

Caracterización del rol inmunológico del factor tisular en el endometrio de mujeres fértiles y de mujeres con abortos a repetición asociados al síndrome antifosfolipídico

María Eugenia Incera,¹ María Constanza Ferrer,¹ Soledad Mayol,² Gustavo Vijoditz,² Natalia Baldjian,² Luciana García,³ Eva Rodríguez Pazo,¹ Gabriela Gutiérrez^{2,3}

¹ Halitus Instituto Médico. Buenos Aires, Argentina.

² Inmunogénesis. Buenos Aires, Argentina.

³ Fundación REPRO. Buenos Aires, Argentina.

Reproducción 2017;32:07-19

Resumen

El perfil endometrial leucocitario de mujeres con abortos a repetición (ARE) ha sido en los últimos años uno de los principales objetivos de investigación orientada al desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico y tratamiento. Más aún, estudios en murinos han demostrado que un aumento en la expresión de factor tisular (CD 142) en células inflamatorias ha sido implicado en la patogénesis del síndrome antifosfolipídico (SAF). Sin embargo, su expresión en pacientes con ARE no ha sido aún determinada. Se estudiaron 27 mujeres con ARE (SAF y no SAF) y 16 mujeres fértiles durante la ventana de implantación. Mediante una ecografía VOCAL doppler se obtuvieron los parámetros de vascularización endometrial. Se determinaron los niveles periféricos de linfocitos CD19⁺CD5⁺ así como el recuento endometrial de células natural killer, neutrófilos y la expresión de factor tisular, IL6, VEGF y TNF- α .

Pacientes con ARE presentaron un endometrio caracterizado por mayor expresión de factor tisular, mayor recuento endometrial de neutrófilos CD142⁺, de natural killer y de linfocitos CD19⁺CD5⁺ asociado a un aumento de la expresión de VEGF y TNF- α . Particularmente, pacientes con SAF presentaron un aumento de factor tisular que podría corresponderse con un mayor índice de vascularización en un contexto inflamatorio de mayor resistencia uterina.

Palabras claves. Factor tisular, endometrio, aborto recurrente, síndrome antifosfolipídico.

Characterization of the immunological role of tissue factor in the endometrium of fertile women and of women with repeated abortions associated with antiphospholipid syndrome

Summary

In recent years, endometrial leukocyte profile of women with recurrent abortions (RSA) has been one of the main objectives for the development of new diagnostic and treatment tools. Increased expression

Correspondencia: María Eugenia Incera
Teléfono: +54 011 5273 2094
Correo electrónico: eugeniaincera@gmail.com/
eugenia.incera@halitus.com

of tissue factor (CD 142) on inflammatory cells has been implicated in the pathogenesis of antiphospholipid antibodies (APA)-induced abortions in mice. However, its expression in RSA patients has not yet been determined. We studied 27 RSA patients (APA⁺ and APA⁻) and 16 fertile women during window implantation. 3D endometrial VOCAL Doppler was performed. CD19⁺CD5⁺ cells were determined in peripheral blood. In addition, natural killer cells and neutrophils counts as well as tissue factor, IL-6, VEGF and TNF- α were measured in the endometrium. RSA patients expressed higher counts of endometrial tissue factor, neutrophil CD142⁺, natural killer cells and CD19⁺CD5⁺ lymphocytes associated with increased expression of VEGF and TNF- α . Particularly, APA⁺ patients exhibit increased expression of endometrial tissue factor which may correspond with a highest vascularization in an inflammatory context of increased uterine resistance.

Key words. Tissue factor, endometrium, recurrent abortion, antiphospholipid syndrome.

Introducción

El término aborto es utilizado para describir un embarazo que resulta en muerte o expulsión del embrión o feto, dependiendo del momento en que ocurra.¹ Las posibles causas de aborto que se han propuesto son numerosas, sin embargo aproximadamente un 20% de los abortos están asociados a un desbalance inmunológico, incluyendo aquellos que alteran la correcta discriminación entre lo propio y lo ajeno (factores autoinmunes).² Una de las enfermedades autoinmunes con mayor incidencia en pacientes con abortos a repetición (ARE) es el síndrome antifosfolipídico (SAF); se estima que aproximadamente entre un 15 y un 20% de pacientes ARE presentan SAF.³ Más aún, entre el 11 y el 29% de mujeres con preeclampsia y el 25% de mujeres con restricción de crecimiento intrauterino (RCIU) presentan prueba positiva para anticuerpos antifosfolipídicos.⁴ El SAF se acompaña de manifestaciones clínicas como trombosis, abortos recurrentes y/o trombo-

citopenia asociadas a la expresión de anticuerpos antifosfolipídicos (aFL) como anticardiolipinas (aCL), anti β 2-glicoproteína (β 2GPI) y anticoagulante lúpico (LAC).⁵ Existen otros anticuerpos que no son considerados en el diagnóstico del SAF pero que son capaces de reconocer proteínas que se unen a fosfolípidos como protrombina, trombomodulina, antitrombina III, proteína C, anexina I, II y V.⁶⁻⁹ El fosfolípido más importante que es reconocido por estas proteínas es la fosfatidilserina y está localizado en la superficie interna de la membrana plasmática, siendo exteriorizado en células apoptóticas.¹⁰ Asimismo, los fosfolípidos cargados negativamente son expuestos por las células trofoblásticas durante el proceso de invasión embrionaria.¹¹ Estos son reconocidos por los aFL presentes en la sangre materna de mujeres con SAF, desencadenando una respuesta autoinmune que podría llevar a la pérdida embrionaria. Más aún, se ha demostrado que los anticuerpos β 2GPI estimulan en las células trofoblásticas la secreción de citoquinas proinflamatorias como interleuquina 6 (IL-6) e interleuquina 8 (IL-8). Esta última es un potente activador y quimioattractante de neutrófilos.¹² Estudios realizados en modelos murinos han demostrado que los aFL activan el complemento, el cual estimula en los neutrófilos la expresión en membrana del factor tisular (FT) y de su receptor activado por proteasas 2 (PAR2), desencadenando la cascada de coagulación. Esto podría explicar el rol de los aFL en el desarrollo de hipercoagulación.¹³ Además, la unión de FT y PAR-2 activa los neutrófilos, produciendo la liberación de moléculas reactivas de oxígeno y enzimas proteolíticas que generan daño de la decidua y pérdida del embrión, así como también un incremento en el depósito de fibrina y una disminución del flujo sanguíneo local.¹⁴ Por otro lado, existe evidencia de que la activación del complemento también es capaz de producir un aumento de los niveles del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α).¹⁵ Mediadores proinflamatorios como el complemento o el TNF- α son responsables de generar respuestas negativas en el embarazo.¹⁶

El FT es una glicoproteína de membrana que se expresa constitutivamente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos y otros tejidos.¹⁷

Al producirse un daño vascular, entra en contacto con la sangre y se une a su ligando FVII. Este complejo se une a receptores PAR activando diferentes factores de coagulación, los cuales contribuyen a la formación de trombina, a la activación de plaquetas y a la deposición de fibrina, y al consecuente estado de hipercoagulación.¹⁸ En el sistema reproductivo humano, el FT se encuentra asociado a los capilares de la decidua favoreciendo la llegada de oxígeno y nutrientes al embrión previo a la formación de la placenta.¹⁹ Asimismo, el FT incrementa el flujo sanguíneo hacia los espacios intervellosos, proceso necesario para el desarrollo de la unidad feto placentaria.²⁰ Sin embargo, una expresión exacerbada de FT en la placenta resulta en diferentes patologías reproductivas, como aborto, preeclampsia y parto prematuro, mientras que un aumento en la expresión de FT en el endometrio está asociado a endometriosis.²¹⁻²²

Por otro lado, se ha demostrado que la expresión de FT en células tumorales estimula la síntesis del factor de crecimiento de la vasculatura endotelial (VEGF), contribuyendo de esta manera a la angiogénesis.²³ Hasta el momento no hay estudios que relacionen la expresión de VEGF y FT en neutrófilos, aunque se sabe que estas células sintetizan VEGF para regular la proliferación vascular del endometrio.²⁴ Estudios realizados in vivo demostraron que monocitos de pacientes con SAF sobreexpresan VEGF, lo que se relaciona con el aumento de los niveles de FT sintetizados.²⁵ Sin embargo, mujeres embarazadas con preeclampsia presentan mayor expresión del inhibidor de FT y una sobreexpresión del receptor soluble de VEGF, sflt-1.²⁷ Por otro lado, los autoanticuerpos anti-receptor de angiotensina II de tipo I (AT1-AA) producidos por los linfocitos B1 (CD19⁺ CD5⁺) estimulan la expresión del FT desencadenando la cascada de coagulación y reduciendo la capacidad fibrinolítica descritas en la patogénesis de preeclampsia.²⁸⁻²⁹

Estudios previos sugieren que pacientes con ARE presentarían una alteración en la vascularización endometrial asociada a un desbalance en la expresión de factor tisular y en los niveles leucocitarios. Más aún, los aFL a nivel periférico tendrían la capacidad de impactar en la calidad

endometrial impidiendo una correcta implantación y continuidad del embarazo. En base a estos antecedentes, el principal objetivo de este trabajo es observar y comparar los niveles endometriales de determinados parámetros bioquímicos (FT, VEGF, IL-6 y TNF- α así como el recuento de células NK y neutrófilos) y periféricos (linfocitos CD19⁺CD5⁺) en pacientes con abortos recurrentes con y sin síndrome antifosfolipídico, a fin de determinar nuevas alteraciones que permitan orientar posibles tratamientos.

Materiales y métodos

Grupos de estudio

Se estudió a 43 mujeres de edad comprendida entre 21 y 39 años, que asistieron voluntariamente al Departamento de Fertilidad de Halitus Instituto Médico, y que, mediante un consentimiento informado, aceptaron participar del protocolo. Fueron consideradas pacientes entre 21 y 39 años con índice de masa corporal ≤ 25 , cavidad uterina normal, FSH < 10 mUI/mL y Estradiol < 50 pg/mL, cariotipo de la pareja normal y ciclos menstruales regulares. Se consideraron como criterios de exclusión antecedentes de patología anatómica uterina, hidrosálpinx, endometriosis y falla ovárica. Los grupos de estudio quedaron conformados por mujeres fértiles ($n = 16$) y pacientes con abortos a repetición ($n = 27$). Asimismo, las pacientes con abortos a repetición se clasificaron en pacientes sin SAF ($n = 11$) y con SAF ($n = 16$). Se define fertilidad comprobada si presenta al menos un nacido vivo en los últimos 3 años, así como aborto recurrente a la pérdida consecutiva de al menos dos gestaciones menores de 10 semanas de gestación, con genético estudiado normal o no estudiado (ESHRE, 2015). El diagnóstico de SAF se realizó siguiendo las recomendaciones internacionales.⁵

Muestras de tejido endometrial

Las pacientes fueron monitoreadas ecográficamente entre los días 10 y 12 de un ciclo menstrual natural (sin medicación ni búsqueda de

embarazo) a fin de determinar la fecha probable de ovulación mediante la presencia de al menos un folículo mayor a 16 mm. Durante la ventana de implantación (5-9 días postovulación) las pacientes concurren al Instituto y se les realizó una ecografía VOCAL doppler, una extracción de sangre periférica y una biopsia endometrial. La muestra de tejido endometrial se extrajo ingresando una cánula especial (*Pipelle de Cornier*) a través de la vagina, atravesando el cuello uterino para finalmente acceder a la cavidad uterina. Se recolectó en medio de cultivo RPMI 1640 (*Roswell Memorial Institute*, GIBCO, Carlsbad, California, USA) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO), 1% de penicilina (10.000 UI/ml, GIBCO) y estreptomycin (10.000 µg/ml, GIBCO). Las células endometriales se obtuvieron mediante disgregación mecánica con un homogeneizador de tejidos manual (DeltaLab, España). Posteriormente, se separaron las fracciones correspondientes para la inmunotipificación por citometría y para la determinación de la expresión de biomarcadores endometriales.

Inmunofenotipificación de células NK y neutrófilos endometriales

Para la determinación de las subpoblaciones de leucocitos endometriales se utilizó la técnica de citometría de flujo (FACS Canto, BD) mediante el programa FACS DIVA 6.1.3. Para tal fin se fraccionaron aproximadamente 1×10^6 células endometriales y se incubaron durante 30 minutos con anticuerpos monoclonales (BD). Para la inmunotipificación de las células NK se utilizaron los anticuerpos CD56-PE, CD9-FITC y CD16-PECy5, para neutrófilos CD11bAPC, CD9-FITC, CD16-PerCPCy5,5, CD142-PE y para el recuento de células endometriales totales CD9-FITC y CD142-PE. En todos los casos se utilizaron anticuerpos inespecíficos del mismo isotipo (IgG1) como control negativo. De esta manera, se determinó el porcentaje de células NK totales ($CD9^+CD56^+$) así como la proporción de ambas subpoblaciones celulares en endometrio $CD56^{dim}CD16^+$ y $CD56^{bright}CD16^{dim/-}$, el porcentaje de neutrófilos ($CD9^+CD11b^+CD16^+$), la proporción de neutrófilos fuente de

factor tisular ($CD9^+CD11b^+CD16^+CD142^+$) y el recuento total de células endometriales que expresan factor tisular ($CD9^+CD142^+$).

Extracción de ARN total

La extracción de ARN mensajero (ARNm) total se realizó utilizando diferentes técnicas según la cantidad de células obtenidas. En el caso de muestras con menos de 5×10^6 células se utilizó *PureLink™ RNA Mini Kit* (Invitrogen, USA), mientras que para muestras con cantidad mayor de células se realizó el protocolo convencional con Trizol® (Invitrogen, Argentina). La extracción del ARNm se realizó siguiendo el protocolo recomendado por los fabricantes. La digestión del ADN contaminante se realizó utilizando *RQ1 RNase-Free Dnase* (Promega, USA). Finalmente, se obtuvo la muestra de ARNm concentrada en pequeños volúmenes de agua estéril, con una concentración media de $0,07 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y un rango de $0,02 - 0,16 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. La cuantificación del ARNm total y su calidad fue determinada por espectrofotometría a 260 nm y 280 nm en el equipo *Genesys UV-Vis Spectrophotometer* (Thermo Scientific, USA). Se consideró como calidad aceptable de ARN $A_{260}/A_{280} \text{ nm} > 1,8$. Las muestras de ARN fueron almacenadas a -70°C hasta el momento de la síntesis de ADN copia.

Síntesis de ADN copia por transcripción reversa

La síntesis de ADN copia se realizó a partir de $1 \mu\text{g}$ de ARN mensajero total. A cada muestra se le agregó una mezcla de Random Primers N6 ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Biodynamics SRL, Argentina), dNTPs (10 mM de cada uno) (Genbiotech, Argentina) y agua destilada estéril hasta alcanzar el volumen final. Se incubó durante 5 min a 65°C seguido de 5 min a 4°C . Luego, se agregó a cada tubo MgCl_2 (3 mM), *ImProm-III™ 5X Reaction Buffer* (1X) (Promega, EE.UU.), RNAsin (1U) y agua bidestilada estéril. Se incubó durante 2 min a 37°C , y finalmente se agregaron $2 \mu\text{l}$ de la enzima *ImProm-III™ Reverse Transcriptase* (Promega, EE.UU.), incubando la mezcla final de reacción 50 min a 37°C y 15 min a 70°C . Una vez finalizada la síntesis, las muestras se almacenaron a -20°C .

Determinación de la expresión de FT, TNF- α y VEGF

A partir del ADNc obtenido se realizó la PCR absoluta en tiempo real para la determinación de los niveles de expresión endometrial de los siguientes marcadores utilizando los cebadores correspondientes: factor tisular (forward 5'-CACCGACGAGATTGTGAAGGA-3', reverse 5'-CCTGCCGGGTAGGAGAAGA-3') *VEGF* (forward 5'-GGGCCTCCGAAACCATGAAC-3', reverse 5'-CCACTTCGTGATGATTCTGCC-3'), y *TNF- α* (forward 5'-TCTTCTCGAACCCC-GAGTGA-3', reverse 5'-CCTCTGATGGCAC-CACCAG-3').

Como control endógeno se utilizó la proteína ribosomal 13A (RPL13A) debido a que se ha demostrado que su expresión no se ve modificada por la variación de los niveles hormonales durante el ciclo menstrual.³⁰ Para la puesta a punto de la reacción se utilizó una muestra denominada *Pool BE*. Esta muestra estaba conformada por ADNc endometrial de 20 mujeres con diferentes patologías reproductivas. Se realizaron dos curvas de diluciones seriadas de *Pool BE* de 1:10 o de 1:5 para cada transcripto, a fin de determinar con cuál se lograban las condiciones óptimas recomendadas por las guías MIQE.³¹ Para la determinación de los niveles de expresión génica se utilizó la mezcla real SYBR® *Select Master Mix* (Applied Biosystems SA). Se utilizó el equipo ABI 7500 (Applied Biosystems SA).

Determinación de los niveles de IL-6

Se cultivaron 4×10^5 células endometriales en un volumen final de 150 μ l de medio RPMI 1640 adicionado con 10% de SFB, 1% de penicilina y estreptomina, por cuadruplicado en placas de 96 pocillos (NUNC, Maxisorp). Las condiciones del cultivo fueron de 48 h en atmósfera húmeda y controlada al 5% de CO₂. Los sobrenadantes de cultivo fueron obtenidos por recolección y centrifugación a 1.600 rpm, y conservados a -70 °C para posterior análisis de los niveles de IL-6. La cuantificación se realizó por la técnica de enzoinmunoensayo de fijación en fase sólida tipo sándwich (ELISA). Se utilizaron los kits comerciales *DuoSet ELISA Development System* (R&D, Minneapolis, MN, EE.UU.), según las especificaciones del fabricante.

Determinación de linfocitos B1 en sangre periférica

Se realizó una extracción de sangre periférica el mismo día de la obtención del tejido endometrial. Se recolectaron 3 ml en un tubo con 50 μ l de anticoagulante (anticoagulante W a base de EDTA, Wiener, Argentina) y se conservó a 4 °C hasta su procesamiento. Se incubaron 50 μ l con anticuerpos monoclonales anti-CD5 PE y anti-CD19 APC (BD, USA) durante 30 min. Posteriormente se realizó una lisis de glóbulos rojos incubando seguido de dos lavados con PBS. Las células fueron fijadas en 0,02 % de formol y guardadas a 4 °C hasta su posterior análisis citométrico. El mismo se realizó con el programa FACS DIVA 6.1.3.

VOCAL Doppler de arteriolas espiraladas de endometrio

El ecodoppler para la determinación de los parámetros angiogénicos endometriales fue realizado por un médico especialista de Halitus Instituto Médico, el mismo día y previo a la toma de la muestra de tejido endometrial. El equipo utilizado fue un ecógrafo *Voluson Expert de General Electric* con transductor transvaginal de 7,5-10 MHz. Los índices endometriales de vascularización (IV), de flujo (IF) y de vascularización y flujo (IVF) fueron calculados mediante histograma de flujo con el programa VOCAL. Además, se determinó el índice de pulsatilidad promedio de las arteriolas uterinas (IP).

Procesamiento de los datos y análisis estadístico

Para el estudio de la distribución de cada variable, las medias, el desvío estándar, el intervalo de confianza y las correlaciones se utilizó el programa *GraphPad Prism 5* (Graphics Software). Una vez determinada si la variable respondía a una distribución normal, se realizó la comparación de medias mediante el *test Man Withney* para distribuciones no paramétricas y *t-Student* para variables cuya distribución fuera normal. Se consideró como valor significativo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. Se consideró una correlación significativa si el coeficiente de correlación (r) se acompañaba de un $p < 0,05$.

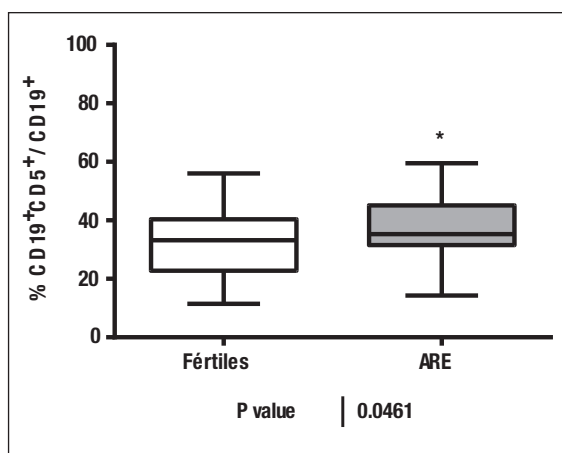
Resultados

I. Pacientes con abortos a repetición

Determinación de linfocitos B1 periféricos

Los linfocitos B (LB), fuente de inmunoglobulinas, juegan un papel central en la regulación de la respuesta inmune. Asimismo, la subpoblación de linfocitos B1 (LB1) es capaz de sintetizar autoanticuerpos, los cuales mediante la unión a su ligando desencadenan un proceso inflamatorio sistémico. En este sentido, se estudió la relación LB1/LB como marcador de inflamación activa. Los resultados arrojaron que las pacientes ARE presentan mayores niveles de LB1/LB periféricos con respecto a mujeres fértiles (Figura 1).

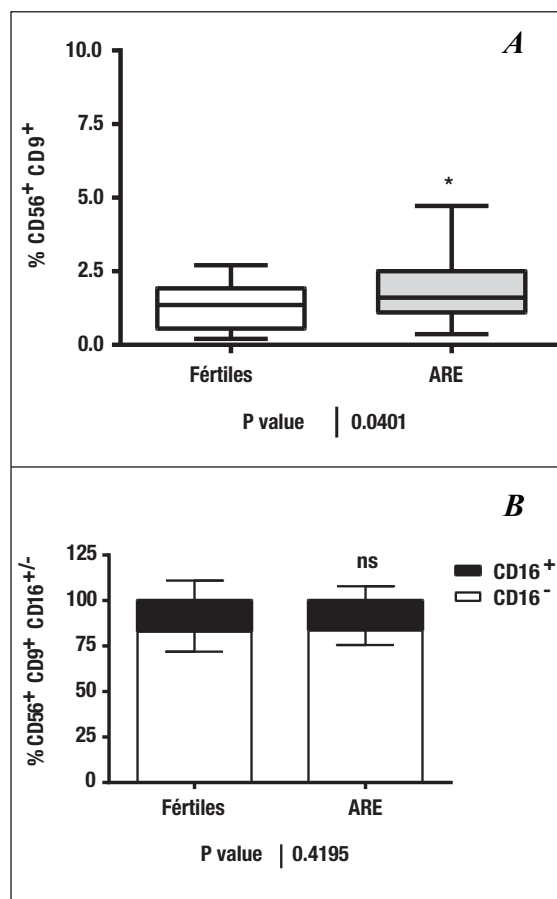
Figura 1. Proporción de linfocitos B1 respecto de los linfocitos B totales (%CD19⁺CD5⁺/CD19⁺). Se realizó un t-Student con posterior corrección de Welch para el caso de varianzas no homogéneas (*p < 0,05).



Determinación de leucocitos endometriales: células NK y neutrófilos

Se evaluaron los niveles de células NK endometriales totales entre ambos grupos de estudio. Los resultados obtenidos demostraron que las pacientes ARE presentan mayor recuento de células NK con respecto a las mujeres fértiles; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las proporciones de ambas subpoblaciones (Figura 2). Por otro lado, se evaluó el recuento de neutrófilos endometriales así como la expresión endometrial del factor tisular en neutrófilos, la cual ha sido fuertemente asociada a daño pla-

Figura 2. A. Recuento de células NK endometriales (%CD56⁺CD9⁺) y B. de la subpoblación angiogénica (%CD56⁺CD9⁺CD16⁻) y citotóxica (%CD56⁺CD9⁺CD16⁺). Se realizó por medio de un t-Student con posterior test de Welch (*p < 0,05).



centario asociado a aborto. A pesar de no hallar diferencias significativas en el recuento total de neutrófilos endometriales (Figura 3 A), las pacientes con abortos a repetición presentan mayor proporción de neutrófilos que expresan factor tisular en su superficie con respecto a las mujeres fértiles (Figura 3 B).

Parámetros bioquímicos de la respuesta inflamatoria

Como se puede observar en la Figura 4 existe una correlación positiva entre los niveles de IL6 endometrial y el índice de vascularización. A continuación, se comparó la expresión de FT endometrial que ha sido asociada a angiogénesis y se

Figura 3. A. Proporción de neutrófilos endometriales (%CD11b⁺CD16⁺CD9⁺/CD9⁺). B. Proporción de las subpoblaciones de neutrófilos endometriales que expresan el factor tisular (%CD11b⁺CD16⁺CD9⁺CD142^{+/-}). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante t-Student. Para varianzas no homogéneas se realizó la corrección de Welch (^mp > 0,05; *p < 0,05).

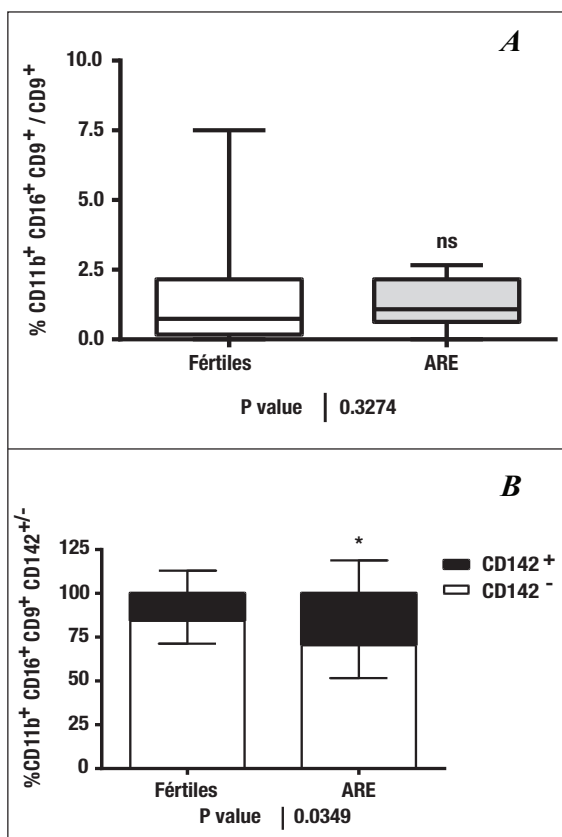
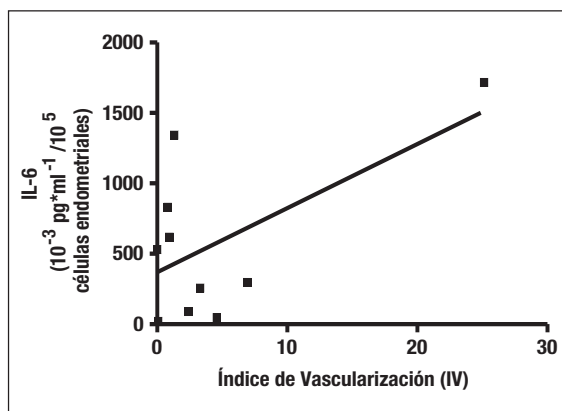
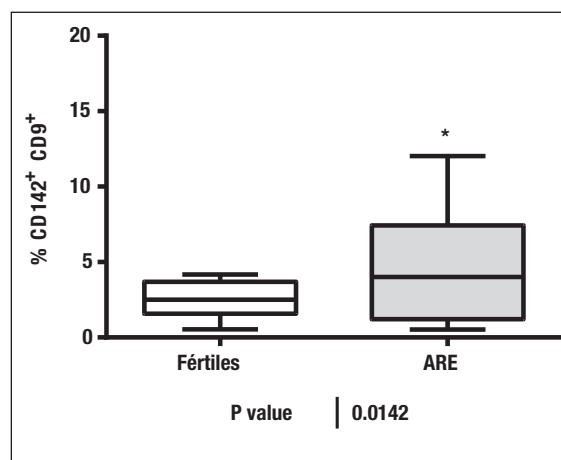


Figura 4. Correlación del índice de vascularización con los niveles de IL-6 endometrial. Se estudió la población de pacientes ARE. R = 0,5984; *p = 0,0338; n = 10 (*p < 0,05).



observó que las pacientes ARE presentan mayores niveles de factor tisular con respecto a las mujeres fértiles (Figura 5). A fin de estudiar si existe asociación entre la expresión de este marcador y los niveles de LB1 y VEGF en el endometrio de mujeres ARE, se realizaron las correlaciones correspondientes. Como se puede observar en la Figura 6, el ARNm de VEGF se correlaciona positivamente con el recuento de LB1 periférico y con el ARNm del FT, así como existe también una correlación positiva entre el % LB1 y la expresión de FT. Asimismo, también se observó una correlación positiva de TNF-α endometrial con los niveles de expresión de FT y con el % LB1 periférico (Figura 7).

Figura 5. Recuento de células endometriales que expresan el factor tisular (%CD142⁺CD9⁺). Se estudiaron mujeres fértiles y pacientes ARE. Se realizó un t-Student con posterior corrección de Welch (*p < 0,05).



II. Pacientes con síndrome antifosfolipídico
Parámetros bioquímicos endometriales

Se clasificó a las pacientes ARE según presencia o ausencia de aFL y se evaluó la expresión del FT en estos grupos de estudio. En una primera instancia, se observó que las pacientes ARE con SAF presentan niveles exacerbados de FT endometrial con respecto a las mujeres fértiles y a las pacientes ARE sin SAF (Figura 8).

Por otro lado, se compararon los niveles de ex-

Figura 6. Correlación de la expresión del factor tisular y VEGF con el porcentaje de linfocitos B1 periféricos (%CD19⁺CD5⁺). Se estudió la población de pacientes ARE. (A) $R = 0,4914$; $*p = 0,0372$; $n = 14$. (B) $R = 0,7549$; $**p = 0,0058$; $n = 10$. (C) $R = 0,7934$; $**p = 0,0018$; $n = 11$ ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$).

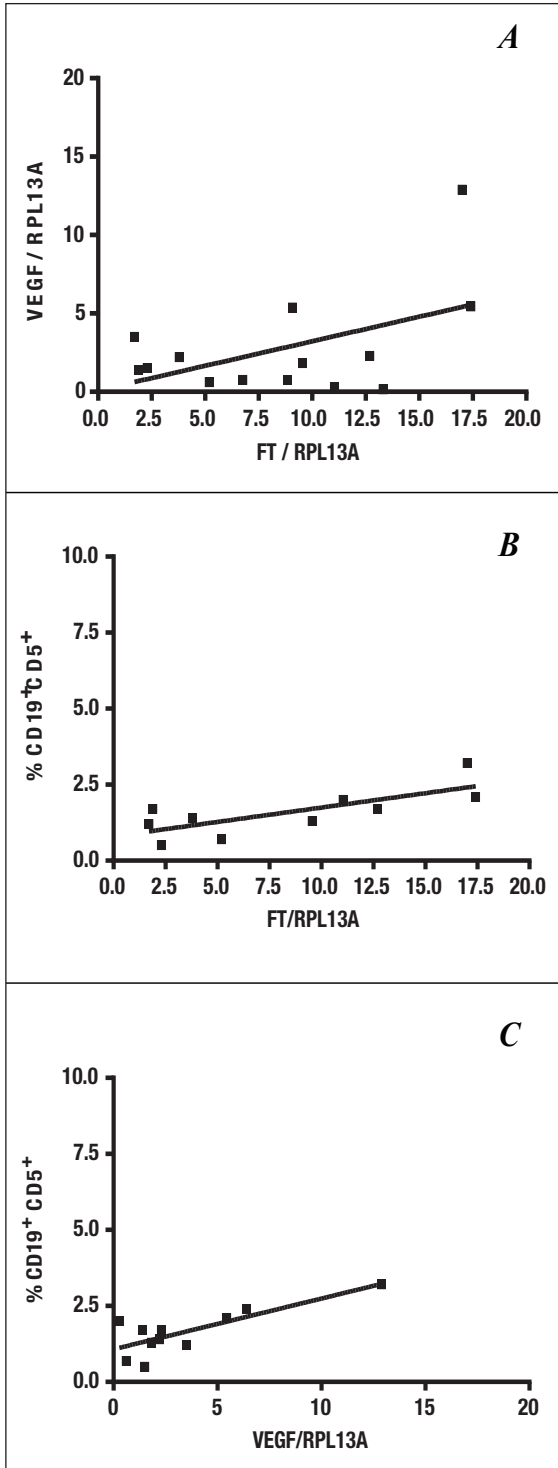


Figura 7. Correlación de (A) la expresión del factor tisular y de (B) linfocitos B1 periféricos (%CD19⁺CD5⁺) con TNF- α . Se estudió la población de pacientes ARE. (A) $R = 0,5651$ $*p = 0,0278$; $n = 12$. (B) $R = 0,6297$; $**p = 0,0079$; $n = 14$. ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$).

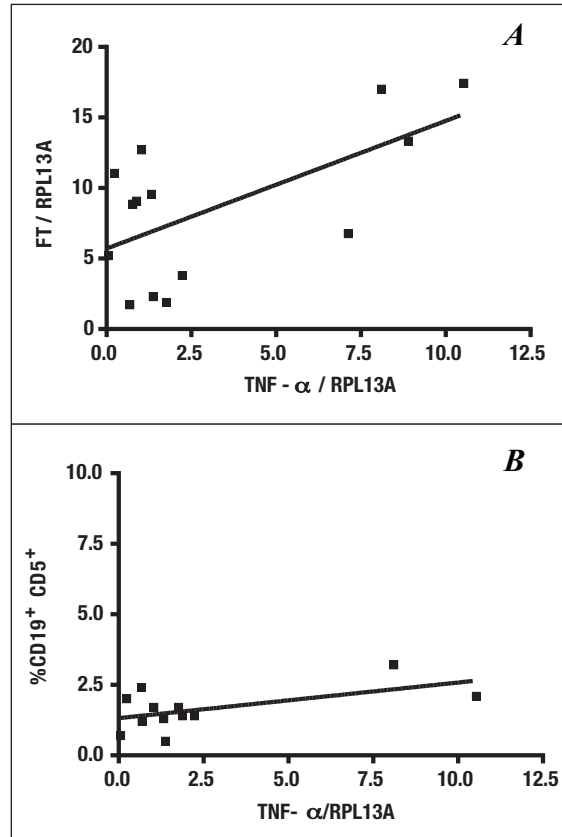
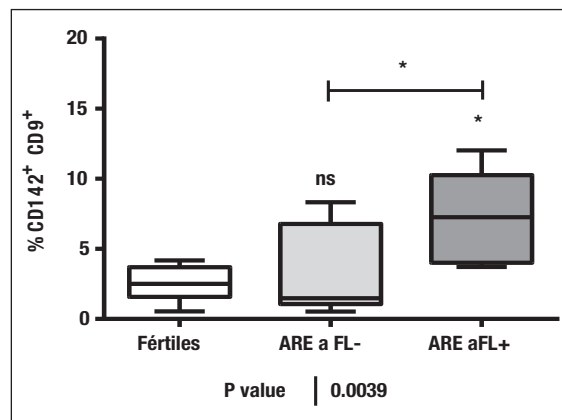
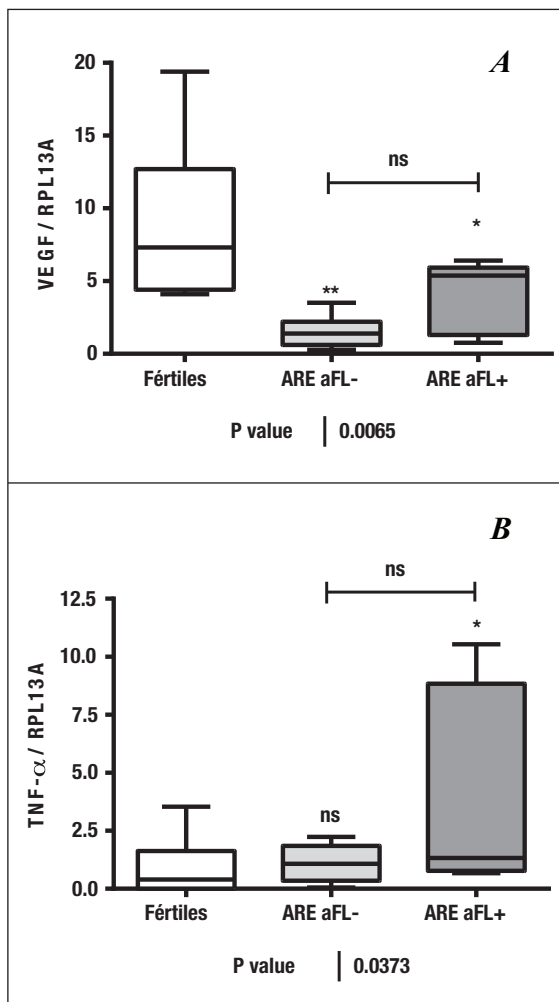


Figura 8. Expresión de factor tisular en células de endometrio. Mujeres fértiles y pacientes ARE sin y con SAF (aFL- y aFL+ respectivamente). Se realizó un test ANOVA ($**p < 0,01$) con posterior test de Tukey ($^{ns}p > 0,05$; $*p < 0,05$).



presión de VEGF y de TNF- α endometrial. Los resultados obtenidos mostraron que las pacientes ARE presentan menor expresión de VEGF endometrial, siendo aún menor en pacientes ARE sin aFL (Figura 9 A). Por el contrario, las pacientes ARE con SAF presentan niveles exacerbados de TNF- α (Figura 9 B).

Figura 9. Determinación de la expresión de (A) VEGF (VEGF/RPL13A) y de (B) TNF- α (TNF- α /RPL13A) endometrial. Pacientes ARE sin SAF (ARE aFL-) y con SAF (ARE aFL+). Se realizó un test de ANOVA con posterior test de Tukey (^{ns} $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).



Parámetros clínicos de vascularización endometrial

Se evaluó el grado de vascularización endometrial determinado por ecografía doppler y se

observó que pacientes ARE sin SAF presentan menor índice de flujo que mujeres fértiles (Figura 10 A). Asimismo, las pacientes con SAF presentan mayor índice de vascularización con respecto a las pacientes con abortos a repetición sin SAF y a las mujeres fértiles (Figura 10 B). Más aún, las pacientes sin SAF tienen un índice de vascularización y flujo endometrial significativamente menor que las mujeres fértiles (Figura 10 C). Por último, pacientes ARE con SAF presentan mayor índice de pulsatilidad promedio de las arteriolas uterinas con respecto a las pacientes ARE sin SAF y a las mujeres fértiles (Figura 11).

Figura 10. Parámetros de vascularización endometrial obtenidos por análisis con el programa VOCAL. Se determinaron (A) el índice de flujo, (B) índice de vascularización e (C) índice de vascularización y flujo en mujeres fértiles, pacientes ARE sin SAF (ARE aFL-) y con SAF (ARE aFL+). Se realizó test ANOVA con post-test de Tukey y mediante test Kruskal Wallis para poblaciones no paramétricas (^{ns} $p > 0,05$; * $p < 0,05$).

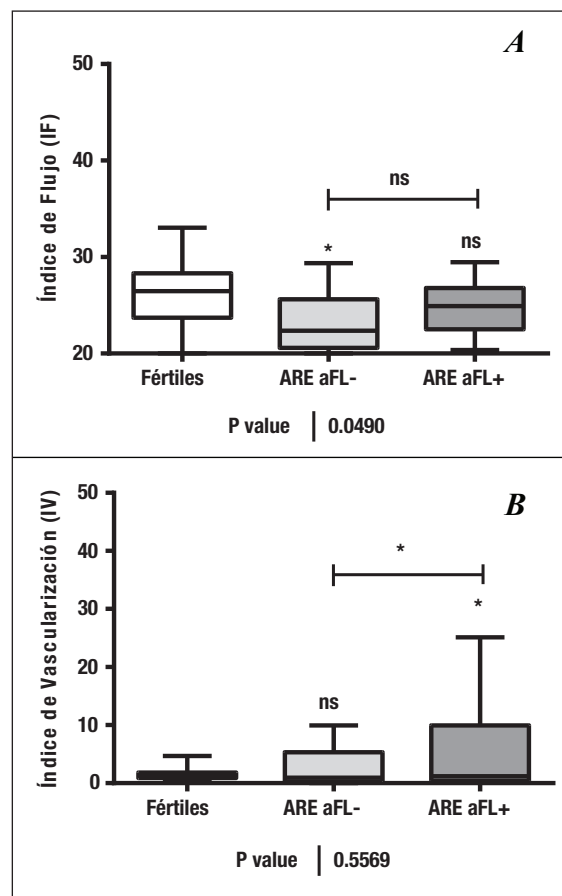
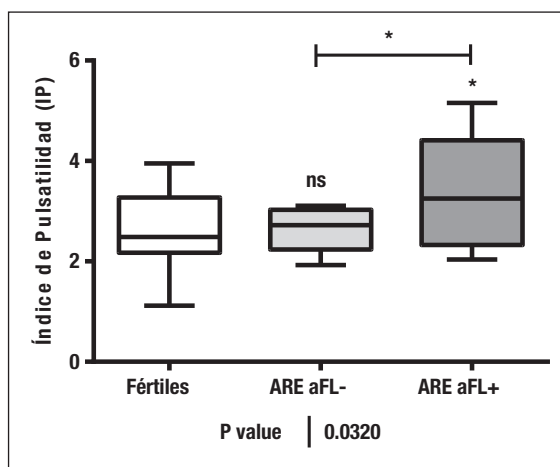


Figura 11. Índice de pulsatilidad promedio de las arteriolas uterinas (IP). Se estudiaron mujeres fértiles, pacientes sin SAF (ARE aFL-) y con SAF (ARE aFL+). Se realizó test ANOVA con posterior test de Tukey ($nsp > 0,05$; $*p < 0,05$).



Discusión

Estudios epidemiológicos han revelado que entre el 1% y el 2% de las mujeres en edad reproductiva sufren de abortos recurrentes a repetición.³² Los avances tecnológicos actuales en medicina reproductiva permiten diagnosticar la causa en el 50% de los casos; sin embargo, la otra mitad de las parejas entrarán en la categoría de aborto recurrente sin causa aparente. Si bien la edad materna avanzada constituye la principal causa social del incremento de la infertilidad, 8 de cada 10 pacientes manifiestan una alteración en el funcionamiento de su sistema inmunológico.² En este sentido, la medicina reproductiva se ha focalizado en el estudio de procesos inmunológicos y hematológicos con el objetivo de explicar los mecanismos por los cuales se produce la injuria endotelial que conduce en muchos casos al aborto sin causa aparente, cobrando vital importancia el estudio de la calidad endometrial. Como consecuencia, es creciente el interés en el estudio del perfil endometrial leucocitario, orientado al desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico y tratamiento. Estudios previos han determinado que el endometrio presenta una diversidad de células del

sistema inmunológico, cuyas subpoblaciones de leucocitos endometriales varían durante el ciclo menstrual. Estos cambios en el recuento leucocitario jugarían un papel vital en la regulación del daño y la reparación tisular.³³

En el presente trabajo hemos estudiado los niveles leucocitarios endometriales de mujeres fértiles y de pacientes ARE. En una primera instancia se estudió el recuento y tipificación endometrial de las células NK. Si bien la mayoría de los trabajos científicos publicados hasta la fecha han caracterizado el recuento de células NK en sangre periférica, son menos los estudios que abarquen el análisis de células NK a nivel endometrial. Sin embargo, un trabajo publicado por nuestro grupo en mujeres con falla de implantación inexplicada demostró que existe una correlación negativa entre el recuento local y periférico de estas células.³⁴ Un aumento en el recuento de células NK se asociaría a un excesivo y defectuoso desarrollo de las arteriolas espiraladas y de los vasos sanguíneos, lo cual conduciría a un flujo de sangre inapropiado e insuficiente en el endometrio.³⁵ En concordancia con este trabajo, se observó que las pacientes ARE presentan mayor recuento de células NK en el tejido endometrial.

Otro parámetro de importancia, abordado en este trabajo, fue el análisis de la población de neutrófilos presente en el endometrio. Existen antecedentes de que la activación y subsiguiente expresión de factor tisular de neutrófilos en modelos murinos estaría vinculada a la activación del complemento mediada por la fijación de anticuerpos antifosfolipídicos a los fosfolípidos aniónicos expuestos por el trofoblasto.¹⁴ Si bien, no se hallaron diferencias significativas en el recuento total de neutrófilos, sí se hallaron niveles elevados de neutrófilos CD142⁺. Este hallazgo podría ser un indicio del estrés oxidativo asociado a la activación leucocitaria que produce daño endotelial y podría conducir a la falla reproductiva.

Por otro lado, también hemos hallado un aumento en la proporción LB1/LB en sangre periférica. Estudios previos han reportado que las células LB1 se encuentran estrechamente vinculadas a respuestas inflamatorias agudas al ser productoras de inmunoglobulinas M.³⁶ Más aún,

estudios previos han demostrado que la IL-6 induce la maduración de los linfocitos B en células productoras de anticuerpos.³⁷ La IL-6 es una citoquina pleiotrópica que regula múltiples procesos biológicos, incluyendo respuestas de fase aguda e inflamatoria.³⁸ En este contexto, se observó una mayor expresión de IL-6 endometrial asociada a una mayor vascularización. Es importante destacar que un aumento en el recuento de células LB1 periféricas correlaciona con mayores niveles de expresión endometrial de FT y de VEGF. Más aún, el recuento de células LB1 y de FT correlaciona con una mayor expresión de la citoquina proinflamatoria TNF- α . Estudios realizados en tejido de placenta de mujeres que sufrieron preeclampsia han demostrado que los anticuerpos AT1-AA producidos por las células LB1 estimulan en células endoteliales placentarias la expresión de FT y de VEGF.²⁸ Este resultado se condice con lo observado en este trabajo, demostrando que existiría una predisposición basal a nivel endometrial previo a la decidualización y desarrollo placentario. Varios estudios han reportado que pacientes con abortos recurrentes asociados al síndrome antifosfolípido presentan mayor probabilidad de desencadenar preeclampsia durante el embarazo como consecuencia de una placentación insuficiente. El SAF se caracteriza por complicaciones tempranas como abortos de menos de 10 semanas de gestación, o tardías como muerte fetal de más de 10 semanas, parto prematuro y RCIU. Los abortos a repetición considerados como eventos clínicos en el diagnóstico del SAF podrían deberse a que los aFL son capaces de reconocer a los fosfolípidos negativos que se exponen en las membranas del trofoblasto durante la invasión embrionaria. Los efectos que se generan a nivel placentario estarían caracterizados por infarto de placenta, defectos en el remodelamiento de las arteriolas uterinas e inflamación de la decidua.³⁹ Estudios *in vitro* han sugerido que los anticuerpos aFL tienen un efecto directo en el trofoblasto impidiendo su diferenciación y maduración. La unión del trofoblasto con los aFL resulta en daño celular, apoptosis, inhibición de la proliferación e invasión defectuosa.⁴⁰ Como consecuencia, estos autoanticuerpos median una placentación defectuosa que finaliza

en la pérdida del embarazo.⁴¹ A partir de estos antecedentes, hemos decidido caracterizar el endometrio de mujeres ARE y prueba positiva para anticuerpos aFL. El diagnóstico del SAF se realiza considerando la presencia de los tres anticuerpos LAC, a β 2-GPI y aCL o una doble prueba positiva separada temporalmente por 12 semanas. Se sabe que el LAC está fuertemente asociado a la presencia de aCL así como de a β 2GPI, y la presencia de los tres autoanticuerpos aumenta el riesgo de producir eventos tromboticos o complicaciones obstétricas.⁴²⁻⁴³ En una primera instancia, se decidió evaluar los niveles endometriales totales de FT en los tres grupos de estudio y se observó que pacientes con SAF presentan un aumento de la expresión de FT endometrial, que podría corresponderse con mayor índice de vascularización en un contexto inflamatorio de mayor resistencia uterina y expresión de TNF- α causada por daño endotelial. El aumento en el índice de pulsatilidad podría deberse a una inflamación de los vasos a causa del reconocimiento y unión de los aFL a las células endoteliales que forman los vasos. Este hallazgo nos indicaría que estos autoanticuerpos podrían generar un proceso inflamatorio caracterizado por una mayor angiogénesis, que podría afectar tanto la implantación del embrión en el endometrio como el desarrollo placentario. Varios trabajos demuestran que en tumores los aFL son capaces de inducir la expresión de VEGF a fin de promover la angiogénesis tumoral y su progresión. Estudios previos corroboran el rol proangiogénico de los aFL al inducir la expresión de VEGF y de FT en células endoteliales.⁴⁴ La creciente evidencia sugiere que el fracaso en el desarrollo de una vasculatura placentaria funcional, debido a un desequilibrio entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos conduce a una defectuosa placentación, y por lo tanto a graves consecuencias obstétricas, como la pérdida recurrente del embarazo y preeclampsia.⁴⁵

En términos generales, el principal aporte que pretende brindar este trabajo es la caracterización endometrial de pacientes ARE con SAF, a fin de poder brindar al especialista en fertilidad nuevas herramientas de diagnóstico endometrial que permitan separar los grupos de pacientes que pueden beneficiarse más con los tratamientos disponibles.

La normatización en el uso de tratamientos anticoagulantes y antiinflamatorios como aspirina, heparina y corticoides en pacientes con SAF ha aumentado significativamente la tasa de nacidos vivos.⁴⁶ Más aún, estudios recientes han demostrado que el uso prolongado de hidroxiclороquina disminuye el título de aFL en sangre periférica de pacientes con SAF.⁴⁷ Esta medicación ha demostrado tener efectos antiinflamatorios, antiagregantes e inmunorregulatorios.⁴⁸ Sin embargo, a pesar de todos los tratamientos disponibles, la incidencia de complicaciones obstétricas aún es alta y entre un 20 y 30% de las pacientes continúa siendo refractaria a los tratamientos convencionales.⁴⁸⁻⁴⁹ Por esta razón, es necesario realizar más investigación destinada a la comprensión de los mecanismos autoinmunes implicados en el aborto, que derive en la búsqueda de nuevos tratamientos a fin de prevenir nuevas complicaciones obstétricas.

Referencias

- Christiansen OB, Pedersen B, Rosgaard A y col. A randomized, double-blind, placebo controlled trial of intravenous immunoglobulin in the prevention of recurrent miscarriage: evidence for a therapeutic effect in women with secondary recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2002; 17(3): 809-816.
- Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol* 2009; 2(2): 76-83.
- Regan L, Rai R. Epidemiology and the medical causes of miscarriage. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14: 839-854.
- Clark EA, Silver RM, Branch DW. Do antiphospholipid antibodies cause preeclampsia and HELLP syndrome? *Curr Rheumatol Rep* 2007; 9(3): 219-225.
- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T y col. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.
- Nayfe R, Uthman I, Aoun J y col. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2013; 52(8): 1358-1367.
- Oosting, JD, Derksen RH, Bobbink IW y col. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood* 1993; 81(10): 2618-2625.
- Kaburaki J, Kuwana M, Yamamoto M y col. Clinical significance of anti-annexin V antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Hematol* 1997; 54(3): 209-213.
- Salle V, Maziere JC, Smail A y col. Anti-annexin II antibodies in systemic autoimmune diseases and antiphospholipid syndrome. *J Clin Immunol* 2008; 28(4): 291-297.
- Hunt J, Krilis S. The fifth domain of beta 2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys281-Cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. *J Immunol* 1994; 152(2): 653-659.
- Di Simone N, Luigi MP, Marco D y col. Pregnancies complicated with antiphospholipid syndrome: the pathogenic mechanism of antiphospholipid antibodies: a review of the literature. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1108: 505-514.
- Jones RL, Hannan N, Kaitu'u T y col. Identification of Chemokines Important for Leukocyte Recruitment to the Human Endometrium at the Times of Embryo Implantation and Menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(12): 6155-6167.
- Ritis K, Doumas M, Mastellos D y col. A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J Immunol* 2006; 177(7): 4794-4802.
- Redecha P, Franzke C, Ruf W y col. Activation of Neutrophils by the Tissue factor Factor VIIa - PAR-2 Axis Mediates Fetal Death in Antiphospholipid Syndrome. *J Clin Invest* 2008; 118(10): 3453-3461.
- Berman J, Girardi G, Salmon JE. TNF-alpha is a critical effector and a target for therapy in antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss. *J Immunol* 2005; 174: 485-490.
- Chaouat G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol* 2007; 29: 95-113.
- Walsh P. Roles of factor XI, platelets and tissue factor-initiated blood coagulation. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2081-2086.
- Versteeg H, Ruf W. Emerging insights in tissue factor-dependent signaling events. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32(1): 24-32.
- Moore K. Formation of the bilaminar embryo. En: *The developing human: clinically oriented embryology* (4th Edition) Moore K, Wonsiewicz M, editor. W.B. Saunders Company. Philadelphia, USA 1988; 38-49.
- Pijnenborg R, Vercruyse L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 2006; 27: 939-958.
- Erez O, Romero R, Hoppensteadt D y col. Tissue factor and its natural inhibitor in pre-eclampsia and SGA. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008; 21: 855-869.
- Krikun G, Lockwood CJ, Paidas MJ. Tissue factor and the endometrium: From physiology to pathology. *Thromb Res* 2009; 124(4): 393-396.

23. Rickles F, Shoji M, Abe K. The role of the hemostatic system in tumor growth, metastasis, and angiogenesis: TF is a bi-functional molecule capable of inducing both fibrin deposition and angiogenesis in cancer. *Int J Hematol* 2001; 73: 145-150.
24. Mueller M, Lebovic DI, Garrett E y col. Neutrophils infiltrating the endometrium express vascular endothelial growth factor: potential role in endometrial angiogenesis. *Fertil Steril* 2000; 74(1): 107-112.
25. Cuadrado M, Buendía P, Velasco F y col. Vascular endothelial growth factor expression in monocytes from patients with primary antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2006; 11: 2461-2469.
27. Godoi LC, Gomes, KB, Alpoim PN y col. Preeclampsia: the role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. *J Thromb Thrombolysis* 2012; 34(1): 1-6.
28. Herse F, LaMarca B. Angiotensin II type 1 receptor autoantibody (AT1-AA)-mediated pregnancy hypertension. *Am J Reprod Immunol* 2013; 69: 413-418.
29. Jensen F, Wallukat G, Herse F y col. CD19⁺CD5⁺ cells as indicators of preeclampsia. *Hypertension* 2012; 59: 861-868.
30. Sadek H, Cagampang R. Variation in stability of house-keeping genes in endometrium of healthy and polycystic ovarian syndrome women. *Hum Reprod* 2012; 27(1): 251-256.
31. Bustin SA, Benes V, Garson JA y col. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. 2009; 55(4): 611-622.
32. Stephenson M D. Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril* 1996; 66: 24-29.
33. Salamonsen LA, Lathbury LJ. Endometrial leukocytes and menstruation. *Hum. Reprod Update* 2000; 6: 16-27.
34. Junovich G, Azpiroz A, Incera E y col. Endometrial CD16⁺ and CD16⁻ NK Cell Count in Fertility and Unexplained Infertility. *Am J Reprod Immunol* 2013; 70(3): 182-189.
35. Kwak-Kim J, Bao S, Ki Lee S y col. Immunological Modes of Pregnancy Loss: Inflammation, Immune Effectors, and Stress. *Am J Reprod Immunol* 2014; 72: 129-140.
36. Kraljevic K, Wong S, Fulcher DA. Circulating phenotypic B-1 cells are decreased in common variable immunodeficiency and correlate with immunoglobulin M levels. *Clin Exp Immunol* 2013; 171(3): 278-282.
37. Tanaka T, Kishimoto T. Targeting interleukin-6: all the way to treat autoimmune and inflammatory diseases *Int J Biol Sci* 2012; 8(9): 1227-1236.
38. Hirano T, Higuchi T, Katsuragawa H. CD9 is involved in invasion of human trophoblast-like choriocarcinoma cell line, BeWo cells. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 168-174.
39. Viall CA, Chamley LW. Histopathology in the placentae of women with antiphospholipid antibodies: a systematic review of the literature. *Autoimmunity Reviews* 2015; 14: 446-471.
40. Pierangeli SS, Chen PP, Raschi E y col. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanisms. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34(3): 236-250.
41. Meroni PL, Ronda N, De Angelis V y col. Role of anti-beta2 glycoprotein I antibodies in antiphospholipid syndrome: in vitro and in vivo studies. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007; 32(1): 67-74.
42. Ruffatti A, Tonello M, Visentin MS y col. Risk factors for pregnancy failure in patients with antiphospholipid syndrome treated with conventional therapies: a multicentre, case-control study. *Rheumatology* 2011; 50: 1684-1689.
43. Galli M. Interpretation and recommended testing for anti-phospholipid antibodies. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2012; 38: 348-352.
44. Wu Y-Y, Nguyen AV, Wu X-X y col. Antiphospholipid Antibodies Promote Tissue Factor- dependent angiogenic switch and tumor progression. *Am J Pathol* 2014; 184(12): 3359-3375.
45. D'Ippolito S, Marana, R, Di Nicuolo F y col. Effect of Low Molecular Weight Heparins (LMWHs) on antiphospholipid Antibodies (aPL) - Mediated Inhibition of Endometrial Angiogenesis. *PLoS ONE* 2012; 7(1): e29660.
46. Di Prima F, Valenti O, Hyseni E. y col. Antiphospholipid Syndrome during pregnancy: the state of the art. *J Prenat Med* 2011; 5(2): 41-53.
47. Nuri E, Taraborelli M, Andreoli L y col. Long-term use of hydroxylchloroquine reduces antiphospholipid antibodies levels in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Immunol Res.* doi:10. 1007/s12026-016-8812-z, 2016.
48. Sciascia S, Hunt BJ, Talavera-Garcia E y col. The impact of hydroxychloroquine treatment on pregnancy outcome in women with antiphospholipid antibodies. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 214(2): 273. e1-8.
49. De Jesus GR, Agmon-Levin N, Andrade CA y col. 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force Report on Obstetric Antiphospholipid Syndrome. *Autoimmunity Reviews* 2014; 13(8): 795-813.