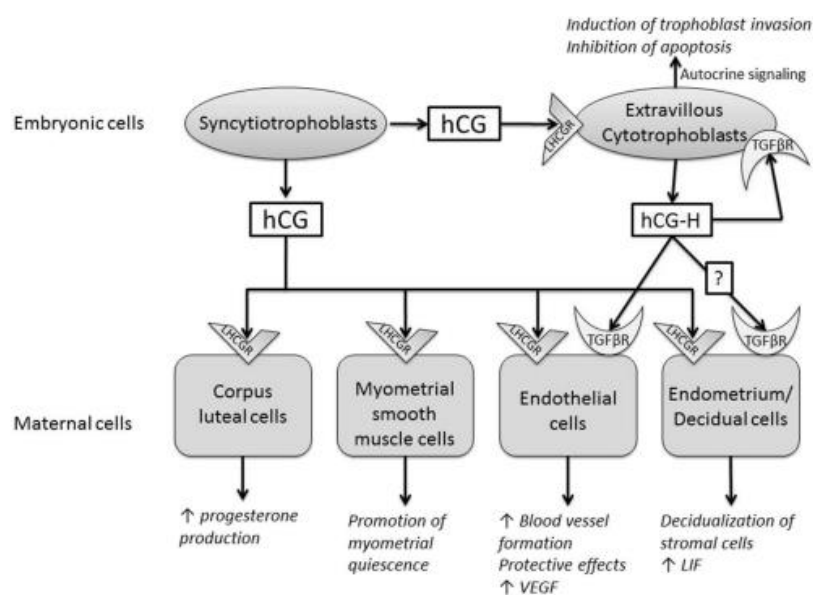


Fig. 3 Diferentes acciones de la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la hCG hiperglucosilada (hCG-H). Ambas moléculas actúan a través de dos receptores diferentes, el receptor de la hormona luteinizante/coriogonadotropina (LHCGR) y el receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGFβR) (9).

La hCG genera efectos sobre los linfocitos T CD4⁺, favoreciendo su diferenciación hacia CD4⁺ 25⁺, aumentando así la población Treg, (Fig.3) y también los atrae hacia el endometrio al inicio del embarazo. Un estudio reciente sobre hCG indica que inhibe la expresión de CD25 y CD28 en células T naive (CD45RA⁺) y la expresión en células T de memoria (CD45RO⁺); aparentemente, promueve la diferenciación de la memoria T al aumentar la expresión de CD45RO⁺, pero reduce su actividad funcional contra los antígenos fetales a través de un proceso competitivo. Por otro lado, promueve la producción de IL-2 en T naive y T memoria (9).

Además, también interviene en la modulación del ratio Th1/Th2 en el embarazo, favoreciendo el estadio Th2, el antiinflamatorio (9).

Por otro lado, la hCG aumenta la proliferación de las células NK uterinas (uNK). Es cierto que estas uNK no tienen receptores LHCGR, por lo que la hCG se une a ellas a través de otro receptor llamado receptor de manosa. Las uNK participan en el proceso de remodelación de las arterias espirales y modificación vascular, indispensables para la placenta para el aporte de nutrientes y oxígeno al feto (9).

hCG también altera la expresión de citoquinas, inhibe TNFα e IFNγ. Se han realizado estudios en los que cultivaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) in vitro con diferentes concentraciones de hCG y demostraron que esta hormona inhibía la producción de ARNm de IL-6 y TNFα. Por lo tanto, observamos que la hCG podría inhibir la producción de citocinas antiinflamatorias (9).

8.2 ESTRÓGENOS

En cuanto a los estrógenos, en el tercer trimestre del embarazo estarán elevados, dando lugar a una linfopenia de linfocitos B "fisiológica". Esta linfopenia se ha atribuido a la migración de estos linfocitos B a otros tejidos, como la decidua placentaria, lo que sugiere que los linfocitos están implicados en la tolerancia materno-fetal (10).

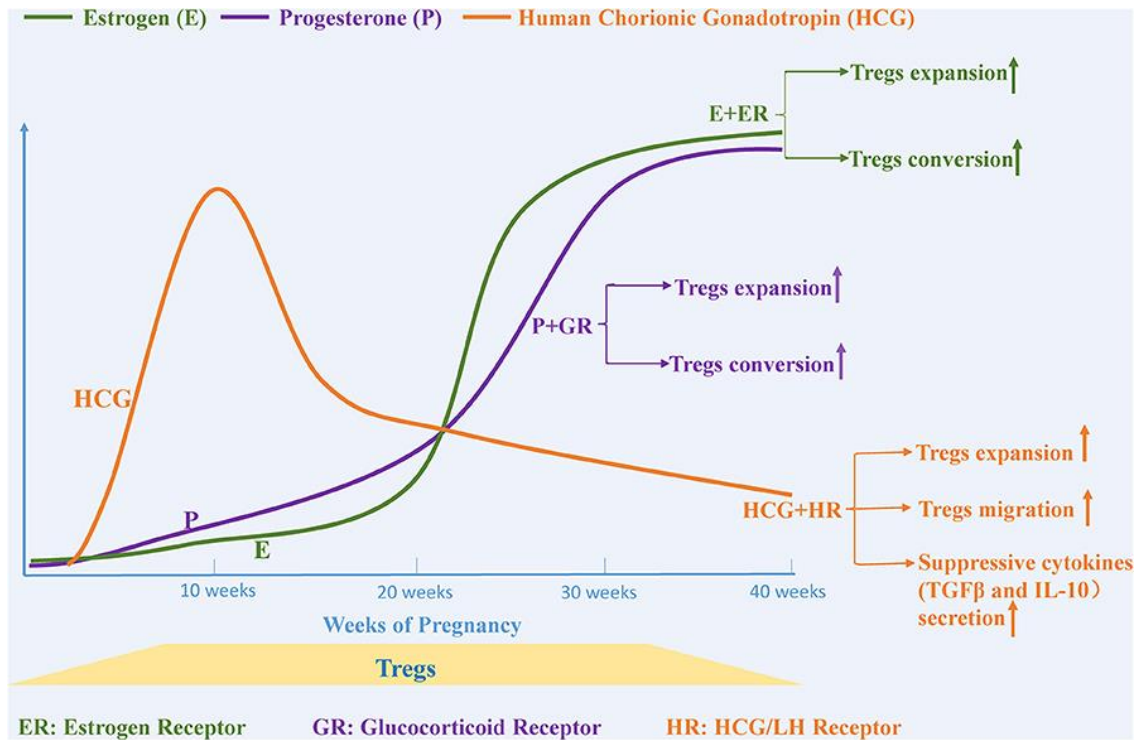
Los estrógenos también modulan la expresión de FOXP3 en las células Treg (aumentan su función supresora) y promueven la diferenciación de las células CD4⁺ a Treg (CD4⁺

CD25+) (Fig.4). Estos datos sugieren que el estrógeno promueve la tolerancia fetal al aumentar el número de Tregs CD4+CD25+ (10).

8.3 PROGESTERONA P4

La progesterona es una hormona esteroide que se produce en mayor concentración en el embarazo, requerida para la implantación del embrión. En la fase inicial de embarazo, hCG induce la producción de P4 del cuerpo lúteo hasta aproximadamente la semana 10 de embarazo, es decir, hasta que comienza a producirla la placenta por si sola. El útero es preparado para la implantación por P4 induciendo la diferenciación de células del estroma a células de la decidua. Además, P4 afecta al sistema inmune durante el embarazo mediante sus receptores PR-A (receptor de progesterona A) y PR-B (receptor de progesterona B) y realizando funciones inmunomoduladores secretando el factor de unión inducido por progesterona (PIBF) y la glicodeína-A (8). Los altos niveles de progesterona inducen la producción por parte de los linfocitos del factor PIBF, que modula los efectos de P4. En el embarazo se concentran grandes niveles de PIBF y decrecen después del nacimiento. PIBF que promueve la diferenciación de las células CD4+ a Th2, favoreciendo el embarazo normal (11).

También media la inmunotolerancia debido a su unión al receptor de glucocorticoides (GR) antes que al receptor de P4, enriqueciendo así la inducción de los linfocitos Treg (Fig.4) y desencadenando la apoptosis para los T efectoros (11). Además, se ha estudiado como P4 se encuentra muy elevada en el cordón umbilical, donde se han reportado funciones de immuno-supresión al inducir y guiar a células T inmaduras del cordón umbilical a Treg y prevenir su paso a Th17 (11).



ER: Estrogen Receptor GR: Glucocorticoid Receptor HR: HCG/LH Receptor

Fig. 4 Niveles de estradiol, progesterona y hCG en las distintas semanas de embarazo y su relación con los linfocitos Treg (Huang et al. *Frontiers in Immunology*, 2020)

8.4 KISSPEPTINAS

Recientemente se ha demostrado que las kisspeptinas modulan positivamente el sistema inmunitario para aportar esa tolerancia de la madre con respecto al embrión (12). Las kisspeptinas son proteínas codificadas por el gen KISS-1. Por otro lado, la mutación o inactivación del gen KISS-1 es la causa del hipogonadismo hipogonadotrópico ya que es un regulador clave para la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (Fig.5).

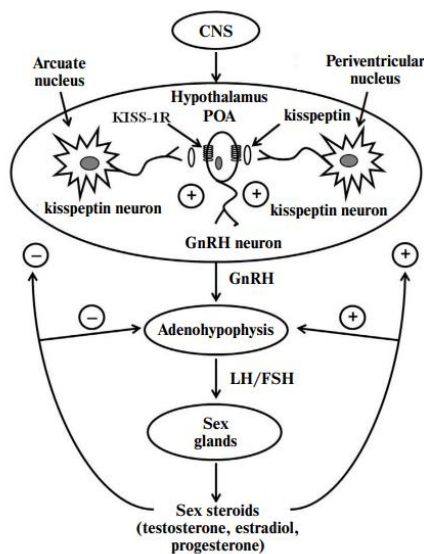


Fig. 5 Estructura del eje gonadal pituitario hipotalámico y su regulación por la kisspeptina (12)

Además, se conoce abiertamente que muchas células del sistema inmunitario tienen receptores para esta proteína. Se sabe que esta proteína aumenta su concentración durante el embarazo (Fig.6), siendo la placenta uno de los productores más importantes (12).

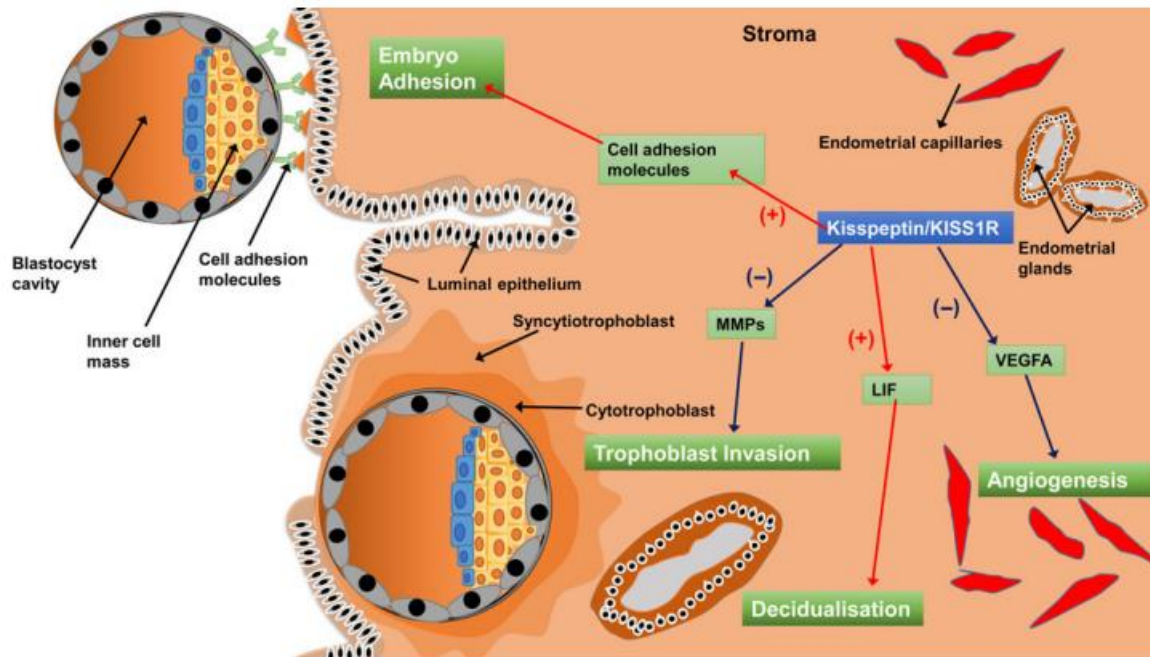


Fig. 6 Involucración de las kisspeptinas en algunos de los procesos necesarios para la implantación y desarrollo embrionario (Ilustración sacada del artículo de Kai-Lun Hu et al., 2018)

Algunas de las acciones que resultan en el sistema inmunológico son, por ejemplo, promover la generación de iTreg (T reguladoras inducidas) (que a su vez producen IL-10); impiden la diferenciación de las células Th17 (por lo tanto, al mismo tiempo suprimen la producción de IL-17) y aumenta la concentración de la molécula Foxp3 en Treg. Las kisspeptinas regulan principalmente a los T CD4+, ya que interactúan con su receptor KISS1R, aumentando el AMPc intracelular. Este aumento de AMPc se debe a su vez a un aumento del calcio intracelular, que estimula la vía MEK1/2 y la enzima adenilato ciclasa que será la encargada de producir AMPc. El AMPc más el calcio intracelular activan la PKA (proteína kinasa A) que suprime la vía mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero) que conduce a la activación de RORC (“RAR-related orphan receptor C”), que este a vez promueve la diferenciación a las células proinflamatorias Th17; y fosforila CREB (del inglés “CAMP responsive element binding protein 1”) que induce la transcripción de Foxp3 e IL-10. Todo ello facilita el paso de T

CD4+ a iTreg y reduce la expresión de RORC (Fig.6) (12). Con esto último vemos que las kisspeptinas inhiben la respuesta citotóxica para promover una respuesta inmune tipo 2, en la que dominan los linfocitos Treg (12)

En el segundo semestre de gestación intervienen en la expresión de IDO (indolamina 2,3-dioxigenasa) en los monocitos que, a su vez, favorece la generación de linfocitos iTreg, y provoca la muerte en los linfocitos T citotóxicos al eliminar el triptófano imprescindible para su actividad (12).

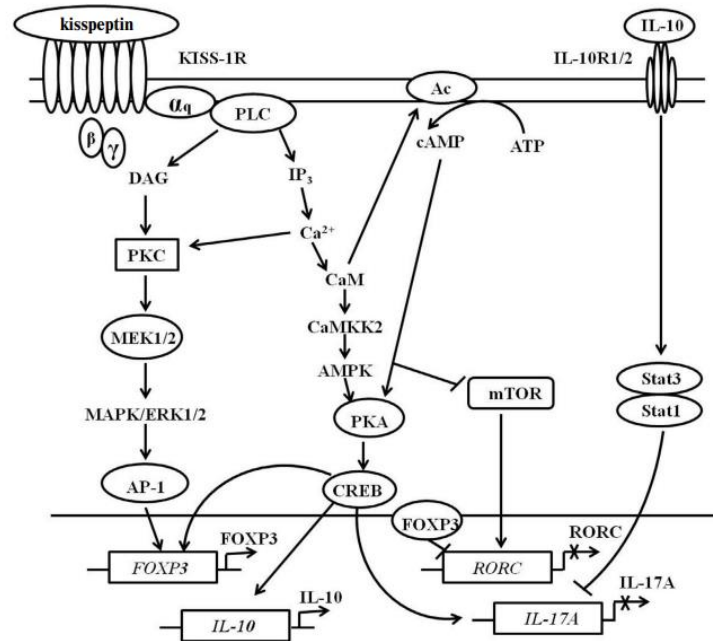


Fig. 7 Mecanismos de los efectos de las kisspeptinas en la diferenciación de las células CD4+ periféricas en iTreg (Treg inducidas) (12).

Por lo tanto, se puede sugerir que las kisspeptinas son un regulador de la subpoblación de células T durante el embarazo (12).

8.5 CITOQUINAS E INTERFERONES

En este sentido, las citoquinas y los interferones juegan un papel importante. Los interferones son glicoproteínas que pertenecen a la gran clase de proteínas conocidas como citoquinas, moléculas utilizadas para la comunicación entre células para desencadenar las defensas protectoras del sistema inmunológico que participan en la erradicación de patógenos (4).

Se sabe que altas concentraciones de citoquinas liberadas por los linfocitos Th1 como el IFN-gamma, inhiben la implantación, así como el IFN tipo I alfa y beta inducen un

desarrollo placentario anormal. La IL-17 secretada por Th17, que causa inflamación crónica y consecuente en pérdidas recurrentes de embarazo (PLR) (4).

Por otro lado, aquellas citoquinas liberadas por los linfocitos Th2 favorecen la implantación y el embarazo, como la IL-6 o la IL-10. Aquellas mujeres con fallos de implantación o abortos de repetición tienen una baja concentración de estas citoquinas (4).

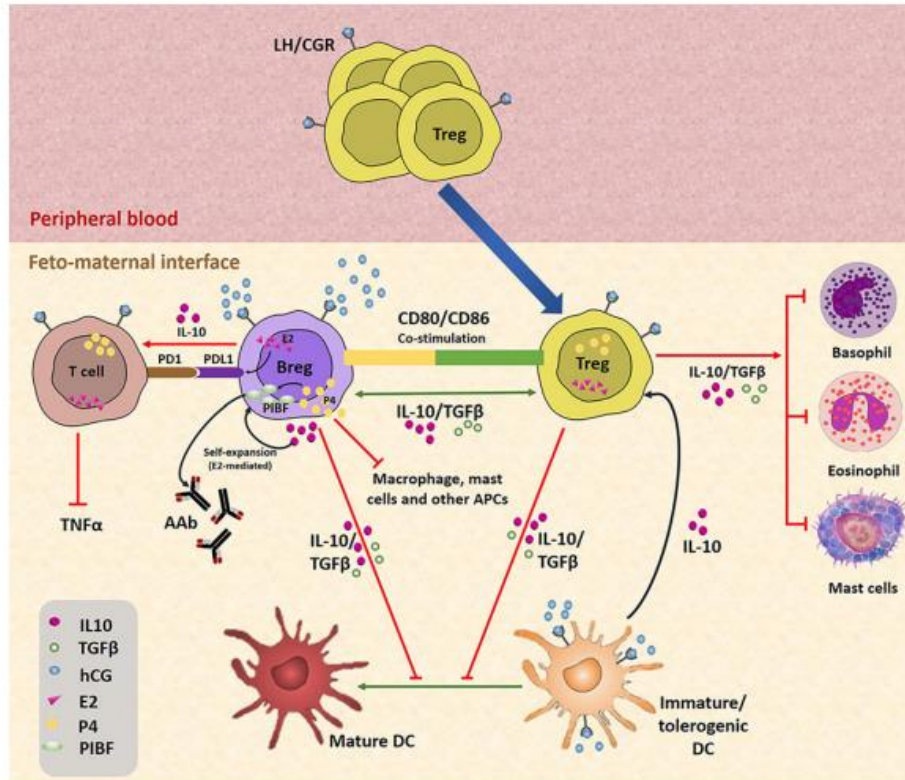


Fig. 8 Interacción de las células B reguladoras (Breg) con las células T reguladoras (Treg) y otras células del sistema inmune en la inmunomodulación en el embarazo (8).

Por lo tanto, un embarazo exitoso depende tanto del sistema inmunitario materno apropiado como de niveles adecuados de hormonas circulantes.

9. RESPUESTA INMUNE INNATA

Respecto a la inmunidad innata, se produce un aumento en número de células, para prevenir cualquier tipo de infección de patógenos. En la circulación sanguínea durante el embarazo, nos encontramos con un mayor número de macrófagos y neutrófilos y en menos número, las células NK; mientras que en la cavidad uterina el 70% de las células inmunológicas son Natural Killer (uNK) (13).

9.1 NATURAL KILLERS: PERIFÉRICOS Y UTERINOS

Como ya hemos comentado, los Natural killers (periféricos y uterinos) no solo intervienen en la implantación, sino también en el desarrollo del embarazo. Las células NK juegan un papel esencial en el éxito reproductivo, aunque su función no se encuentra bien definida. Este subconjunto de linfocitos está controlado por un delicado equilibrio de una serie de receptores activadores e inhibidores. Un equilibrio de estos receptores interrumpido se ha asociado con algunas complicaciones del embarazo, ya que se debe dar comunicación para inhibir la acción citotóxica de las NK.

En el estudio de Comins-Boo et al., (2021) (13) las mujeres con FI tenían un aumento significativo de células NK periféricas. Pero esta determinación no se usó para distinguir de una población normal de la que resulta en FI; únicamente se usó esta determinación para que, en aquellas personas con FI ya establecidas, comprobar si la etiología de su fallo de implantación está relacionada con su sistema inmunológico y concretamente con fallos en sus células NK (13).

La evaluación de células NK de sangre periférica completa se ha propuesto como una herramienta de diagnóstico útil para evaluar pacientes con iRPL (pérdida recurrente de embarazo inducida) o iFI (fallo de implantación inducido). La combinación de dos subconjuntos de NK: subconjunto 1 NK con marcadores NKp30 + cytNK y subconjunto 2 con marcadores TIGIT + cytNK; pueden ser propuestos como biomarcadores alternativos de RPL y FI. Estos biomarcadores NK funcionales pueden ayudar a determinar pacientes con RPL y FI asociados con fisiopatología inflamatoria.

Los receptores clave para la activación de NK son los NCR (receptores naturales de citotoxicidad); NCR1 (receptor 1 desencadenante de citotoxicidad natural), CD335 (también conocido como NKp46), NCR3 (receptor 3 desencadenante de citotoxicidad natural) y CD337 (también conocido como NKp30). Estos receptores citotóxicos naturales se han descrito como receptores activadores que desencadenan la citotoxicidad y la liberación de citoquinas. Se ha encontrado que estos receptores se sobreexpresan en NK en la decidua preeclámpsica, lo que desencadena la liberación de citoquinas Th1, incluidos IFN- γ (interferón alfa 2B) y TNF- α .

Por el contrario, la expresión del receptor de las células T y dominio ITIM (motivo inhibidor inmunorreceptor a base de tirosina, TIGIT, del inglés T-cell Immunoglobulin

and ITIM domain Receptor) en NK inhibe la producción de IFN- γ e IL-17 y mejora la de citoquinas de las células Th2 y la IL-10. Por lo tanto, TIGIT cambia el equilibrio de la inmunidad tipo 1 y tipo 17 hacia la inmunidad tipo 2 e IL-10. La función principal de TIGIT es mantener la tolerancia inmunitaria y reducir las respuestas inmunitarias excesivas (13).

Las células Uterine Natural Killer (uNK), con fenotipo CD56^{bright}CD16⁻ (7) derivan de la línea celular NK debido a su marcador CD56+, sin embargo, no tienen la misma capacidad para matar líneas celulares cancerosas u otras moléculas HLA (antígenos leucocitarios humanos) de clase I negativas. Por lo tanto, no pueden tener un efecto perjudicial en la implantación de embriones. Además, al tener un fenotipo similar, CD117+, CD94-, CD3-, es probable que las células NK periféricas en el desarrollo migren al endometrio y completen su maduración y desarrollo para convertirse en células uNK. De hecho, son el tipo de célula mayoritaria en el endometrio y su número depende del ciclo menstrual, aumenta después de ovular con el aumento de progesterona, también su número aumenta en el embarazo temprano y decrece a mitad de gestación. Su principal papel es contribuir en la remodelación de la arteria espiral materna y angiogénesis, a la vez que inmuno tolerancia (7). La interacción entre el trofoblasto y las uNK se realiza mediante moléculas HLA clase I del trofoblasto y receptores KIR (del inglés “killer immunoglobulin-like receptors) de las células uNK. Los receptores KIR pueden ser haplotipo A con genes de inhibición o KIR haplotipo B con genes de activación. Hasta el momento se ha visto que el trofoblasto placentario expresa en su mayoría HLA-G, HLA-E y HLA-C, ligandos para las células uNK(14). HLA-C es especialmente vulnerable a la acción de las NK, siendo diana muy específica del receptor KIR, por lo que inhibe de manera excesiva las uNK, dando lugar a una estrecha relación con el fallo reproductivo (14).

Estudios han demostrado además que hay una diferencia en los tipos de marcadores en NK si estas provienen de sangre periférica o del endometrio. Las células uNK tienen un fenotipo CD56^{bright}CD16⁻; mientras que aquellas con fenotipo CD56^{dim}CD16⁺ son NK muy citotóxicas(Fig.9). Este receptor de superficie CD16+ activa a células citotóxicas dependientes de anticuerpo, ADCC (de sus siglas en inglés “antibody dependent cell-mediated cytotoxicity”) (7).

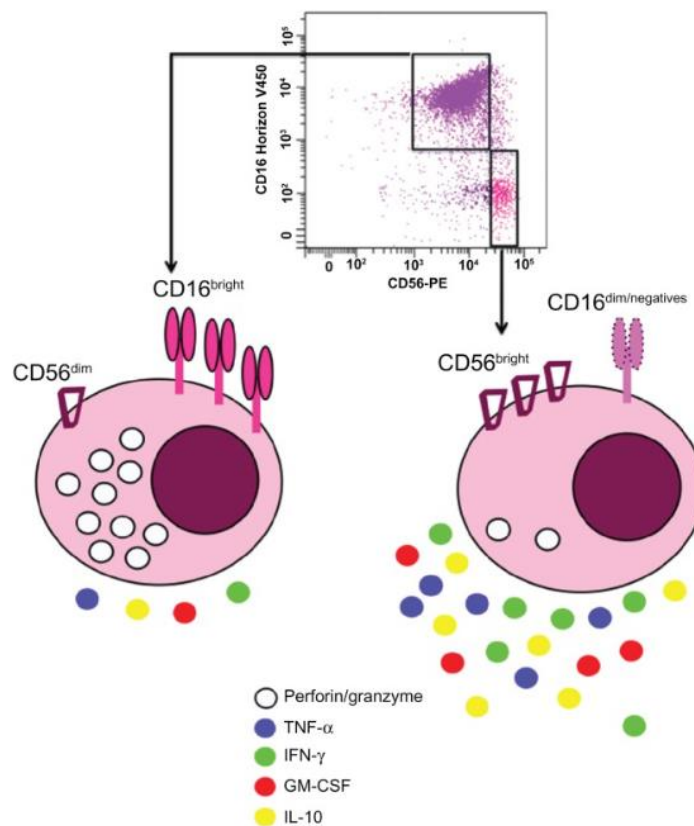


Fig. 9 Subconjuntos de células asesinas naturales humanas basadas en las expresiones de CD56 y CD16. Estas células son más citotóxicas a través de la secreción de perforina y granzima15 que las células asesinas naturales que muestran una expresión CD56^{bright} y una expresión baja o nula de CD16 (CD56^{bright}CD16^{-/low}). (Ilustración sacada de Langers et al., (2012). Natural killer cells: Role in local tumor growth and metastasis. *Biologics : targets & therapy*. 6. 73-82. 10.2147/BTT.S23976.).

Al contrario que las NK, las uNK también tienen maquinaria para actuar como citotóxicas, en cambio, secretan citoquinas para la angiogénesis, colaborando así con el desarrollo embrionario. De hecho, se ha demostrado como aquellas mujeres con FI o AR, tienen una tendencia de aumento de concentración de NK con CD16+, por lo que este podría ser un buen marcador para la evaluación de la desregulación de la uNK (7).

Los resultados en cuanto a la concentración de células NK periféricas y uterinas en comparación con las mujeres que sufren FI con las que no, son controvertidos. Serían necesarios más estudios para validar los resultados en series independientes de pacientes con RPL y FI (13).

10. ENFERMEDADES INMUNOLÓGICAS Y SU IMPLICACIÓN EN EL EMBARAZO

10.1 AUTOANTICUERPOS

El síndrome antifosfolípido (APS) es una enfermedad autoinmune caracterizada por trombosis vascular o morbilidad del embarazo. Los anticuerpos antifosfolípidos contribuyen a complicaciones como abortos espontáneos, muerte fetal o preeclampsia. Los anticuerpos antifosfolípidos (aPL) son identificados como los anticuerpos anticardiolipinas (ACA), anticoagulante lúpico (LAC) y antibeta2-glicoproteína 1 (la glicoproteína 1 β 2 es el cofactor de la anticardiolipina). Todos estos están involucrados en las pérdidas bioquímicas del embarazo.

El diagnóstico de la enfermedad APS requiere de la detección de la presencia de anticuerpos antifosfolípidos, antes mencionados, anticuerpos anticardiolipina IgG, IgM, anticoagulante lúpico, anticuerpos anti-2-glicoproteína I, IgG, IgM. Además de estos criterios de laboratorio, también se deben cumplir criterios clínicos como la trombosis o morbilidad del embarazo. Estos anticuerpos pueden afectar directamente la función del trofoblasto al disminuir la proliferación, inhibir la sincitización y disminuir la producción de hormonas, por lo que es probable que contribuyan a AR al inducir efectos nocivos en el trofoblasto. Se ha demostrado que estos anticuerpos antifosfolípidos generan una menor diferenciación e invasión trofoblástica en la decidua, así como un aumento de la inflamación local (1).

Particularmente los autoanticuerpos contra GPI beta2glicoproteínas (beta2GPI) son especialmente patológicos, ya que este antígeno se expresa en el trofoblasto, encargado de la remodelación de las arterias uterinas, por lo que estos beta2GPIs son requeridos en el desarrollo de pérdidas fetales mediadas por anticuerpos antifosfolípidos (1).

Para el tratamiento contra APS se propone la administración de heparina, inhibiendo la activación aberrante del complemento APS, protegiendo contra pérdidas fetales. La positividad de anticuerpos antifosfolípidos es mayor en mujeres infértiles o mujeres con fallo de implantación recurrente en comparación con los controles. Los estudios siguen siendo escasos (1).

Además, el lupus eritema sistémico (LES), caracterizada por: inflamación sistémica, con riesgo de parto prematuro, preeclampsia, desarrollo fetal deficiente y pérdida fetal, está asociada con el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (1).

10.2 OBESIDAD Y DIABETES

Otra enfermedad como la diabetes o la obesidad también puede comprometer el embarazo. La obesidad conduce a un estado crónico de inflamación, que no solo produce resistencia a la insulina o la enfermedad diabética tipo II, sino también a abortos espontáneos recurrentes, muerte fetal... y complicaciones en el recién nacido vivo. Se han encontrado vías inmunitarias desreguladas en la placenta de mujeres obesas, así como un aumento de las citoquinas IL-1 β e IL-8.

Por otro lado, las mujeres con diabetes tipo I (DM1) tienen un desequilibrio inmunológico que da lugar a una disminución de células T reguladoras, y por ello el desarrollo de la enfermedad (15), además de una concentración de uNK disminuida (1).

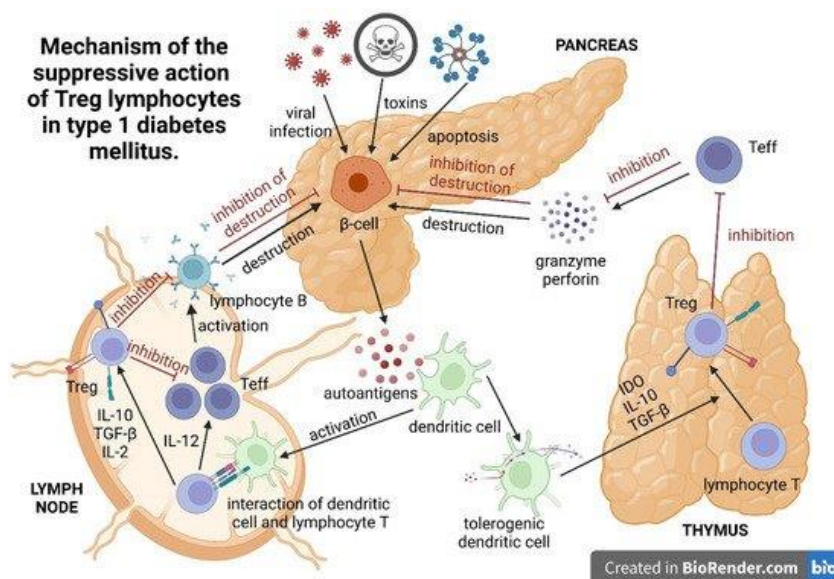


Fig. 10 Mecanismo supresión de los linfocitos T reguladores en la diabetes mellitus tipo 1 (15).

Respecto a las posibles intervenciones inmunitarias, se ha propuesto la potencial terapia de la inducción de la población de células Treg en la DM1 con citoquinas como la IL-2, uso de células dendríticas con fenotipo antiinflamatorio... O incluso el trasplante de células T reguladoras.

10.3 TROMBOFILIA HEREDITARIA

La trombofilia hereditaria puede ser causa de la FI en el subgrupo de mujeres con fallo de implantación recurrente con etiología desconocida. En el estudio de Azem et al. se mostró que había tasas más altas de deficiencia de metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), factor V Leiden, deficiencia de protrombina y deficiencia de antitrombina III en mujeres con FI en comparación con los grupos de control (1).

Aunque la investigación en este ámbito está aún pendiente, un nuevo posible marcador podrían ser los agentes antitrombóticos como otra posible intervención para las mujeres que padecen FI. (1).

11. POSIBLES IMPLICACIONES DE TRATAMIENTO

El fallo de implantación supone una de las mayores limitaciones en la reproducción asistida y como hemos visto, puede ser causado por factores de estrés, coagulación, anatómicos, edad avanzada, índice de masa corporal, endometrio no receptor, hormonal... Ante esto, estudios avanzados han propuesto tratamientos enfocándose en la cavidad uterina, como ultrasonidos, biopsia del endometrio; y en el desarrollo del embrión, como la tecnología de time lapse o el PGT-A (test genético preimplantacional de aneuploidías) (1).

Además, nos encontramos con el factor inmunológico, que por su desregulación es causante también de los fallos de implantación, provocando embarazos pretérminos, preeclampsias, abortos recurrentes o crecimiento intrauterino insuficiente. Por lo que, en este sentido, la inmunoterapia es considerada uno de los tratamientos para combatir los fallos de implantación y mejorar los resultados de embarazo.

A continuación, se presentan las distintas terapias que intentan disminuir estas desregulaciones:

-Terapia con células mononucleares en sangre periférica, PBMCs: basada en conseguir un estadio previo de inflamación necesario para la implantación. Con este tratamiento autólogo de PBMCs, se induce la producción de distintas citoquinas tales como as IL-1 α , IL-1 β , and TNF- α , que tienen impacto positivo sobre la receptividad del endometrio, haciendo así que el blastocisto se acople mejor a este. La inyección de PBMCs se realiza a través de un catéter de inseminación intrauterina antes de la

transferencia de embriones. Se conoce que aquellas mujeres que se pueden beneficiar de este tratamiento son aquellas con cuatro o más fallos de implantación (1).

Además, existe una variante de esta terapia, donde, además, administrando la hormona hCG al cultivo in vitro de PBMCs, se ha comprobado que promueve la activación in vitro de PBMCs, dando lugar a la mejora de la invasión del trofoblasto al secretar LIF y IL-1 β y el factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF. PBMCs activados con la hormona, pueden modular el sitio de implantación y llegar al estroma del endometrio, actuando como guía para la invasión del blastocisto. El tratamiento trata de una previa incubación in vitro de 24 horas de PBMCs junto con hCG, tras las cuales se transfieren a la cavidad uterina por medio de catéteres, 3 días antes de la transferencia del blastocisto (16)

-Administración intrauterina de plasma autólogo rico en plaquetas (PRP): Compuesto por una alta concentración de plaquetas autólogas (5-7 veces mayor que la concentración de plaquetas en sangre periférica) obtenida por la centrifugación de sangre periférica. Se sabe que distintos tipos de GF (factor de granulocitos) y citoquinas contenidos en este plasma se encuentran involucrados en el proceso de implantación embrionaria y en la mejora del grosor del endometrio. La dosis establecida es de al menos un PRP 72 horas antes de la transferencia embrionaria. El metaanálisis más reciente realizado por Maleki–Hagiagha et al. con un total de 625 pacientes (311 casos y 314 control). Los estudios con estos pacientes incluían casos de endometrio delgado (2 estudios) y fallos de implantación (5 estudios). Se demostró, así como con PRP se aumentó la tasa de embarazo clínico (RR: 1.79, 95% CI: 1.29–2.50; $p < 0.001$) y de implantación (RR: 1.97, 95% CI: 1.40–2.79; $p < 0.001$). En el grupo con endometrio delgado (74 casos y 73 control), mejoró significativamente con respecto al control (SMD: 1.79, 95% CI: 1.13–2.44; $p < 0.001$)

Este tratamiento aumenta la tasa de embarazo clínico; pero el inconveniente más importante, es que no se sabe la base de los mecanismos exactos por lo que se produce la mejora, por ello habría que investigar tanto todos los tipos de citoquinas y GF que hay en el PRP, y cómo producen la mejora (16).

-Administración intrauterina del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Los autores observaron que el uso de G-CSF subcutáneo (1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$) a partir del sexto día después de la ovulación aumenta significativamente el número de recién nacidos

vivos al comparar el grupo tratados con G-CSF (29/35, 82.8%) con el grupo control (16/33, 48.5%). G-CSF puede administrarse a través de una infusión intrauterina, IU (generalmente para abortos de repetición, AR) o por vía subcutánea (pacientes con FI o endometrio delgado). G-CSF mejora el embarazo clínico tanto por infusión IU ((RR 1.46, 95% CI 1.04–2.05, $p = 0.041$)) como por vía subcutánea (RR 2.23, 95% CI 1.68–2.95, $p < 0.00001$). La mayoría de los protocolos de IU de G-CSF llevaron a cabo la infusión de 300 $\mu\text{g/mL}$ del fármaco en el día de activación de hCG o en la recuperación de ovocitos.

Pero al igual que el anterior, el efecto y mecanismo de mejora es poco conocido. Zeyneloglu et al. compararon los resultados de ICSI de personas con FI tratados con G-CSF: grupo 1 ($n=38$) pacientes que recibieron la dosis subcutáneamente; grupo 2 ($n=39$) pacientes que recibieron la dosis tanto subcutáneamente como por IU; y el grupo control ($n=34$) sin ninguna administración. Los resultados muestran como efectivamente en el grupo 2 con las dos modalidades de administración la tasa de embarazo clínico (CPR, clinical pregnancy rate) eran significativamente más altos (grupo 1 = 52.6% [20/38], grupo 2 = 64.1% [25/39], grupo control 32.3% [8/34]; $p = 0.002$). Al igual que la tasa de recién nacido vivo (LBR) fue mayor en el grupo 2 (grupo 1 = 34.2% [13/38], grupo 2 = 64.1% [25/39], grupo 3 = 23.5% [8/34]; $p = 0.001$) (16).

Se conoce que aquellas mujeres que pueden beneficiarse de este tratamiento son aquellas que padecen repetidos fallos de implantación y endometrio delgado. Se ha propuesto adicionalmente a este tratamiento para el endometrio delgado, suplementar la administración de G-CSF con vitamina E y supositorios de citrato de sildenafil para mejorar el flujo sanguíneo que da lugar a una mayor proliferación endometrial (1).

-Administración hCG mediante infusión de IU. La administración intrauterina de la hormona gonadotropina coriónica humana o hCG aumenta los niveles endometriales de factores proangiogénicos (como VEGF), modula la proliferación de uNKs y Treg, además de la invasión trofoblástica, lo que da lugar a un aumento de las tasas de implantación y embarazo. Algunos protocolos sugieren además suministrar hCG para apoyar la fase lútea. La dosis más eficaz es de 500 UI de hCG, aproximadamente 7 minutos antes de la transferencia embrionaria, lo que incrementó tanto la tasa de implantación (41.6%) como de embarazo (75%) al compararlo con el grupo control (29.5% y 60% respectivamente). Como hemos dicho, el inconveniente más relevante sería el desconocimiento de los

mecanismos inmunológicos durante la implantación provocados por la administración de hCG.

Además, se han realizado varios estudios para encontrar esa dosis ideal a suministrar y el tiempo que debe haber entre la administración de la hormona y la transferencia embrionaria. Este estudio se realizó con 2763 pacientes, donde significativamente el grupo <15 minutos tiene mayor tasa de LBR, CPR y tasa de implantación que aquellos grupos con 6- y >48 horas. Por otro lado, también hubo mejores resultados de FIV al usar dosis de 500 IU hCG comparado con los grupos de 700 y 1000 IU (16).

-Tacrolimus y prednisolone: El tacrolimus restringe las respuestas excesivas de las células inmunitarias contra el feto al inhibir la proliferación de los linfocitos, de los receptores de IL-2 y la generación de linfocitos T citotóxicos. Este estudio de cohorte prospectivo se realizó en pacientes con FI ($n = 42$) con proporción elevada de células Th1 ($CD4 + /IFN-\gamma +$) /Th2 ($CD4 + /IL-4 +$). 25 mujeres tratadas con tacrolimus dos días antes de la transferencia de embriones hasta el día de la prueba de embarazo (un total de 16 días); y 17 mujeres como grupo control. La dosis diaria de tacrolimus (1-3 mg) se determinó en función del grado de relación de células Th1/Th2. La tasa de embarazo clínico fue de 64% en el grupo experimental y de 0% para el control, siendo significativamente mayor ($p < 0,0001$). Además, en el grupo con tacrolimus, la tasa de aborto espontáneo fue del 6,3 % y la tasa de nacidos vivos fue del 60,0 % ($p < 0,0001$). No hubo efectos secundarios significativos en el grupo tratado (18). Ciertamente, que la administración de tacrolimus no debe ser excesivamente elevada ya que en cierta medida se necesitan de citoquinas de células Th1 para la implantación (18).

Prednisolone tiene efectos inmunomoduladores, inhibe la secreción de citoquinas por parte de los linfocitos Th1 y aumenta el número de Treg y uNK. Se realizó un ensayo controlado con 334 (con fallos de implantación, grupo de estudio $n=148$; grupo control $n=147$) a los que se asignaron prednisolona 20mg/día comenzando el primer día de estimulación ovárica y heparina BPM 1mg/kg/día comenzando el día 1 tras la extracción de ovocitos. Los embarazos totales fueron significativamente diferentes entre los grupos de estudio (42,8%) y control (30,3%) ($P = 0,028$); al igual la tasa de embarazo clínico (40,7 %) y (27,5 %) ($P = 0,018$). Las tasas de implantación fueron 23,9 y 14,7 % en el tratamiento combinado y grupos de control, respectivamente ($P < 0,001$) (17).

-Tratamiento con inmunoglobulina intravenosa (IGIV). Tratamiento dirigido a aquellas mujeres con repetidos fallos de implantación, relación Th1/Th2 elevada, TNF α /IL-10 anormal (1). IGIV inhibe la producción de autoanticuerpos de las células B, además de disminuir el equilibrio de las citoquinas Th1/Th2, disminuye el número de linfocitos Th17 y células NK, y aumenta la función de las células Treg. La dosis estándar de IVIG es de 400 mg/kg diarios por 5 días. Estudios también hablan de una nueva dosis de 1 g/kg/día durante 2 días que quizás es más efectiva (5).

-Tratamiento con Hydroxychloroquine (HCQ): HCQ es un inmunomodulador. Se ha sugerido que algunos de sus mecanismos son la disminución de citoquinas proinflamatorias o bloquear el receptor de células T y B.

La dosis estándar de tratamiento es 400 mg de HCQ durante 16 días, comenzando el día 4 del ciclo menstrual y continua hasta el día 20 del ciclo. Las mujeres con FI además recibían dosis 2 días antes de la transferencia embrionaria y continuaba hasta el día de la prueba de embarazo.

Tras el tratamiento con HCQ en pacientes con FI y desórdenes inmunológicos, se midió el nivel de RNAm de FOXP3 y ROR γ t (crucial para el desarrollo de Th17). Como resultado, el nivel de FOXP3 incrementó significativamente, mientras que los niveles de ROR γ t disminuyeron ($P < 0,01$). Lo mismo ocurrió con las citoquinas de Th17 (IL-17, IL-21) y Treg (IL-10, TGF- β). Antes del tratamiento se mostró como los niveles IL-10, TGF- β eran bajos en el endometrio, y tras la administración de HCQ, aumentaron significativamente, mientras que las citoquinas proinflamatorias de TH17, disminuyeron (16)

Immunoterapia	Conjuntos de células inmunes involucradas	Dosis	Resultados	Limitaciones	Estudio de Referencia
Administración intrauterina de células mononucleares autólogas de sangre periférica (PBMCs).	PBMCs activadas por hCG.	IU infusión de $1-3 \times 10^7$ PBMC en cultivo enriquecido con hCG o gonadotropina menopáusica humana por un período de 24 a 48 horas.	Mejora de implantación, embarazo y nacidos vivos	Los mecanismos de los efectos terapéuticos de estas células no se conocen exactamente; infiltración excesiva de células inmunitarias y las respuestas inflamatorias graves son desencadenantes del rechazo del embrión	(Cavalcante MB et al. 2020)
Terapia con hidroxicloroquina (HCQ)	Regula a la baja las citoquinas relacionadas con Th17 y regula la función de las células Treg	En el día 4 del ciclo menstrual hasta el día 20 del ciclo menstrual y 2 días antes de la transferencia de embriones	Embarazo exitoso; crea un microambiente tolerante para la implantación	Los mecanismos implicados en la mejora de los resultados siguen sin comprenderse bien	Sadeghpour S et al., 2020
Administración intrauterina de gonadotropina coriónica humana, hCG	hCG aumenta los niveles endometriales de factores proangiogénicos proliferación de uNK, eleva los niveles de Tregs, e invasión trofoblástica	Infusión de UI de 500 UI de hCG aproximadamente 7 minutos antes de la ET (transferencia de embriones)	Aumenta significativamente las tasas de implantación y embarazo.	Se desconoce el impacto del uso de hCG en los mecanismos inmunológicos durante la implantación embrionaria	Cavalcante MB et al. 2020
Tacrolimus y prednisolona	El tacrolimus restringe las respuestas excesivas de las células inmunitarias contra el feto al inhibir la proliferación de linfocitos, la proliferación de receptores Il-2 y la generación de células T citotóxicas.	Dos días antes de la transferencia embrionaria	Previene FI	Se necesitan más estudios.	Nakagawa K et al., 2015

	La prednisolona inhibe la secreción de citocinas Th1 y aumenta el número de células Treg y uNK				
Tratamiento con inmunoglobulina intravenosa (IGIV)	Disminuye el equilibrio de las citoquinas Th1/Th2, disminuye el número de células NK y Th17 periféricas y aumenta la función de las células Treg	La dosis estándar de IVIG es de 400 mg/kg al día durante 5 días. La nueva dosificación: 1 g/kg/d durante 2 días, puede ser más efectivo.	Tolerancia en el embarazo	Riesgo de hipersensibilidad con deficiencia de IgA (se deben controlar los niveles de IgA antes de comenzar), meningitis aséptica, dolor de cabeza, escalofríos, mialgias, hipertensión transitoria, sobrecarga de líquidos, necrosis tubular aguda, síndrome de hiperviscosidad	Sadeghpour S et al., 2020
Administración intrauterina de plasma autólogo rico en plaquetas	Alta concentración de plaquetas autólogas que producen GF, quimiocinas y antiinflamatorios y citoquinas proinflamatorias	Una infusión de PRP al menos 72 horas antes de la transferencia de embriones (ET)	Mejora del endometrio delgado y tasa de embarazo clínico	Los mecanismos implicados en la mejora de los resultados siguen sin comprenderse bien	Cavalcante MB et al. 2020
Administración intrauterina del factor estimulante de granulocitos (G-CSF)	G-CSF	Subcutánea o intrauterina. G-CSF (1 µg/kg/día) a partir del sexto día después de la ovulación o UI 300 µg/mL G-CSF en el día de activación de HCG o el día de recuperación de ovocitos	Mejora significativamente los abortos de repetición	Los efectos al administrar G-CSF por vía SC o IU en la implantación del embrión.	Cavalcante MB et al. 2020

Tabla 1. Resumen de inmunoterapias dirigidas a mejorar la implantación embrionaria y los resultados de embarazo.

12.DISCUSIÓN

Los linfocitos Treg tienen una clara involucración en la creación de la tolerancia fetomaterna al suprimir el ataque inmunológico. Para un embarazo exitoso, no únicamente se necesita una buena concentración de Treg, sino además que porten el marcador Foxp3 para estar activas y realizar su función supresora (5). Se ha visto como en una gran proporción de casos de infertilidad, abortos de repetición, preeclampsia, Tregs se encuentran comprometidos. Un aumento de Treg y células T CD8+ agotadas en sangre periférica disminuye la posibilidad de FI; mientras que la alta concentración de células Treg agotadas o baja concentración de Treg y alta concentración Th17 aumenta la posibilidad de sufrir FI (3).

Por otro lado, conocemos que, además de la obtención de células T reguladoras derivadas del timo, estos linfocitos se pueden inducir periféricamente mediante la conversión de linfocitos Tconv (CD4+)(3). Hoy en día hay numerosas investigaciones abiertas en las que se estudia esta conversión a través de distintas hormonas, marcadores o péptidos para sobre todo enfermedades autoinmunes como son la diabetes o la esclerosis múltiple (15). Una futura línea de investigación podría ser, no solo potenciar la actividad de las células T reguladoras ya existentes, sino inducir la conversión de Tconv a Treg para aumentar el número en pacientes infértiles con deficiencias en la concentración de células T reguladoras.

Vemos además como las hormonas hCG, E2, P4 se encuentran orquestadas para regular tanto el desarrollo embrionario, como para el resto del sistema inmune, ya que aumentan la proliferación de las células Treg, Breg y uNK, y tienen la capacidad de atraerlos hasta el endometrio. Así mismo, las kisspeptinas, péptidos relacionados con el embarazo, están involucradas tanto en la liberación de la hormona GnRH como en la activación y reclutamiento de los Treg en el endometrio (12). Sería interesante poder conocer en qué momento del embarazo temprano se empieza a elevar la concentración de kisspeptinas para poder usarlo como biomarcador, y compararlo con la sensibilidad y especificidad del diagnóstico temprano del embarazo entre los niveles de plasma o suero de las kisspeptinas y los niveles de β -hCG.

Respecto a las células NK, hay claras tendencias de que en concreto uNK CD56+ CD16- promueven la implantación y desarrollo de la gestación; mientras que aquellas poblaciones de uNK donde presentan CD16+ tienen tendencia a producir FI y/o abortos(14). Respecto a la concentración de NK citotóxicos en sangre periférica, no es posible tomarlo como parámetro para distinguir la población sana de la que resulta en fallos de implantación debido a los resultados contradictorios en distintos estudios; aunque si se puede afirmar, que en mujeres con FI con alta concentración de NK, la etiología del FI se encuentra relacionada con fallos en el sistema inmune. La debilidad más común en los estudios respecto a las células NK es que no presentan claro el fenotipo de cada tipo de NK, y por eso mismo, muchas veces es controvertido cuando hablan de si los linfocitos NK permiten la mejora o no de la implantación. Se debería investigar, en estudios con muestra poblacional más grande, los distintos fenotipos, y determinar las distintas moléculas tanto de superficie como citoplasmáticas, que permitan identificar las distintas NK tanto periféricas como uterinas en distintos tiempos del ciclo menstrual de la mujer.

Por otro lado, vemos como las enfermedades autoinmunes afectan gravemente a la evolución del embarazo (1). En relación con la diabetes y las terapias tanto de activación como de trasplante de linfocitos T reguladores (15), se podría estudiar si además de mejorar el pronóstico de la enfermedad, la fertilidad mejora al inducir los Treg e intentar equilibrar el sistema inmune.

Por último, respecto a las posibles inmunoterapias (1,5,16,17,18), se deberían hacer tratamientos personalizados para cada caso concreto de infertilidad ocasionada por factores inmunológicos; es decir, determinar el fallo inmunológico, así como los niveles de células inmunitarias que se puedan ver comprometidas (por ejemplo: mujer de edad avanzada con niveles elevados de citoquinas proinflamatorias) y asignar la terapia personalizada para ese caso (por ejemplo: IGIV). Para que esto fuera más certero, se necesita investigar por grupos tanto de edad, como etiología del fallo reproductivo, como el tipo de fallo inmunológico. Por otro lado, vemos como estos tratamientos mejoran tasas de implantación y embarazo, pero en la mayoría no se conoce el mecanismo por el cual lo hace. Se podrían cometer fallos con la dosis provocando excesiva infiltración de células, hormonas o citoquinas, dando lugar a una respuesta exagerada de inflamación que puede dar lugar a un rechazo del embrión, ocasionando el aborto. Una posible futura línea de investigación sobre estos mecanismos ya no solo explicaría el porqué del éxito

de la terapia, sino abriría paso a la raíz del problema y a poder solventarlo de manera más efectiva.

13. CONCLUSIONES.

Para terminar, concluimos en esta revisión que:

-Los linfocitos T reguladores tienen especial importancia en el establecimiento y mantenimiento del embarazo gracias a sus acciones inmunosupresoras contra linfocitos T citotóxicos CD8+, NK, así como linfocitos Th17 y Th1 (así como sus citoquinas) para evitar una respuesta inflamatoria excesiva, y por tanto el rechazo del embrión, y así crear un ambiente tolerante hacia él.

-Mayor cociente entre Th2/Th1 y entre Treg/Th17 resulta en evolución exitosa del embarazo (mayor concentración de citoquinas Th2 y Treg que Th1 y Th17, y por tanto menor cantidad de sus citoquinas proinflamatorias).

-La presencia en la decidua de linfocitos T citotóxicos CD8+ “agotados”, es decir, expresando los marcadores TIM3 Y PD1, favorece el embarazo normal.

-Las células Breg también se esfuerzan por regular las expresiones, acciones y proliferaciones de células T reguladoras y otras potentes células inmunitarias para soportar los desafíos del embarazo. Además, previenen la respuesta inmune contra antígenos paternos que porta el trofoblasto gracias a sus anticuerpos asimétricos que los “enmascaran”. Hacen falta más estudios sobre estas células y su relación con el establecimiento de la tolerancia en el embarazo.

-Se necesitan aún más estudios para determinar las funciones y fenotipo de cada NK, pNK y uNK, en el embarazo y cuáles de ellas permiten una buena evolución de este, por lo que podría ser una posible línea futura de investigación a seguir. Aún así, como hemos visto, hay cierta creencia en que las uNK CD56+ CD16- son NK favorecedoras de la implantación.

-Las conversaciones cruzadas entre las hormonas gestacionales (hGC, E2, P4 y novedosamente las kisspeptinas) y las funciones de las células T muestran un efecto

orquestrado para producir una respuesta para combatir los cambios fisiológicos que presenta el embarazo. Además, modulan positivamente la actividad de los Treg.

-Por último, destacamos las posibles y prometedoras inmunoterapias destinadas a modular tanto a células Treg, como inhibir T citotóxicas, y resto del sistema inmune, para superar el fallo de implantación o/y el aborto de repetición. Al ser la inmunología un campo tan relativamente nuevo y cambiante, se precisan de más estudios futuros sobre estas inmunoterapias, así como tratamientos para la activación o inducción de Treg más punteros.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Bashiri, A., Halper, KI y Orvieto, R. (2018). Fallo de implantación recurrente: descripción general actualizada de la etiología, el diagnóstico, el tratamiento y las direcciones futuras. *Biología reproductiva y endocrinología*, 16 (1), 1-18.
2. Ford, HB y Schust, DJ (2009). Pérdida recurrente del embarazo: etiología, diagnóstico y tratamiento. *Revisiones en obstetricia y ginecología*, 2 (2), 76.
3. Ghaebi, M., Abdolmohammadi-Vahid, S., Ahmadi, M., Eghbal-Fard, S., Dolati, S., Nouri, M., ... y Yousefi, M. (2019). Subconjuntos de células T en sangre periférica de mujeres con fallos de implantación recurrentes. *Revista de inmunología reproductiva*, 131, 21-29
4. Yockey, LJ y Iwasaki, A. (2018). Interferones y citocinas proinflamatorias en el embarazo y el desarrollo fetal. *Inmunidad*, 49 (3), 397-412.
5. Sadeghpour, S., Ghasemnejad Berenji, M., Nazarian, H., Ghasemnejad, T., Nematollahi, MH, Abroon, S., ... y Ghaffari Novin, M. (2020). Efectos del tratamiento con hidroxiclороquina sobre la modulación de la relación Th17/Treg y los resultados del embarazo en mujeres con fallo de implantación recurrente: ensayo clínico. *Inmunofarmacología e inmunotoxicología*, 42 (6), 632-642.
6. Marsán Suárez, V., del Valle Pérez, L. O., & Macías Abraham, C. (2013). Aspectos actuales de la organogénesis. Función e involución del timo. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 29(4), 349-358.
7. Sauerbrun-Cutler, M.-T., Huber, WJ, Krueger, PM, Sung, CJ, Has, P. y Sharma, S. (2021), ¿Difieren las células T reguladoras y las asesinas naturales endometriales en pacientes infértiles y con embarazo clínico? Un análisis en pacientes sometidas a ciclos de transferencia de embriones congelados. *Am J Reprod Immunol*, 85: e13393. <https://doi.org/10.1111/aji.13393>
8. Dutta, S., Sengupta, P. y Haque, N. (2020). Funciones inmunomoduladoras reproductivas de las células B en el embarazo: las células B son actores fundamentales en el embarazo que ajustan la tolerancia y la respuesta inmunitarias mediante interacciones cruzadas con las hormonas gestacionales. *Revisiones internacionales de inmunología*, 39 (2), 53-66.
9. Gridelet, V., Perrier d'Hauterive, S., Polese, B., Foidart, JM, Nisolle, M. y Geenen, V. (2020). Gonadotropina coriónica humana: nuevas funciones pleiotrópicas para una hormona "antigua" durante el embarazo. *Fronteras en inmunología*, 11, 343.

10. Abu-Raya, B., Michalski, C., Sadarangani, M. y Lavoie, PM (2020). Adaptación inmunológica materna durante el embarazo normal. *Frontiers in Immunology* , 11 , 2627.
11. Rocamora-Reverte, L., Reichardt, HM, Villunger, A. y Wieggers, G. (2017). Muerte autónoma de células T inducida por la regeneración de metabolitos de glucocorticoides inertes. *Muerte celular y enfermedad* , 8 (7), e2948-e2948.
12. Gorbunova, O. L., & Shirshv, S. V. (2020). Role of Kisspeptin in Regulation of Reproductive and Immune Reactions. *Biochemistry. Biokhimiia*, 85(8), 839–853. <https://doi.org/10.1134/S0006297920080015>
13. Comins - Boo, A., Cristóbal, I., Fernández - Arquero, M., Rodríguez de Frías, E., Calvo Urrutia, M., Pilar Suárez, L., ... y Sánchez - Ramón, S. (2021). Biomarcadores sustitutos de NK funcionales para la pérdida recurrente del embarazo por inflamación y el fracaso de la implantación recurrente. *Revista estadounidense de inmunología reproductiva*, e13426.
14. Maria Núñez Beltrán. Histocompatibilidad [HLA] KIR, A, B, C, DR y DQ en el fallo reproductivo recurrente [Tesis doctoral]. Madrid. Universidad Complutense de Madrid. (2021)
15. Ben-Skowronek I, Sieniawska J, Pach E, Wrobel W, Skowronek A, Tomczyk Z, Rosolowska I. Aplicación terapéutica potencial de las células T reguladoras en la diabetes mellitus tipo 1. *Revista internacional de ciencias moleculares* . 2022; 23(1):390. <https://doi.org/10.3390/ijms23010390>
16. Cavalcante, MB, Cavalcante, CTDMB, Sarno, M. y Barini, R. (2020). Inmunoterapias de perfusión intrauterina en fallas recurrentes de implantación: revisión sistemática. *American Journal of Reproductive Immunology* , 83 (6), e13242.
17. Fawzy, M. y El-Refaeey, AAA (2014). ¿La combinación de prednisolona y heparina de bajo peso molecular tiene un papel en el fallo de implantación inexplicable?. *Archivos de ginecología y obstetricia*, 289 (3), 677-680.
18. Nakagawa, K., Kwak-Kim, J., Ota, K., Kuroda, K., Hisano, M., Sugiyama, R. y Yamaguchi, K. (2015). La inmunosupresión con tacrolimus mejoró el resultado reproductivo de mujeres con fallas repetidas de implantación y proporciones elevadas de células TH1/TH2 en sangre periférica. *Revista americana de inmunología reproductiva* , 73 (4), 353-361.