

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
en
Biología y Tecnología Aplicada a
la Reproducción Humana Asistida

**ESTUDIO DE LA INMUNIDAD CELULAR
COMO BIOMARCADOR EN EL ABORTO
DE REPETICIÓN Y FALLO DE
IMPLANTACIÓN RECURRENTE
INEXPLICABLES**

Autor: Alba Alarcón Escudero

Tutores: Javier Carbone Campoverde / José Rivera Torres

Alcobendas, septiembre 2022

Índice

<i>Resumen</i>	3
<i>Palabras clave</i>	3
<i>Introducción</i>	4
<i>Objetivos</i>	9
1. Objetivo principal	9
2. Objetivos secundarios	9
<i>Materiales y Métodos</i>	10
1. Estudio Casos y Controles	10
DISEÑO	10
PACIENTES	10
- CRITERIOS DIAGNOSTICOS	10
- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	10
CONTROLES	11
- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	11
2. Método de evaluación	11
CITOMETRÍA DE FLUJO	11
- MARCAJE DE LA MUESTRA	11
- ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE LA MUESTRA	12
3. Estadística	15
4. Ética	15
<i>Resultados</i>	16
1. Descripción del grupo pacientes	16
2. Comparación del perfil inmunológico entre grupos	16
COMPARACION ENTRE GRUPOS DE PACIENTES	16
COMPARACION ENTRE GRUPO FIR Y GRUPOS CONTROL	17
COMPARACION ENTRE GRUPO AR Y GRUPOS CONTROL	18

3. Identificación de puntos de corte asociados al AR.....	19
4. Identificación de biomarcadores de riesgo de AR.....	20
5. Identificación de factores de riesgo mediante regresión logística.....	21
REGRESIÓN LOGÍSTICA UNIVARIABLE	21
REGRESIÓN LOGÍSTICA MULTIVARIABLE	21
6. Identificación de escalas de riesgos o <i>score</i> inmunológico	21
7. Identificación de diferencias inmunológicas celulares intragrupalas.....	22
GRUPO FIR.....	22
- PERFIL INMUNOLÓGICO SEGÚN EL NÚMERO DE FI	22
- PERFIL INMUNOLÓGICO SEGÚN LA EDAD.....	22
- PERFIL INMUNOLÓGICO SEGÚN EL TIPO DE INFERTILIDAD	22
GRUPO AR.....	23
- PERFIL INMUNOLÓGICO SEGÚN EL NÚMERO DE ABORTOS	23
- PERFIL INMUNOLÓGICO SEGÚN LA EDAD.....	24
- PERFIL INMUNOLÓGICO SEGÚN EL TIPO DE INFERTILIDAD	24
<i>Discusión</i>	24
<i>Conclusiones</i>.....	29
<i>Bibliografía</i>.....	29
<i>Agradecimientos</i>.....	32
<i>Anexos</i>.....	33
1. Anexo 1: Tablas de resultados	33
2. Anexo 2: Aprobación de comités de ética (CEI).....	39

Resumen

El sistema inmunológico materno comprende un rol importante en la tolerancia materno-fetal, por lo que un desequilibrio en este podría desencadenar un fallo reproductivo en la mujer. Alrededor del 50% y < 5% de las pacientes con abortos de repetición (AR) y fallos de implantación recurrentes (FIR), respectivamente, no presentan una causa conocida de la patología, por lo que nuestro objetivo es observar el perfil inmunológico de estas pacientes a fin de encontrar alteraciones con un posible papel patogénico en la enfermedad. Se evaluaron las subpoblaciones linfocitarias T, B, NK y NKT, además de la serie monocítica en sangre periférica de un total de 61 pacientes no embarazadas con diagnóstico de abortos de repetición o fallos de implantación recurrente y de 100 controles sanas por citometría de flujo de 6 colores. Ambos grupos de pacientes presentaron un perfil inmunofenotípico de activación de célula T CD8, de células NK y del estado de maduración del linfocito B similar. Sin embargo, tras la comparación con los grupos control, se encontraron alteraciones de las subpoblaciones linfocitarias T CD3+, T CD8+, NKT y B de memoria no switch y class switch tanto en pacientes FIR como AR, sugiriendo un perfil periférico predominantemente proinflamatorio. Niveles de células NKT > 5%, linfocitos T CD8+ > 26,50%, linfocitos B de memoria no switch > 22% y linfocitos B de memoria no switch > 32% fueron identificados como nuevos biomarcadores de riesgo para el AR. Así mismo, la combinación de al menos dos de ellos aumentaría significativamente la probabilidad de padecer la enfermedad.

Palabras clave

Fallos de implantación inexplicable, abortos de repetición inexplicables, fallo reproductivo, inmunología reproductiva, inmunidad celular, leucocitos en sangre periférica, biomarcadores, citometría de flujo.

Introducción

La pérdida recurrente de gestación, o más conocido como, aborto de repetición (AR), es un trastorno consensuado por las diferentes sociedades médicas internacionales del ámbito reproductivo como la pérdida de dos o más embarazos clínicos antes de la semana 22 de gestación, sin tener que ser estas necesariamente consecutivas⁽¹⁾. Es difícil establecer la prevalencia real del AR. La falta de registros nacionales, diferencias en los criterios diagnósticos de la patología, o diferentes actitudes sociales y/o culturales, hacen que esto sea todo un desafío⁽²⁾. Sin embargo, la última guía clínica publicada por la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE), establece que afecta en torno al 1-2% de las parejas en edad fértil⁽³⁾.

Diferentes factores de riesgo se han asociado directamente con el AR, edad materna avanzada, número de abortos espontáneos previos, malformaciones uterinas congénitas o adquiridas, endometritis crónica y alteraciones en la decidualización, obesidad (IMC>30kg/m²), endocrinopatías mal controladas, anormalidades en cariotipos parentales, estilo de vida (estrés, tabaquismo y alcoholismo), trombofilias congénitas, además de alteraciones inmunológicas⁽¹⁻³⁾. A pesar de los factores descritos, en más del 50% de las parejas que presentan AR no se identifica factor alguno⁽²⁾, por lo que otros mecanismos podrían estar relacionados con la patogénesis del AR.

Los procedimientos llevados a cabo en las clínicas de fertilidad, comúnmente conocidos como técnicas de fecundación in vitro (FIV), brindan una gran oportunidad de tratamiento en aquellas parejas con problemas reproductivos. Sin embargo, la aplicación de dichas técnicas ha llevado a la aparición de otros desafíos como el fallo de implantación recurrente (FIR)⁽⁴⁾. La definición de FIR no está totalmente establecida. Actualmente podríamos considerar la ausencia de embarazo tras la transferencia de al menos tres blastocistos de buena calidad en mujeres hasta 37 años, o de tres blastocistos euploides en mujeres mayores de 37 años, sin una evidencia clara de no implantación en los estudios básicos previos de la pareja infértil, como la definición de FIR más aceptada⁽⁵⁾. La disparidad en las tasas de implantación y los diferentes protocolos de trabajo utilizados por las distintas clínicas de reproducción, hacen que no haya un consenso internacional en esta⁽⁵⁾, mostrando una incidencia real indeterminada.

Sociedades científicas como la Sociedad Británica de Fertilidad (BFS) o la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), han elaborado guías clínicas donde exponen las evidencias

actuales sobre posibles factores de riesgo descritos y recomendaciones clínicas para el manejo de FIR. En ellas se detalla que algunas alteraciones anatómicas uterinas congénitas o adquiridas además de la presencia de alteraciones genéticas en el embrión, pueden afectar directamente a la capacidad de implantación embrionaria^(5,6). No obstante, algunos grupos de investigación han establecido que <5% de las pacientes con FIR a las que se les ha transferido embriones euploides, no presentaban alteraciones anatómicas uterinas/endometriales, siendo por tanto desconocida la causa del fallo de implantación⁽⁷⁾. A diferencia del AR, no se ha encontrado evidencia suficiente para atribuir a factores endocrinos y/o trombofilias una relación directa en la patogenia de FIR^(5,6).

Establecer relación entre desordenes inmunológicos y el AR y/o FIR se encuentra en fase de estudio. Es conocido que la tolerancia materno-fetal es esencial para una correcta implantación y progresión del embarazo, por lo que una alteración en la adaptación inmunitaria materna al embrión/feto podría desencadenar un rechazo, y como consecuencia, un fallo de implantación o pérdida gestacional⁽²⁾.

Entre los factores inmunológicos descritos con mayor evidencia científica en AR encontramos el Síndrome antifosfolípido (SAF), una trombofilia adquirida asociada a la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (anticuerpo anticoagulante lúpico (AL); anticuerpo anti $\beta 2$ glicoproteína I ($\beta 2$ GPI) IgG y/o IgM; anticuerpo anticardiolipina (ACA) IgG y/o IgM) que afecta al 15-20% de las mujeres con un diagnóstico de AR, pudiendo este síndrome causar abortos tempranos y/o tardíos, preeclampsia, además de retraso del crecimiento intrauterino fetal⁽²⁾. La titulación de los anticuerpos antifosfolípidos en suero para el cribado del SAF es actualmente el único biomarcador recomendado por las guías clínicas en el diagnóstico de desórdenes inmunológicos relacionados con el AR^(1,3). Por el contrario, encontramos que las sociedades científicas no establecen suficiente evidencia para atribuir al SAF una relación directa con la patogenia en FIR, recomendando en ella, la medición de los anticuerpos antifosfolípidos en casos individualizados y con carácter experimental⁽⁵⁾.

A pesar de que el SAF sea la única alteración inmunológica reconocida por las sociedades médicas en el ámbito reproductivo, existen muchos otros parámetros inmunológicos actualmente en investigación que parecen mediar en la relación materno-fetal, como el tipo de receptor KIR materno y la presencia de moléculas HLA-C2 en el embrión, o los niveles de vitamina D maternos, algunos de los cuales, son reconocidos a

nivel experimental por las guías clínicas. Otros autores están centrando sus estudios en la inmunología reproductiva a nivel celular, destacándose entre ellos el análisis de las subpoblaciones linfocitarias T reguladoras (Tregs) y de las células Natural Killer (NK) (8).

Las células Tregs son una subpoblación linfocitaria T CD3+CD4+ dentro del sistema inmune adaptativo que tienen un papel fundamental en la inmunoregulación y tolerancia al embarazo, entendida desde el punto de vista inmunológico como la predominancia de una respuesta de citoquinas tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13)⁽⁹⁻¹¹⁾. Aproximadamente, entre un 10% y un 30% de las células T CD3+CD4+ expresan el factor de transcripción FOXP3 característico de las Treg⁽¹¹⁾.

Tanto a nivel uterino como en el torrente sanguíneo, el reclutamiento de las Tregs comienza en la fase folicular de cada ciclo menstrual, alcanzando su máximo durante la ovulación. En caso de embarazo, sus niveles permanecen aumentados hasta la mitad de la gestación, disminuyendo con el nacimiento⁽¹¹⁾. Estas variaciones en los niveles de Tregs regulan cambios en los perfiles de citoquinas necesarios para una correcta tolerancia materno-fetal. Durante la implantación y el parto, se requerirá cierta actividad pro-inflamatoria mediada por una respuesta Th1 y Th17 (IL-2, INF γ , TNF α e IL-17), a diferencia de las fases intermedias del embarazo, donde predominará de forma casi excluyente una respuesta tolerante Th2⁽⁹⁾.

Estudios en modelos murinos y humanos apuntan a que un desequilibrio en los niveles de células Tregs tanto en la decidua como en sangre periférica podría alterar el equilibrio entre la respuesta Th1/Th2, afectando, por tanto, a la implantación embrionaria y a la progresión de un aborto espontáneo. Niveles de Tregs uterinas y periféricas disminuidos se han asociado a mujeres con AR y FIR en comparación con mujeres fértiles, observándose una respuesta predominantemente pro-inflamatoria Th1 y Th17 en ellas (2,4,8-11).

Además de estos estudios, otras alteraciones asociadas a la inmunidad adaptativa han sido descritas por diferentes autores en relación con el AR y FIR (12,13).

Estudios previos realizados por nuestro grupo en una pequeña cohorte de pacientes que presentaban AR, asocian una mayor activación linfocitaria T citotóxica (CD3+CD8+) en estas pacientes frente a controles sanos, entendiéndose el aumento de activación como un incremento de la expresión de HLA-DR presente en la membrana celular⁽¹³⁾, molécula

de histocompatibilidad (MHC) de tipo II presente en células presentadoras de antígeno (APC) que representa un marcador de activación tardío en subpoblaciones linfocitarias T capaz de intensificar la respuesta inmunológica en presencia de estímulo. La expresión de dicho marcador se ha visto comprometida de igual forma en perfiles de infección crónica y de enfermedades autoinmunes⁽¹²⁾.

Alteraciones en la fase madurativa de la población linfocitaria B (CD19+) también han sido descritas por nuestro laboratorio en pacientes con recurrentes pérdidas gestacionales, observándose un aumento en número absoluto de células B de memoria que no han realizado cambio de clase (CD19+CD27+IgD+IgM+). Asimismo, dicho hallazgo ha sido documentado por otros autores en pacientes con AR que presentaban ACA IgM positivos⁽¹³⁾.

No solo se ha reportado la implicación del sistema inmune adaptativo en la correcta implantación y desarrollo embrionario. Ciertos desordenes de la inmunidad innata también están adquiriendo un papel relevante en las investigaciones destinadas a explicar la patogenia del AR y FIR.

La implicación del sistema inmune innato en la tolerancia materno-fetal viene determinada predominantemente por las células NK, definidas clásicamente como una población celular de la serie linfoide, caracterizada por expresar CD56 como marcador de superficie. A diferencia de las células T, carecen de la expresión de CD3 en su membrana⁽⁹⁾. La intensidad con la que las NK expresan CD56, permite dividir las en dos subpoblaciones diferentes, encontrando, por un lado, las células NK con CD56 de alta intensidad (NK CD56^{bright}), y por otro, a las células NK con CD56 de baja intensidad (NK CD56^{dim}). Las NK CD56^{dim} se caracterizan por una función citotóxica y por una elevada expresión del receptor Fc de IgG (CD16) en superficie, receptor que participa en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. A diferencia, las células NK CD56^{bright} carecen de actividad citotóxica, predominando su elevada actividad proliferativa e inmunoreguladora mediada por la producción de citoquinas⁽¹⁴⁾.

A nivel fisiológico, las células NK de sangre periférica (pNK) representan aproximadamente un 10% de los linfocitos totales circulantes, las cuales un 90% de estas corresponden a células NK CD56^{dim}, siendo las células NK CD56^{bright} el 10% restante del total de las pNK. Esta proporción NK CD56^{dim}/ NK CD56^{bright} hace que la función de las células pNK sea principalmente citolítica, defendiendo al organismo de células infectadas

o aberrantes mediante citotoxicidad directa o mecanismos pro-apoptóticos^(9,14). La alteración del número de células NK presentes en sangre periférica ha sido relacionada en diversos trabajos con la presencia de fallo reproductivo, lo que ha llevado incluso a algunos autores a definir valores de normalidad de pNK en pacientes sin dichos antecedentes⁽⁹⁾.

No solo este desequilibrio en las pNK ha sugerido una relación con el AR y el FIR, sino, la alteración de las células NK uterinas (uNK), también han sido de gran interés en las investigaciones relacionada con la inmunología reproductiva. Su perfil predominantemente regulador y proliferativo (NK CD56^{bright}) hace pensar en su posible implicación sobre la tolerancia materna, hecho que ha podido demostrarse tras el estudio las dos subpoblaciones en las que pueden dividirse. Por un lado, encontraríamos las células NK endometriales (eNK), que representan aproximadamente el 30% de los linfocitos totales endometriales con ciertas variaciones en número dependiendo de la fase del ciclo menstrual, y cuya función, aunque es todavía desconocida, sugiere una participación en la implantación embrionaria, y por otro lado, las células NK de la decidua (dNK), células NK uterinas más estudiadas que representan un 70% de los linfocitos totales uterinos durante el embarazo, implicadas directamente en la inmunotolerancia, la invasión del trofoblasto y la angiogénesis⁽¹⁴⁾.

Otros tipos de células NK no clásicas, como son las denominadas NKT por su expresión positiva de CD3, al igual que la subpoblación linfocitaria T, también han sido relevantes desde el punto de vista reproductivo en el caso del AR⁽⁹⁾.

Una limitación de estos estudios es que, como la mayoría de los realizados en este campo, incluyen pacientes con otras alteraciones inmunológicas que pueden afectar el nivel de expresión de estos biomarcadores como podría ser la presencia de anticuerpos antinucleares que no suelen incluirse como criterio de exclusión en dichos estudios.

La falta de consenso en los criterios diagnósticos de pacientes limita la comparación de trabajos, además del reducido tamaño muestral incluido en los estudios, y la gran cantidad de resultados controvertidos en la literatura científica, imposibilita que los hallazgos mostrados adquieran suficiente evidencia para avalar una relación directa con la fisiopatología del AR y/o FIR.

Existe una gran necesidad de conocer qué otros factores de riesgo pueden estar afectando a las pacientes con AR y FIR en las que no se encuentra un hecho causal. Esto,

junto con la gran cantidad de estudios que demuestran la importancia de una correcta coordinación del sistema inmunológico a nivel celular para que una gestación pueda llevarse a cabo y, en consecuencia, llegar a término, hace que nos planteemos que la determinación de biomarcadores inmunológicos celulares en pacientes con AR y/o FIR de causa no aclarada, podría ayudarnos a entender mejor dichas patologías, permitiéndonos desarrollar una medicina más personalizada.

Objetivos

1. Objetivo principal

- Describir el perfil inmunológico celular de pacientes con abortos de repetición o fallos recurrentes de implantación inexplicables previo a cualquier tratamiento farmacológico, tanto a nivel de la respuesta inmune adaptativa como innata, identificando alteraciones en estas pacientes en comparación con mujeres fértiles.

2. Objetivos secundarios

- Establecer puntos de corte en las subpoblaciones linfocitarias T, B, NK y NKT y serie monocítica que se asocien al aborto de repetición o fallo de implantación recurrente.
- Comparar el perfil inmunológico de las pacientes con abortos de repetición con el de las pacientes con fallos recurrentes de implantación.
- Establecer asociación entre el número de abortos o fallos de implantación, y las alteraciones inmunológicas estudiadas.
- Establecer asociación entre factores como la edad o el tipo de infertilidad (primaria o secundaria), y las alteraciones inmunológicas estudiadas.

Materiales y Métodos

1. Estudio Casos y Controles

DISEÑO

Estudio prospectivo observacional analítico (casos y controles) realizado en el Servicio de Inmunología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM) desde octubre de 2019 hasta abril de 2022.

PACIENTES

La cohorte de pacientes seleccionada constaba de 12 mujeres no embarazadas con antecedentes de fallo recurrente de implantación inexplicable (Grupo FIR) y 49 mujeres no embarazadas con historial clínico de abortos de repetición de causa desconocida (Grupo AR).

- *CRITERIOS DIAGNOSTICOS*

Se tuvo en cuenta la ausencia de embarazo (β -HCG negativa) tras transferencia de al menos tres blastocistos de buena calidad en mujeres hasta 37 años, o de tres blastocistos euploides en mujeres mayores de 37 años, sin evidencia clara de no implantación en los estudios básicos previos de la pareja infértil, como criterio diagnóstico para la selección de pacientes con FIR. La definición de AR considerada en el estudio fue la pérdida de dos o más embarazos clínicos, consecutivos o no, antes de la semana 22 de gestación.

- *CRITERIOS DE EXCLUSIÓN*

Mujeres con causa documentada de FIR o AR fueron excluidas del estudio. Potenciales antecedentes como alteraciones anatómicas uterinas congénitas o adquiridas, anomalías en el cariotipo tanto de la mujer como en su pareja, además de alteraciones genéticas en el producto de concepción (POC), obesidad ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$), infecciones en los 6 últimos meses, alteraciones endocrinas (hiperprolactinemia no tratadas, diabetes mellitus e hipo/hipertiroidismo mal controladas), celiaquía sin restricción de gluten, alteraciones ginecológicas (endometriosis, síndrome de ovario poliquístico, amenorrea), trombofilias congénitas (mutación en G20210A e la protrombina o factor V Leiden) y adquiridas (síndrome antifosfolípido), tratamientos inmunomoduladores en los 6 meses anteriores, y cualquier desorden inmunológico autoinmune (anticuerpos antinucleares,

antifosfolípidos, anti-transglutaminasa, y anti-tiroideos), se tuvieron en cuenta en la exclusión de pacientes.

CONTROLES

Grupo de controles formada por un subgrupo de 40 mujeres en edad fértil (25-45 años) con al menos un recién nacido vivo (Grupo CNT hijos), y otro subgrupo de 60 mujeres en edad fértil sin antecedentes de embarazo (Grupo CNT sin hijos). La selección de mujeres incluidas en los grupos control se llevó a cabo a partir de bases de datos elaboradas en estudios previos. Los controles negaron tener enfermedades activas en el momento del estudio.

- *CRITERIOS DE EXCLUSIÓN*

Antecedentes de fallo de implantación o aborto espontáneo, además de los mencionados para la cohorte de pacientes, se tuvieron en cuenta en la exclusión de controles en ambos grupos.

2. Método de evaluación

CITOMETRÍA DE FLUJO

- *MARCAJE DE LA MUESTRA*

Se realizó un estudio inmunofenotípico de subpoblaciones linfocitarias T, B, NK y NKT, además de serie monocítica, incluyéndose un perfil de activación celular T CD8+, junto al estado madurativo de linfocitos B CD19+. La caracterización celular se llevó a cabo mediante citometría de flujo en sangre periférica recogida en tubos con anticoagulante EDTA. El procesamiento de la muestra incluía en un primer momento, el marcaje en superficie de 100 μ L de sangre periférica con el coctel de anticuerpos monoclonales conjugados, recogido en la *Tabla 1*, durante 20 minutos en oscuridad y temperatura ambiente, separando en un tubo, la identificación celular T, NK, NKT y monocitos, además de la activación linfocitaria T CD8 (Tubo 1), y en otro, la caracterización linfocitaria B (Tubo 2). La muestra utilizada en el tubo 2 fue previamente lavada en una proporción 1:10 con PBS 1X (*Gibco/ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA*). Tras la incubación con los anticuerpos monoclonales correspondientes, se llevó a cabo la lisis de eritrocitos y fijación de la muestra mediante el uso del reactivo BD FACS Lysing Solution 10X (*Becton Dickinson, San José, CA*,

USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Finalmente se realizaron tres lavados de la muestra añadiendo 2mL de PBS 1X y centrifugando a 400xg durante 5 minutos.

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales utilizados en la identificación de monocitos y subpoblaciones linfocitarias T, B, NK y NKT

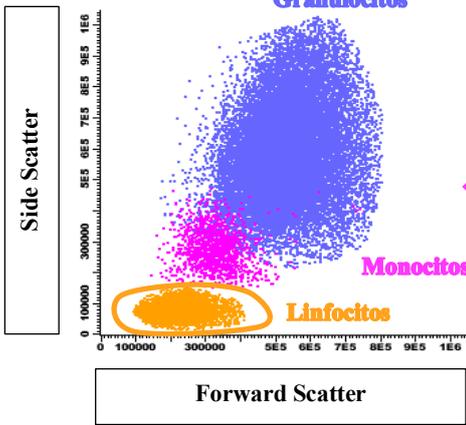
<i>Tubo</i>	<i>Perfil celular</i>	<i>Anticuerpo</i>	<i>Fluorocromo</i>	<i>Clon</i>	<i>μL /test</i>	<i>Casa comercial</i>
Tubo 1: <i>subpoblación T, NK, NKT y monocitos</i>	Monocitos	CD14	PerCP	MEM-15	10 μL	EXBIO
	Linfocitos T, NK Y NKT	CD3	PB	UCHT1	5 μL	Cytognos
		CD8	APC	17D8	3 μL	Cytognos
		CD56	PC5.5	N901	5 μL	Beckman Coulter
	Activación T y serie monocítica	HLA DR	FITC	L243	5 μL	Cytognos
CD38		PE	T16	5 μL	Cytognos	
Tubo 2: <i>subpoblación B</i>	Linfocito B	CD19	PerCP Cy5.5	HIB19	3 μL	Cytognos
	Maduración B	CD27	FITC	LT27	5 μL	EXBIO
		IgM	APC	SADA4	3 μL	Cytognos
		IgD	PE	IGD26	5 μL	Miltenyi Biotec

PerCP: complejo proteico de peridina y cloroquina, PB: pacific blue, APC: alofocianina, PE: ficoeritrina, FITC: isotiocinato de fluoresceína, PerCP Cy5.5: complejo proteico de peridina y cloroquina cianina 5.5, PC5.5: ficoeritrina cianina 5.5.

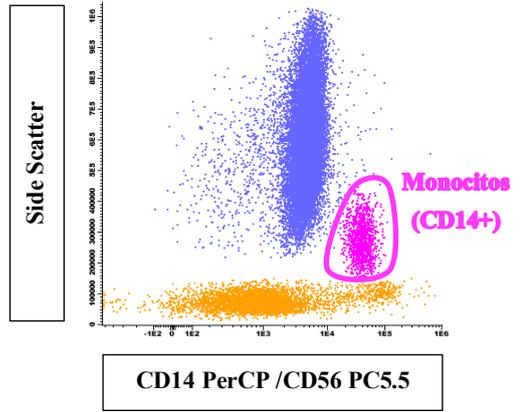
- **ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE LA MUESTRA**

La adquisición de la muestra previamente procesada se realizó en un citómetro de flujo Gallios Beckman Coulter 10 colores (3 láseres) mediante el software Cytometry List Mode Data Acquisition and Analysis (*Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA*). El análisis se ejecutó mediante el Kaluza Analysis Software (*Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA*) e Infinicyt Software (*Cytognos, Salamanca, España*), siguiendo la estrategia de análisis mostrada en la *Figura 1*.

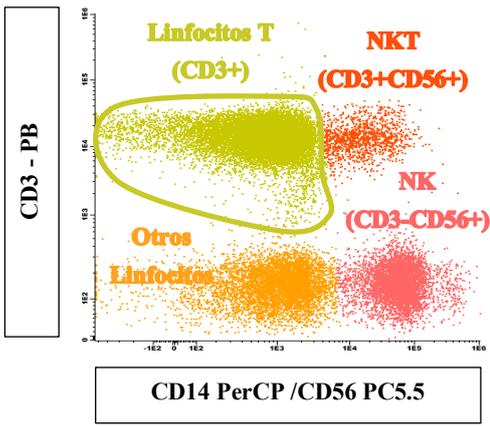
A



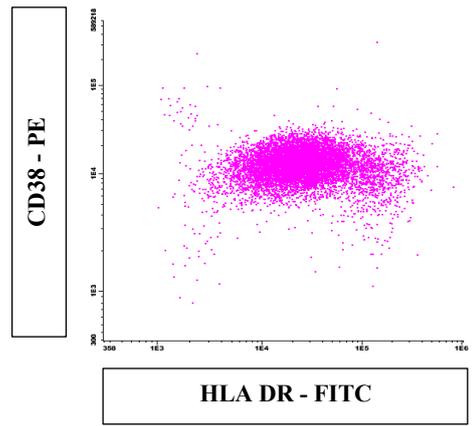
IDENTIFICACIÓN DE MONOCITOS



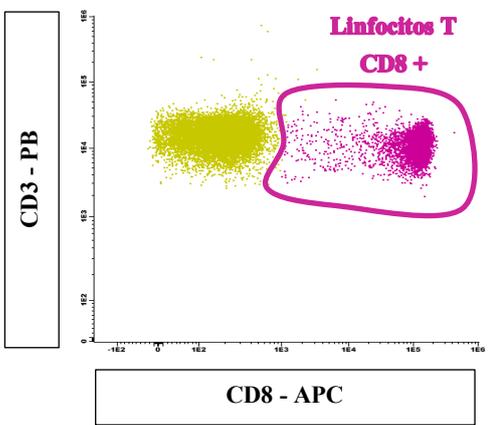
IDENTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS



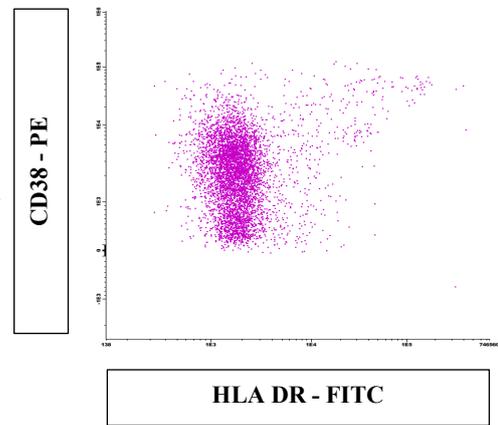
SERIE MONOCÍTICA



IDENTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIÓN LINFOCITARIA T CD8



ACTIVACIÓN LINFOCITARIA T CD8



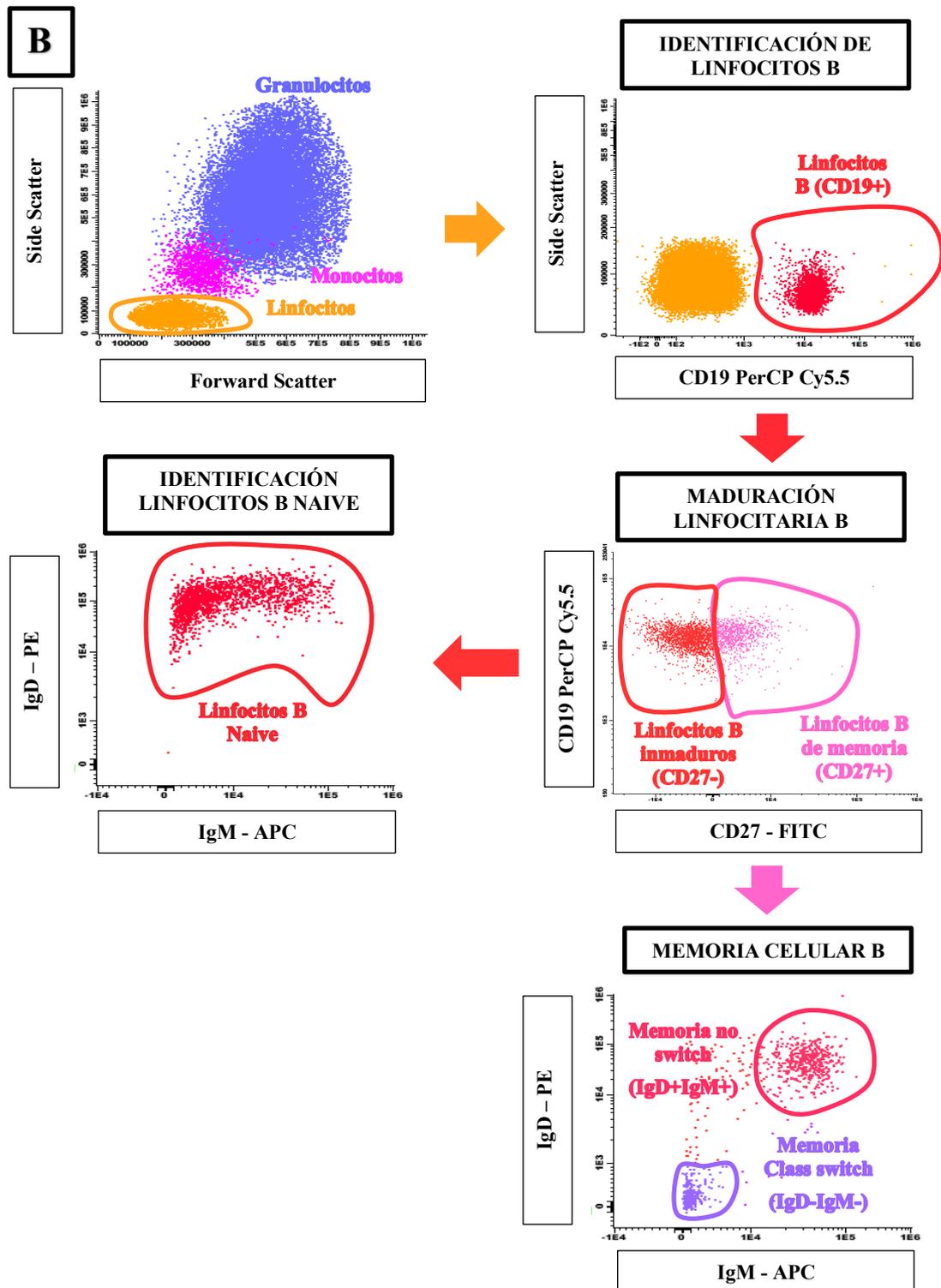


Figura 1. A) estrategia de análisis seguida para la identificación de subpoblaciones linfoides T, NK y NKT y serie monocítica, además de activación celular T CD8, tras la adquisición de la muestra procesada en el tubo 1 del protocolo; B) estrategia de análisis seguida para la identificación de la subpoblación linfocitaria B y su perfil madurativo tras la adquisición de la muestra procesada en el tubo 2 del protocolo.

3. Estadística

El análisis estadístico de las variables medidas en nuestro estudio se llevó a cabo en el software IBM SPSS Versión 25 (*SPSS Inc., Chicago, IL, USA*). El tamaño muestral mínimo a evaluar se calculó en 31 participantes por grupo. Se consideró un error tipo I del 5%, con una potencia estadística del 80%, asumiendo una distribución de alteraciones para nivel NKT de estudios previos alrededor del 40% y 10% en población enferma y controles respectivamente. Las variables cuantitativas fueron sometidas a un análisis descriptivo de tendencia central tras la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov. Las variables cualitativas fueron representadas por su frecuencia absoluta y relativa. Se realizó un análisis de diferencia de medias entre los diferentes subgrupos de pacientes, y entre subgrupos de pacientes y subgrupos control, aplicando la prueba T de Student para variables cuantitativas y la chi-cuadrado (χ^2) en las categóricas. Para minimizar el error en comparaciones de más de 2 grupos se realizó análisis de ANOVA con corrección de Bonferroni. Mediante curva ROC se identificaron puntos de corte en las variables que se asociaban con desarrollo de AR. La identificación del riesgo relativo se realizó mediante un análisis de regresión logística, obteniéndose el valor de Odd Ratio (OR). Las variables que resultaron significativas se introdujeron en modelos de regresión logística multivariable para ver las variables más fuertemente asociadas con el desarrollo de abortos. Para la identificación de escalas de riesgo o *score* en el AR, se combinaron los biomarcadores descritos en el análisis de regresión logística multivariable, teniendo en cuenta el valor de OR obtenido para el cálculo de la puntuación. Mediante curva ROC se identificó un punto de corte en el score y se procedió a un análisis de regresión logística univariable y multivariable. Se consideró un intervalo de confianza del 95% y valores de $p < 0,05$ como significativos para estos análisis.

4. Ética

El presente estudio cumplió con los estándares éticos propuestos por el comité de ética del HGUGM y el comité de ética de la Universidad Europea de Madrid, consiguiendo su aprobación previamente a la realización del estudio (*Anexo 2*). Los procedimientos seguidos se ajustaron a la Declaración de Helsinki de 1975. Se recogió un consentimiento informado antes de la obtención de las muestras y realización de procedimientos en cada uno de los sujetos de estudio.

Resultados

1. Descripción del grupo pacientes

El grupo FIR constaba de 12 mujeres no embarazadas con una edad media de 35 años (30-41 años) e historial clínico de fallo recurrente de implantación de causa desconocida, de las cuales, el 75% manifestaron antecedentes de tres fallos de implantación, y el 25% presentaron más de tres. En el grupo AR se incluyeron un total de 49 mujeres con media de 36 años (30-43 años), no embarazadas con antecedentes de abortos de repetición de causa desconocida en el 1^{er} y 2^o trimestre. El 38,76% tuvo un total de dos abortos espontáneos y el 61,22% más de dos abortos. Entre otras variables clínicas evaluadas en los dos grupos de pacientes se pudo observar diferencias significativas en el número de pacientes que presentaban factor tubárico o antecedentes de cirugías uterinas (*Anexo 1, Tabla 1*).

2. Comparación del perfil inmunológico entre grupos

COMPARACION ENTRE GRUPOS DE PACIENTES

Las pacientes con diagnóstico de AR presentaron mayor porcentaje de linfocitos totales en sangre periférica que el grupo de pacientes con FIR (*Figura 2*). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el resto de los parámetros inmunológicos estudiados entre estos grupos (*Anexo 1, Tabla 2*).

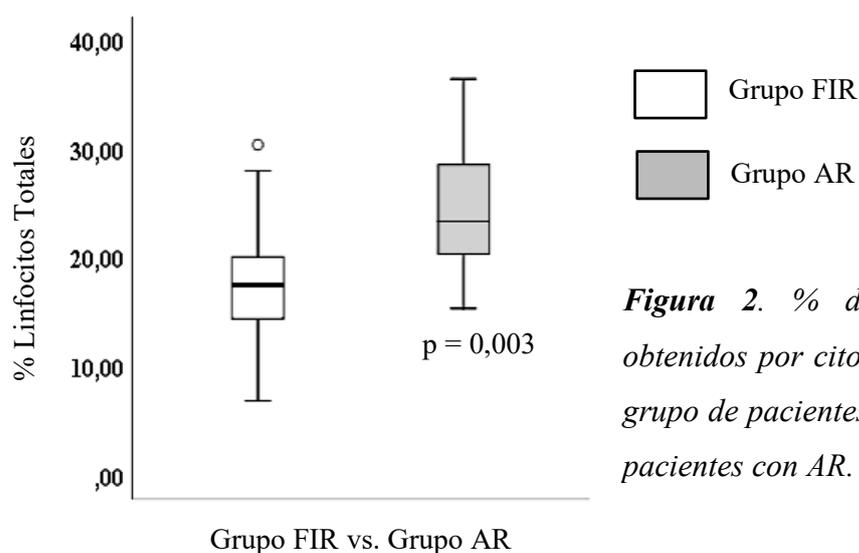
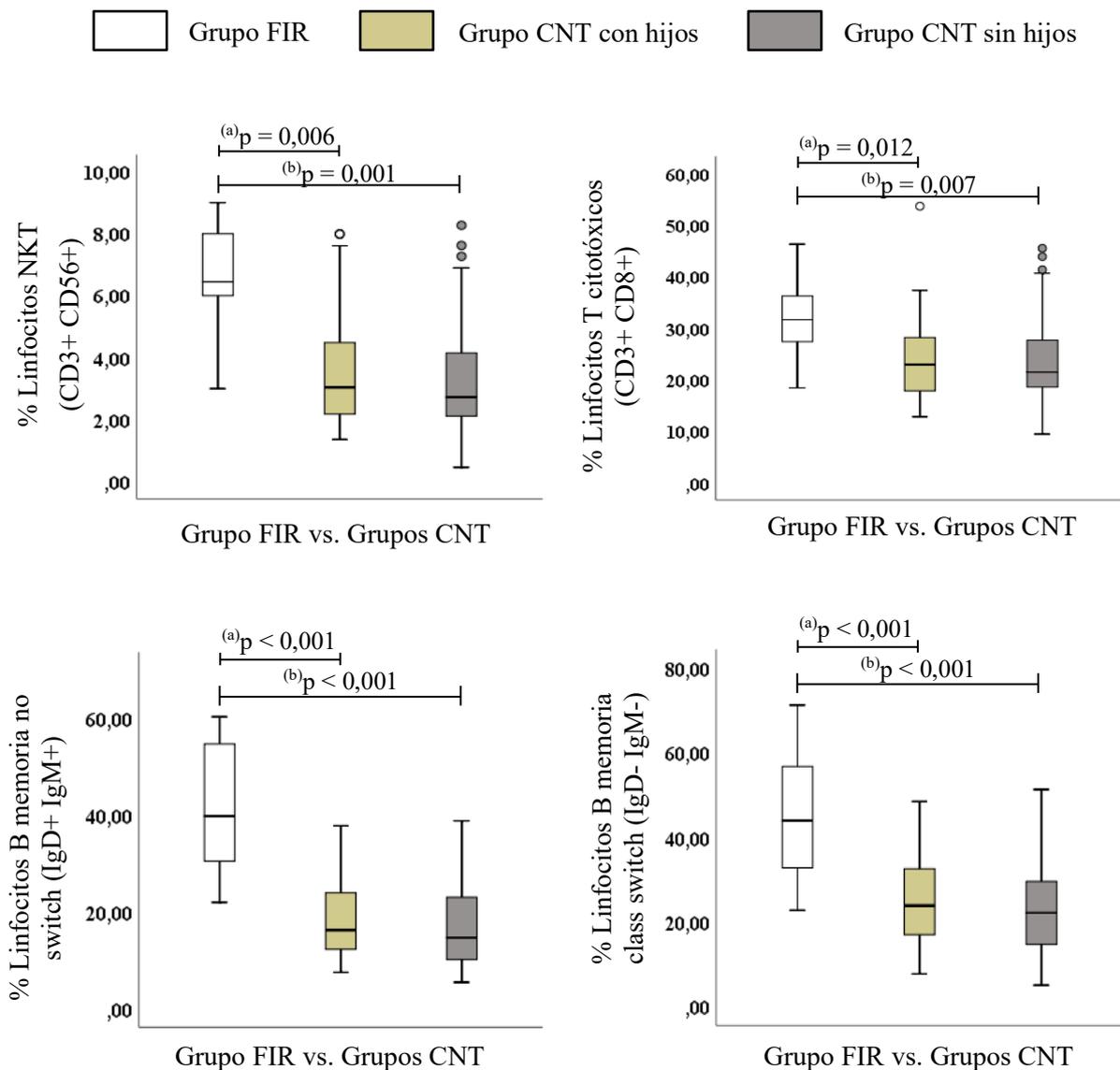


Figura 2. % de linfocitos totales obtenidos por citometría de flujo en el grupo de pacientes con FIR y grupo de pacientes con AR.

COMPARACION ENTRE GRUPO FIR Y GRUPOS CONTROL

Se encontraron porcentajes significativamente más altos de linfocitos NKT (CD3+ CD56+), linfocitos T citotóxicos (CD3+ CD8+), linfocitos B memoria no switch (CD19+ CD27+ IgD+ IgM+) y linfocitos B memoria class switch (CD19+ CD27+ IgD- IgM-) en las pacientes con FIR en comparación con ambos grupos control (CNT) con hijos y sin hijos. Las mujeres con FIR tuvieron mayor porcentaje de linfocitos B naive (CD19+CD27-) con respecto al grupo control con hijos y menor porcentaje de linfocitos T (CD3+) con respecto a los dos grupos control (*Figura 3*). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos para el resto de los marcadores inmunológicos celulares (*Anexo 1, Tabla 2*).



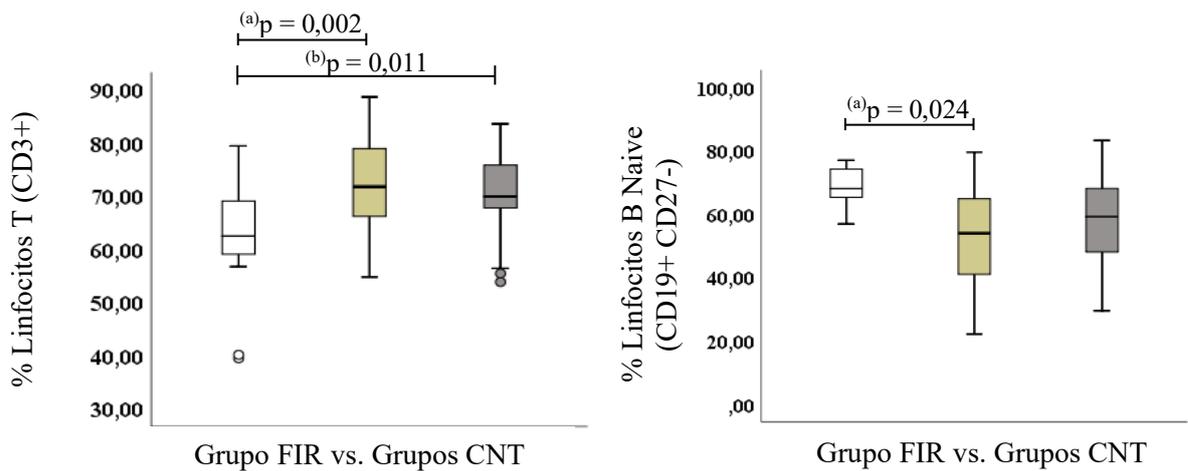
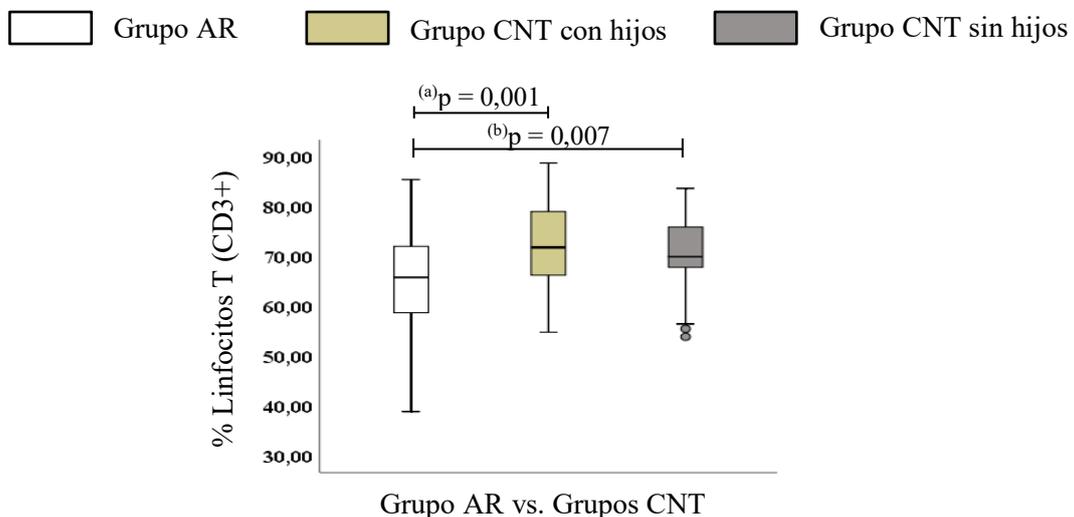


Figura 3. CNT: grupo control. % linfocitos NKT (CD3+ CD56+), % linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+), % linfocitos B memoria no switch (CD19+CD27+IgD+IgM+), % linfocitos B memoria class witch (CD19+CD27+IgD-IgM-), % linfocitos T (CD3+) y % linfocitos B naive (CD19+CD27-), obtenidos por citometría de flujo. ^(a) Valores de p entre grupo FIR y grupo CNT con hijos; ^(b) Valor de p entre grupo FIR y grupo CNT sin hijos.

COMPARACION ENTRE GRUPO AR Y GRUPOS CONTROL

El grupo AR presentó mayor porcentaje de linfocitos NKT (CD3+CD56+), linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+), linfocitos B memoria no switch (CD19+CD27+IgD+IgM+) y linfocitos B memoria class switch (CD19+CD27+IgD- IgM-), y menor porcentaje de linfocitos T (CD3+) que ambos grupos de control (*Figura 4*). Las otras subpoblaciones linfocitarias analizadas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (*Anexo 1, Tabla 2*).



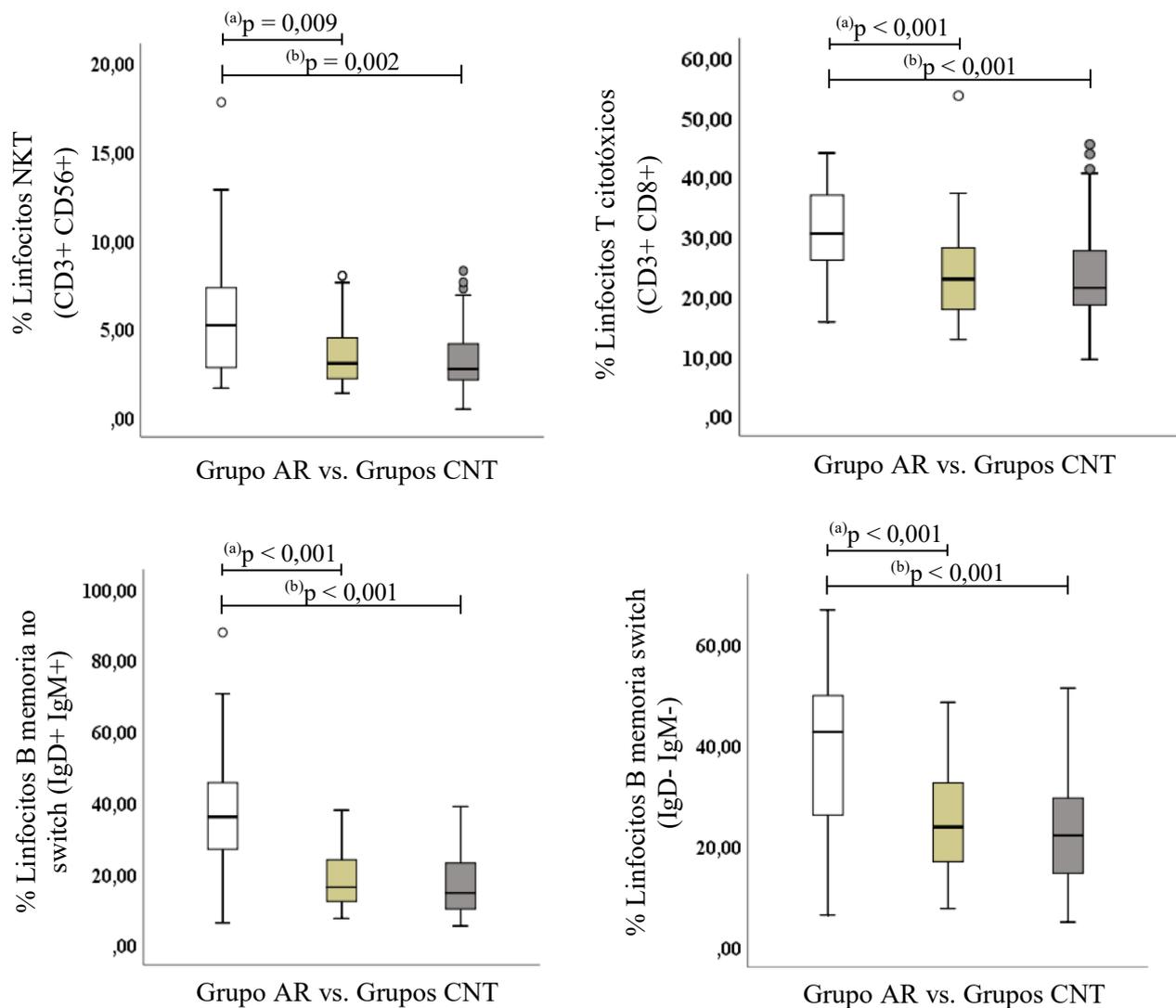


Figura 4. CNT: grupo control. % linfocitos T (CD3+), % linfocitos NKT (CD3+CD56+), % linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+), % linfocitos B memoria no switch (CD19+CD27+IgD+ IgM+) y % linfocitos B memoria class witch (CD19+CD27+IgD- IgM-) obtenidos por citometría de flujo en el grupo de pacientes con AR y ambos grupos de controles. ^(a) Valores de p entre grupo AR y grupo CNT hijos; ^(b) Valor de p entre grupo AR y grupo CNT sin hijos.

3. Identificación de puntos de corte asociados al AR

Se identificó mediante curva ROC un punto de corte de linfocitos NKT >5% (sensibilidad 51,40% y especificidad 82,10%), y otro con mayor especificidad de células NKT >8,50% (sensibilidad 23% y especificidad 100%). Otros puntos de corte incluyeron: linfocitos T CD8+ >26,50% (sensibilidad 71,40% y especificidad 70%), linfocitos B de

memoria no switch y class switch >22% (sensibilidad 79,2% y especificidad 70%) y >32% (sensibilidad 66,70% y especificidad 72,50%), respectivamente (Figura 5). No se identificaron puntos de corte para el porcentaje de linfocitos T CD3+.

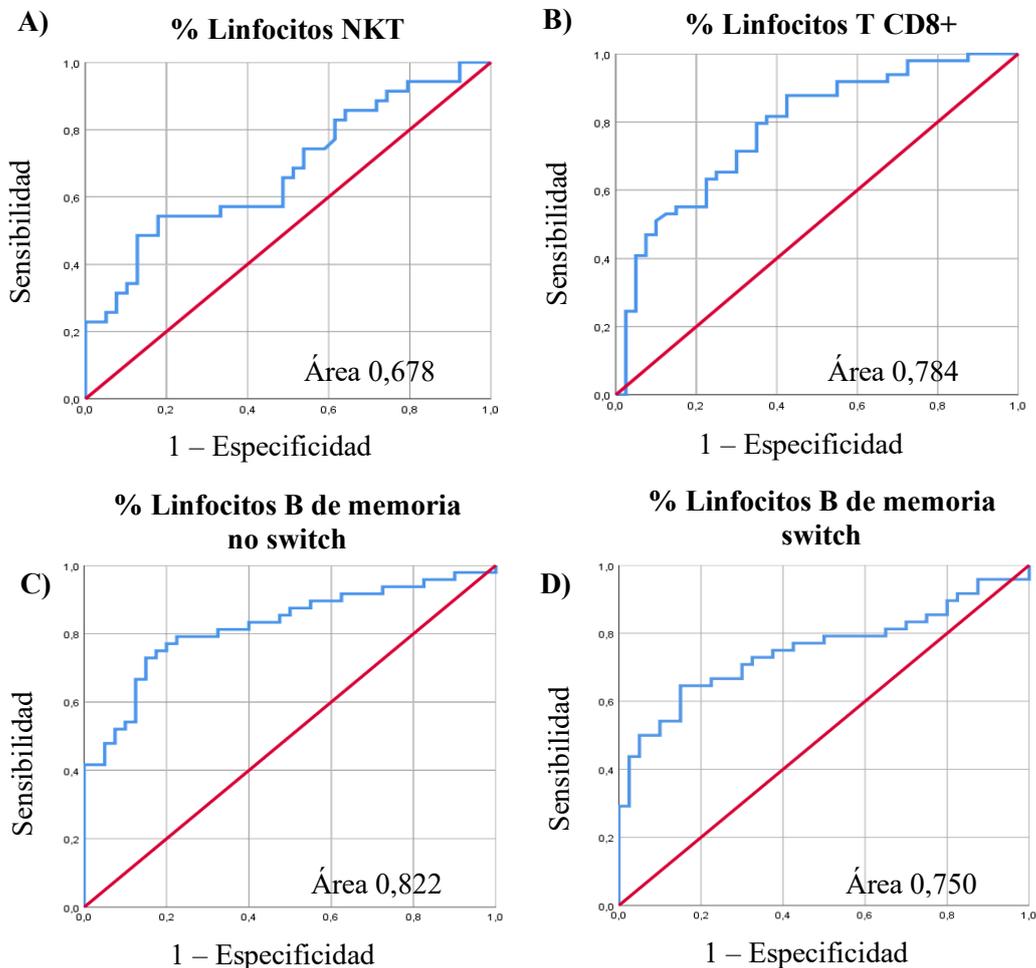


Figura 5. Curvas ROC de: % de linfocitos NKT (A), % de linfocitos T CD8+ (B), % de linfocitos B de memoria no switch (C) y % de linfocitos B de memoria class switch (D).

4. Identificación de biomarcadores de riesgo de AR

Niveles más altos de porcentaje de linfocitos NKT, linfocitos T CD8+, linfocitos B de memoria no switch y class switch, se vieron asociados significativamente con el desarrollo de AR. Mediante la prueba χ^2 se identificó asociación estadísticamente significativa del porcentaje de linfocitos NKT > 5% o > 8,50%, porcentaje de linfocitos T CD8+ > 26,50%, y porcentaje de linfocitos B de memoria no switch > 22% y class switch > 32% con desarrollo de AR (Anexo 1, Tabla 3).

5. Identificación de factores de riesgo mediante regresión logística

REGRESIÓN LOGÍSTICA UNIVARIABLE

Los niveles de células NKT > 5%, células T CD8+ > 26,50%, células B de memoria no switch > 22% y células B de memoria class switch > 32%, resultaron significativamente asociados con riesgo de AR en el análisis de regresión logística univariante (*Anexo 1, Tabla 4*).

REGRESIÓN LOGÍSTICA MULTIVARIABLE

Tras ajuste entre variables, en el análisis de regresión logística multivariante se mantuvieron con asociación significativa al AR en el modelo los linfocitos NKT > 5%, células T CD8+ > 26,50% y células B de memoria no switch > 22% (*Anexo 1, Tabla 5*), quedando excluido el biomarcador de linfocitos B de memoria class switch > 32% con una significación de $p = 0,921$.

6. Identificación de escalas de riesgos o *score* inmunológico

El cálculo del score se realizó adjudicando 5 puntos si el porcentaje de linfocitos NKT era superior al 5%, 4 puntos si el porcentaje de la subpoblación T CD8+ era superior a 26,50% y 3 puntos si el porcentaje de la subpoblación linfoide B de memoria no switch superaba el 22%. Mediante curva ROC se identificó un punto de corte en el *score* de 6 puntos con una sensibilidad del 50% y una especificidad del 97,40% (*Figura 6*), significativamente asociado al desarrollo de AR ($p < 0,001$, prueba χ^2), adquiriendo un valor de OR de 12,47 (3,86-40,29 95% IC). Realizamos un análisis multivariante donde observamos un desplazamiento de las variables individuales y la prevalencia del score frente a estas, sugiriéndose que la combinación de alteraciones puede asociarse mejor con riesgo de AR (*Anexo 1, Tabla 6*).

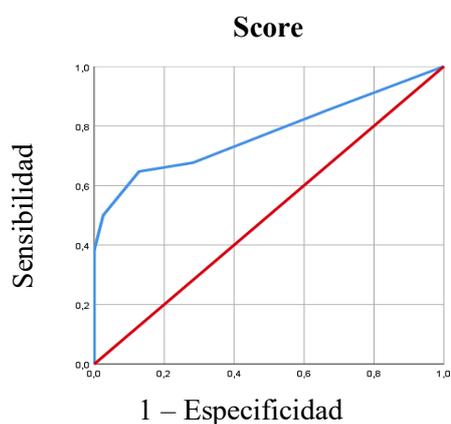


Figura 6. Curva ROC obtenida para los valores de score calculados. Área bajo la curva = 0,775.

7. Identificación de diferencias inmunológicas celulares intragrupal

GRUPO FIR

- PERFIL INMUNOLÓGICO SEGÚN EL NÚMERO DE FI

No se identificaron diferencias significativas en las variables inmunológicas celulares estudiadas al comparar el grupo con 3 fallos de implantación con el grupo que presentó más de 3 fallos de implantación (*Anexo 1, Tabla 7*).

- PERFIL INMUNOLÓGICO SEGÚN LA EDAD

Las pacientes mayores de 35 años presentaron significativamente menor porcentaje de linfocitos T (CD3+) y mayor porcentaje de células NK (CD3-CD56+) que las pacientes menores de 35 años (*Figura 7 y Anexo 1, Tabla 7*).

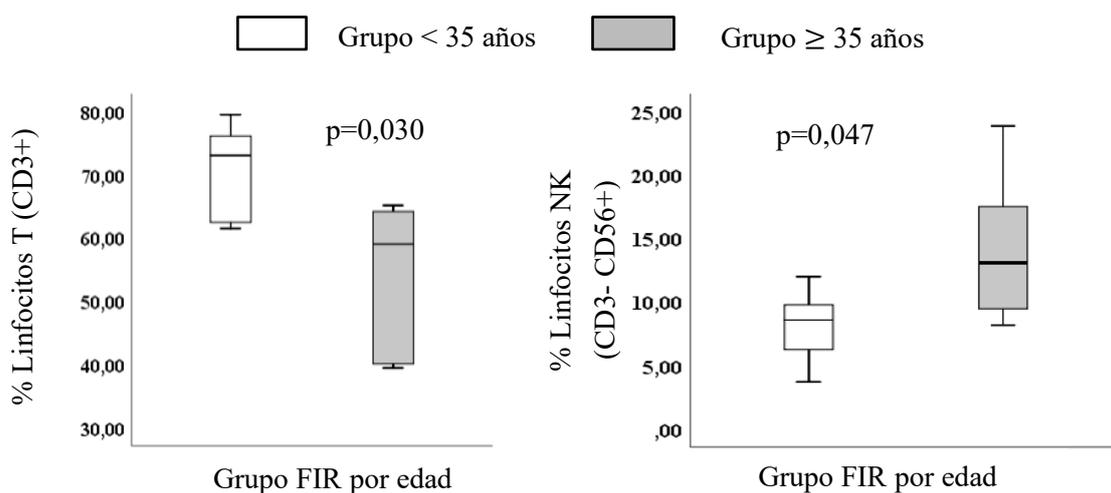
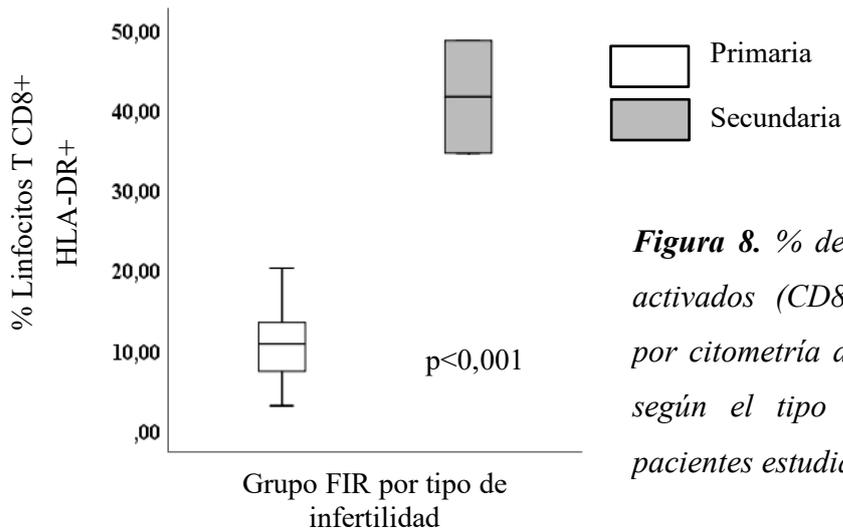


Figura 7. % de linfocitos T (CD3+) y células NK (CD3-CD56+) obtenidos por citometría de flujo en el grupo FIR dependiente de la edad.

- PERFIL INMUNOLÓGICO SEGÚN EL TIPO DE INFERTILIDAD

El porcentaje de linfocitos T CD8+ HLA-DR+ fue significativamente mayor en el grupo de pacientes FIR que presentaban infertilidad secundaria que las pacientes con infertilidad primaria (*Figura 8*). No se encontraron otras diferencias entre estos grupos de pacientes (*Anexo 1, Tabla 7*).



GRUPO AR

- PERFIL INMUNOLÓGICO SEGÚN EL NÚMERO DE ABORTOS

Se observó mayor porcentaje de monocitos y menor porcentaje de linfocitos B de memoria no switch en el grupo con más de dos abortos que en el grupo con historial clínico de dos abortos (Figura 9). No se encontraron otras diferencias significativas entre grupos (Anexo 1, Tabla 8).

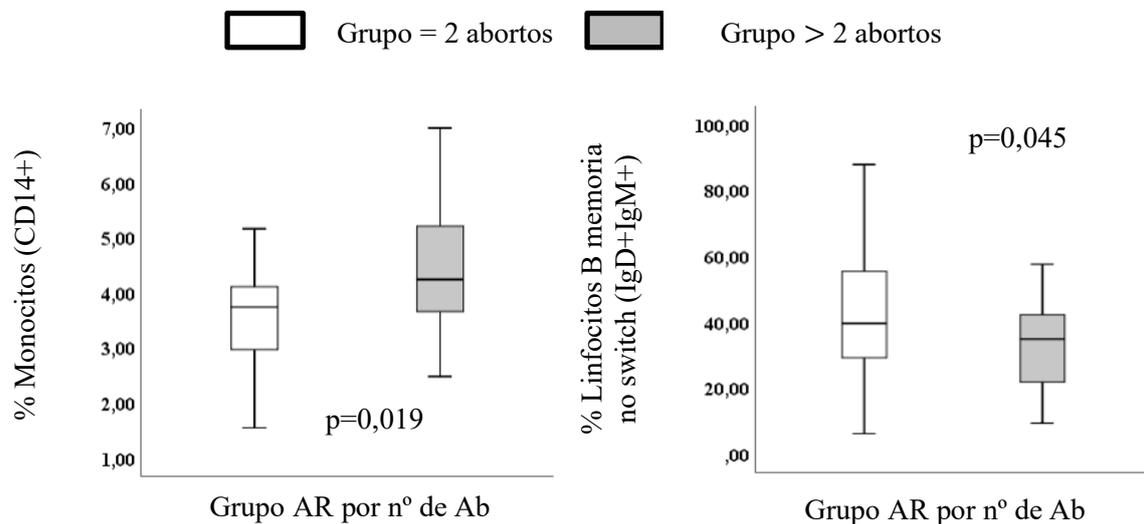


Figura 9. Ab: abortos espontáneos; % monocitos (CD14+) y linfocitos B de memoria no switch (CD19+CD27+IgD+IgM+) obtenidos en el grupo AR dependiendo del número de abortos.

- PERFIL INMUNOLÓGICO SEGÚN LA EDAD

No se encontraron diferencias significativas en el perfil inmunológico de las pacientes con AR menores a 35 años en comparación con el grupo mayor o igual a 35 años (*Anexo 1, Tabla 8*).

- PERFIL INMUNOLÓGICO SEGÚN EL TIPO DE INFERTILIDAD

Las mujeres con AR secundario presentaron mayor porcentaje de linfocitos B de memoria class switch que las pacientes con AR primario (*Figura 10*). No se identificaron diferencias en el resto del perfil inmunológico entre grupos (*Anexo 1, Tabla 8*).

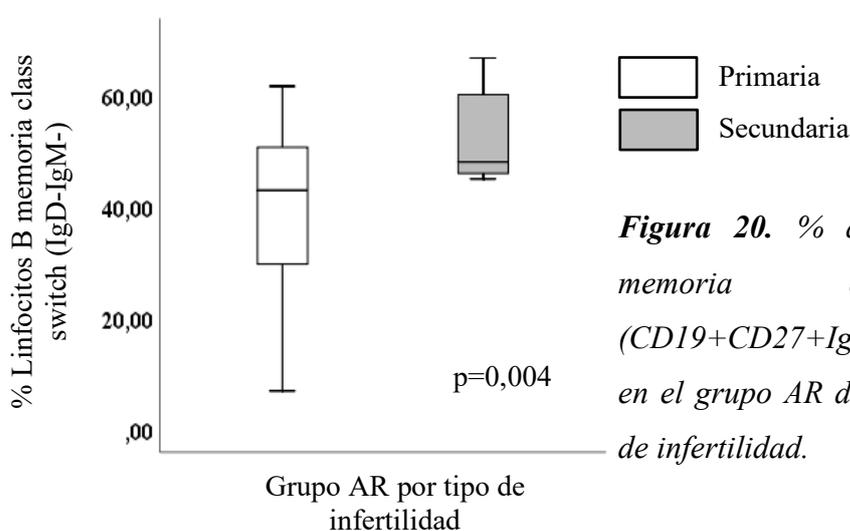


Figura 20. % de linfocitos B de memoria class switch (CD19+CD27+IgD-IgM-) obtenido en el grupo AR dependiendo del tipo de infertilidad.

Discusión

El correcto funcionamiento del sistema inmunológico materno es esencial para que una adecuada adaptación y/o tolerancia materno-fetal se produzca a lo largo del embarazo. La desregulación de este puede desencadenar complicaciones durante la implantación y gestación que desembocarán en un fallo reproductivo. Establecer biomarcadores inmunológicos que ayuden a predecir el AR y FIR está siendo objeto de estudio de muchos grupos de investigación.

Nuestro estudio, nos ha posibilitado la comparación de un perfil celular de pacientes con AR y FIR con el perfil inmunológico de grupos control, permitiéndonos identificar ciertos parámetros que podrían estar influyendo en la patogenia del AR y FIR de causa desconocida. Además, hemos podido estudiar las diferencias a nivel celular entre

pacientes con AR y FIR, observado únicamente un incremento porcentual de linfocitos totales en las pacientes AR, por lo que podríamos concluir que existe una similitud en el perfil inmunológico celular entre ambos fallos reproductivos entre lo que hemos evaluado.

Tanto en pacientes con AR como en pacientes con FIR, hemos observado una disminución porcentual celular T CD3+ en sangre periférica, aparentemente no descrita por otros autores, junto con una paradójica elevación de niveles celulares T citotóxicos CD8+, puesto que al estar disminuida la población T CD3+ podríamos esperar una disminución de sus subpoblaciones celulares. Dichos hallazgos podrían explicarse desde el punto de vista de una respuesta Th1/Th2 alterada, en la que la disminución de células T CD3+ podría asociarse a un descenso de la subpoblación celular T CD4+, en especial de linfocitos Treg encargados de la tolerancia materna durante la gestación, descrito previamente por diferentes autores^(2,7,10,11,15), aumentando así, la proporción de células T citotóxicas CD8+ circulantes y prevaleciendo un perfil inmunológico proinflamatorio, tal y como describen Wang et al.⁽¹⁵⁾. Sin embargo, la corroboración de la hipótesis expuesta debería de realizarse ampliando el perfil celular de estudio en futuros trabajos. A pesar de que la población celular T CD3+ se encuentre disminuida en el grupo de pacientes FIR, hemos identificado mayores niveles de células T CD3+ en aquellas pacientes menores de 35 años, a diferencia del grupo AR menor de 35 años, donde no se observó dicha elevación, lo que nos indica que la edad podría estar influyendo en la proporción de linfocitos T de mujeres con FIR inexplicable, hecho que debiera de confirmarse con un reclutamiento mayor de pacientes.

A diferencia de estudios realizados anteriormente por nuestro grupo de investigación y otros en pacientes con AR, no conseguimos encontrar diferencias significativas en los niveles de activación celular T CD8+ (CD3+CD8+HLA DR+) entre grupos de pacientes y grupos control. Sin embargo, hemos identificado mayor proporción de activación en pacientes FIR con infertilidad secundaria frente a las pacientes con infertilidad primaria. Este hecho puede deberse a la alta y exhaustiva selección de pacientes llevada a cabo en este trabajo, donde se descartaron todas aquellas pacientes con cualquier alteración autoinmune, a fin de evitar sesgos en cuanto a la identificación de un perfil proinflamatorio activado en las mujeres con AR y FIR, lo que no se ha hecho en estudios previos. Se sabe que dichos procesos pueden asociarse a un aumento de activación T.

La presencia de alteraciones porcentuales en la población linfocitaria NKT también ha sido reflejada en nuestro trabajo, observándose un aumento celular tanto en pacientes con AR como con FIR. Existe cierta controversia entre los resultados encontrados por diferentes grupos de investigación acerca de la implicación patogénica de estas células en el AR y FIR. Khalaf et al. ⁽¹⁶⁾ describieron como niveles linfocitarios NKT elevados en sangre periférica de pacientes con AR pueden asociarse a un desequilibrio en la producción de citoquinas Th1/Th2, predominado un estado inflamatorio frente al regulador/tolerante que podría estar afectando al transcurso de la enfermedad. Sin embargo, otros estudios recogidos en una revisión realizada por Miko et al.⁽¹⁷⁾, no encontraron diferencias significativas entre pacientes con AR o FIR y controles, sugiriendo que estas células, no solo no están implicadas en la patofisiología del FIR y AR, sino que una proporción equilibrada de estas es esencial para que se genere un pequeño estado inflamatorio necesario para que la implantación embrionaria y el transcurso del embarazo se den de forma adecuada.

Al igual que en la activación celular T CD8+, hemos encontrado discrepancias en los niveles linfocitarios NK de pacientes con AR entre este estudio y otros anteriormente realizados, observando diferencias no significativas porcentuales de células NK entre los grupos control y los grupos de pacientes, en contraste con diferencias significativas reportadas en estudios anteriores. Las mejoras y disparidades metodológicas presentadas en este trabajo respecto a investigaciones previas podrían explicar dicha discordancia, sugiriendo la presencia de sesgos metodológicos que podrían estar afectando a los resultados obtenidos en estudios anteriores. Pese a dichos hallazgos, identificamos una elevación porcentual significativa de células NK circulantes en pacientes FIR mayores de 35 años, no presente en el mismo subgrupo de pacientes con AR, por lo que del mismo modo que ocurría en la población celular T CD3+, la edad podría repercutir en subpoblaciones celulares innatas como en el caso de las células NK.

Centrándonos en el estudio de la subpoblación linfocitaria B, nuestro grupo de investigación ya había obtenido datos que asociaban una alteración en el perfil madurativo celular B con el AR, observando un aumento linfocitario B de memoria no switch (CD19+ CD27+ IgM+ IgD+) en pacientes que presentaban dicho fallo reproductivo⁽¹³⁾. Otros grupos como Ota et al.⁽¹⁸⁾ también reportaron este hallazgo en pacientes con AR que presentaban anticuerpos antifosfolípidos positivos persistentes.

Nuestra investigación no solo ha identificado una mayor proporción celular de linfocitos B de memoria no switch (CD19+ CD27+ IgM+ IgD+) en sangre periférica tanto en pacientes AR como FIR, tal y como se había descrito anteriormente, sino también, un aumento porcentual de linfocitos B memoria class switch (CD19+ CD27+ IgM- IgD-) en dichas pacientes, hecho que puede ser explicado desde un punto de vista metodológico, en el que un aumento de la cohorte de pacientes junto a criterios de exclusión más estrictos respecto a estudios anteriores, han permitido la identificación de nuevos parámetros inmunológicos alterados en el fallo reproductivo. Además, hemos observado como aquellas pacientes abortadoras que presentan una infertilidad secundaria presentaban mayores niveles celulares B de memoria class switch que aquellas pacientes con infertilidad primaria. Sin embargo, paradójicamente, nuestros datos revelaron mayores niveles de células B de memoria no switch en aquellas pacientes que habían sufrido dos abortos en comparación a aquellas que presentaron más de dos.

A pesar de que estos hallazgos se encuentren descritos en la literatura mencionada anteriormente, otros autores como Sung et al.⁽¹⁹⁾ han identificado datos discordantes con los obtenidos por nuestro grupo, observando un descenso celular B tanto de memoria no switch como de memoria class switch, además de un porcentaje celular B CD19+ menor en el AR. No obstante, se trata de una única paciente, lo cual impide atribuir a los hallazgos encontrados una relación causal directa con la patología, a diferencia de nuestro estudio. En comparación con otras subpoblaciones linfocitarias, el rol celular B durante el embarazo todavía no es del todo conocido. Hasta el momento, distintos grupos han asociado a los linfocitos B reguladores (Breg) como parte de la maquinaria inmunológica implicada en la tolerancia materna junto con una activación de la respuesta humoral B a un embarazo saludable, puesto que se ha visto como inmunoglobulinas G (IgG) maternas impedían la activación de células T citotóxicas frente al trofoblasto embrionario. Algunos autores apuntan en estudios murinos a que alteraciones en la expresión superficial de marcadores pan-B y funciones celulares diferidas pueden afectar a la evolución del embarazo⁽²⁰⁾, sin embargo, hasta la fecha no existen muchos estudios en cuanto a la implicación de las distintas subpoblaciones B en el fallo reproductivo por lo que nuestra investigación es de interés en este campo.

La identificación de parámetros celulares alterados en pacientes FIR y AR en comparación con controles sanos, nos ha permitido determinar 2 puntos de corte de la proporción celular NKT en el AR. Por un lado, hemos determinado que mujeres con una

proporción mayor al 5% de células NKT respecto a linfocitos totales en sangre periférica presentaban 4,84 veces más riesgo de padecer AR que mujeres con valores inferiores o iguales. Por otro lado, hemos obtenido un punto de corte del 8,5% de células NKT, con una especificidad del 100%, lo que supone que todas las mujeres con proporciones mayores a este valor presentarían AR. Así pues, este podría ser un futuro biomarcador celular a tener en cuenta en la selección de pacientes para la administración de terapias inmunomoduladoras, como es el caso de la inmunoglobulina humana inespecífica intravenosa (IGIV). También se obtuvo que niveles sanguíneos mayores al 26,50% de linfocitos T CD8+, mayores al 22% de linfocitos B de memoria no switch o mayores al 32% de linfocitos B de memoria class switch en mujeres, aumentaba el riesgo de AR en 5,83, 7,89 o 4,68 veces, respectivamente. Sin embargo, si analizamos estos biomarcadores en una regresión logística multivariable, observamos como los OR obtenidos en este disminuyen con respecto a los obtenidos de forma individual, lo que podría sugerir la existencia de una dependencia entre ellos. Cuando evaluamos perfiles de riesgo la presencia de más de una alteración inmunológica descrita anteriormente aumentó el riesgo en 12,47 veces para presentar AR, insinuando que el AR es una patología compleja en la que múltiples factores podrían influir en la patogenia de la enfermedad.

En el caso del grupo FIR, un tamaño muestral reducido imposibilitó la determinación de biomarcadores inmunológicos, limitando así nuestro estudio en este grupo.

Entre otras limitaciones presentes en nuestro trabajo, destacamos la obtención de variables del grupo control a partir de bases de datos elaboradas en estudios anteriores. A pesar de las limitaciones mencionadas, este trabajo da pie a la realización de estudios de cohorte multicéntricos con un tamaño muestral superior y un perfil celular más completo, que validen el rol de las células NKT, linfocitos T citotóxicos y B en el AR y FIR. Por último, cabe mencionar que el estudio del papel de terapias inmunomoduladoras sobre los biomarcadores que hemos evaluado sería interesante a fin de evaluar posibles nuevos tratamientos que ayuden a la prevención del fallo reproductivo de causa inmunológica, contribuyendo de esta manera a una medicina más personalizada.

Conclusiones

- El perfil inmunofenotípico de activación de célula T CD8, de células NK y del estado de maduración del linfocito B es similar en pacientes con AR y FIR.
- El perfil inmunofenotípico celular periférico de pacientes con FIR y AR sugiere alteraciones las subpoblaciones linfocitarias T CD3+, NKT, T CD8+ y B de memoria no switch y class switch con un posible rol patogénico.
- Niveles de células NKT > 5%, linfocitos T CD8+ > 26,50%, linfocitos B de memoria no switch > 22% y linfocitos B de memoria no switch > 32% podrían emplearse como nuevos biomarcadores de riesgo para el AR.
- La combinación de alteraciones inmunofenotípicas en sangre periférica aumenta el riesgo de padecer AR en la mujer.
- Las pacientes con AR que experimentaron más de 2 abortos presentaron alteraciones de la serie monocítica y de la subpoblación celular B de memoria no switch que las pacientes con 2 abortos.
- Las pacientes con AR e infertilidad secundaria presentaron % de linfocitos B de memoria switch mayores que las pacientes con infertilidad primaria. La edad no parece afectar a las subpoblaciones celulares estudiadas.

Bibliografía

1. Grupo de Trabajo de Fracaso Reproductivo. Recomendaciones para el manejo del aborto recurrente (AR) [Internet]. 1st ed. Sociedad Española de Fertilidad SEF, editor. 2019 [cited 2022 Mar 4]. Available from: <https://www.sefertilidad.net/docs/recomendacionesAR.pdf>
2. Dimitriadis E, Menkhorst E, Saito S, Kutteh WH, Brosens JJ. Recurrent pregnancy loss. *Nature Reviews Disease Primers*. 2020 Dec 1;6(1).
3. The ESHRE Guideline Group on RPL, Bender Atik R, Christiansen OB, Elson J, Kolte AM, Lewis S, et al. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Human Reproduction Open*. 2018 Apr 1;2018(2):hoy004.
4. Bashiri A, Halper KI, Orvieto R. Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. Vol. 16, *Reproductive Biology and Endocrinology*. BioMed Central Ltd.; 2018.

5. Grupo de Trabajo de Fracaso Reproductivo. Recomendaciones para el manejo del fallo de implantación recurrente (FIR) [Internet]. 1st ed. Sociedad Española de Fertilidad SEF, editor. 2020 [cited 2022 Mar 8]. Available from: <https://www.sefertilidad.net/docs/recomendacionesFIR.pdf>
6. Mascarenhas M, Jeve Y, Polanski L, Sharpe A, Yasmin E, Bhandari HM. Management of recurrent implantation failure: British Fertility Society policy and practice guideline. *Human Fertility*. 2021 Apr 5;1–25.
7. Pirtea P, Scott RTJr, de Ziegler D, Ayoubi JM. Recurrent implantation failure: how common is it? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2021;33(3).
8. Vomstein K, Voss P, Molnar K, Ainsworth A, Daniel V, Strowitzki T, et al. Two of a kind? Immunological and clinical risk factors differ between recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Journal of Reproductive Immunology*. 2020 Sep 1;141.
9. García Segovia A, Sanchez-Ramón S. Estado actual del estudio de las células NK en pacientes infértiles. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana*. 2015;32:10–8.
10. Ander SE, Diamond MS, Coyne CB. Immune responses at the maternal-fetal interface. *Sci Immunol*. 2019 Jan 11;4(31).
11. Robertson SA, Care AS, Moldenhauer LM. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. *J Clin Invest*. 2018/10/01. 2018 Oct 1;128(10):4224–35.
12. Kuon RJ, Schaumann J, Goeggel T, Strowitzki T, Sadeghi M, Opelz G, et al. Patients with idiopathic recurrent miscarriage show higher levels of DR+ activated T-cells that are less responsive to mitogens. *Journal of Reproductive Immunology*. 2015 Nov 1;112:82–7.
13. Carbone J, Sarmiento E, Gallego A, Lanio N, Navarro J, García S, et al. Peripheral blood T- and B-cell immunophenotypic abnormalities in selected women with unexplained recurrent miscarriage. *Journal of Reproductive Immunology*. 2016 Feb 1;113:50–3.
14. Guerrero B, Hassouneh F, Delgado E, Casado JG, Tarazona R. Natural killer cells in recurrent miscarriage: An overview. *Journal of Reproductive Immunology*. 2020 Nov 1;142.

15. Wang F, Jia W, Fan M, Shao X, Li Z, Liu Y, et al. Single-cell Immune Landscape of Human Recurrent Miscarriage. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* [Internet]. 2021;19(2):208–22. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1672022921000036>
16. Khalaf WS, Mahmoud MRA, Elkhatab WF, Hashem HR, Soliman WE. Phenotypic characterization of NKT-like cells and evaluation of specifically related cytokines for the prediction of unexplained recurrent miscarriage. *Heliyon* [Internet]. 2021;7(11):e08409. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844021025123>
17. Miko E, Barakonyi A, Meggyes M, Szereday L. The Role of Type I and Type II NKT Cells in Materno-Fetal Immunity. *Biomedicines* [Internet]. 2021 Dec 14;9(12):1901. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34944717>
18. Ota K, Dambaeva S, Lee J, Gilman-Sachs A, Beaman K, Kwak-Kim J. Persistent high levels of IgM antiphospholipid antibodies in a patient with recurrent pregnancy losses and rheumatoid arthritis. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2014 Mar;71(3):286–92. Available from: <http://ezproxy.universidadeuropea.es/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=24382154&lang=es&site=eds-live&scope=site>
19. Sung N, Byeon HJ, Garcia MDS, Skariah A, Wu L, Dambaeva S, et al. Deficiency in memory B cell compartment in a patient with infertility and recurrent pregnancy losses. *Journal of Reproductive Immunology* [Internet]. 2016;118:70–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165037816304454>
20. Guzman-Genuino RM, Hayball JD, Diener KR. Regulatory B Cells: Dark Horse in Pregnancy Immunotherapy? *Journal of Molecular Biology* [Internet]. 2021;433(1):166596. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283620304551>

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría dedicar estos agradecimientos a mi tutor principal de TFM, el Dr. Javier Carbone. Gracias por brindarme la oportunidad de poder realizar este trabajo, ayudarme en cada momento a llevarlo adelante y, sobre todo, por haber conseguido que me desarrolle como profesional de la inmunología reproductiva durante todos estos años que hemos trabajado juntos.

Quiero reconocer en este apartado también, a todo el equipo de trabajo que hay detrás de este proyecto de investigación. A Rocío por ayudarme con el estudio de las muestras siempre que lo necesitaba y por ser la mejor compañera de trabajo que se puede tener. A Antonio, por guiarme durante mi desarrollo profesional, por sus consejos y por su gran simpatía. A Marian, enfermera encargada de la extracción de muestras de este proyecto, porque sin ella este trabajo no hubiese podido salir adelante. Y a Mariale, Marisa y residentes del servicio, por ayudarme con el reclutamiento de pacientes, por su profesionalidad, y su gran amistad.

No solo agradezco en este trabajo a las personas que han estado trabajando conmigo durante el desarrollo del proyecto, mi familia también ha sido una parte muy importante a lo largo de este camino. A mis padres, quienes me han dado la gran oportunidad de formarme como embrióloga y han estado apoyándome a lo largo de esta etapa, y a Rubén, quien, con su ayuda, consejos, motivación y apoyo este trabajo y esta etapa ha sido mucho más fácil de llevar, les doy las gracias por estar siempre ahí en cualquier momento.

Por último, pero no menos importante, me gustaría agradecer a todo el profesorado del máster su trabajo y dedicación durante este año tan intenso, y en especial, al profesor José Rivera, quien, además, ha ejercido la función de tutor académico de este TFM con gran empeño y entusiasmo, a pesar de que este no fuese su campo habitual de trabajo.

Anexos

1. Anexo 1: Tablas de resultados

Tabla 1. Análisis descriptivo de las variables clínicas presentes en el grupo de pacientes con FIR y en el grupo de pacientes con AR.

VARIABLES	PACIENTES				^(a) p
	Grupo FIR (n=12)		Grupo AR (n=49)		
	= 3 FI, n (%)	> 3 FI, n (%)	= 2 Ab, n (%)	> 2 Ab, n (%)	
	9 (75)	3 (25)	19 (38,76)	30 (61,22)	
Edad (años), media ± SD	35,20 ± 3,46		35,90 ± 3,30		0,498
< 35 años, n (%)	6 (50)		18 (36,73)		0,399
≥ 35 años, n (%)	6 (50)		31 (63,27)		
IMC (kg/m²), media ± SD	24 ± 3,79		23,90 ± 2,78		0,934
Nº Ab 1^{er} y 2º trimestre, mediana [RIC]	1 [0,0]		3 [1]		-
Pacientes con Ab en FIR, n (%)	4 (33,33)		-		-
Nº fallos de implantación, mediana [RIC]	3 [0,250]		1 [0,0]		-
Pacientes con FI en AR, n (%)	-		2 (4,50)		-
Infertilidad					
Primaria, n (%)	10 (83,33)		35 (71,43)		0,863
Secundaria, n (%)	2 (16,67)		6 (12,24)		
Historial clínico					
Hipotiroidismo en tratamiento, n (%)	1 (8,33)		4 (8,16)		0,985
Ovario poliquístico, n (%)	2 (16,67)		2 (4,08)		0,114
Factor tubárico, n (%)	2 (16,67)		0 (0,0)		0,004*
Cirugías uterinas, n (%)	3 (25)		3 (6,12)		0,049*
Pólipos/miomas subserosos, n (%)	1 (8,33)		5 (10,20)		0,845
Embarazo ectópico, n (%)	0 (0,0)		3 (6,12)		0,352
Candidiasis vaginal recurrente, n (%)	0 (0,0)		2 (4,08)		0,477
Mutación c677t en el gen de la MTHFR, n (%)	6 (50)		19 (38,76)		0,479
Otras mutaciones en factores de coagulación, n (%)	1 (8,33)		2 (4,08)		0,542

IMC: índice de masa corporal, FI: fallo de implantación, Ab: aborto espontáneo, SD: desviación estándar, RIC: rango intercuartílico.

^(a) Valor de p entre Grupo FIR y AR.

* Se consideró significativa una $p < 0,05$. Prueba T Student, U de Mann-Whitney o χ^2 , según corresponda.

Tabla 2. Comparación de medias del perfil inmunológico intergrupar.

POBLACIONES CELULARES	PACIENTES		CONTROLES		^(a) p	^(b) p	^(c) p	^(d) p	^(e) p
	Grupo FIR (n=11)	Grupo AR (n=49)	Grupo CNT con hijos (n=40)	Grupo CNT sin hijos (n=60)					
Sobre el total de la muestra (singletes)									
% Linfocitos totales	18,20 ± 6,72	24,50 ± 5,61	-	-	0,003*	-	-	-	-
% Monocitos (CD14+)	3,32 [0,955]	4,04 ± 1,17	-	-	0,309	-	-	-	-
Sobre Linfocitos Totales									
% Linfocitos T (CD3+)	61,80 ± 12,80	65,30 ± 10,00	72,60 ± 8,11	70,80 ± 6,70	1,00	0,002*	0,011*	0,001*	0,007*
% Linfocitos NK (CD3-CD56+)	11,20 ± 5,42	12,90 [8,33]	12,60 [9,64]	11,10 [5,81]	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
% Linfocitos NKT (CD3+CD56+)	6,61 ± 1,73	5,20 [4,52]	3,04 [2,31]	2,72 [2,02]	0,640	0,006*	0,001*	0,009*	0,002*
Sobre Linfocitos T (CD3+)									
% Linfocitos T citotóxicos (CD3+ CD8+)	31,80 ± 7,22	31,50 ± 7,71	22,90 [10,20]	21,50 [8,71]	1,00	0,012*	0,007*	<0,001*	<0,001*
Sobre Linfocitos T citotóxicos (CD3+ CD8+)									
% Linfocitos T citotóxico HLA-DR+	13,00 [10,90]	17,60 [14,80]	23,80 ± 9,41	19,40 ± 9,18	1,00	0,086	1,000	0,144	1,00
Sobre Linfocitos Totales									
% Linfocitos B (CD19+)	7,78 ± 3,20	7,10 [3,38]	7,54 [5,35]	9,22 ± 2,95	1,00	1,00	0,874	1,000	0,280
Sobre Linfocitos B (CD19+)									
% Linfocitos B de memoria (CD27+)	29,30 [9,54]	34,20 [14,60]	-	-	0,338	-	-	-	-
% Linfocitos B naive (CD27-)	68,10 [8,93]	62,10 [14,20]	52,10 ± 15,70	56,80 ± 14,60	1,00	0,024*	0,177	0,080	1,00
Sobre Linfocitos B de memoria (CD19+ CD27+)									
% Linfocitos B memoria no switch (IgD+ IgM+)	41,20 ± 14,20	36,60 ± 16,90	16,20 [11,50]	14,70 [12,90]	1,00	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
% Linfocitos B memoria class switch (IgD- IgM-)	46,00 ± 16,70	38,30 ± 16,00	24,90 ± 10,80	22,20 [14,90]	0,464	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*

FI: fallo de implantación, Ab: aborto espontaneo, CNT: grupo control. Representación de los datos como media ± SD para variables normales, y mediana [RIC] para las variables no normales.

^(a) Valor de p entre Grupo FIR y AR.

^(b) Valor de p entre Grupo FIR y CNT con hijos.

^(c) Valor de p entre Grupo FIR y CNT sin hijos.

^(d) Valor de p entre Grupo AR y CNT con hijos.

^(e) Valor de p entre Grupo AR y CNT sin hijos.

* Significación estadística con p<0,05. Prueba ANOVA o Kruskal-Wallis con corrección Bonferrani según corresponda.

Tabla 3. Comparación de frecuencias para la determinación de biomarcadores inmunológicos en AR.

Biomarcadores	Grupo AR	Grupo CNT con hijos	p
	n (%)	n (%)	
Linfocitos NKT > 5%	18 (51,34)	7 (17,95)	0,002*
Linfocitos NKT > 8,50%	8 (22,86)	0 (0,0)	0,002*
Linfocitos T CD8+ > 26,50%	35 (71,43)	12 (30)	<0,001*
Linfocitos B de memoria no switch > 22%	38 (79,17)	13 (32,50)	<0,001*
Linfocitos B de memoria class switch > 32%	32 (66,67)	12 (30)	0,001*

CNT: grupo control.

* Significación estadística con $p < 0,05$. Prueba χ^2 de Pearson.

Tabla 4. Análisis univariable de biomarcadores inmunológicos celulares de asociación a AR.

Biomarcadores	p	OR	95% IC para OR	
			Inferior	Superior
Linfocitos NKT > 5%	0,003*	4,84	1,69	13,87
Linfocitos T CD8+ > 26,50%	<0,001*	5,83	2,33	14,6
Linfocitos B de memoria no switch > 22%	<0,001*	7,89	3,02	20,63
Linfocitos B de memoria class switch > 32%	0,001*	4,68	1,89	11,53

OR: odd ratio, IC: intervalo de confianza.

* Significación estadística con $p < 0,05$. Regresión logística univariable.

Tabla 5. Análisis multivariable de biomarcadores inmunológicos celulares de asociación a AR.

Biomarcadores	p	OR	95% IC para OR	
			Inferior	Superior
Linfocitos NKT > 5%	0,015*	4,84	1,32	14,11
Linfocitos T CD8+ > 26,50%	0,021*	3,67	1,22	11,08
Linfocitos B de memoria no switch > 22%	0,041*	3,12	1,05	9,28

OR: odd ratio, IC: intervalo de confianza.

* Significación estadística con $p < 0,05$. Regresión logística multivariable.

Tabla 6. Modelo de regresión logística multivariable tras el cálculo de score.

Biomarcadores	p	OR	95% IC para OR	
			Inferior	Superior
<i>Linfocitos NKT > 5%</i>	0,298	1,98	0,547	7,16
<i>Linfocitos T CD8+ > 26,50%</i>	0,446	1,72	0,425	6,98
<i>Linfocitos B de memoria no switch > 22%</i>	0,642	1,48	0,282	7,79
<i>Score ≥ 6</i>	<0,001*	12,47	3,86	40,29

OR: odd ratio, IC: intervalo de confianza.

* Significación estadística con $p < 0,05$. Regresión logística multivariable.

Tabla 7. Comparación de medias del perfil inmunológico entre grupos de pacientes con FIR.

POBLACIONES CELULARES	GRUPO FIR						^(a) p	^(b) p	^(c) p
	N.º de FI		Edad		Infertilidad				
	= 3 FI (n=9)	> 3 FI (n=3)	< 35 años (n=6)	≥ 35 años (n=6)	1ª (n=10)	2ª (n=2)			
Sobre el total de la muestra (singletes)									
% Linfocitos totales	16,90 ± 6,00	24,00 ± 9,10	20,70 ± 5,79	16,10 ± 7,23	18,60 ± 7,21	16,30 ± 5,15	0,194	0,287	0,681
% Monocitos (CD14+)	3,32 [1,09]	3,65 [0,340]	3,32 [0,670]	3,09 [1,07]	3,32 [0,820]	3,38 [0,715]	0,906	0,314	0,723
Sobre Linfocitos Totales									
% Linfocitos T (CD3+)	59,90 ±12,80	70,50 ±12,70	70,50 ± 8,10	8,17 ±11,80	63,80 ±11,90	52,70 ± 17,70	0,314	0,030*	0,289
% Linfocitos NK (CD3-CD56+)	12,60 ± 5,41	6,98 ± 3,02	8,17 ± 2,95	14,20 ± 5,84	9,60 [3,37]	16,10 [1,39]	0,125	0,047*	0,121
% Linfocitos NKT (CD3+CD56+)	6,74 ±0,990	6,33 ± 3,06	6,20 ± 2,17	7,11 ± 1,04	6,43 ± 1,90	7,22 ± 1,10	0,762	0,468	0,600
Sobre Linfocitos T (CD3+)									
% Linfocitos T citotóxicos (CD3+ CD8+)	31,60 ± 7,86	32,90 ± 5,01	31,60 ± 3,65	32,00 ± 9,67	31,80 ± 7,79	32,00 ± 6,00	0,828	0,934	0,975
Sobre Linfocitos T citotóxicos (CD3+ CD8+)									
% Linfocitos T citotóxico HLA-DR+	18,80 ±14,40	8,18 ± 1,20	10,90 ± 4,58	21,80 ±16,90	11,30 ± 5,45	41,70 ± 9,96	0,344	0,199	<0,001*
Sobre Linfocitos Totales									
% Linfocitos B (CD19+)	8,10 ± 3,24	5,25 ± 2,31	6,25 ± 2,67	8,69 ± 3,40	7,70 ± 3,46	7,05 ± 2,53	0,276	0,225	0,811
Sobre Linfocitos B (CD19+)									
% Linfocitos B de memoria (CD27+)	29,30 [8,77]	26,90 [5,15]	28,30 [6,27]	31,20 [14,30]	29,30 [8,77]	30,10 [9,43]	1,00	0,341	0,909
% Linfocitos B naïve (CD27-)	68,10 [8,87]	70,50 [4,93]	69,90 [7,79]	66,50 [13,50]	68,10 [8,29]	67,00 [10,10]	0,727	0,324	0,909
Sobre Linfocitos B de memoria (CD19+ CD27+)									
% Linfocitos B memoria no switch (IgD+ IgM+)	40,00 ±14,50	46,50 ±16,30	46,50 ± 14,60	36,80 ±13,50	43,20 ±14,60	32,00 ± 11,20	0,586	0,282	0,339
% Linfocitos B memoria class switch (IgD- IgM-)	47,50 ±17,50	39,30 ±15,60	43,60 ± 13,90	48,0 ±19,80	43,20 ±16,10	58,50 ± 17,90	0,558	0,693	0,261

FI: fallo de implantación. Representación de los datos como media ± SD para variables normales, y mediana [RIC] para las variables no normales.

^(a) Valor de p entre Grupo = 3 FI y > 3 FI.

^(b) Valor de p entre Grupo < 35 años y ≥ 35 años.

^(c) Valor de p entre Grupo infertilidad 1ª e infertilidad 2ª.

* Significación estadística con p<0,05. Prueba T de Student o U de Mann-Whitney según corresponda.

Tabla 8. Comparación de medias del perfil inmunológico entre grupos de pacientes con AR.

POBLACIONES CELULARES	GRUPO AR						^(a) p	^(b) p	^(c) p
	N.º de Ab		Edad		Infertilidad				
	= 2 Ab (n=19)	> 3 Ab (n=30)	< 35 años (n=18)	≥ 35 años (n=31)	1ª (n=35)	2ª (n=6)			
Sobre el total de la muestra (singletes)									
% Linfocitos totales	24,40 ± 6,56	24,60 ± 4,79	23,80 [6,46]	21,80 [8,11]	25,20 ± 5,78	21,10 ± 3,05	0,891	0,296	0,098
% Monocitos (CD14+)	3,56 ± 0,944	4,46 ± 1,21	3,74 ± 1,33	4,22 ± 1,05	4,11 ± 1,08	3,66 ± 1,61	0,019*	0,235	0,397
Sobre Linfocitos Totales									
% Linfocitos T (CD3+)	64,30 ± 10,30	66,00 ± 10,00	66,30 ± 8,20	64,70 ± 11,10	63,30 ± 9,93	64,00 ± 8,18	0,574	0,596	0,865
% Linfocitos NK (CD3- CD56+)	14,30 ± 7,13	12,60 ± 5,09	13,70 [7,92]	11,80 [8,04]	14,20 [7,11]	11,10 [2,73]	0,314	0,975	0,416
% Linfocitos NKT (CD3+ CD56+)	6,36 [6,25]	3,85 [3,32]	5,20 [3,25]	5,50 [6,13]	6,00 [5,03]	7,00 [3,00]	0,188	0,339	0,827
Sobre Linfocitos T (CD3+)									
% Linfocitos T citotóxicos (CD3+ CD8+)	33,40 ± 6,22	30,30 ± 8,40	31,50 ± 8,01	35,50 ± 7,66	32,80 ± 7,52	33,90 ± 6,48	0,179	0,998	0,754
Sobre Linfocitos T citotóxicos (CD3+ CD8+)									
% Linfocitos T citotóxico HLA-DR+	16,60 ± 10,40	21,30 ± 11,60	17,10 [14,90]	17,70 [14,6]	15,5 [13,8]	17,10 [5,11]	0,160	0,644	0,602
Sobre Linfocitos Totales									
% Linfocitos B (CD19+)	7,10 [2,67]	7,10 [5,19]	7,61 [4,11]	6,98 [2,78]	7,10 [3,56]	6,83 [1,56]	0,492	0,860	0,768
Sobre Linfocitos B (CD19+)									
% Linfocitos B de memoria (CD27+)	34,10 [7,08]	34,40 [22,4]	34,20 [9,37]	34,00 [19,60]	34,00 [17,20]	36,50 [8,48]	0,490	0,835	0,467
% Linfocitos B naive (CD27-)	62,70 [14,40]	60,90 [14,00]	62,60 [12,30]	61,30 [16,10]	62,50 [13,50]	59,70 [14,40]	0,631	0,493	0,679
Sobre Linfocitos B de memoria (CD19+ CD27+)									
% Linfocitos B memoria no switch (IgD+ IgM+)	42,60 ± 20,30	32,70 ± 13,10	36,00 ± 16,70	37,10 ± 17,20	39,90 ± 17,30	36,90 ± 9,58	0,045*	0,829	0,689
% Linfocitos B memoria class switch (IgD- IgM-)	38,60 ± 13,70	38,10 ± 17,60	40,50 ± 14,40	37,00 ± 17,00	39,90 ± 14,20	52,40 ± 8,96	0,930	0,466	0,004*

Ab: aborto espontaneo. Representación de los datos como media ± SD para variables normales, y mediana [RIC] para las variables no normales.

^(a) Valor de p entre Grupo = 2 Ab y > 2 Ab.

^(b) Valor de p entre Grupo < 35 años y ≥ 35 años.

^(c) Valor de p entre Grupo de infertilidad 1ª e infertilidad 2ª.

* Significación estadística con p<0,05. Prueba T de Student o U de Mann-Whitney según corresponda.

2. Anexo 2: Aprobación de comités de ética (CEI)



Comité de Ética de la Investigación de
la Universidad Europea



José Rivera Torres
Universidad Europea de Madrid

Villaviciosa de Odón, 26 de noviembre de 2021.

Estimado investigador:

En relación al Proyecto de Investigación titulado:

"Estudio retrospectivo observacional del uso de prednisona a baja dosis en mujeres con abortos recurrentes asociado a células natural killer en sangre <12%",

este Comité de Ética de la Investigación ha procedido a la revisión del mismo y ha acordado que está en situación de:

APROBADO

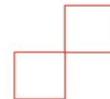
Al proyecto se le ha asignado el código interno **CIPI/213006.95**

Atentamente,

Fdo.: Lola Pujol
Secretaria del Comité de Ética de la Investigación

Campus Villaviciosa de Odón
Calle Tajo S/N, Villaviciosa de Odón
28670 Madrid
universidadeuropea.com

Campus Alcobendas
Avenida Fernando Alonso, 8
28108 Madrid



ci@universidadeuropea.es

DICTAMEN DEL COMITÉ de ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN con MEDICAMENTOS

D^a. Camino Sarobe González, Secretaria Técnica del COMITÉ de ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN con
MEDICAMENTOS HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑÓN

CERTIFICA

Que se ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio observacional EPA-OD:

Código JC_INMUNO_2019

TÍTULO: "Estudio retrospectivo observacional del uso de prednisona a baja dosis en mujeres con aborto recurrente asociado a células natural killer en sangre > 12%"

Protocolo versión 3. 28-05-2019. **Hoja de Información al paciente y Consentimiento Informado** versión 2. 28.05.2019.

Promotor: Investigador

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos legalmente establecidos, y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Este CEIm actuando como comité evaluador, emite **dictamen favorable** y acepta que dicho estudio sea realizado en los centros siguientes por los investigadores principales que se relacionan a continuación:

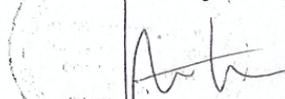
Dr. Javier Alberto Carbone Campoverde / Hospital General Universitario Gregorio Marañón

Y HACE CONSTAR QUE:

- 1º En la reunión celebrada el día **03 de junio de 2019, acta 11/2019** se decidió emitir el informe correspondiente al estudio de referencia.
- 2º En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente -Real Decreto 1090/2015 y Decreto 39/94 de la Comunidad de Madrid- para que la decisión del citado CEIm sea válida.
- 3º El CEIm, tanto en su composición, como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ ICH/ 135/95)
- 4º La composición actual del CEIm es la siguiente:

- D. FELIPE ATIENZA FERNÁNDEZ (Cardiología - Presidente)
- D. ANDRÉS JESÚS MUÑOZ MARTÍN (Oncología Médica - Vicepresidente)
- D^a. CAMINO SAROBE GONZÁLEZ (Farmacia Hospitalaria - Secretaria Técnica)
- D. JUAN ANTONIO ANDUEZA LILLO (Medicina Interna)
- D^a. MARÍA LUISA BAEZA OCHOA DE OCÁRIZ (Alergología)
- D^a. PILAR AITANA CALVO FERRÁNDIZ (Farmacología Clínica)
- D^a MARÍA DEL CARMEN DE LA CRUZ ARGUEDAS (Unidad de Apoyo a la Investigación)
- D. RAFAEL CARRIÓN GALINDO (Oncología Médica)
- D. VICENTE DE LAS PEÑAS GIL (Psicología Clínica)
- D. JAVIER DE MIGUEL DÍEZ (Neumología)
- D^a. PATRICIA FONT LÓPEZ (Hematología y Hemoterapia)
- D^a. ISABEL GÓMEZ VALBUENA (Farmacia de Atención Primaria)
- D^a. MARÍA DEL CARMEN HERAS ESCOBAR (Enfermería)
- D^a. ANA MARÍA IGLESIAS MOHEDANO (Neurología)
- D^a IUSTINA JANTA (Reumatología)
- D. LUIS ANDRÉS LÓPEZ FERNÁNDEZ (Biología)
- D^a. ANA ESTHER LÓPEZ PÉREZ (Anestesiología y Reanimación)
- D. ANTONIO MUIÑO MIGUEZ (Medicina Interna)
- D^a. ANA MUR MUR (Farmacia Hospitalaria)
- D^a. MARÍA LUISA NAVARRO GÓMEZ (Pediatría)
- D. DIEGO RINCÓN RODRÍGUEZ (Aparato Digestivo)
- D. CARLOS ROJAS-MARCOS ASENSI (Licenciado en Derecho)

Lo que firmo en Madrid, a 05 de junio de 2019



Fdo.: Dra. Camino Sarobe González