

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**Estudio inmunológico en líquido folicular y biopsia
endometrial en pacientes con abortos de repetición y fallo de
implantación recurrente de origen inflamatorio**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Lydia Pilar Suárez

DIRIGIDA POR

**Silvia María Sánchez Ramón
Marta Calvo Urrutia**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

***ESTUDIO INMUNOLOGICO EN LIQUIDO
FOLICULAR Y BIOPSIA ENDOMETRIAL EN
PACIENTES CON ABORTOS DE REPETICION
Y FALLO DE IMPLANTACION RECURRENTE
DE ORIGEN INFLAMATORIO***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

LYDIA PILAR SUAREZ

DIRECTORAS

SILVIA MARIA SANCHEZ RAMON
MARTA CALVO URRUTIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO- INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
MÉDICO-QUIRÚRGICAS



***ESTUDIO INMUNOLÓGICO EN LÍQUIDO FOLICULAR Y BIOPSIA
ENDOMETRIAL EN PACIENTES CON ABORTOS DE REPETICIÓN
Y FALLO DE IMPLANTACIÓN RECURRENTE DE ORIGEN
INFLAMATORIO.***

TESIS DOCTORAL

Lydia Pilar Suárez

DIRECTORAS

Silvia María Sánchez Ramón

Marta Calvo Urrutia

MADRID 2024

A Martín y Mateo.

AGRADECIMIENTOS.

Tras años trabajando en este proyecto, llegó el momento de concluirlo y no puede ser de otra manera que dando las gracias a las personas que me han ayudado. Espero no dejarme a nadie.

En primer lugar al Profesor Miguel Ángel Herráiz, que en 2018 confió en mi para invitarme a participar en un proyecto de investigación conjunto entre Ginecología e Inmunología, y que a día de hoy se convierte en mi tesis doctoral.

Al Dr. Pluvio Coronado Martín, mi tutor, por su conocimiento científico, su enseñanza y su cariño desde que era residente. Siempre a golpe de teléfono o email para resolver complicaciones logísticas. Es un honor trabajar contigo.

A mis compañeros de la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Clínico San Carlos: Marta Calvo, Teresa Gastañaga, Maribel Calventus, Raúl Villsasevil, Nacho Cristóbal, Nuria Celis, Mayca, Isabel Sánchez (Chispa), Sara Rafael, Marta Vidaurreta, Silvia Veganzones y Lola Cuquerella, por compartir cada día juntos, tratando de ayudar a nuestras pacientes para “hacer vida”.

A mis compañeros del Servicio de Inmunología: Silvia Sánchez Ramón, Mariló Mansilla, Juliana Ochoa, María Casas y Alejandra Comins, y especialmente a, Nabil Shubi-Issa por haber sido una excelente pareja de trabajo durante estos años, peleando juntos “codo con codo” por sacar adelante nuestros proyectos.

Al Departamento de Investigación y Metodología Estadística y especialmente a Irene Serrano García, por sus explicaciones, por las múltiples veces que te pedí nuevos cálculos de resultados o una gráfica de diferente forma y color... Gracias por tu paciencia, dedicación y ayuda constante.

A mi compañera la Dra. Sylvia Fernández Shaw del Centro Reproductivo Hermanos García del Real por su colaboración en el estudio.

A mi familia de Fertility Madrid, por ayudarme en el reclutamiento de pacientes y la recuperación de las muestras: a Ana Fernández- Sanguino, Jon Díez Alcántara, Martín Sueldo, Rafael Collazos, Mar Belmonte, Bárbara Martín, Criseila Santana, Yessica Blanco, Cristina Cañavate, Sandra Ogallar, Gema López, Joselyn Pontones, Esther Ruiz, Irene

Gómez y, especialmente, a Aitziber Domingo, José Luis de Pablo, Óscar Oviedo y Carmen Anarte, por su amistad, su cariño y haber hecho “magia” en mi vida.

A todos mis compañeros del Servicio de Ginecología, por ser “mi familia” en Madrid, y por haberme ayudado en este trabajo de una manera u otra. Gracias a Nacho Cristóbal Quevedo por sus enseñanzas y tutoriales salvavidas, y a Vanesa Rayo por revisarme datos cuando yo no podía.

A mis amigas del Hospital, Mar, Noelia y Alicia, gracias por haberme enseñado desde R1, por haberme cuidado y por haberme dado la oportunidad de crecer a vuestro lado. Os admiro como ginecólogas y os quiero como amigas.

A mis “hermanas”, Blanca e Isa, por ser lo mejor que tengo en el Hospital Clínico. Gracias por ser más que compañeras, y más que amigas! Gracias por darme aliento cuando me quedo sin fuerza, y por ayudarme a ver las cosas desde una perspectiva mejor. Muchas gracias por darme la mano en los momentos de dolor y por formar parte de los momentos más felices de mi vida. Seguiremos sumando juntas!!

A mis mejores amigas: Lucía, juntas desde el cole, gracias por ayudarme con las traducciones. A Ana, gracias por estar siempre a mi lado.

A la Dra. Marta Calvo, mi directora, gracias por ayudarme en mi formación todos estos años. Por haber despertado en mi la llama de la Reproducción y por haberme apoyado en momentos difíciles. Este proyecto es un logro del trabajo en equipo, y así seguiremos trabajando juntas.

A la Dra. Silvia Sánchez Ramón, mi directora, gracias por haber confiado en mi para este proyecto, por no haber tirado la toalla a pesar de las adversidades y por empujarme cuando me sentía desanimada. Agradezco a este trabajo el haber cruzado nuestros caminos, y no solo desde la perspectiva profesional, sino también en la personal. No habrá líneas suficientes para darte las gracias por ayudarme a conseguir lo más importante en mi vida, M&M. Es un honor contar con tu cariño y tu amistad.

Al Dr. Nacho Cristóbal García, revisor externo de este trabajo. Tampoco tengo palabras para agradecerte tu disponibilidad, amabilidad y cariño. Gracias por darme ánimo y no dejarme caer cuando ya no me quedaban fuerzas. Gracias por tener siempre una palabra reconfortante. Gracias por leerte todos los capítulos una y otra vez, y por re-correr lo

corregido raudo y veloz. Gracias por tu enseñanza diaria y por tu esfuerzo incansable en nuestro éxito profesional. Seguiremos sumando buenos momentos juntos.

A mis suegros, Ángel y Merche por su cariño y su esfuerzo. Gracias por quererme como a una hija.

A mi marido, Hugo, gracias por haber dejado a la Ginecología formar parte de tu vida. Gracias por ayudarme a avanzar en mis metas, y por ganar tiempo para que yo escriba este proyecto. Gracias por compartir nuestra vida y sobre todo GRACIAS POR NUESTROS HIJOS.

A mis padres, Mariano y Charo, por su cariño y su ejemplo cada día. Gracias a los dos por habernos hecho tan felices. Y especialmente a mi madre, gracias por no haber dejado de luchar ni un momento por nosotras, por esforzarte cada día por darnos lo mejor... Por tener siempre una palabra dulce y un gesto cariñoso. Todos nuestros éxitos son fruto de tus cosechas.

A mi hermana, Lorena, por ser la mejor compañera de viaje que habría podido tener. Gracias por estar conmigo en los buenos, pero sobre todo, en los malos momentos... gracias por ser mi mitad.

A mis hijos, Martín y Mateo. Gracias por ser el motor de mi vida. Nunca pensé que se podría querer tanto. Sois el proyecto más gratificante de mi vida. Gracias por vuestro tiempo y vuestro amor.

ÍNDICES.

ÍNDICE GENERAL.

| | | |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. | RESUMEN | 16 |
| | SUMMARY | 24 |
| 2. | INTRODUCCIÓN | 33 |
| 3. | ESTADO ACTUAL DEL TEMA | 35 |
| | 3.1 Visión general del fallo reproductivo recurrente..... | 35 |
| | 3.2 Aproximación a la inmunología reproductiva | 37 |
| | 3.3 Abortos de repetición | 40 |
| | 3.3.1 Definiciones y epidemiología. Estimación de la probabilidad de implantación | 40 |
| | 3.3.2 Impacto psicológico. | 42 |
| | 3.3.3 Principales factores de riesgo | 42 |
| | 3.3.4 Investigación de posibles factores causales y diagnóstico | 44 |
| | 3.3.5 Tratamientos inmunológicos: nuevas terapias..... | 51 |
| | 3.3.6 Pronóstico del AR | 56 |
| | 3.4 Fallo de implantación recurrente | 57 |
| | 3.4.1 Definiciones y epidemiología. Definición de la probabilidad de implantación | 57 |
| | 3.4.2 Impacto psicológico | 61 |
| | 3.4.3 Posibles factores de riesgo: estilo de vida | 62 |
| | 3.4.4 Investigación de posibles factores causales y manejo diagnóstico | 62 |

| | | |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.4.5 | Manejo terapéutico | 69 |
| 3.4.6 | Pronóstico del FIR | 71 |
| 4. | HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 73 |
| 5. | MATERIAL Y MÉTODOS | 78 |
| 5.1 | Lugar de ejecución y grupo de estudio | 78 |
| 5.2 | Descripción de pacientes | 79 |
| 5.3 | Metodología clínica | 87 |
| 5.4 | Metodología analítica | 93 |
| 5.5 | Metodología estadística | 108 |
| 6. | RESULTADOS | 112 |
| 6.1 | Datos demográfico de la población: análisis descriptivo global y por grupos | 112 |
| 6.2 | Biomarcadores inmunofenotípicos: descripción de datos y cálculos de significación estadística clasificados por grupo de paciente (AR, FIR y controles) y origen de la muestra (endometrio, líquido folicular y sangre periférica) | 127 |
| 6.3 | Biomarcadores inmunofenotípicos: estudios de correlación estadística | 160 |
| 7. | DISCUSIÓN | 179 |

| | | |
|------------|---------------------------------------------------------------------|------------|
| 8. | CONCLUSIONES | 198 |
| 9. | ANEXOS | 201 |
| | 9.1 Permisos y becas | 201 |
| | 9.2 Convenios de colaboración | 204 |
| | 9.3 Consentimiento informado | 206 |
| | 9.4 Documento informativo del consentimiento informado | 212 |
| 10. | BIBLIOGRAFÍA | 218 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

| | |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| AAS. | Ácido acetil salicílico. |
| Aβ2. | Anticuerpos anti β 2 glicoproteína. |
| Ac. | Anticuerpos. |
| ACA. | Anticuerpos anticardiolipinas. |
| AL. | Anticoagulante lúpico. |
| AFL. | Anticuerpos antifosfolípidos. |
| AMH. | Hormona antimulleriana. |
| ANA. | Anticuerpos antinucleares. |
| AntiTPO. | Anticuerpos antiperoxidasa. |
| AR. | Aborto de repetición. |
| ASRM. | American Society for Reproductive Medicine. |
| βHCG. | Gonadotropina coriónica humana. |
| B reg. | Linfocito B regulador. |
| Cél. MDSCs_M. | Células supresoras derivadas de mieloides. |
| Cél. MDSCs_MO. | Células supresoras mieloides derivadas de monocitos. |
| Cél. NK. | Células Natural Killer totales (%). |
| Cél. NKcit. | Células Natural Killer citotóxicas. |
| Cél. NKcit CD69+. | Células Natural Killer citotóxicas CD69 positivo. |
| Cél. NKcit NKp30+. | Células Natural Killer citotóxicas NKP30 positivo. |
| Cél. NKcit Perforina+. | Células Natural Killer citotóxicas que sobreexpresa perforina. |
| Cél. NKcit TIGIT+. | Células Natural Killer citotóxicas TIGIT positivo. |
| Cél. NKcit TIM3+. | Células Natural Killer citotóxicas TIM3 positivo. |
| Cél. NKT. | Células NKT. |
| Cél. NKT CD69+. | Células NKT CD69 positivo. |
| Cél. NKT NKp30+. | Células NKT NKp30 positivo. |
| Cél.NKT Perforina+. | Células NKT que sobreexpresa perforina. |
| Cél. NKT TIGIT+. | Células NKT TIGIT positivo. |

| | |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Cél. NKT TIM3+. | Células NKT TIM3 positivo. |
| Cél. NK reg. | Células Natural Killer reguladoras. |
| Cél. NKreg CD69+. | Células Natural Killer reguladoras CD69 positivo. |
| Cél. NKreg NKp30+. | Células Natural Killer reguladoras NKp30 positivo. |
| Cél. NKreg Perforina+. | Células Natural Killer reguladoras que sobreexpresa perforina. |
| Cél. NKreg TIGIT+. | Células Natural Killer reguladoras TIGIT positivo. |
| Cél. NK reg TIM3+. | Células Natural Killer reguladoras TIM3 positivo. |
| Cél. TCD4+. | Linfocitos T CD4 positivo. |
| Células T CD8+. | Linfocitos T CD8 positivo. |
| Células Treg_CD25^{high}. | Células T reguladoras CD25 high positivo. |
| Cél. TregCD4+. | Células T reguladoras CD4 positivo. |
| CD. | Cluster of differentiation. |
| CI. | Consentimiento Informado. |
| CMH. | Complejo mayor de histocompatibilidad. |
| CMP. | Citometría de Flujo Multiparamétrica. |
| CT. | Criotransferencia. |
| DGP. | Diagnóstico genético preimplantacional. |
| ERA. | Endometrial receptivity assay. |
| ESHRE. | European Society of Human Reproduction and Embryology. |
| FF. | Follicular fluid. |
| FIV. | Fecundación in vitro. |
| FIR. | Fallo de implantación recurrente. |
| FRR. | Fallo reproductivo recurrente. |
| FRRi. | Fallo reproductivo recurrente de origen inflamatorio. |
| FSH. | Hormona estimulante del folículo. |
| G-CSF. | Factor estimulante de colonias de granulocitos. |
| GM-CSF. | Factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos. |

| | |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| HBPM. | Heparina bajo peso molecular. |
| HC. | Healthy control. |
| HCSC. | Hospital Clínico San Carlos. |
| HNF. | Heparina no fraccionada. |
| Hcys. | Homocisteína. |
| HHcys. | Hiperhomocisteinemia. |
| HLA. | Antígenos leucocitarios humanos. |
| hMG. | Gonadotropina menopáusica humana. |
| HSG. | Histerosalpingografía. |
| HysoG. | Histerosonografía. |
| IFI. | Inmunofluorescencia indirecta. |
| IMC. | Índice de masa corporal (IMC) |
| IL-10. | Interleucina 10. |
| KIR. | <i>Killer inhibitory receptor- receptor inhibidor de Natural killer.</i> |
| LB. | Linfocito B. |
| LIF. | Factor inhibidor de la leucemia. |
| LH. | Hormona luteinizante. |
| MBE. | Medicina basada en la evidencia. |
| Mo clásicos CCR2+. | Monocitos clásicos CCR2+ positivo. |
| Mo clásicos CCR5+. | Monocitos clásicos CCR5+ positivo. |
| Mo clásicos CD11b_ACT+. | Monocitos clásicos CD11b_ACT positivo. |
| Mo clásicos CD69+. | Monocitos clásicos CD69+ positivo. |
| Mo clásicos CX3CR1+. | Monocitos clásicos CX3CR1+ positivo. |
| Mo intermedios CCR2+. | Monocitos intermedios CCR2 positivo. |
| Mo intermedios CCR5+. | Monocitos intermedios CCR5 positivo. |
| Mo intermedios CD11b_ACT+. | Monocitos intermedios CD11b_ACT+. |
| Mo intermedios CD69+. | Monocitos intermedios CD69 positivo. |
| Mo intermedios CX3CR1+. | Monocitos intermedios CX3CR1 positivo. |
| Mo no clásicos CCR2+. | Monocitos no clásicos CCR2 positivo. |
| Mo no clásicos CCR5+. | Monocitos no clásicos CCR5 positivo. |

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------|
| Mo no clásicos CD11b_ACT+. | Monocitos no clásicos CD11b_ACT positivo. |
| Mo no clásicos CD69+. | Monocitos no clásicos CD69 positivo. |
| Mo no clásicos CX3CR1+. | Monocitos no clásicos CX3CR1 positivo. |
| NGS. | Next generation sequencing. |
| NK. | Natural Killer. |
| NKp/pNK. | Natural Killer periféricas. |
| NKT. | Células T asesinas naturales. |
| NKu/uNK. | Natural Killer uterinas. |
| OMS. | Organización Mundial de la Salud. |
| PGR. | Pérdida Gestacional Recurrente. |
| PGT. | Progesterona. |
| PGT-A. | Preimplantation genetic testing for aneuploidies. |
| PRL. | Prolactina. |
| RFA. | Recuento de folículos antrales. |
| RIF. | Recurrent implantation failure. |
| RN. | Recién nacido. |
| RNV/RNVS. | Recién nacido vivo/ Recién nacido vivo sano. |
| RPL. | <i>Recurrent pregnancy loss.</i> |
| SAF. | Síndrome antifosfolípido. |
| SEF. | Sociedad Española de Fertilidad. |
| Th1. | Linfocitos T helper o colaboradores tipo 1. |
| Th2. | Linfocitos T helper o colaboradores tipo 2. |
| TE. | Transferencia embrionaria. |
| TNF-α. | Factor de necrosis tumoral alfa. |
| TRA. | Tratamiento /técnica de reproducción asistida. |
| Treg. | Linfocitos T reguladores. |
| TSH. | Hormona estimulante del tiroides. |
| T4. | Tiroxina. |

ÍNDICE DE FIGURAS.

- Figura 1. Principales causas de pérdida recurrente del embarazo (2016).
- Figura 2. Estrategia de gating para endometrio.
- Figura 3. Estrategia de gating para líquido folicular.
- Figura 4. Estrategia de gating para sangre periférica.
- Figura 5. Distribución de la población reclutada.
- Figura 6. Distribución poblacional por edad.
- Figura 7. Distribución poblacional por raza.
- Figura 8. Distribución poblacional por IMC.
- Figura 9. Distribución poblacional por grupo sanguíneo.
- Figura 10. Distribución poblacional según cariotipo.
- Figura 11. Distribución poblacional por tabaquismo.
- Figura 12. Gráfica box-plot para células NK citotóxicas en FIR frente a controles en el endometrio.
- Figura 13. Gráfica box-plot para células NKT que expresan perforina en FIR y controles en el endometrio.
- Figura 14. Gráfica box-plot para células NK reguladoras en FIR y controles en el endometrio.
- Figura 15. Gráfica box-plot para células citotóxicas NKp30 positivo en FIR y controles en líquido folicular.
- Figura 16. Gráfica box-plot para células NKT que expresan CD69 en FIR y controles en líquido folicular.

- Figura 17. Gráfica box-plot para células NKT que expresan perforina en FIR y controles en líquido folicular.
- Figura 18. Gráfica box-plot para células reguladoras que expresan CD69 en FIR y controles en líquido folicular.
- Figura 19. Gráfica box-plot para células reguladoras NKp30 positivo en FIR y controles en líquido folicular.
- Figura 20. Gráfica box-plot para células NK reguladoras que expresan perforina en FIR y controles en líquido folicular.
- Figura 21. Gráfica box-plot para monocitos CCR5 positivo en FIR y controles en líquido folicular.
- Figura 22. Gráfica box-plot para células supresoras de mieloides en FIR y controles en líquido folicular
- Figura 23. Gráfica box-plot para células NK citotóxicas TIGIT positivo en FIR y controles en sangre periférica.
- Figura 24. Gráfica box-plot para NK citotóxicas que expresan CD69 en FIR y controles en sangre periférica.
- Figura 25. Gráfica box-plot para células NKT que expresan perforina en pacientes FIR y controles en sangre periférica.
- Figura 26. Gráfica box-plot para Monocitos totales en FIR y controles en sangre periférica.
- Figura 27. Gráfica box-plot para células supresoras mieloides derivadas de monocitos FIR y controles en sangre periférica.
- Figura 28. Gráfica de dispersión NKp30+ NKcit/ TIGIT+ NKcit para controles en endometrio.

- Figura 29. Gráfica de dispersión Perforina+ NKcit/ TIGIT+ NKcit para controles en endometrio.
- Figura 30. Gráfica de dispersión Perforina+ NKcit/ NKp30+ NKcit para controles en endometrio.
- Figura 31. Gráfica de dispersión MDSCs_M/ Perforina+ NKcit para controles en endometrio.
- Figura 32. Gráfica de dispersión TIGIT+ NKcit/ NKcit para FIR en endometrio.
- Figura 33. Gráfica de dispersión CD69+ NKcit/ NKcit para FIR en endometrio.
- Figura 34. Gráfica de dispersión Perforina+ NKcit/ NKcit para FIR en endometrio.
- Figura 35. Gráfica de dispersión TIGIT+ NKcit/ NKcit para FIR en líquido folicular.
- Figura 36. Gráfica de dispersión CD69+ NKcit/ NKcit para FIR en líquido folicular.
- Figura 37. Gráfica de dispersión Perforina+ NKcit/ NKcit para FIR en líquido folicular.
- Figura 38. Gráfica de dispersión para MDSCs_M/ NKcit para FIR en líquido folicular.
- Figura 39. Gráfica de dispersión para MDSCs_M/ CD69+ NKcit para FIR en líquido folicular.
- Figura 40. Gráfica de dispersión para MDSCs_M/ Perforina+ NKcit para FIR en líquido folicular.
- Figura 41. Gráfica de dispersión para MDSCs_MO/ NKcit para controles en sangre periférica.
- Figura 42. Gráfica de dispersión para TIM3+ NKcit / TIGIT+ NKcit para controles en sangre periférica.
- Figura 43. Gráfica de dispersión para TIM3+ NKcit/ CD69+ NKcit para controles en sangre periférica.

Figura 44. Gráfica de dispersión para MDSCs_M/ NKp30+ NKcit para controles en sangre periférica.

Figura 45. Gráfica de dispersión para TIM3+ NKcit / CD69+ NKcit para FIR en sangre periférica.

Figura 46. Gráfica de dispersión para Perforina+ NKcit/ TIM3+ NKcit para FIR en sangre periférica.

ÍNDICE DE TABLAS.

- Tabla 1. Aplicación de la definición de FIR a la práctica clínica de la Medicina Reproductiva.
- Tabla 2. Recomendación de intervenciones en pacientes FIR.
- Tabla 3. Definiciones de AR, FIR, Controles y Criterios de inclusión y exclusión para el reclutamiento poblacional de participantes en el estudio con iFRR.
- Tabla 4. Participación de pacientes (casos y controles) en el estudio iFRR.
- Tabla 5. Comparación biomarcadores inmunofenotípicos analizados en cada tejido.
- Tabla 6. Marcadores y fluorocromos para NKs y macrófagos en endometrio.
- Tabla 7. Anticuerpos y fluorocromos para NKs y macrófagos en líquido folicular.
- Tabla 8. Anticuerpos y Fluorocromos utilizados como marcadores para sangre periférica.
- Tabla 9. Coeficiente de correlación de Spearman: valores e interpretación.
- Tabla 10. Número y porcentaje de pacientes participantes.
- Tabla 11. Número de pacientes según rango de IMC.
- Tabla 12. Características demográficas de la población general: FIR+ AR+ controles.
- Tabla 13. Características demográficas para el grupo casos: AR y FIR.
- Tabla 14. Características demográficas para el grupo controles.
- Tabla 15. Resultados de los biomarcadores inmunofenotípicos en el grupo AR en los tres tejidos: endometrio, líquido folicular y sangre periférica.
- Tabla 16. Resultados de los biomarcadores inmunofenotípicos para los grupos FIR y controles en endometrio y análisis de significación estadística.

- Tabla 17. Resultados de los biomarcadores inmunofenotípicos para los grupos FIR y controles en líquido folicular y análisis de significación estadística.
- Tabla 18. Resultados de los biomarcadores inmunofenotípicos para los grupos FIR y controles en sangre periférica y análisis de significación estadística.
- Tabla 19. Resumen de resultados con significación estadística en FIR y controles, en endometrio, líquido folicular y sangre periférica.
- Tabla 20. Resumen resultados con tendencia estadística entre FIR y controles, en líquido folicular y sangre periférica.
- Tabla 21. Resultados de correlaciones de Spearman en endometrio para controles.
- Tabla 22. Resultados de correlaciones de Spearman en endometrio para casos- FIR.
- Tabla 23. Resultados de correlaciones de Spearman en líquido folicular para controles.
- Tabla 24. Resultados de correlaciones de Spearman en líquido folicular para casos- FIR.
- Tabla 25. Resultados de correlaciones de Spearman en sangre periférica para controles.
- Tabla 26. Resultados de correlaciones de Spearman en sangre periférica para casos- FIR.
- Tabla 27. Resumen de resultados de correlación en endometrio, líquido folicular y sangre periférica en pacientes FIR y controles.

RESUMEN/ SUMMARY

1. RESUMEN.

Estado actual del tema.

El fallo reproductivo recurrente (FRR), que se presenta en forma de dos entidades, el aborto recurrente (AR) y el fallo de implantación recurrente (FIR), representa un desafío significativo en la medicina de la reproducción, afectando al 1-5% de las parejas en edad reproductiva(1).

El AR se define como la pérdida consecutiva de dos o más gestaciones, mientras que el FIR se refiere a la incapacidad de lograr un embarazo tras la transferencia de embriones de buena calidad en ciclos de fecundación in vitro (FIV). La etiología de estas entidades es multifactorial, abarcando causas genéticas, inmunológicas, anatómicas, endocrinas, hematológicas e infecciosas; sin embargo, en aproximadamente el 50% de los casos, el origen permanece desconocido(4).

El sistema inmunológico, tanto innato como adaptativo, juega un papel fundamental en la implantación y el desarrollo del embarazo. Las células Natural Killer (NK), tanto uterinas como periféricas, desempeñan un papel crucial en el éxito del embarazo. Las NK uterinas, son las principales mediadoras en la interfaz materno-fetal, facilitando el remodelado vascular y la inmunotolerancia hacia el embrión. Sin embargo, una inadecuada activación puede asociarse con AR y FIR. De manera similar, las células NK periféricas, aunque menos directamente involucradas, reflejan desequilibrios inmunológicos sistémicos que pueden influir en el microambiente uterino(3).

A pesar de los avances en la investigación, la heterogeneidad en la definición y el manejo del FRR dificulta la construcción de perfiles prepatológicos en base a distintos biomarcadores inmunológicos. En consecuencia, la estandarización de estrategias diagnósticas y terapéuticas, y su implementación clínica carece de consenso por el momento. Por ese motivo, este trabajo busca contribuir al entendimiento del FRR desde una perspectiva ginecológica e inmunológica, con el fin de proponer enfoques que optimicen los resultados reproductivos y, en última instancia, el éxito del embarazo.

Hipótesis y objetivos.

Este estudio persigue profundizar en el conocimiento y la comprensión de los biomarcadores inmunológicos relacionados con el FRR, abordando la inflamación como una posible causa.

Para ello se parte de la *hipótesis nula* de que no existen diferencias inmunológicas, tanto a nivel local (ovario, útero) como sistémico (sangre periférica), entre mujeres con fallo reproductivo recurrente (FRR) y mujeres fértiles. En contraste, la *hipótesis alternativa* plantea que un subgrupo de mujeres con FRR presenta un perfil inmunológico distinto, caracterizado por biomarcadores proinflamatorios específicos (células NK, monocitos/macrófagos), al perfil que presentan mujeres sanas con fertilidad probada.

El proyecto tiene como objetivo principal identificar biomarcadores inmunológicos locales (en endometrio y líquido folicular) y sistémicos (en sangre periférica) relacionados con el FRR de origen inmunológico. Dichos biomarcadores son determinadas subpoblaciones de células NK, de monocitos y macrófagos.

Entre los objetivos secundarios se encuentra realizar un análisis comparativo de los biomarcadores en cada tejido para las distintas poblaciones (pacientes con FRR, AR o FIR, y controles sanos) y determinar si existen diferencias estadísticamente significativas, así como posibles correlaciones entre dichos biomarcadores. En última instancia, se propone desarrollar un algoritmo diagnóstico que integre los biomarcadores más importantes para hacer un manejo más preciso y personalizado de las pacientes con FRR.

Material y métodos.

Este proyecto se desarrolla por los servicios de Ginecología e Inmunología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, en colaboración con otros centros externos de medicina reproductiva, entre 2019 y 2023.

Se trata de un estudio observacional prospectivo de casos y controles sobre el posible origen inflamatorio del fallo reproductivo recurrente. Incluye 33 mujeres, 13 controles (mujeres sanas con fertilidad probada) y 20 casos, 7 con aborto de repetición (AR) y 13 con fallo de implantación recurrente (FIR).

La base del estudio es determinar el inmunofenotipo de las pacientes participantes a través del análisis de marcadores inmunológicos específicos: natural killers (NKs), monocitos y macrófagos, destacando entre otros las siguientes subpoblaciones celulares: NK citotóxicas, reguladoras y NKT (TIGIT+, CD69+, NKp30+, Perforina+ y TIM3+), así como diferentes tipos de monocitos (clásicos, intermedios y no clásicos) y células mieloides derivadas de monocitos (MDSC).

Las muestras proceden de endometrio, líquido folicular y sangre periférica de las pacientes participantes en el contexto de un tratamiento de fecundación in vitro (FIV) y se analizan en fresco mediante citometría de flujo multiparamétrica siguiendo protocolos estandarizados para garantizar la validez de los resultados.

El análisis estadístico incluyó descripciones de frecuencias para variables cualitativas y medidas robustas para datos cuantitativos con distribución no normal, además de un análisis de significación para comparación entre grupos (aplicando la prueba de Mann-Whitney) y la evaluación de correlaciones entre las variables mediante el coeficiente de Spearman. El procesamiento de datos se hace con el software IBM SPSS Statistics v26.

Resultados.

Los resultados de este estudio se dividen en tres bloques: el descriptivo, el estudio de significación entre grupos y el análisis de correlación entre variables.

En cuanto al análisis descriptivo se aplica a toda la población participante, en total 33 pacientes de las cuales 13 son mujeres con fertilidad probada (“controles”), y 20 son “casos”, 13 son FIR y 7 son AR. Se describirán las variables de manera conjunta como por grupos de estudio. La media de edad de 24,53 años para controles, 37,9 años para

FIR y 39,14 años para AR. El 81,8% de las pacientes son caucásicas, el 78,1% tienen un IMC normal y el 87,5% un cariotipo normal. Destaca que las pacientes AR y FIR presentan más antecedentes ginecológicos como endometriosis. El consumo de alcohol y tabaco por esta población es bajo. Cabe destacar que según nuestros resultados, el 3.1% de participantes presenta cariotipo alterado, lo cual es homólogo con lo descrito en la bibliografía.

Respecto al análisis de significación estadística destaca explicar que sólo se realizará entre mujeres con fertilidad probada y pacientes FIR. El motivo es que, a pesar de que se consiguió reclutar inicialmente el número necesario de pacientes con AR, finalmente varias pacientes desestimaron participar en el estudio por la incompatibilidad entre la biopsia endometrial necesaria para el estudio y la transferencia embrionaria en fresco.

Las variables analizadas son diferentes subpoblaciones de natural Killers (NK) con perfil activador o regulador, y también de monocitos, en muestras de endometrio, líquido folicular y sangre.

Los resultados de significación estadística calculados aplican de la U de Mann-Whitney para los siguientes biomarcadores significativos:

En cuanto al análisis de significación se observa que en endometrio de pacientes FIR hay una mayor presencia de células NK citotóxicas totales, así como NK citotóxicas con expresión CD69 y de células NKT con sobreexpresión de perforina respecto a controles, lo que podría indicar mayor actividad citotóxica y un microambiente endometrial menos favorable para la implantación. Por su parte, se observa mayor presencia de células NK reguladoras en el endometrio de las mujeres fértiles, lo que sugiere mejores mecanismos de inmunosupresión en su endometrio.

Por otro lado se objetiva que en el líquido folicular de las pacientes con FIR hay una mayor presencia de células NKT con sobreexpresión de CD69 y de perforina, ambas relacionadas con la activación celular y la inflamación, así como aumento de las células reguladoras NK reguladoras con sobreexpresión de CD69; mientras que en controles se

encontraron niveles más altos de NK citotóxicas con expresión de NKp30+, así como niveles altos de NK reguladoras NKp30+.

Finalmente en sangre periférica se observa una mayor presencia de células NKT perforina positivo en pacientes FIR, sugiriendo más actividad citotóxica, mientras que en controles se determina mayor expresión de los biomarcadores NK citotóxicas TIGIT positivo y de las NK citotóxicas CD69 positivo, lo que puede indicar una disminución en la regulación de la respuesta inmunitaria a nivel sistémico.

En cuanto al análisis de correlaciones se aplicó a los biomarcadores inmunológicos significativos para FIR y controles sanos en endometrio, líquido folicular y sangre periférica. Es importante resaltar los resultados obtenidos en líquido folicular por lo novedoso de la investigación, y por presentar una asociación significativa positiva o negativa pero más fuerte en comparación con el resto de determinaciones. La conclusión es que mientras los controles muestran un equilibrio entre activación y regulación inmunológica en los tres tejidos estudiados, las pacientes FIR expresan un perfil de activación exacerbada y una regulación insuficiente, especialmente en endometrio y líquido folicular, lo que sugiere un desequilibrio en los mecanismos inmunológicos que puede conllevar al fallo de implantación

El conocimiento de las causas asociadas al FRR, tanto en su forma de FIR o de AR, ha sido y es objetivo de múltiples trabajos científicos, y se ha desarrollado principalmente en endometrio y sangre periférica. Nuestro trabajo, orientado a la inflamación como causa del FRR, trató de identificar biomarcadores inmunológicos tipo NK y monocitos a nivel local y periférico, aunque centró su investigación en el líquido folicular, dada la escasez de estudios previos en este tejido. A continuación se resumen nuestros hallazgos y su comparativa con la literatura médica publicada hasta la fecha.

En el endometrio se halló un aumento de células NK citotóxicas totales y NKT con sobreexpresión de perforina en pacientes con FIR, cuya activación puede generar un microambiente hostil para la implantación tal y como ya se describió en trabajos previos de Cuadrado- Torroglosa et al., 2023(122); y Braun et al., 2023(123). Por otro lado, en pacientes fértiles se encontró un aumento significativo de las células NK reguladoras, lo

que sugiere un papel inmunomodulador, aunque estudios previos han presentado resultados variables por lo que, en línea con lo descrito por Von Woon et al., 2022, se necesita continuar investigando(83).

El análisis del líquido folicular representa la parte más innovadora de este trabajo, ya que hay muy pocos estudios de investigación sobre el microambiente inmunológico ovárico. A este nivel se pueden encontrar desequilibrios inmunitarios que interfieran en la maduración ovocitaria y, potencialmente, en la implantación. Nuestros hallazgos, comparados con los de los estudios previos, reafirman su relevancia en el éxito reproductivo. Así, en pacientes con FIR se determinó un aumento significativo de las células NKT activadas (con sobreexpresión de CD69 y perforina) similar al descrito por Krizan et al., 2009, lo que sugiere que una activación desregulada puede interferir en la maduración folicular(131). Por otro lado, en pacientes FIR se determinó un incremento significativo de las células NK reguladoras CD69+ cuya presencia en el líquido folicular sugiere una función moduladora hacia un entorno inmunitario local más equilibrado para una foliculogénesis exitosa y para la maduración del ovocito(133).

En cuanto al estudio del líquido folicular en mujeres fértiles (controles) se observó una expresión significativamente mayor de las células NK citotóxicas NKp30+ y de las NK reguladoras NKp30+ cuyos niveles, significativamente más altos, sugieren un microambiente inmunológicamente equilibrado. Hasta la publicación de este proyecto no se conocen trabajos de investigación específicos en líquido folicular.

Respecto al análisis de los biomarcadores significativos en sangre periférica caben destacar dos hallazgos significativos. Por un lado, la elevación de marcadores activadores como las células NKT con sobreexpresión de perforina en pacientes FIR, que confirman un perfil proinflamatorio sistémico que sigue la línea de los trabajos publicados previamente por Miko et al., 2010(136), que refiere cambios hacia Th1, es decir, hacia una acción proinflamatoria, en las células NK y las células NKT de mujeres con FIR.

En cuanto a las mujeres fértiles (controles) se determinó un aumento inesperado a priori de las células NK citotóxicas TIGIT+ y CD69+, hallazgo que podría reflejar un estado

inmunológico óptimo para la implantación. Según el trabajo de nuestro grupo, Comins-Boo et al., 2021(6) se observó un aumento de las células NK citotóxicas, en este caso TIGIT+, en la sangre de las pacientes con FIR. Además, estudios como el de Dons'koi et al., 2014, mostraron que tanto niveles elevados como reducidos de las células NK CD69+ se asocian con un mayor riesgo de fallo de implantación, en comparación con niveles moderados (30-60%), considerados óptimos(134). Publicado más recientemente destaca el trabajo de Salazar et al., 2022 que destaca la relevancia de la citotoxicidad de las células NK en la etiología del FIR(85).

La relevancia clínica de todos estos trabajos persigue, en última instancia, la integración de los biomarcadores en endometrio, líquido folicular y sangre periférica para caracterizar de una forma más precisa las alteraciones inmunológicas de las pacientes con FIR. El líquido folicular, en particular, se presenta como una herramienta prometedora para evaluar desequilibrios inmunitarios locales, aunque por el momento se requiere continuar con más estudios de investigación.

Desde la perspectiva terapéutica se aboga por la personalización de los tratamientos. Así, terapias inmunomoduladoras, como las revisadas por Genest et al., 2023(140), que incluyen corticosteroides, IVIg y tratamientos celulares pueden tener su lugar. Además, la innovación tecnológica con algoritmos diagnósticos basados en inteligencia artificial que integren datos clínicos y analíticos (locales y sistémicos), podrían transformar el manejo del FRR y mejorar las tasas de éxito de embarazo y RNVS.

Conclusiones.

Este estudio ha permitido identificar y caracterizar biomarcadores inmunofenotípicos asociados a células NK, monocitos y macrófagos mediante citometría de flujo multiparamétrica, analizando simultáneamente endometrio, líquido folicular y sangre periférica en pacientes con fallo reproductivo recurrente de posible origen inflamatorio y mujeres fértiles. El tamaño muestral para el grupo AR no fue suficiente para realizar análisis estadísticos significativos ni estudios de correlaciones.

En el análisis del endometrio, se observó un incremento de células NK citotóxicas y NKT con perforina en pacientes con FIR respecto a mujeres fértiles, lo que sugiere un ambiente proinflamatorio; mientras que las mujeres fértiles presentaron un predominio de células NK reguladoras, favoreciendo un entorno más propicio para la implantación. En el líquido folicular, los hallazgos son especialmente innovadores ya que prácticamente no existen estudios previos comparables. Se detectó un aumento significativo de células NKT activadas (CD69+ y con expresión de perforina) en pacientes con FIR, acompañado de un incremento de células NK reguladoras CD69+, lo que podría indicar un intento de compensación frente al estado inflamatorio. En los controles, se observó un equilibrio entre células NK citotóxicas NKp30+ y NK reguladoras NKp30+, reflejando un microambiente inmunológico más favorable.

En sangre periférica, las pacientes con FIR presentaron un incremento de células activadoras a través de las células NKT con expresión de perforina, mientras que las controles mostraron mayores niveles de células NK citotóxicas TIGIT+ y CD69+.

Las correlaciones más significativas se encontraron en el líquido folicular, destacando las relaciones entre subpoblaciones citotóxicas y reguladoras tanto en pacientes con FIR como en controles.

Estos hallazgos subrayan la importancia del perfil inmunológico en el manejo del FRR, destacando el líquido folicular como una herramienta novedosa y accesible para explorar biomarcadores, abriendo la posibilidad de desarrollar algoritmos diagnósticos que permitan tratamientos personalizados y mejoren los resultados reproductivos.

SUMMARY.

Introduction.

Recurrent reproductive failure (RRF), which manifests as two entities, recurrent miscarriage (RM) and recurrent implantation failure (RIF), represents a significant challenge in reproductive medicine, affecting 1-5% of couples of reproductive age(1).

RM is defined as the consecutive loss of two or more pregnancies, while RIF refers to the inability to achieve a pregnancy after the transfer of good-quality embryos in vitro fertilization (IVF) cycles. The etiology of these entities is multifactorial, encompassing genetic, immunological, anatomical, endocrine, hematological, and infectious causes; however, in approximately 50% of cases, the origin remains unknown(4).

The immune system, both innate and adaptive, plays a fundamental role in implantation and pregnancy development. Natural Killer (NK) cells, both uterine and peripheral, play a crucial role in pregnancy success. Uterine NK cells are the main mediators at the maternal-fetal interface, facilitating vascular remodeling and immunotolerance towards the embryo. However, inadequate activation may be associated with RM and RIF. Similarly, peripheral NK cells, although less directly involved, reflect systemic immunological imbalances that can influence the uterine microenvironment(3).

Despite advances in research, heterogeneity in the definition and management of RRF complicates the construction of pre-pathological profiles based on different immunological biomarkers. Consequently, the standardization of diagnostic and therapeutic strategies and their clinical implementation lacks consensus at the moment. For this reason, this work seeks to contribute to the understanding of RRF from a gynecological and immunological perspective, in order to propose approaches that optimize reproductive outcomes and, ultimately, pregnancy success.

Hypotheses and objectives.

This study seeks to deepen the knowledge and understanding of immunological biomarkers related to RRF, addressing inflammation as a possible cause.

The study is based on the null hypothesis that there are no immunological differences, either locally (ovary, uterus) or systemically (peripheral blood), between women with recurrent reproductive failure (RRF) and fertile women. In contrast, the alternative hypothesis posits that a subset of women with RRF presents a distinct immunological profile, characterized by specific pro-inflammatory biomarkers (NK cells, monocytes/macrophages), compared to the profile presented by healthy women with proven fertility.

The main objective of the project is to identify local (in the endometrium and follicular fluid) and systemic (in peripheral blood) immunological biomarkers related to RRF of immunological origin. These biomarkers are specific subpopulations of NK cells, monocytes, and macrophages.

One of the the secondary objectives is to perform a comparative analysis of the biomarkers in each tissue for the different populations (patients with RRF, RM, or RIF, and healthy controls) and to determine if there are statistically significant differences, as well as possible correlations among these biomarkers. Ultimately, the aim is to develop a diagnostic algorithm integrating the most relevant biomarkers to achieve a more precise and personalized management of patients with RRF.

Material and methods.

This project was carried out by the Gynecology and Immunology services of the Hospital Clínico San Carlos in Madrid, in collaboration with other external reproductive medicine centers, between 2019 and 2023.

It is a prospective observational case-control study on the possible inflammatory origin of recurrent reproductive failure. It includes 33 women: 13 controls (healthy women

with proven fertility) and 20 cases, 7 with recurrent miscarriage (RM) and 13 with recurrent implantation failure (RIF).

The foundations of the study is to determine the immunophenotype of the participating patients through the analysis of specific immunological markers: natural killers (NKs), monocytes, and macrophages, highlighting among others the following cell subpopulations: cytotoxic, regulatory, and NKT NKs (TIGIT+, CD69+, NKp30+, Perforin+, and TIM3+), as well as different types of monocytes (classical, intermediate, and non-classical) and myeloid-derived suppressor cells (MDSC-).

Samples come from the endometrium, follicular fluid, and peripheral blood of the participating patients in the context of an IVF treatment and are analyzed fresh using multiparametric flow cytometry following standardized protocols to ensure the validity of the results.

Statistical analysis included frequency descriptions for qualitative variables and robust measures for quantitative data with non-normal distribution, as well as a significance analysis for group comparisons (using the Mann-Whitney test) and the evaluation of correlations among variables using Spearman's coefficient. Data processing was performed with IBM SPSS Statistics v26 software.

Results.

The results of this study are divided into three sections: the descriptive analysis, the significance analysis between groups, and the correlation analysis between variables.

Regarding the descriptive analysis, it was applied to the entire study population, totaling 33 patients, of whom 13 were women with proven fertility ("controls") and 20 were "cases" (13 RIF and 7 RM). Variables were described both jointly and by study groups. The mean age was 24.53 years for controls, 37.9 years for RIF, and 39.14 years for RM. Among the participants, 81.8% were Caucasian, 78.1% had a normal BMI, and 87.5% had a normal karyotype. Notably, RM and RIF patients had more gynecological history such as endometriosis. Alcohol and tobacco consumption were low in this population.

According to our results, 3.1% of participants presented an altered karyotype, a finding consistent with the literature.

Regarding the significance analysis, it was performed only between women with proven fertility and RIF patients. This decision was made because, although the necessary number of RM patients was initially recruited, several ultimately declined participation due to the incompatibility between the required endometrial biopsy and fresh embryo transfer.

The variables analyzed included different subpopulations of natural killer (NK) cells with activating or regulatory profiles, as well as monocytes, in endometrial, follicular fluid, and blood samples.

The significance analysis calculated using the Mann-Whitney U test yielded the following results for significant biomarkers:

In the endometrium of RIF patients, there was a greater presence of total cytotoxic NK cells, CD69-expressing cytotoxic NK cells, and perforin-overexpressing NKT cells compared to controls, which may indicate higher cytotoxic activity and a less favorable endometrial microenvironment for implantation. Conversely, a higher presence of regulatory NK cells was observed in the endometrium of fertile women, suggesting better immunosuppressive mechanisms.

In follicular fluid from RIF patients, there was a greater presence of CD69-expressing and perforin-overexpressing NKT cells, both associated with cell activation and inflammation, as well as an increase in CD69-expressing regulatory NK cells. In controls, higher levels of NKp30+ cytotoxic NK cells and NKp30+ regulatory NK cells were observed.

Finally, in peripheral blood, there was a greater presence of perforin-positive NKT cells in RIF patients, suggesting higher cytotoxic activity. In controls, higher expression of TIGIT-positive and CD69-positive cytotoxic NK cells was observed, potentially reflecting better regulation of the systemic immune response.

Regarding the correlation analysis, it was applied to significant immunological biomarkers for RIF patients and healthy controls in the endometrium, follicular fluid, and peripheral blood. The results in follicular fluid stand out due to the novelty of the investigation and the stronger positive or negative associations compared to other determinations. The conclusion is that while controls showed a balance between immune activation and regulation in all three tissues, RIF patients exhibited an exacerbated activation profile and insufficient regulation, particularly in the endometrium and follicular fluid, suggesting an imbalance in immune mechanisms that may lead to implantation failure.

Discussion.

Understanding the causes associated with RRF, both in its RIF and RM forms, has been and remains the objective of multiple scientific studies, primarily focusing on the endometrium and peripheral blood. Our work, oriented towards inflammation as a cause of RRF, sought to identify NK-type and monocyte immunological biomarkers at both local and systemic levels, although it focused its investigation on follicular fluid due to the scarcity of prior studies in this tissue. The following is a summary of our findings and their comparison with the medical literature published to date.

In the endometrium, an increase in total cytotoxic NK cells and perforin-overexpressing NKT cells was found in RIF patients, whose activation may create a hostile microenvironment for implantation, as previously described in studies by Cuadrado-Torroglosa et al., 2023(122), and Braun et al., 2023(123). Conversely, in fertile patients, a significant increase in regulatory NK cells was found, suggesting an immunomodulatory role, although previous studies have presented variable results. Consistent with the findings of Von Woon et al., 2022(83), further research is needed.

The analysis of follicular fluid represents the most innovative aspect of this work, as there are very few studies on the ovarian immunological microenvironment. At this level, immunological imbalances can interfere with oocyte maturation and potentially

implantation. Our findings, compared to previous studies, reaffirm its relevance in reproductive success. In RIF patients, there was a significant increase in activated NKT cells (CD69 and perforin overexpression), similar to that described by Krizan et al., 2009(131), suggesting that dysregulated activation may interfere with follicular maturation. Additionally, in RIF patients, there was a significant increase in CD69+ regulatory NK cells, whose presence in follicular fluid suggests a modulatory function towards a more balanced local immune environment conducive to successful folliculogenesis and oocyte maturation.

In follicular fluid from fertile women (controls), there was a significantly higher expression of NKp30+ cytotoxic NK cells and NKp30+ regulatory NK cells, whose significantly higher levels suggest an immunologically balanced microenvironment. Until the publication of this project, no specific research on follicular fluid has been known.

In terms of the analysis of significant biomarkers in peripheral blood, two noteworthy findings stand out. First, the elevation of activating markers, such as perforin-overexpressing NKT cells, in RIF patients confirms a systemic pro-inflammatory profile. This aligns with previously published work by Miko et al., 2010(136), which reported a shift toward a Th1 pro-inflammatory response in NK and NKT cells in women with RIF.

For fertile women (controls), an unexpected increase in TIGIT+ and CD69+ cytotoxic NK cells was determined. This finding may reflect an optimal immunological state for implantation. According to a study by our group, Comins-Boo et al., 2021(6), an increase in cytotoxic NK cells, in this case TIGIT+, was observed in the blood of RIF patients. Moreover, studies such as Dons'koi et al., 2014(134), showed that both elevated and reduced levels of CD69+ NK cells are associated with a higher risk of implantation failure compared to moderate levels (30-60%), which are considered optimal. Recently published research by Salazar et al., 2022(85), further underscores the importance of NK cell cytotoxicity in the etiology of RIF.

The clinical relevance of all these studies ultimately aims to integrate biomarkers from the endometrium, follicular fluid, and peripheral blood to more accurately characterize the immunological alterations in RIF patients. Follicular fluid, in particular, emerges as a

promising tool for evaluating local immune imbalances, though further research is required to substantiate its utility.

From a therapeutic perspective, personalized treatments are advocated. Immunomodulatory therapies, as reviewed by Genest et al., 2023(140), including corticosteroids, intravenous immunoglobulins (IVIg), and cell-based treatments, may have a role. Additionally, diagnostic algorithms leveraging technological innovation, such as artificial intelligence, could integrate clinical and analytical data (local and systemic) to transform the management of RRF, improving pregnancy and live birth rates.

Conclusions.

This study has enabled the identification and characterization of immunophenotypic biomarkers associated with NK cells, monocytes, and macrophages through multiparametric flow cytometry, analyzing endometrium, follicular fluid, and peripheral blood simultaneously in patients with recurrent reproductive failure of potential inflammatory origin and in fertile women. The sample size for the RM group was insufficient to perform statistically significant analyses or correlation studies.

In the endometrial analysis, an increase in cytotoxic NK cells and perforin-expressing NKT cells was observed in RIF patients compared to fertile women, suggesting a pro-inflammatory environment. Conversely, fertile women exhibited a predominance of regulatory NK cells, which promotes a more favorable environment for implantation.

In follicular fluid, the findings are particularly innovative as there are practically no comparable prior studies. A significant increase in activated NKT cells (CD69+ and perforin-expressing) was detected in RIF patients, along with an increase in CD69+ regulatory NK cells, potentially indicating a compensatory response to the inflammatory state. In controls, a balance between NKp30+ cytotoxic NK cells and NKp30+ regulatory NK cells was observed, reflecting a more favorable immunological microenvironment.

In peripheral blood, RIF patients demonstrated an increase in activating markers via perforin-expressing NKT cells, while controls showed higher levels of TIGIT+ and CD69+ cytotoxic NK cells.

The most significant correlations were found in follicular fluid, highlighting relationships between cytotoxic and regulatory subpopulations in both RIF patients and controls.

These findings underscore the importance of the immunological profile in managing RRF, highlighting follicular fluid as a novel and accessible tool for exploring biomarkers. This opens the possibility of developing diagnostic algorithms to enable personalized treatments and improve reproductive outcomes.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN.

El fallo reproductivo recurrente (FRR), bien en su forma de aborto de repetición (AR) o en su forma de fallo de implantación recurrente (FIR) ha sido siempre un tema inquietante para mí, tanto desde mi perspectiva personal como profesional.

Como ginecóloga especialista en Reproducción Asistida es un tema de difícil abordaje en la consulta ya que no hay una definición única y exacta, y además, en casi un 50% de las pacientes que lo padecen no llegamos a saber la causa. En consecuencia, no podemos plantear una solución específica y perfecta, hecho que genera malestar en nuestro quehacer como médicos, y además, cierto sentimiento de culpabilidad o pena hacia las pacientes, ya que uno mismo es absolutamente consciente del sufrimiento por el que está pasando esa persona o pareja.

Por este motivo, cuando me propusieron participar en este proyecto de investigación que se desarrollaría de manera conjunta por los Servicios de Ginecología e Inmunología del Hospital Clínico San Carlos, no dudé ni un minuto en embarcarme.

Todos los profesionales de la reproducción sabemos que la perspectiva de la inflamación como causa del fallo reproductivo recurrente es controvertida, hay adeptos y hay escépticos, pero sobre todo hay que investigar si realmente subyace alguna alteración inmunológica que justifique la patología, y en caso de que la haya, ponerle nombre y apellidos y darle un valor de gravedad clínico.

Este trabajo, que profundiza en el estudio de distintas poblaciones celulares (natural killers, monocitos, etc.), que llamaremos habitualmente marcadores inmunológicos o biomarcadores, persigue el objetivo de construir con ellos un algoritmo diagnóstico sencillo que aplicar en el futuro a pacientes con FRR, facilitar su manejo e indicar la mejor opción terapéutica para conseguir el embarazo exitoso.

ESTADO ACTUAL DEL TEMA

3. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

3.1 VISIÓN GENERAL DEL FALLO REPRODUCTIVO RECURRENTE.

Según datos de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), entre el 15% y el 17% de las parejas en edad reproductiva en España experimentan problemas de fertilidad lo que equivale a unas 800.000 parejas españolas(1). De hecho, cada vez son más las personas que presentan dificultades para conseguir la gestación, o que, consiguiéndolo reiteradamente, nunca llegan a tener un recién nacido vivo (RNV). Estas situaciones, denominadas comúnmente fallo reproductivo recurrente (FRR), son un grupo heterogéneo de patologías que constituyen un reto importante para las unidades de medicina reproductiva. Se estima que aproximadamente entre el 1% y el 5% de las mujeres en edad fértil presentan abortos espontáneos recurrentes, definidos clásicamente como la pérdida consecutiva de tres o más embarazos clínicamente reconocidos(2). Y alrededor del 10% de las parejas que se someten a tratamientos de fecundación in vitro (FIV) presentan fallo de implantación recurrente, es decir, la imposibilidad de conseguir la implantación de embriones de buena calidad tras varias transferencias, a pesar de unas condiciones óptimas de receptividad endometrial(3). En algunos estudios, la cifra asciende a un 10% según ciertos contextos clínicos, particularmente cuando se incluyen pérdidas gestacionales subclínicas (simplemente con un test de embarazo positivo) o tempranas detectadas mediante ecografía antes de que el embrión sea visible. Otra forma de explicar su incidencia es a través del total de embarazos, afectando al 0,4 al 1% de todas las gestaciones(4).

Su etiología es muy variada. Según un trabajo publicado en 2016 por Mateo Sáñez et al(4), las causas de FRR se podrían distribuir de la siguiente manera: en el 47% de las parejas su etiología sería desconocida; un 18%, de origen inmunológicas, predominando el Síndrome antifosfolípido, 14%, endocrina; en un 13%, anatómica; en un 5%, genética y en un 3%, infecciosa.

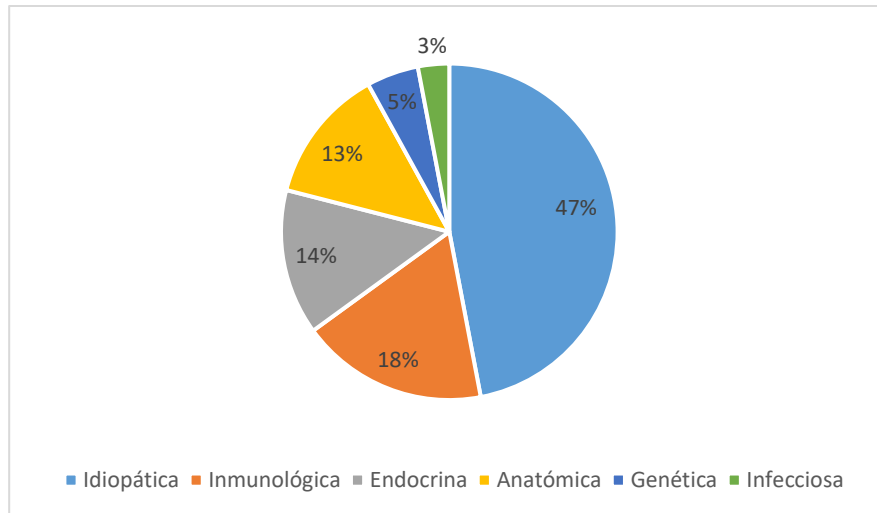


Figura 1. Principales causas de pérdida recurrente del embarazo (2016)(4).

Datos obtenidos de *Pérdida recurrente del embarazo. Revisión bibliográfica. Mateo-Sáñez HA.*

Los abortos recurrentes suelen ser de origen multifactorial, con causas que incluyen las alteraciones genéticas, inmunológicas, endocrinas y anatómicas. En aproximadamente el 50% de los casos, la etiología permanece sin explicación, lo que complica el diagnóstico y tratamiento de estos pacientes.

A pesar de los avances en medicina reproductiva, la falta de consenso en la definición y en el diagnóstico, ha dificultado la estandarización de los tratamientos, por lo que la identificación personalizada de las causas subyacentes podría mejorar significativamente las tasas de éxito en estas pacientes, mediante intervenciones específicas, como la selección genética de los embriones y la modulación inmunológica.

Dado que la incidencia de estos trastornos es alta y afecta considerablemente, tanto a la salud física como psicológica de estas pacientes, es muy importante continuar investigando. Con ese objetivo se desarrolla este trabajo, para profundizar en el conocimiento de la inmunología reproductiva, un campo que podría explicar algunos casos del FRR y contribuir a mejorar la comprensión de la etiología y optimizar las estrategias terapéuticas en las pacientes con abortos de repetición (AR) y fallos de implantación repetidos (FIR), de posible de origen inflamatorio.

3.2 APROXIMACIÓN A LA INMUNOLOGÍA REPRODUCTIVA.

La inmunidad se clasifica en dos tipos principales: innata y adquirida, ambas desempeñan papeles cruciales en la protección del organismo y están implicadas en las respuestas inmunitarias que pueden influir en el FRR.

- La **inmunidad innata** representa la primera línea de defensa y actúa de forma inmediata tras la exposición a patógenos. Es inespecífica, es decir, no distingue entre diferentes tipos de agentes patógenos. Incluye barreras físicas (piel, mucosas), células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos), células NK (Natural Killer), y moléculas solubles como las citoquinas y el sistema del complemento. Así por ejemplo, en el contexto de AR, la disfunción en componentes innatos como las células NK uterinas podría estar relacionada con fallos en la tolerancia inmunológica durante la implantación embrionaria.
- La **inmunidad adquirida o adaptativa** es más específica y se desarrolla tras la exposición a un patógeno o antígeno. Implica la activación de linfocitos T y B, que generan una memoria inmunológica.

Por otro lado, debemos conocer dos conceptos:

- La **autoinmunidad**, es un proceso patológico en el cual el sistema inmunológico a través de su mecanismo de inmunidad adquirida o adaptativa reconoce como extraños sus propios tejidos y genera autoanticuerpos y los ataca erróneamente. En el contexto de la salud reproductiva, se asocia con trastornos como el aborto de repetición y el fallo de implantación recurrente. Las enfermedades autoinmunes pueden interferir con la implantación del embrión o el desarrollo temprano del embarazo al generar una respuesta inmunológica inapropiada contra componentes del tejido placentario o embrionario/ fetal.
- La **aloinmunidad** se caracteriza porque el sistema inmunitario de la madre, que debería desarrollar mecanismos de tolerancia hacia el feto, reconoce como

extraños los antígenos paternos, pudiendo derivar en un rechazo hacia el embrión/feto.

Ambos tipos de inmunidad están interconectados y su desregulación puede contribuir a diferentes patologías. Según la guía de la ESHRE sobre AR de 2017 destacan los siguientes factores inmunológicos(5):

- Monocitos y Macrófagos: implicados en ambos tipos de inmunidad.
- HLA y células NK están principalmente relacionados con la inmunidad autoinmune.

El sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*) es un conjunto de genes altamente polimórficos ubicados en el cromosoma 6 que codifican moléculas responsables de la presentación de antígenos a las células del sistema inmunológico, desempeñando un papel clave en la diferenciación entre lo propio y lo ajeno. Estas moléculas son esenciales para la regulación de la respuesta inmune adaptativa y están implicadas en la tolerancia inmunológica, particularmente en el contexto del embarazo, donde facilitan la interacción materno-fetal. Por otro lado, las células NK (*natural killer*) son linfocitos del sistema inmune innato que, mediante receptores activadores e inhibidores, reconocen células alteradas o extrañas. Desempeñan un papel crucial en la vigilancia inmunológica y en la remodelación de las arterias uterinas durante la implantación embrionaria. La interacción entre el sistema HLA, concretamente el HLA-C, y las células NK uterinas es fundamental para establecer un ambiente de inmunotolerancia que favorezca el embarazo.

- Las citocinas pueden actuar en ambos tipos de inmunidad, según el contexto.
- Los ANA son característicos de la inmunidad autoinmune.

Dado que no hay un tratamiento consensuado de los abortos de repetición, es un campo de investigación creciente. Como se reconoce en la literatura, una de las causas más

plausible de los AR es la *inflamatoria*, hablando así de *fallo reproductivo o gestacional recurrente de origen inflamatorio (iFRR o iFGR)*.

Clásicamente se ha aceptado que la gestante presenta un estado de inmunotolerancia (o estado anti-inflamatorio) en el que la placenta desempeña un papel activo en la inmunosupresión de la respuesta inmune materna.

De manera general, en el embarazo normal, existe un predominio de citoquinas de diferenciación *Th2/Treguladoras (Treg)* antiinflamatorias. Sin embargo, durante un breve período de la implantación del embrión es necesario cierto grado de inflamación, con predominio de citoquinas *Th1*, que se sigue de una expansión de células Treguladoras, especializadas en el control de la inmunidad celular de la madre hacia el tejido trofoblástico (embrionario). La inmunidad innata desempeña un papel esencial en el éxito gestacional. *De hecho, las células natural killers (NK) y los macrófagos constituyen el 90% de las células inmunitarias maternas en la interfase materno-fetal.*

Durante la gestación normal, salvo en un período muy concreto y limitado que corresponde a la implantación, existe un elevado número de macrófagos en la interfase materno-fetal con funciones antiinflamatorias, que favorecen la remodelación del estroma uterino, la regulación de la implantación del trofoblasto y la inmunotolerancia frente a los antígenos fetales. Más adelante, al final del embarazo, también participarán en el inicio del trabajo del parto. Por su parte, a nivel de la sangre materna los monocitos se encuentran activados, con elevación en la expresión de moléculas de adhesión en su superficie, metabolismo oxidativo y fagocitosis.

Numerosos estudios han descrito la asociación de expansiones de células NK citotóxicas en sangre o endometrio con el iFRR, marcador inespecífico en muchas ocasiones en el contexto de una enfermedad autoinmune subyacente(6)

Es aquellas pacientes con FRR sin filiar en las que se han descrito distintas alteraciones inmunológicas, como *aloimmunes*, en relación con la compatibilidad de la pareja respecto al HLA-C y a ciertas combinaciones del HLA-C del feto con la expresión de ligandos de células NK (KIR) de la madre, como un factor de mal pronóstico gestacional; como alteraciones de *la inmunidad celular*, asociado a

expansión de células natural killers (NK) en sangre y en endometrio como un factor de riesgo de iFRR; además de un *desequilibrio de citoquinas* con predominio de Th1/Th17 proinflamatorio frente al perfil Th2/Treg de la gestación natural.

En los últimos años, se han desarrollado biomarcadores individuales, como la expansión de células NK, cocientes de citoquinas Th1/Th2, o bien la actividad citotóxica in vitro de las células NK(7), que son útiles pero no reflejan el estado global de riesgo de iFRR. *Tampoco existen adecuados estudios que analicen el papel de los monocitos/macrófagos en el iFRR*, a pesar de ser células clave en los procesos inflamatorios y de su elevada presencia en sangre y en endometrio.

En conclusión, a día de hoy no existe un algoritmo diagnóstico específico que aplicar a las pacientes o parejas con perfil de iFRR, lo cual sería fundamental para el abordaje terapéutico en una próxima gestación y prevenir un nuevo fracaso reproductivo.

3.3 ABORTOS DE REPETICIÓN.

3.3.1 Definición y epidemiología.

Clásicamente se definía AR como la presencia de tres o más abortos, siendo la incidencia entre el 1-2% de las parejas en edad fértil. En el momento actual se contempla el aborto de repetición a partir de dos pérdidas gestacionales, y la incidencia aumenta a un 4-5% de parejas(8). La realidad es que no existe unanimidad entre los especialistas, ya que hay definiciones basadas únicamente en el concepto numérico; otras basadas en el concepto clínico (diagnóstico ecográfico y/o histopatológico), o incluso algunas basadas en la bioquímica (un test positivo de embarazo en sangre u orina). Así, las principales sociedades de Medicina Reproductiva publican diversos protocolos y revisiones: la *Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM)* redactó en 2012 un protocolo sobre pérdida gestacional recurrente(9) que posteriormente modificó en 2020 con una nueva definición de pérdida gestacional recurrente, contemplándola como una enfermedad distinta de la infertilidad, caracterizada por la pérdida espontánea de *dos o*

más embarazos, recomendando estudiar a la paciente/pareja a partir de esa cifra e insistiendo en que cada aborto precisa una evaluación específica de cara a futuras actitudes(10). La *Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE)* elaboró la “*Guía clínica para pérdida gestacional recurrente*”(5) publicada en 2017 y actualizada en 2022. En nuestro país contamos con la Sociedad española de Fertilidad (SEF) como referente, destacando el grupo de Trabajo de Fracaso Reproductivo que publicó recomendaciones para el manejo de aborto de repetición en 2019(11).

En 2017 la *European Society of Human Reproduction (ESHRE)* modificó su protocolo sobre pérdida gestacional recurrente (PGR) y define el AR como la interrupción de dos o más embarazos clínicos, conseguidos espontáneamente o mediante TRAs, excluyendo embarazos ectópicos, gestaciones molares y el propio fallo de implantación. Esas dos o más pérdidas gestacionales pueden ser consecutivas o no(5).

A su vez, establece el concepto de pérdida gestacional recurrente primaria, cuando no ha ocurrido una gestación viable previamente, o secundaria, cuando sí ha habido otra/s gestación/es evolutivas más allá de las 24 semanas. El pronóstico para un embarazo exitoso es mejor en los casos de AR secundario(12).

Además, también aclara que no hay más riesgo de AR si las pérdidas previas fueron consecutivas, o si hubo tres o dos pérdidas anteriores; tampoco es más probable que los progenitores presenten alteraciones cromosómicas si hubo dos o tres abortos consecutivos frente a no consecutivos, y por último, la presencia de AR previos impacta en el pronóstico de un nuevo aborto.

El *Grupo de Trabajo en Fracaso Reproductivo de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF)* publicó en 2019 una guía de Recomendaciones para el manejo de AR, definiéndolo en dos o más gestaciones clínicas interrumpidas involuntariamente por debajo de las 22 semanas(11).

En cuanto a la prevalencia, si se utiliza la definición clásica de tres o más abortos, se recoge una incidencia en la población general del 1-2% de las parejas en edad fértil, mientras que, si se utiliza la definición más actual, en dos o más AR, la incidencia aumenta a un 4-5%(12).

Teniendo en cuenta que la probabilidad de que una pareja joven y sana presente un nuevo aborto tras haber tenido dos abortos previos es de un 24-30%, y de un 30-33% en el caso de haber presentado tres abortos, dada la escasa diferencia porcentual, la recomendación es iniciar los estudios complementarios tras dos abortos. Respecto a si las pérdidas son consecutivas o no, sólo el 1-2% de las mujeres embarazadas experimentan dos pérdidas de embarazo seguidas, y entre el 0,4-1%, tres(5).

3.3.2 Impacto psicológico.

El aborto de repetición presenta un gran impacto emocional en las mujeres y también en sus parejas, ya que para ellos supone la pérdida de un posible futuro hijo y de la posibilidad de convertirse en familia, siendo frecuentes los sentimientos de duelo y fracaso personal tras la pérdida. Hay pacientes/parejas que cesan en la búsqueda del embarazo, pero en las que siguen intentándolo, la ansiedad sobre una nueva gestación puede ser mayor. Es deseable conocer en la medida de lo posible las causas que ocasionaron la pérdida previa y realizar pruebas/ tratamientos de cara a evitar su recurrencia(13).

3.3.3 Principales factores de riesgo.

- Edad.
- Factores relacionados con el estilo de vida: estrés, ocupación, hábitos de salud.

EDAD.

El aumento de la edad femenina es un factor de riesgo ampliamente conocido en la disminución de la fertilidad debido al detrimento de la función ovárica y a la presencia de alteraciones cromosómicas en los ovocitos, lo cual puede derivar en anomalías en el embrión y/o en el feto, además de asociarse a un aumento de la morbilidad/mortalidad obstétrica. Se conoce que el riesgo de aborto es más bajo entre los 20 y los 35 años donde se sitúa entre el 10-13%(14). Para mujeres de más de 40 años está por encima del 60%, y en mujeres de 45 años, por encima del 80%(15,16).

Un estudio de cohortes retrospectivo concluyó que la edad de la mujer por encima de 35 años era el único factor predictivo estadísticamente significativo del riesgo de anomalías cromosómicas en la pérdida gestacional esporádica y recurrente(17).

FACTORES RELACIONADOS CON EL ESTILO DE VIDA.

Estrés.

Algunos estudios de poca calidad sugieren la relación entre el estrés materno y los resultados adversos en el embarazo y el parto. No está claro el impacto del estrés en el riesgo de aborto espontáneo o AR(18).

Factores ambientales.

Hay pocos estudios. La exposición a factores ambientales y ocupacionales (metales pesados, pesticidas, etc.) parece asociarse con un mayor riesgo de pérdida gestacional en mujeres con AR, pero no hay datos suficientes para recomendar la protección contra un determinado factor ambiental en mujeres con AR(19).

Hábitos de salud: peso, tabaquismo, alcohol, cafeína, ejercicio.

- Peso.

La obesidad, definida por un Índice de masa corporal (IMC) mayor a 30 kg/m², tiene un impacto significativo en la salud reproductiva femenina. A mayor IMC menor fertilidad, más abortos y peores resultados en los TRA(20). Una revisión sistemática informó de una mayor prevalencia de AR en mujeres obesas en comparación con mujeres con IMC normal(21).

- Tabaco, alcohol, cafeína.

El tabaquismo y el alcoholismo están estrechamente relacionados con resultados obstétricos y perinatales adversos pero su impacto en el AR es menos conocido. Así, en un estudio en el que se revisó el consumo femenino de tabaco, cafeína y alcohol, no se pudo relacionar un aumento de riesgo de AR para dichos factores(5).

- **Ejercicio.**

Se recomienda el ejercicio durante el embarazo ya que se considera beneficioso para la mujer, pero los datos para el aborto espontáneo no son tan claros, y no se dispone de estudios para AR(22).

3.3.4 Investigación de posibles factores causales y diagnóstico.

a. Factor inmunológico.

b. Otros factores: genético, hematológico, endocrino, anatómico e infeccioso.

Se han propuesto múltiples causas de AR, algunas demostradas a través de la medicina basada en la evidencia (MBE), pero en la mayoría de los casos no han podido ser ratificadas a través de estudios o están siendo investigadas en el momento actual. *En principio, sólo los factores genéticos y el síndrome antifosfolípido han sido adecuadamente demostrados.*

En cualquier caso, la evaluación de todos estos factores se sigue incluyendo para construir una mejor aproximación diagnóstica en las pacientes con AR.

A continuación, se explican con más detalle los posibles factores causales del AR.

a. Factor inmunológico.

El campo de la inmunología en la reproducción asistida y el embarazo está en continua investigación, y aunque en algunas parcelas la evidencia científica aún es contradictoria, son muchos los estudios aleatorizados y los ensayos clínicos en curso para tratar de demostrar la validez de las pruebas diagnósticas y de las terapias propuestas.

Así, la disfunción en la inmunidad innata y/o en la adaptativa que juegan un papel fundamental en la implantación y el mantenimiento del embarazo, provoca la aparición de situaciones patológicas como el AR. Dentro de las causas inmunológicas de AR se distinguen alteraciones autoinmunes y aloinmunes que a continuación se detallan.

Autoinmunidad.

El síndrome antifosfolípido (SAF) es la causa inmunológica autoinmune mejor caracterizada asociada a AR. Se trata de una enfermedad sistémica definida por la existencia de trombosis y morbilidad durante el embarazo, y se debe a la presencia de anticuerpos (Ac) antifosfolípidos (AFL), como los Ac anticardiolipina (ACA), los Ac antibeta-2-glicoproteína I (A β 2I) y el anticoagulante lúpico (AL). Durante la gestación estos anticuerpos favorecen un estado procoagulante que conduce a la trombosis placentaria, afectando el desarrollo adecuado del feto y provocando abortos espontáneos recurrentes o complicaciones obstétricas como preeclampsia o crecimiento intrauterino restringido(5,23).

Las guías recientes recomiendan el uso de anticoagulación con heparina de bajo peso molecular (HBPM) y aspirina en gestantes con SAF confirmado, lo cual ha demostrado mejorar las tasas de RNV(23).

Alloinmunidad.

El sistema inmunitario de la madre debe desarrollar tolerancia hacia el feto, el cual expresa antígenos paternos extraños. Sin embargo, el fallo en los mecanismos de tolerancia inmunológica puede derivar en un rechazo hacia el embrión/feto.

Uno de los modelos más estudiados es el papel de las células NK uterinas (uNK), las cuales regulan la invasión trofoblástica y la vascularización en el sitio de implantación. La activación aberrante o el aumento de la citotoxicidad de las células NK se ha relacionado con abortos recurrentes, aunque su papel exacto aún es objeto de debate(24).

La influencia de las células NK en sangre periférica y en el endometrio sigue siendo controvertida y las terapias basadas en la modulación de células NK, como el uso de inmunoglobulina intravenosa (IgIV) o esteroides, no han demostrado consistentemente una mejoría en los resultados

Según la guía de la ESHRE sobre AR destacan los siguientes factores inmunológicos(5).

- HLA y células NK están principalmente relacionados con la **inmunidad aloinmune**.
- Las citocinas pueden actuar en **ambos tipos de inmunidad**, según el contexto.
- Los ANA son característicos de la **inmunidad autoinmune**(6).

Compatibilidad HLA (HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos):

El HLA juega un papel central en la inmunidad aloinmune, reconociendo lo extraño, como sucede en el embarazo, donde el sistema inmune reconoce el feto como un semi-aloinjerto. Esta función de tolerancia es fundamental durante la implantación y el mantenimiento del embarazo, y su desregulación puede llevar a rechazo fetal y abortos de repetición.

Los alelos HLA de clase II, expresados principalmente en células presentadoras de antígenos, pueden influir en el reconocimiento y la tolerancia inmunológica durante el embarazo. Las moléculas HLA-C y HLA-G, en particular, son de interés debido a su expresión en el trofoblasto, interfiriendo en la interacción materno-fetal. HLA-G, una molécula no clásica, se asocia con el mantenimiento de la tolerancia inmunológica en el embarazo, y sus isoformas solubles y ligadas a membrana participan en la modulación de la citotoxicidad de las células NK (Natural Killer). Los niveles bajos de HLA-G se han relacionado con complicaciones como abortos recurrentes, preeclampsia e infecciones intrauterinas.

Las investigaciones en torno a la compatibilidad HLA entre parejas con AR han arrojado resultados mixtos. Un meta-análisis encontró que la compartición de alelos HLA-A, B y C entre parejas con AR no presentaba diferencias significativas en comparación con parejas sin AR. Sin embargo, estudios recientes sugieren una posible relación entre ciertos alelos HLA, como HLA-DRB1*03, y un mayor riesgo de abortos en mujeres con múltiples pérdidas gestacionales. En mujeres con AR secundario, el nacimiento previo

de un varón y la presencia de alelos HLA de clase II restrictivos parecen estar asociados con un peor pronóstico en embarazos posteriores, sugiriendo una respuesta inmunitaria específica que contribuye a la pérdida gestacional(5).

Anticuerpos anti-HLA (Ac antiHLA).

Según diferentes estudios, los anticuerpos anti-HLA de clase I o II se detectan con una frecuencia significativamente mayor en mujeres multíparas respecto a mujeres con AR, y curiosamente, las mujeres con AR de causa conocida presentaban niveles similares de Ac antiHLA respecto a las de origen desconocido(25).

Otro estudio informó que las gestantes con antecedente de AR que tenían Ac antiHLA positivos presentaban una tasa menor de RNV respecto a las que no tenían dichos Ac(26).

En conclusión, no hay suficiente evidencia científica sobre la determinación de los Ac antiHLA en el cribado de mujeres con AR(5).

Citocinas.

Las citocinas son moléculas reguladoras tanto a nivel autoinmune como aloinmune y tienen una función crucial en el embarazo. La investigación sobre su papel en los abortos de repetición (AR) ha revelado un predominio de citocinas proinflamatorias en lugar de antiinflamatorias (predominio de la respuesta Th1 en lugar de la Th2, como ocurre en el embarazo de curso normal).

Así, se han identificado citocinas antiinflamatorias como la interleucina-10 (IL-10) y la interleucina-4 (IL-4) y proinflamatorias, como el IFN γ y el TNF- α , que predominan en la interfaz materno-fetal y generan un ambiente hostil que deriva en el rechazo del embrión y en el posible aborto de repetición. Además, es un marcador de inflamación sistémica, observándose niveles plasmáticos elevados de TNF- α y una mayor proporción de células Th1 productoras de TNF- α en sangre periférica de mujeres con una mayor incidencia de abortos espontáneos, especialmente de aquellos euploides(27).

Además, las mujeres con AR secundario presentan niveles significativamente más altos de TNF- α al inicio del embarazo en comparación con mujeres con AR primario(28).

Otros estudios encontraron un porcentaje significativamente mayor de células Th1 que expresan TNF- α intracelular en linfocitos de sangre periférica y una relación TNF- α /IL10 Th significativamente mayor en pacientes con AR en comparación con controles(29).

Por ello, debido a la variabilidad en los resultados de los estudios que examinan citocinas en diferentes momentos del embarazo y a la influencia de polimorfismos genéticos, no se recomienda el uso rutinario de pruebas de citocinas ni de polimorfismos en la práctica clínica para pacientes con AR(5).

Anticuerpos antinucleares (ANA)

Los ANA están dirigidos contra componentes del núcleo celular propio y son reguladores de la inmunidad y las enfermedades autoinmunes. Su presencia en mujeres con AR indica una respuesta autoinmune que afecta negativamente el desarrollo del embarazo y puede favorecer la pérdida gestacional.

Varios estudios, aunque antiguos, han analizado la relación entre la positividad de ANA en AR respecto a controles sanos(30). Incluso algún estudio informó que la positividad de ANA fue más prevalente en mujeres con AR y un nuevo aborto espontáneo respecto a las que tuvieron un RNV(31).

En el momento actual la relación fisiopatológica entre los ANA y los AR no está completamente establecida, y algunos estudios no han encontrado una correlación significativa. Se ha propuesto que el alelo HLA-DRB1*03, uno de los orígenes de las síntesis de ANAs, podría estar involucrado en esta predisposición(32).

Células natural killer (NK)

Los estudios sobre las células NK en la pérdida gestacional recurrente se pueden hacer mediante análisis de citometría de flujo o pruebas de citotoxicidad de linfocitos NK en sangre periférica antes o durante el embarazo, y estudios de células NK en biopsias de

endometrio previas al embarazo o restos de tejido decidual de embarazos interrumpidos.

- **Células NK en sangre periférica**

Son varios los estudios realizados entre 1995 y 2013, amplios y de buena calidad, que demostraron que el porcentaje de células NK CD56+ en sangre periférica antes del embarazo es significativamente mayor en mujeres con AR.

El estudio de Chao et al., 1995 considera que las células NK periféricas pueden estar vinculadas a desbalances inmunológicos asociados al embarazo, pero no pone el foco en ellas ya que considera que las NK uterinas desempeñan un papel más directo en el microambiente uterino y en el éxito o fracaso del embarazo(33).

Carbone et al., 2009 publicaron un trabajo sobre pérdida gestacional recurrente donde destaca que la hiperactividad de las células NK periféricas en pacientes con síndrome antifosfolípido puede exacerbar la disfunción inmunológica y vascular, aumentando el riesgo de pérdida del embarazo(34).

También destaca el estudio de Lee et al., 2013 según el cual las células NK periféricas no actúan directamente sobre el trofoblasto, pero en mujeres con AR se determinaron niveles más altos de NK periféricas con actividad citotóxica anormal, que reflejan una actividad inmunológica sistémica que afecta al microambiente uterino, lo cual puede asociarse a mayor riesgo de aborto espontáneo o recurrente. Así, las células NK periféricas se podrían utilizar como marcador inmunológico para identificar mujeres en riesgo de AR(35).

El grupo de Katano et al., 2013 llegó también a la conclusión tras el análisis de 1200 mujeres y sus embarazos, que niveles altos de NK periféricas producen mayor tasa de evolución gestacional no favorable, y que niveles más altos previos a la concepción pueden tener impacto en no conseguir el embarazo(36).

- **Células NK uterinas en biopsia endometrial o tejido decidual.**

Parece que en embarazos normales la citotoxicidad de las células NK deciduales está significativamente reducida en comparación con embarazos anormales, como se demuestra en los siguientes trabajos:

Así, según refiere el trabajo de Michimata et al., 2002, aunque se observaron variaciones en el número y distribución de las células NK en el endometrio de mujeres con AR, éstas no mostraron una correlación directa con los resultados de embarazos posteriores(37).

El estudio de Tuckerman et al., 2009 demuestra que un aumento significativo en la densidad de células NK uterinas en el endometrio de mujeres con antecedentes de AR en comparación con mujeres fértiles, sin antecedentes de pérdidas, lo que sugiere su utilidad como biomarcador pronóstico para pacientes con AR(38).

Según el estudio de Lee et al., 2013 previamente mencionado, las células NK uterinas son clave para la interacción directa con el trofoblasto y la remodelación vascular(35).

Por otro lado, en un estudio muy reciente de este mismo año publicado por Cuadrado- Torroglosa et al., 2024 se destaca el importante papel de las NK uterinas en la remodelación de las arterias espirales y en la regulación de la invasión del trofoblasto. Estas células, aunque derivadas de la línea inmunitaria citotóxica, tienen una función más de inmunomodulación en el desarrollo temprano del embarazo que una función destructiva(39).

Podemos concluir por tanto:

- A partir de los estudios que analizan las células NK en la sangre periférica antes o durante el embarazo, parece existir una débil asociación con AR, pero por el momento las pruebas de células NK no pueden utilizarse para seleccionar a las mujeres con AR para plantear posteriormente un tratamiento inmunológico.

- Por otro lado, la expresión de subconjuntos de células NK en endometrio y sangre periférica son muy diferentes, y, además, dentro de un determinado tejido, existen fluctuaciones a lo largo del ciclo ginecológico.
- Las células NK pueden medirse en biopsia endometrial mediante inmunohistoquímica o citometría de flujo. La primera técnica puede hacer una evaluación subjetiva y, en el caso de segunda, puede cambiar la expresión de los marcadores de superficie al someter al tejido a digestión enzimática. De hecho, ninguna técnica de medición se ha protocolizado y no existen rangos de normalidad estandarizados.

3.5.5 Tratamientos inmunológicos: nuevas terapias.

Recientes avances en la comprensión de las interacciones inmunológicas materno-fetales han llevado a investigar terapias dirigidas para mujeres con abortos recurrentes de causa inmunológica. Entre ellas, se han estudiado tratamientos con inmunoglobulina intravenosa, inmunosupresores como el rituximab y moduladores del complemento, aunque los resultados no son concluyentes.

Un campo prometedor es la evaluación del microambiente inmunológico endometrial, donde algunos estudios han sugerido que un equilibrio entre células T reguladoras (Treg) y células T efectoras es clave para la tolerancia materno-fetal. La disfunción de las células Treg ha sido implicada en la patogénesis de abortos recurrentes, lo que ha llevado a la propuesta de nuevos enfoques terapéuticos dirigidos a mejorar la tolerancia inmunológica(40).

En resumen, las causas inmunológicas de los abortos recurrentes abarcan un espectro complejo de desregulaciones autoinmunes y aloinmunes. A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento, aún persisten lagunas en el entendimiento de estos mecanismos. Se requieren estudios adicionales para establecer terapias inmunológicas eficaces y personalizadas para las pacientes AR.

b. Otros factores: genético, hematológico, endocrino, anatómico uterino e infeccioso.

Factor genético:

Las alteraciones genéticas son una causa más que reconocida de aborto, tanto esporádico como recurrente y presentan una prevalencia aproximada del 45%. En una revisión sistemática, la prevalencia de anomalías cromosómicas en un único aborto esporádico fue del 45%, y la prevalencia para un siguiente aborto similar, del 39%(5).

Las alteraciones cromosómicas se clasifican de una manera sencilla en dos grupos, numéricas, por exceso o defecto de cromosomas (trisomías, monosomías, poliploidías) y/o estructurales, como son traslocaciones (recíprocas o robertsonianas), inversiones, deleciones y mosaicismos.

Respecto al embrión, éste puede presentar cromosomopatías heredadas de sus progenitores o *de novo*. Éstas representan el 75% de los abortos esporádicos, y son habitualmente de origen materno asociado a una edad avanzada (por alteraciones de disyunción en la meiosis I y II del ovocito, dando lugar habitualmente a trisomías)(11). Por tanto, resulta muy interesante estudiar la euploidia del producto de la gestación para determinar si subyace una causa genética(41).

Así, los estudios publicados han utilizado diversas técnicas genéticas como el análisis del cariotipo, hibridación fluorescente in situ [FISH], o hibridación genómica comparativa basada en array [array-CGH]). El cariotipo convencional presenta limitaciones, ya que puede tener un resultado no concluyente o haber contaminación materna(42).

El FISH también puede tener un uso limitado dado que sólo utiliza sondas para determinados cromosomas y, por tanto, puede no detectar la causa en sí misma. Las nuevas técnicas de secuenciación masiva o *next generation sequencing* (NGS) también se pueden aplicar exitosamente examinando todos los cromosomas y evitando las limitaciones del cariotipo y del FISH, a pesar de que también presenta sus limitaciones ya que puede no detectar reordenamientos equilibrados y mosaicismos de bajo nivel (por debajo de un 10-15%)(43).

Cuando una pareja presenta cariotipos normales y tienen un aborto por una trisomía, un nuevo aborto puede volver a ocurrir hasta en el 50% de los casos. Sin embargo, si el producto de la gestación es cromosómicamente normal, es probable que subyazca otra causa de aborto(44). Por el contrario, se observa que el 3-5% de las parejas con AR presentan una alteración genética, que en el caso de ser una traslocación recíproca o una inversión, la probabilidad de aborto es de un 35-65%(45).

Así, el estudio del cariotipo en progenitores aporta mucha información, ya que aquellos casos con resultado alterado, presentan una probabilidad mayor de tener un nuevo aborto, y una tasa de recién nacido vivo (RNV), más baja; aunque la tasa acumulada de RNV es buena (del 64%) sigue siendo más baja en comparación con las mujeres con cariotipo normal (78%)(46).

Por tanto, se recomienda analizar el cariotipo parental en parejas con AR, o en parejas cuyos hijos presenten anomalías cromosómicas/ congénitas; ante la existencia de familiares con alteraciones cromosómicas desequilibradas, o ante la presencia de alteraciones cromosómicas como una translocación en el análisis de un feto/ tejido abortivo.

Factor hematológico:

Las alteraciones en el sistema de la coagulación pueden producir un aumento del riesgo trombotico. Pueden ser de origen congénito (hereditarias) o adquiridas (*de novo*) como es el caso del síndrome antifosfolípido.

Dentro de las *trombofilias congénitas o hereditarias* destacan la mutación del factor V de Leiden, la mutación del factor II o protrombina, el déficit de proteína C, proteína S y/o antitrombina, así como la mutación de la metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Sólo la *mutación del factor V de Leiden* y la *mutación 20210A del factor II* han demostrado cierta asociación con el AR, pero no se dispone de estudios para definir la prevalencia exacta de dichas trombofilias entre estas pacientes. *Así, en la guía de 2017 de la ESHRE sobre AR se explica que no existe asociación, o si la hay es débil, y, por tanto,*

no recomienda su screening rutinario salvo contextos de investigación o factores de riesgo trombótico adicionales(5).

Respecto a las trombofilias adquiridas, el *síndrome antifosfolípido (SAF)* es la única causa demostrada no genética de AR. Para realizar su diagnóstico se necesita que coexistan determinados criterios definidos por consenso (llamados *criterios de Miyakis*, actualizados en 2006(23):

- *Criterios analíticos*: los llamados anticuerpos antifosfolípidos determinados en sangre periférica durante al menos 12 semanas. Son el anticoagulante lúpico (AL), los anticuerpos anticardiolipinas (ACA, tipo IgG e IgM) y los anticuerpos anti β 2 glicoproteína I (A β 2, tipo IgG e IgM).
- *Criterios clínicos* como puede ser “tres o más abortos espontáneos, consecutivos, por debajo de las 10 semanas, excluidas alteraciones anatómicas/hormonales maternas o cromosómicas en ambos progenitores”; trombosis vascular y/o complicaciones del embarazo.

En un estudio retrospectivo de cohortes, no se observaron diferencias en el número de abortos, la secuencia de los embarazos o la edad materna entre las mujeres con AR y SAF, frente a mujeres con AR inexplicado (sin SAF). Por lo tanto, los autores concluyen que está justificado ofrecer pruebas de detección del SAF a todas las mujeres con antecedentes de dos o más pérdidas de embarazo, consecutivas o no consecutivas(47).

Factor endocrino/ metabólico.

En el contexto de las pacientes con aborto recurrente (AR), se han investigado diversos factores endocrinos y metabólicos que podrían influir en la pérdida gestacional:

- **Disfunción tiroidea**: Las alteraciones de la función tiroidea, especialmente el hipotiroidismo y la autoinmunidad tiroidea (antiTPO), se asocian con un mayor riesgo de subfertilidad y aborto espontáneo. Se ha reportado una mayor prevalencia de hipotiroidismo en mujeres con AR(48), aunque los estudios sobre hipotiroidismo subclínico no muestran un impacto significativo en la tasa de nacidos vivos. Se recomienda el cribado tiroideo en mujeres con AR(49).

En cuanto a la autoinmunidad, los anticuerpos antiTPO son los más estudiados y más relevantes en mujeres con AR. Su prevalencia es del 8-14% en mujeres en edad reproductiva y predisponen al hipotiroidismo, aunque la mayoría de las mujeres que los presentan son eutiroides(50,51).

- **Metabolismo de la insulina y síndrome de ovario poliquístico (SOP):** El SOP y el aborto podrían relacionarse por factores como la obesidad, la hiperinsulinemia, la hipersecreción de hormona luteinizante (LH), el hiperandrogenismo y la trombofilia, aunque se desconoce el mecanismo exacto. El SOP es más frecuente en mujeres con AR(52), y la resistencia a la insulina parece estar presente en un porcentaje significativo de estas pacientes, lo que sugiere una posible implicación en la etiología del AR(53).

- **Prolactina:** Aunque la prolactina es importante para el mantenimiento del cuerpo lúteo, no se ha establecido una relación clara entre los niveles de prolactina y el AR. En ausencia de síntomas de hiperprolactinemia, no se justifica la realización de pruebas de prolactina en mujeres con AR(54).

- **Progesterona, andrógenos, vitamina D y homocisteína.**
No se ha demostrado un papel causal claro de la progesterona o los andrógenos en el AR(5).

Factor anatómico uterino:

Las malformaciones congénitas, como el septo uterino (U2) o el útero bicorne (U3) (según la clasificación de la ESHRE(55)), están asociadas con una mayor prevalencia de AR. También se han observado malformaciones uterinas adquiridas, como miomas y adherencias uterinas, en mujeres con AR. Se recomienda la evaluación anatómica uterina en todas las pacientes con AR debido a su mayor riesgo de anomalías uterinas(53,56).

Factor infeccioso. La endometritis crónica se caracteriza por la inflamación crónica del endometrio y la presencia de células plasmáticas (CD138) y podría estar relacionada con

una disbiosis vaginal y/o endometrial, aunque su impacto en el AR no se conoce por completo(57).

Causa desconocida/inexplicada. Dado que en torno al 50% de los casos no se conoce la causa de la pérdida gestacional(4), en algunas pacientes se han probado diferentes tratamientos de manera empírica para evitar un nuevo fallo reproductivo.

La ESHRE a través de su guía de recomendaciones para pérdida gestacional recurrente de 2022 actualiza los estudios realizados hasta el momento actual sobre determinadas terapias y formula las siguientes recomendaciones(58).

- No utilizar la terapia de inmunización linfocitaria, las inmunoglobulinas intravenosas (IVIg) y el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) hasta que se desarrollen más ensayos controlados aleatorizados.
- No utilizar anticoagulantes para pacientes con AR idiopático según los resultados de un metaanálisis y dos grandes ensayos controlados aleatorizados.
- En cuanto a los glucocorticoides la evidencia apunta un efecto beneficioso de la prednisona en mujeres con AR seleccionadas, aunque teniendo en cuenta sus posibles fenómenos adversos, por ahora la ESHRE desaconseja su recomendación.
- Ácido fólico y progesterona no han demostrado ningún beneficio.

Debido a que la evidencia científica actual es insuficiente, se necesitan más trabajos de investigación para mejorar los algoritmos diagnósticos y terapéuticos como el presente trabajo.

3.3.6 Pronóstico del AR.

Según un estudio danés que evalúa el pronóstico de casi mil mujeres con AR primario y/o secundario, a los cinco años habían conseguido un RNV el 66% de las pacientes, y a los 15 años, el 71%. La edad materna determina claramente el pronóstico, ya que consiguieron RNV el 41% de las mujeres de más de 40 años y el 81% de las mujeres entre 20 y 24 años. También este estudio observó una disminución significativa de las probabilidades de RNV a mayor número de abortos espontáneos previos(59).

Son factores pronósticos a tener en cuenta:

- Antecedentes familiares: varios estudios que evalúan el componente familiar del AR en mujeres con más de dos abortos espontáneos y sus familiares de primer grado, parecen encontrar la existencia de un componente hereditario (deben tenerse en cuenta los sesgos de información)(60).
- Antecedentes reproductivos
Los autores encuentran sistemáticamente que el número de abortos previos es un factor pronóstico importante sobre para la probabilidad de obtener un RNV y el tiempo transcurrido hasta conseguirlo(61).
- Sexo del primogénito
Según un estudio danés de mujeres con AR secundario de causa inexplicada, parece que es más probable tener un aborto cuando el sexo del primogénito es un varón. En cuanto a los RNV tras los abortos, predominaban las mujeres(62).

3.4 FALLO DE IMPLANTACION RECURRENTE.

3.4.1. Definiciones y epidemiología. Estimación de la probabilidad de implantación.

Definiciones y epidemiología.

Hasta la fecha, el *fallo de implantación recurrente* (FIR) no tiene una definición clara ni una fisiopatología establecida. Se usa de forma un tanto aleatoria por los especialistas para describir la situación clínica por la cual, un embrión presumiblemente viable transferido a la cavidad uterina no logra la consecución de un embarazo (considerando éste como un saco gestacional visible ecográficamente). Como ocurre de manera repetida o recurrente, por su por su homónimo en lengua anglosajona, “*recurrent*”, ha dado lugar a la aparición del término *fallo de implantación recurrente (FIR)* de una manera un tanto paralela al concepto de aborto de repetición.

Se considera FIR un fenómeno secundario a las TRAs, ya que solo se observa en el contexto de la FIV, siendo la cohorte de pacientes heterogénea con respecto a la indicación del tratamiento y las posibilidades individuales de conseguir un embarazo.

Clásicamente se definía como tres o más intentos fallidos de transferencia de embriones de alta calidad, frescos o congelados(63). Entre las pacientes bajo tratamiento de infertilidad, el 15% experimenta FIR(64). Pero al igual que ocurre con AR, existe una importante falta de consenso en su definición. La mayoría de ellas se basa en un número de embriones transferidos con una frecuencia suficiente como para haber conseguido embarazo.

La evolución de la medicina reproductiva y de las prácticas de transferencia de embriones (TE), de varios embriones a embrión único, de TE en estado de clivaje a blastocisto, de embriones sin cribado cromosómico a embriones analizados con pruebas de screening genético preimplantacional (*pregestational test*, PGT-A) etc., el concepto de TE fallida ha cambiado(65). Teniendo en cuenta el número de embriones transferidos, la ESHRE considera el diagnóstico de FIR cuando se transfiere de *dos a tres* embriones de buena calidad sin embarazo(66).

En 2019 la ESHRE desarrolló una guía de Buena Práctica Clínica con el objetivo de una mejor identificación, diagnóstico y tratamiento de las pacientes con FIR(67). En 2022, expertos internacionales en medicina reproductiva se reunieron en Lugano, Suiza, para hacer una revisión sistemática sin metaanálisis de los estudios publicados sobre FIR en inglés entre 2015 y 2022, y tratar de definir las diferentes facetas del mismo, sobre todo un diagnóstico y manejo más apropiados(68).

En algunas publicaciones, se concreta a 2 transferencias de blastocitos euploides, o al número equivalente de transferencias de embriones no cribados, ajustado a la edad de la paciente y la tasa de euploidía correspondiente para dicho rango etario. A continuación se muestra una tabla en la que se especifica la tasa de embarazo y el número mínimo de TE para conseguir embarazo según la euploidía del embrión, (desconocida o euploide), por rangos de edad materna. Como se observa, aunque algunas pacientes pueden alcanzar el umbral del 60% de implantación positiva con una

única transferencia, lo esperable es al menos tener que recibir dos transferencias para que la β HCG sea positiva.

Tabla 1. Aplicación de la definición de FIR a la práctica clínica de la Medicina Reproductiva.

| | EDAD MATERNA | TASA DE IMPLANTACIÓN/TASA EMBARAZO (%) | MÍNIMO N.º DE TE PARA CONSEGUIR 60% TASA DE EMBARAZO |
|--------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| EMBRIÓN EUPLOIDÍA DESCONOCIDA | < 35 | 31,5 | ≥ 3 ET |
| | 35-39 | 29,5 | ≥ 4 ET |
| | ≥ 40 | 15,0 | ≥ 6 ET |
| EMBRIÓN EUPLOIDE | < 35 | 68,4 | ≥ 2 ET |
| | 35-39 | 64,1 | ≥ 2 ET |
| | >40 | 58,0 | ≥ 2 ET |

Datos obtenidos del programa de registros de la ESHRE para las TRA en 2017(69) y del estudio publicado por Reig en 2020 tras la revisión de más de 8000 transferencias de embriones euploides(70).

En conclusión, si los embriones son euploides, se necesitarían al menos 2 transferencias para conseguir un test de embarazo positivo, mientras que si la euploidía es desconocida, se requieren al menos tres transferencias para el grupo de menores de 35 años; 4 para el grupo de 35 a 39 años; y al menos, 6 TE para las mujeres mayores de 40 años(66).

Según un trabajo de P. Pirtea publicado por IVIRMA-New Jersey con más de 4500 pacientes con FIR, con hasta tres transferencias simples consecutivas de embriones vitrificados euploides se revela que el verdadero FIR es poco frecuente. Aquellas pacientes que logren 3 blastocistos euploides, conseguirán embarazo con más del 95% de probabilidad(71).

La ASRM no es rígida con la definición ya que no hay un consenso universal, y generalmente se acepta el criterio de FIR tras la transferencia de al menos dos o tres embriones.

Estimación de la probabilidad de implantación.

La probabilidad de éxito de la implantación tras la FIV viene determinada por varios factores, entre los que destacan:

- *Factores femeninos:* la edad, los niveles hormonales, el estado uterino/endometrial, posible patología genética u otras afecciones subyacentes.
- *Factores relacionados con el embrión:* las características del cultivo embrionario, estadio de desarrollo (clivaje o blastocisto), la euploidía y las implantaciones previas de embriones hermanos.
- *Factores masculinos:* posibles trastornos genéticos.
- *Factores externos:* el rendimiento del laboratorio y la clínica, las políticas de transferencia y las restricciones legales.

La creación de un modelo de probabilidad acumulada de éxito de la implantación que considere estos factores sería útil. En casos de FIR, la probabilidad de embarazo tras cada transferencia embrionaria (TE) es compleja, pero crucial para el manejo clínico(72). El grupo de expertos en FIR de la ESHRE consideró un umbral del 60% como referencia clínica para determinar si un fallo de implantación se debe a la "mala suerte" o a una patología subyacente. Sin embargo, este valor puede variar entre pacientes y centros de reproducción asistida(66).

En la práctica clínica de los tratamientos de reproducción asistida (TRA), las pacientes pueden dividirse en dos grupos: aquellas con una probabilidad realista de embarazo y aquellas con una resistencia biológica a la implantación. En las primeras transferencias de embriones euploides, la probabilidad de implantación es alta, alcanzando un 69%, y se mantiene entre el 59-60% en las transferencias sucesivas. Con tres TE consecutivas, la tasa acumulada de implantación es del 95.5%, quedando solo un 4.5% sin lograr el embarazo. Según el grupo de Lugano, el verdadero FIR ocurre en menos del 5% de las

parejas con infertilidad. Así, el grupo de Lugano estimó tras su análisis que el verdadero FIR es extremadamente infrecuente, ocurriendo en <5% de las parejas con infertilidad(68).

La aneuploidía es la principal causa de fallo de las TRA, y su tasa aumenta con la edad materna. Por eso, los estudios de tasa de implantación tras transferencia de embriones euploides son los que más información nos dan sobre la prevalencia de FIR. Algunos autores sostienen que sólo se puede hablar de FIR si la euploidía está demostrada, y así buscar otras causas que justifiquen la no implantación. Además sugieren que se debería establecer una definición de FIR diferente según la edad materna y la posibilidad de conseguir embriones euploides y la probabilidad acumulada de embarazo de cada grupo etario(73).

3.4.2 Impacto psicológico.

El FIR representa una situación emocionalmente compleja para las mujeres y parejas en las unidades de reproducción asistida ya que tras varios ciclos de FIV y sus correspondientes tratamientos, varias transferencias, tiempos de β -espera, etc. no logran el éxito de la implantación, generando niveles elevados de ansiedad e incluso, depresión, además de frustración y enfado hacia el equipo médico.

Esta falta de uniformidad en la definición y los criterios diagnósticos entre centros e incluso entre especialistas de la misma unidad, conduce a una gran heterogeneidad en los estudios publicados, lo que a su vez se traduce en enfoques diagnósticos y terapéuticos diversos que repercuten negativamente, en última instancia, sobre los pacientes.

Es esencial ofrecer un diagnóstico adecuado a las pacientes que experimentan FIR, así como transmitir que los fracasos repetidos no implican necesariamente un fracaso definitivo en el tratamiento de la infertilidad.

Aunque se sabe que factores biológicos y el estilo de vida influyen en el éxito del tratamiento, el impacto del estrés emocional continúa siendo incierto(74).

3.4.3 Posibles factores de riesgo para FIR: estilo de vida.

Los especialistas en reproducción asistida consideran que el tabaquismo, el índice de masa corporal (IMC) y el consumo de fármacos son los factores de riesgo relacionados con el estilo de vida más importantes en pacientes con FIR; seguidos de la dieta, el estrés y el consumo de cafeína(65).

El **IMC** se considera un factor de riesgo relevante para el fracaso de las TRA(75) aunque la mayoría de estudios indican que la obesidad no afecta de forma significativa a la calidad embrionaria(76), el IMC puede influir negativamente en la calidad ovocitaria. Además, la obesidad (clase II- III) puede afectar a la receptividad endometrial desplazando la ventana de implantación(76).

El papel de la **Vitamina D** en los TRA es controvertido. Así hay estudios que encuentran asociación entre los niveles bajos séricos e intrafoliculares de vitamina D y la tasa de embarazo(77), mientras que otros no lo encuentran(78).

3.4.3 Investigación de posibles factores causales del FIR y manejo diagnóstico.

FACTOR INMUNOLOGICO:

El hecho de que diferentes mecanismos inmunológicos puedan intervenir negativamente en el proceso de implantación hace que el campo de la inmunología reproductiva esté en continua investigación.

Así, aunque la gran mayoría de los especialistas en reproducción asistida solicitan pruebas complementarias, no hay marcadores inmunitarios claramente definidos asociados a FIR, por lo que las guías de buena práctica clínica de la ESHRE(66) en el momento actual no respaldan el cribado inmunológico universal, a expensas de que nuevas investigaciones arrojen luz para mejorar este campo.

En base a los mecanismos involucrados en la fisiopatología del FIR, se ha tratado de establecer pruebas diagnósticas para mejorar los resultados en las pacientes.

Células natural killers uterinas y periféricas (NKu y NKp).

Las células natural killers (NK) se encuentran en sangre periférica, NKp, o en la interfaz feto-maternal, NKu, donde representan alrededor del 70% de las células inmunitarias. Las NKu son menos citotóxicas y demuestran un perfil de citocinas secretadas y expresión de receptores/genes diferente a las NKp(79). Además, no existe correlación entre el número de células NKp y NKu en un mismo individuo, por lo que deben analizarse como marcadores independientes.

Las concentraciones de NKu cambian significativamente durante el ciclo menstrual, con niveles altos en la fase lútea, lo que destaca la importancia de establecer unos criterios estrictos para analizar su cantidad y su función. Algunos estudios relacionan más NKu con un ambiente menos favorable para la implantación y con fallo de implantación recurrente (FIE). Sin embargo, otros estudios no han encontrado esta asociación, lo cual podría deberse a la falta de consenso en su metodología de cuantificación. Recientemente ha surgido la teoría de que una inadecuada activación de las células NKu podría ser la causa del FIR(80).

En cualquier caso, la estandarización de un umbral de normalidad para las NKu no ha sido posible incluso a través de diversas técnicas (análisis FACS, inmunohistoquímica), y se cree que el dinamismo de las NKu a lo largo del ciclo menstrual, siendo mayormente inactivas en el endometrio no gestante y más activas en la fase lútea, preparando el endometrio para facilitar la implantación y estableciendo un ambiente de inmunotolerancia para el embrión de cara al embarazo(81).

Si bien un metaanálisis de seis estudios identificó que las pacientes con FIR presentaban niveles altos de NKu(82), otro estudio más reciente que compara niveles altos frente a normales de NKu en pacientes con FIR no encontró diferencias significativas(82,83,84). De la misma forma ocurre para NKp donde los estudios sugieren que la NKp diferencian significativamente a las mujeres no embarazadas con AR y FIR de los controles sanos, y a las mujeres embarazadas con AR de los controles embarazadas normales en FIR(85).

Linfocitos T.

Uno de los principales mecanismos involucrados en la regulación del FIR es el desarrollado por las células T, con un desequilibrio a favor de las células Th1 (proinflamatorias) respecto a Th2 (antiinflamatorias). Aunque se conoce que cierto grado de inflamación es necesario para la implantación, un exceso puede implicar que el embrión no implante.

Los desequilibrios en los Linfocitos T helpers CD4+, es decir, Th1, Th2, Th17 y Treg, se han visto implicados en el FIR(86).

En una revisión sistemática, que incluyó varios estudios de pacientes con FIR, se observó una diferencia significativa en el total de células CD56+ en mujeres con FIR en comparación con los controles(83).

En relación a la actividad de linfocitos CD3, CD4 y CD8 en pacientes con FIR, un estudio reciente que compara porcentajes de CD3+ vio que sus niveles eran más altos en las mujeres que no consiguieron embarazo frente a las que si (87). Sin embargo, no se observaron diferencias en los linfocitos CD4+ y CD8 en pacientes FIR(88).

En otro estudio, no se observaron diferencias significativas en los linfocitos T circulantes, aunque los autores informaron de una mayor producción de citocinas Th1 y Th2 en pacientes FIR(89).

Por tanto, ante la falta de uniformidad en los resultados, no se recomienda la evaluación de Linfocitos T uterinos y/o en sangre periférica en pacientes FIR.

Citoquinas.

Son proteínas fundamentalmente sintetizadas por linfocitos T, aunque también por macrófagos, linfocitos B, células dendríticas y células NK (natural killer).

Durante la implantación, se ha descrito que las citocinas en la sangre periférica cambian de un perfil proinflamatorio (tipo Th1) a un perfil antiinflamatorio (tipo Th2)(90). Si bien esto puede representar una simplificación excesiva, algunos estudios con poblaciones pequeñas demostraron que en las mujeres con FIR persiste un estado proinflamatorio que podría perturbar la implantación(82).

Dado que la evaluación de los niveles de citoquinas requiere mucho tiempo y es costosa, no se recomienda en la práctica clínica.

Compatibilidad HLA-C.

Otro mecanismo relevante en la implantación es el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) y los receptores KIR a nivel del útero. La interacción entre los antígenos HLA-C del embrión y los receptores KIR influye en la capacidad del embrión para implantarse. Las combinaciones desfavorables entre estos marcadores pueden dar lugar a respuestas inmunológicas que impidan la implantación exitosa.

Debido a su variabilidad genética y a su capacidad para unirse a alotipos específicos de HLA de clase I, los receptores (KIR) de las células NK se han considerado buenos candidatos para equilibrar la tolerancia leucocitaria materna hacia el embrión.

Se ha postulado que una interacción entre los KIR maternos y sus ligandos de moléculas de antígeno leucocitario humano (HLA) de clase I, expresados por las células del trofoblasto, es crucial para una implantación clínica(91).

Se observa un mayor riesgo de FIR en mujeres portadoras del alelo HLA-C2 y del alelo HLA-G(92).

Sin embargo, el hecho de que ni los blastocistos ni el sincitiotrofoblasto expresen HLA-C en el momento de la transferencia, y que su expresión se inicie más tarde, durante la placentación, plantea la importancia de seguir investigando el papel del HLA-C en la FIR.

FACTOR GENÉTICO: cariotipos parenterales.

Como se ha mencionado previamente, las alteraciones cromosómicas embrionarias son la principal causa de pérdida del embarazo, y así se observa en el período preimplantacional donde los blastocitos aneuploides presentan una capacidad de desarrollo significativamente menor(93). En la mayoría de los casos las alteraciones genéticas presentan una herencia materna asociada a la edad, donde se observan más alteraciones en la meiosis del ovocito(93), presentando la edad paterna un impacto limitado(94).

El 67% de los especialistas en reproducción consideran la causa genética como origen del FIR y la mayoría evalúan el cariotipo de los futuros progenitores(65). De acuerdo a esto, los estudios publicados revelan que más alteraciones en los cariotipos de pacientes con FIR, aunque la prevalencia absoluta es baja(95). De hecho, estas cifras se encuentran dentro del rango de prevalencia de las anomalías cromosómicas descritas en parejas infértiles sometidas a TRA, que oscilan entre del 3- 15% de las mujeres(96).

La presencia de un cariotipo parental alterado predispone a alteraciones en el embrión, por lo que se recomienda el consejo genético y las pruebas de screening preimplantacional (PGT)(97).

FACTOR ANATÓMICO.

Más del 80% de los especialistas en reproducción asistida profundizan el estudio uterino en los casos de FIR, incluso algunos sugieren su evaluación antes de la primera TE. Se destacan patologías como Síndrome de Asherman, hidrosálpinx, endometriosis/adenomiosis, malformaciones uterinas, endometritis y miomas(65).

GROSOR ENDOMETRIAL.

Este aspecto ha sido ampliamente estudiado tratando de establecer un umbral por debajo del cual los resultados sean desfavorables. Es raro un endometrio menor a 5 mm en pacientes con sustitución estrogénica para preparación endometrial. Una revisión sistemática reciente y un metaanálisis que evaluaron la relación del grosor endometrial y el éxito del embarazo, refiere que la tasa de RNV es menor en pacientes con un endometrio delgado, por debajo de 7 mm(98). Sin embargo, en otros estudios muy interesantes refieren que el grosor endometrial no influye en el resultado de los TRAs(99).

Hay que destacar también el momento en que se mide el grosor del endometrio, por ejemplo, existe un proceso de compactación como la administración de PGT(100).

FACTOR INFECCIOSO: endometritis crónica.

La endometritis crónica (EC) es la inflamación crónica del endometrio, y puede disminuir la tasa de embarazo. Puede darse asociada a infección intrauterina(101) y se trata con antibióticos como la doxiciclina entre otras medicinas(102) siendo significativamente mejores las tasas de embarazo/RNV en pacientes con EC curada que sin curar(103); sin asociarse a infección, como en pacientes con endometriosis(104).

Estas pacientes presentan alteraciones macroscópicas en el endometrio como micropólipos, y al tomar biopsias para el análisis anatomopatológico se observan células plasmáticas (CD138). Lamentablemente, los criterios de diagnóstico no están estandarizados(65).

FACTORES METABÓLICOS/ ENDOCRINOS.

Más del 80% de los especialistas en reproducción consideran que los aspectos endocrinos son relevantes en el FIR, centrándose principalmente en la función tiroidea, la obesidad y los niveles de progesterona(65).

El estudio de la *función tiroidea* en el diagnóstico de FIR está bien establecido: niveles séricos de TSH >4 mUI/L (hipotiroidismo subclínico o hipotiroidismo) o <0,4 mUI/L (hipertiroidismo subclínico) pueden considerarse como disfunción tiroidea y requerir seguimiento y tratamiento adicionales(105).

La *obesidad* puede alterar la receptividad endometrial por cambios en del metabolismo lipídico(106). Además, la asociación entre obesidad, inflamación crónica y estrés oxidativo disminuye la receptividad endometrial por desplazamiento de la ventana de implantación(107).

En los últimos años también se ha investigado profundamente los resultados clínicos en relación con los niveles de *progesterona (PGT)* en sangre en las fases folicular tardía y lútea. Los aumentos prematuros de progesterona próximos a la ovulación, y/o niveles bajos de PGT previa o posteriormente a la TE, pueden conducir a una asincronía entre el endometrio y el embrión y a la no implantación, lo que justificaría cancelar la TE(108).

FACTOR HEMATOLÓGICO- TROMBOFILIAS

La predisposición a la trombofilia puede implicar una limitación local para la implantación embrionaria. Más del 75% de los especialistas en reproducción complementan con estudios de coagulación en pacientes con FIR, especialmente para trombofilias congénitas y SAF(65), pero realmente hay pruebas contradictorias de la asociación entre FIR y trombofilias (hereditarias y también adquiridas), por lo que no se aconseja su estudio(109).

Trombofilia hereditaria.

Un metaanálisis reciente de siete artículos no informó de diferencias en los resultados en caso de mutación del factor V Leiden, del gen de la protrombina, de la MTHFR y/o de la mutación de la resistencia a la proteína C activada(110).

Trombofilia adquirida.

Un estudio reciente que evaluó la relación de los anticuerpos del SAF en pacientes con FIR, no demostró una relación causal por lo que en el momento actual no se recomienda su screening(111).

FACTORES RELACIONADOS CON EL EMBRIÓN.

La mala calidad embrionaria o las alteraciones morfocinéticas en el cultivo embrionario se relacionan con una menor capacidad reproductiva, incluso en el contexto de los embriones euploides(112).

OTRAS PRUEBAS: RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL Y MICRIOBIOMA

Pruebas de receptividad endometrial.

Un ensayo clínico multicéntrico que comparó la TE personalizada frente a TE en fresco/desvitrificada rutinaria, mostró una tasa mayor de RNV acumulada para el grupo de TE personalizada(113), aunque un metaanálisis más actual demostró una tasa de implantación exitosa similar a la de las pacientes con TE rutinaria(114). Por lo tanto, no

hay pruebas con suficiente evidencia para considerar el estudio de la receptividad endometrial de manera rutinaria.

Pruebas de microbioma.

Muchos trabajos han revelado que la cavidad endometrial no es estéril, sino que en ella residen de diversos microorganismos y algunas publicaciones refieren que el microbioma endometrial influye en la receptividad(115) mientras que otros no han encontrado dicha correlación(116). En un estudio más reciente publicado en 2019 se concluía que un microbioma vaginal disbiótico reducía la probabilidad de embarazo en los TRA(117).

3.4.6 Manejo terapéutico en FIR.

Tras la revisión por el grupo de expertos en FIR de la ESHRE (Lugano 2022) se concluyó que dada la falta de estudios exhaustivos y la heterogeneidad de los trabajos presentados, no se recomienda la infusión intrauterina de inmunoglobulina intravenosa, el factor estimulante de colonias de granulocitos, la perfusión intrauterina de plasma rico en plaquetas (PRP), la infusión intrauterina de células mononucleares de sangre periférica autólogas ni la gonadotropina coriónica humana(68).

Por el contrario, sí se recomienda aquellos cambios que impliquen una mejora en el estilo de vida; el consejo genético en caso de alteraciones cromosómicas conocidas en los progenitores y la medición de los niveles de estradiol en caso de endometrios finos.

En el punto intermedio entre las medidas a considerar se debe tener en cuenta la transferencia de embriones en estadio de blastocisto y el cribado genético de aneuploidías (PGT-A) de forma sistemática a todos los embriones; el tratamiento antibiótico en caso de endometritis crónica y la Instilación intrauterina de hCG.

Tabla 2. Recomendación de intervenciones en pacientes FIR según grado de evidencia.

| RECOMENDACIÓN DE INTERVENCIONES EN PACIENTES FIR | |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| RECOMENDADO | Mejorar el estilo de vida. |
| | Consejo genético + PGT- SR si e alteración cromosómica conocida |
| | Evaluación de los niveles de estradiol si endometrio fino |
| SE PUEDE CONSIDERAR | Transferencia de embriones en estadio de blastocisto |
| | Estudio genético preimplantacional de aneuploidías (PGT-A). |
| | Tratamiento antibiótico si endometritis crónica. |
| NO SE RECOMIENDA | Scratching endometrial. |
| | Administración de G- CSF. |
| | Infusión intravenosa de intralípidos. |
| | Infusión intravenosa de IGIV. |
| | Infusión intrauterina de PRP. |
| | Infusión intrauterina autóloga de células mononucleares de sangre periférica. |
| | Assited hatching |
| | HBPM |
| | Instilación intrauterina de hCG. |

(Basado en Recomendaciones de buena práctica clínica de la ESHRE para FIR- 2023)(66).

3.3.6 Pronóstico del FIR.

En el momento actual, las recomendaciones ofrecidas en el campo del FIR se desarrollan sin una base sólida. Por tanto, es una prioridad de la medicina reproductiva seguir investigando en este campo(118), ya que aplicar una definición de FIR común homogenizaría los estudios y los resultados de los metaanálisis.

Es de especial interés, avanzar en estudios sobre los posibles factores inmunológicos como causa subyacente de FIR y progresar en opciones terapéuticas como la Infusión intrauterina autóloga de células mononucleares de sangre periférica, el PRP y la inyección intrauterina de hCG.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

HIPÓTESIS.

En el diseño de este estudio partimos de las siguientes hipótesis:

Hipótesis NULA: No existe un fenotipo inmunológico diferencial o existe un fenotipo inmunológico similar tanto a nivel local (ovario, útero) como sistémico (sangre periférica) en pacientes que presentan fallo reproductivo recurrente, bien en su forma clínica de abortos de repetición o de fallo de implantación recurrente, en comparación con pacientes sanas y con fertilidad probada (al menos dos hijos propios, y/o donantes de óvulos cuyos embriones han dado al menos dos embarazos en otra/s mujer/es) en muestra de líquido folicular, endometrio y sangre recogidas el día de la punción ovárica para la extracción de ovocitos en el contexto de un ciclo de FIV.

Hipótesis ALTERNATIVA: Existe un subgrupo de mujeres que clínicamente manifiestan una situación de fallo reproductivo recurrente, bien en forma de abortos de repetición o de un fallo de implantación recurrente, que presentan un perfil inmunológico diferencial a nivel local (ovárico y/o uterino) y/o sistémico (sangre periférica) expresado a través de diferentes biomarcadores proinflamatorios (células *Natural Killers*, monocitos/macrófagos) en comparación con el perfil inmunológico que presentan mujeres sanas y con fertilidad probada (al menos dos hijos propios, y/o donantes de óvulos cuyos embriones han dado al menos dos embarazos en otra/s mujer/es).

La determinación de estas subpoblaciones se realiza mediante citometría de flujo multiparamétrica analizando las muestras biológicas de líquido folicular, endometrio y sangre obtenidas el día de la punción ovárica para la recuperación de ovocitos en el contexto de un tratamiento de fecundación in vitro.

OBJETIVOS.

Para mejorar los resultados reproductivos de pacientes/ parejas que presentan FRR, bien en su forma de AR o en su forma de FIR, se debe profundizar en el campo de la investigación, siendo la Inmunología Reproductiva uno de las áreas con más potencial de investigación.

Además de otras causas ya conocidas como la edad materna o situaciones protrombóticas como el síndrome antifosfolípido (SAF), se considera la inmunológica como una de las causas más plausibles de FRR.

Así, la finalidad de este proyecto es investigar los posibles perfiles inmunológicos/proinflamatorios subyacentes en la fisiopatología del FRR a través de distintos biomarcadores locales y sistémicos asociados a células *natural killer* y monocitos/macrófagos, persiguiendo mejorar los resultados reproductivos, tanto gestacionales como de RNV de estas pacientes.

A continuación, se enumeran los objetivos de este estudio:

OBJETIVOS PRINCIPALES

OBJETIVO 1. Determinar si existe algún tipo de biomarcador local, endometrial y/u ovárico, que nos permita diagnosticar y tratar el FRR de causa inmunológica, como por ejemplo, células *natural killers*, monocitos y macrófagos, células supresoras de origen mieloide.

OBJETIVO 2. Determinar si existe algún tipo de biomarcador sistémico o periférico que nos permita diagnosticar y tratar el FRR de causa inmunológica como por ejemplo, células *natural killers*, monocitos y macrófagos, células supresoras de origen mieloide.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

OBJETIVO 1: caracterizar los biomarcadores inmunofenotípicos a nivel de células NK y macrófagos, presentes en el endometrio de una cohorte de pacientes estrictamente seleccionadas con posible iFRR y otra cohorte de pacientes con fertilidad probada y sanas desde la perspectiva reproductiva, dentro del contexto de un tratamiento de FIV, y aplicar estudios de asociación estadística para cada uno de dichos biomarcadores, realizando una comparativa por grupos, es decir, casos- controles (AR- controles y FIR- controles).

OBJETIVO 2: caracterizar los biomarcadores inmunofenotípicos a nivel de células NK y macrófagos, presentes en líquido folicular de una cohorte de pacientes estrictamente seleccionadas con posible iFRR y otra cohorte de pacientes con fertilidad probada y sanas desde la perspectiva reproductiva, dentro del contexto de un tratamiento de FIV, y aplicar estudios de asociación estadística para cada uno de dichos biomarcadores, realizando una comparativa por grupos, es decir, casos- controles (AR- controles y FIR- controles).

OBJETIVO 3: caracterizar los biomarcadores inmunofenotípicos células NK y monocitos presentes a nivel sistémico, sangre periférica, de una cohorte de pacientes estrictamente seleccionadas con posible iFRR y otra cohorte de pacientes con fertilidad probada y sanas desde la perspectiva reproductiva, dentro del contexto de un tratamiento de FIV, y aplicar estudios de asociación estadística para cada uno de dichos biomarcadores, realizando una comparativa por grupos, es decir, casos- controles (AR- controles y FIR- controles).

OBJETIVO 4- Para aquellos biomarcadores inmunofenotípicos que hayan resultado estadísticamente significativos, se plantea un estudio de correlaciones y el grado de la misma, comparando los grupos de pacientes, es decir, casos y controles (AR- controles

y FIR-controles) en cada uno de los tres tejidos analizados (endometrio, líquido folicular y sangre periférica).

OBJETIVO 5- Crear un algoritmo diagnóstico en base a los biomarcadores analizados y que nos ayude a identificar y/o clasificar a las pacientes con FRR para un mejor diagnóstico de su cuadro clínico, y aplicar las estrategias terapéuticas más precisas para la consecución del embarazo.

MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Lugar de ejecución y grupo de trabajo.

- Centro logístico central: Hospital Clínico San Carlos de Madrid (HCSC) a través de sus Servicios de Inmunología y de Ginecología y Obstetricia (Instituto de la Mujer José Botella Llusía).
- Centros colaboradores externos: Fertility Madrid y Centro Reproductivo Hermanos García del Real de Madrid.

Este estudio se ha realizado en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid de manera multidisciplinar por la Unidad de Reproducción Asistida del Servicio de Obstetricia y Ginecología y el Servicio de Inmunología Clínica a través de la Unidad de Inmunología Reproductiva, y la Unidad de Investigación y Análisis de muestras), durante el período comprendido entre 2019 y 2023.

Para su desarrollo ha contado con la colaboración, completamente altruista, de dos centros externos especializados en Medicina Reproductiva, Fertility Madrid y Hermanos García del Real. (VER APARTADO DE ANEXOS: CONVENIOS DE COLABORACIÓN).

El comité de Ética e Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Clínico San Carlos aprobó este estudio con código 19/478-E_BC en 2019 (APARTADO DE ANEXOS: PERMISOS, PERMISO 1).

Además, este trabajo presenta parte de su financiación a través de una beca del FEDER (Fondo Europeo de desarrollo Regional) a nombre de la Dra. Sánchez Ramón como directora del proyecto *“Desarrollo de medicina de precisión en el fallo gestacional recurrente de causa inflamatoria”* (APARTADO DE ANEXOS, PERMISO 2) y cuenta con el apoyo y la colaboración del Departamento de Investigación dirigido por el Dr. Corbí del Consejo Superior de Investigación Clínica desde 2019 (APARTADO DE ANEXOS: PERMISOS, PERMISO 3).

5.2 Descripción de pacientes.

5.2.1 Diseño global del estudio.

En cuanto al diseño global del estudio, se trata de un *estudio prospectivo observacional de cohortes*, con una selección de dos series de pacientes: *pacientes “caso”* con Fallo Reproductivo Recurrente de posible origen inflamatorio, dentro de las cuales se diferencia el grupo de mujeres con AR y el grupo de pacientes con FIR; y el grupo de *pacientes “controles”* o mujeres sanas, sin patología reproductiva y fertilidad probada.

Respecto al tamaño muestral, el número de muestras necesarias dependerá del análisis utilizado. A priori no es fácil cuantificar el número de casos necesarios. Así, según Peduzzi considera suficiente un mínimo de 10 casos por variable independiente en el análisis de regresión logística(119), de manera que para este proyecto serían necesarios:

- **CASOS:** 20 pacientes con FRR de posible origen inflamatorio: 10 mujeres con abortos de repetición y 10 mujeres con fallo de implantación recurrente.
- **CONTROLES:** 10 pacientes sanas (mujeres con fertilidad probada).

Finalmente, la población de este estudio incluye un total de 33 pacientes: 20 con posible iFRR, dentro de las cuales, 7 pertenecen al grupo de AR y 13 pertenecen al grupo de FIR, y 13 son controles sanos.

El tiempo de estudio propuesto inicialmente fue de 24 meses en total, con un período estimado de recogida de pacientes de 18 meses, y un tiempo estimado de unos 6 meses para el análisis de datos. El reclutamiento comenzó en enero de 2020 coincidiendo con la pandemia de COVID – SARS 19 que produjo una interrupción en las consultas de Medicina Reproductiva y de los ciclos de FIV tanto en centros públicos como privados, lo cual derivó en un retraso de unos 9-10 meses en el inicio del reclutamiento. Además, dado que como más adelante se detalla, hubo dificultades para el reclutamiento de la cohorte de pacientes caso-AR, con desestimación de la participación por parte de las mismas por cinco mujeres, por lo que este proceso se prolongó unos seis meses más respecto al planteamiento inicial, terminando en noviembre de 2023.

Todas las pacientes recibieron y firmaron el consentimiento informado y el documento informativo del consentimiento informado (ver apartado de Anexos: ANEXOS I y II respectivamente) previamente al procedimiento. La recuperación de las muestras (líquido folicular, biopsia de endometrio y muestra de sangre) se realizó durante el acto quirúrgico de la punción ovárica para la recuperación de ovocitos bien en el HCSC o en los centros reproductivos colaboradores externos. Por último, el análisis de las muestras se realizó por la Unidad de Análisis e Investigación del Servicio de Inmunología del HCSC en las 24-48 horas primeras horas tras su recogida.

Finalmente, en cuanto a la confidencialidad, el consentimiento informado y el documento informativo anexo al mismo, el registro de los datos personales de los pacientes es absolutamente confidencial de acuerdo a la Ley Española, y serán mantenidos en el anonimato durante la duración del estudio, así como en las publicaciones de los datos obtenidos. La identidad de los pacientes estará codificada, siendo el coordinador del estudio el responsable de los archivos y el acceso a los mismos estará limitado.

5.2.2 Grupos de estudio: definición de casos y controles.

GRUPO CASOS:

A). Paciente con abortos de repetición (AR):

En este estudio se considera AR si se cumplen los siguientes criterios:

- Al menos **dos abortos espontáneos** de causa no filiada.
- Deben ser abortos clínicos, es decir, tras haberse visualizado ecográficamente o cuyos resultados de anatomía patológica confirman que se trata de restos embrionarios/corio-decduales.
- Se excluyen los abortos bioquímicos.

B). Fallo implantación recurrente (FIR):

En este estudio se considera FIR si se cumplen los siguientes criterios:

- Al menos **dos transferencias embrionarias**.
- Los embriones transferidos previamente podrán haberse transferido “desvitrificados” o “frescos”.
- Los embriones deben ser de buena calidad a criterio de Laboratorio de Reproducción asistida.

Los embriones pueden o no haber sido cribados genéticamente (PGT-A). En nuestro centro, perteneciente a la red de hospitales de la medicina pública, el análisis genético preimplantacional no está incluido en cartera de servicios, y por tanto, los embriones procedentes de nuestro laboratorio de FIV no estarán cribados genéticamente y se desconoce su euploidía.

GRUPO CONTROL:

- Mujeres con fertilidad probada, del rango de edad definido por criterios de inclusión, que hayan presentado al menos dos embarazos biológicos con sendos hijos sanos.
- Mujeres que tras haber donado ovocitos, los embriones procedentes de dichos óvulos han dado lugar a embriones de buena calidad a criterio de Laboratorio de Reproducción Asistida (con o sin PGT-A) y tras haber sido transferidos a mujeres receptoras, han dado lugar a embarazo y a RNV. (Nota: según la *Ley de Reproducción Asistida que regula la donación de gametos y preembriones en España, Ley 14/2006*, del 26 de mayo en su artículo 5 refiere que la mujer donante debe tener entre 18 y 35 años).

5.2.3 Criterios de participación en el estudio: criterios de inclusión y exclusión.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Otorgar el consentimiento informado para participar en el estudio observacional.
- Capacidad intelectual suficiente para comprender el CI y firmarlo.
- Edad entre 18 y 45 años (ambos inclusive).
- Cumplir con la definición propuesta para este estudio de *caso- aborto de repetición (AR)*, *caso- fallo de implantación recurrente (FIR)*, o ser paciente control
- No haber recibido ningún tratamiento inmunosupresor en los meses previos ni en el momento actual.
- Contexto de un tratamiento de FIV.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Pacientes con enfermedades autoinmunes o historia de inmunodeficiencia, incluyendo HIV.
- Presencia de *hepatitis B o C* y / o antígeno positivo hepatitis B de superficie (HBsAg) o la prueba de la hepatitis C en el cribado, en el momento actual.
- Pacientes en lactancia materna o con alteraciones asociadas a la hiperprolactinemia.
- Pacientes embarazadas.
- Pacientes portadoras de malformaciones uterinas, o enfermedades ginecológicas como endometriosis o adenomiosis, o enfermedades sistémicas que afecten a la reproducción como trombofilias.
- Abuso de alcohol en el momento actual o durante los 12 meses previos.
- Retirada del consentimiento informado por parte de la paciente.

Pacientes que no cumplan estrictamente los criterios de inclusión, como recibir tratamientos inmunosupresores.

Tabla 3. Definiciones de AR, FIR, Controles y Criterios de inclusión y exclusión para el reclutamiento poblacional de participantes en el estudio con iFRR.

| RECLUTAMIENTO POBLACIONAL PARA ESTUDIO INMUNOLÓGICO EN LÍQUIDO FOLICULAR Y BIOPSIA ENDOMETRIAL DE PACIENTES CON POSIBLE iFRR | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DEFINICIONES | CASO | | CONTROL |
| | ABORTO REPETICIÓN | FALLO IMPLANTACIÓN | FERTILIDAD PROBADA |
| | ≥ 2 abortos clínicos | ≥ 2 transferencias de blastocitos de buena calidad (no precisa DGP). | <ul style="list-style-type: none"> - ≥ 1 hijo biológico previo. - ≥ 2 embarazos (en la misma o en diferentes mujeres receptoras) con ≠ embriones procedentes de su donación de óvulos. |
| | | <ul style="list-style-type: none"> - Donantes de óvulos. - Mujer con hijo previo (no TRA) que hace nueva FIV por cambio pareja o patología tubárica. | |
| CRITERIOS | INCLUSIÓN | <ul style="list-style-type: none"> - Firma del consentimiento informado (para extracción de biopsia endometrial, recuperación de líquido folicular y muestra de sangre). - Mujer: 18-45 años (inclusive). - Haber tenido 1 aborto espontáneo o 1 o más abortos voluntarios. | |
| | EXCLUSIÓN | <ul style="list-style-type: none"> - Historia de inmunodeficiencia, incluyendo VIH. - Presencia de hepatitis B o C y / o antígeno positivo hepatitis B de superficie (HBsAg) o la prueba de la hepatitis C en el cribado, en el momento actual. - Pacientes gestantes, en lactancia materna o hiperprolactinemia. - Abuso de alcohol en el momento actual o durante los 12 meses previos. - Haber tenido dos o más abortos (uno, sí incluye). Se excluyen los abortos voluntarios. - Malformaciones uterinas, endometriosis, adenomiosis, trombofilias. - Retirada del consentimiento informado por parte de la paciente. | |

5.2.4 Recogida de datos poblacionales: variables cuantitativas y cualitativas.

Las variables poblacionales recogidas para este estudio son las siguientes:

VARIABLES CUANTITATIVAS

- Edad. La población a estudio se dividirá en tres rangos etarios: menores a 34, de 35 a 39 años, y mayores de 40 años. El motivo por el que se seleccionan estos puntos de corte es porque a los 35 años se objetiva la disminución de la función ovárica y de la calidad ovocitaria, siendo este proceso declive a partir de los 40 años. La afectación de la calidad de los óvulos repercute en la calidad de los embriones y su probabilidad para conseguir gestación(120).
- Peso.
- IMC. La OMS establece los siguientes rangos: Bajo peso: < 18; Normopeso: 18-25; Sobrepeso: 25-30; Obesidad: > 30(121).
- Número de embarazos propios previos.
- Número de hijos vivos.
- Número de abortos.
- Número de fallos de implantación (Número de embriones transferidos previamente)
- Número de embarazos externos.

VARIABLES CUALITATIVAS.

- Raza.
- Etnia.
- Grupo sanguíneo.
- Cariotipo.
- Fumadora o no fumadora o exfumadora.
- Consumidora de alcohol o no consumidora o consumidora ocasional.
- Consumidora de otras drogas o no consumidora.
- Antecedentes oncológicos.
- Enfermedades/ alteraciones con repercusión en la reproducción o sin repercusión en la reproducción.

- Antecedentes quirúrgicos: sí o no.
- Natural Killers, monocitos y macrófagos y sus subpoblaciones celulares:

En endometrio:

- Linfocitos totales (%), células NK totales, células NK citotóxicas, células NKT totales y células NK reguladoras.
- Subpoblaciones de células NK citotóxicas: células NK TIGIT positivo, células NK CD69 positivo, células NK NKp30 positivo y células NK Perforina positivo.
- Subpoblaciones de células NKT: células NKT TIGIT positivo, células NKT CD69 positivo, células NKT NKp30 positivo, células NKT Perforina positivo.
- Subpoblaciones de células NK reguladoras: células NKreg TIGIT positivo, células NK CD69 positivo, células NK NKp30 positivo, células NKreg Perforina positivo.
- Monocitos totales (%), Monocitos HLA-DR positivo.
- Monocitos clásicos y subpoblaciones de clásicos: Monocitos clásicos CX3CR1 positivo, Monocitos clásicos CD69 positivo, Monocitos clásicos CCR2 positivo, Monocitos clásicos CCR5 positivo.
- Células mieloides: Células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs_M), Células granulocíticas y Células supresoras mieloides derivadas de monocitos (MDSCs_MO).
- Células T CD4 positivo, células T reg CD4 positivo, células T CD8 positivo, células Treg_CD25^{high}.

En líquido folicular:

- Linfocitos totales (%), células NK totales, células NK citotóxicas, células NKT totales y células NK reguladoras.
- Subpoblaciones de células NK citotóxicas: células NK TIGIT positivo, células NK CD69 positivo, células NK NKp30 positivo y células NK Perforina positivo.
- Subpoblaciones de células NKT: células NKT TIGIT positivo, células NKT CD69 positivo, células NKT NKp30 positivo, células NKT Perforina positivo.
- Monocitos totales (%), Monocitos HLA-DR positivo.

- Monocitos clásicos y subpoblaciones de clásicos: Monocitos clásicos CX3CR1 positivo, Monocitos clásicos CD69 positivo, Monocitos clásicos CCR2 positivo, Monocitos clásicos CCR5 positivo.
- Subpoblaciones de monocitos intermedios: monocitos intermedios CX3CR1 positivo, monocitos intermedios CD69 positivo, monocitos intermedios CCR2 positivos, monocitos intermedios CCR5 positivos.
- Células mieloides: Células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs_M), Células granulocíticas y Células supresoras mieloides derivadas de monocitos (MDSCs_MO).
- Células T CD4 positivo, células T reg CD4 positivo, células T CD8 positivo, células Treg_CD25^{high}.

En sangre periférica:

- Linfocitos totales (%), células NK totales, células NK citotóxicas, células NKT totales y células NK reguladoras.
- Subpoblaciones de células NK citotóxicas: células NK TIGIT positivo, células NK CD69 positivo, células NK NKp30 positivo, células NK Perforina positivo y células citotóxicas TIM3 positivo.
- Subpoblaciones de células NKT: células NKT TIGIT positivo, células NKT CD69 positivo, células NKT NKp30 positivo, células NKT Perforina positivo, células NKT TIM3 positivo.
- Subpoblaciones de células NK reguladoras: células NKreg TIGIT positivo, células NKreg CD69 positivo, células NKreg NKp30 positivo, células NKreg Perforina positivo, células NKreg TIM3 positivo.
- Monocitos totales (%), Monocitos HLA-DR positivo.
- Monocitos clásicos y subpoblaciones de clásicos: Monocitos clásicos CX3CR1 positivo, Monocitos clásicos CD69 positivo, Monocitos clásicos CCR2 positivo, Monocitos clásicos CCR5 positivo, Monocitos clásicos CD11b_ACT positivo.
- Subpoblaciones de monocitos intermedios: monocitos intermedios CX3CR1 positivo, monocitos intermedios CD69 positivo, monocitos intermedios CCR2 positivos, monocitos intermedios CCR5 positivos, Monocitos intermedios CD11b_ACT positivo.

- Subpoblaciones de monocitos no clásicos: Monocitos no clásicos CX3CR1 positivo, Monocitos no clásicos CD69 positivo, Monocitos no clásicos CCR2 positivo, Monocitos no clásicos CCR5 positivo, Monocitos no clásicos CD11b_ACT positivo.
- Células mieloides: Células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs_M), Células granulocíticas y Células supresoras mieloides derivadas de monocitos (MDSCs_MO).
- Células T CD4 positivo, células T reg CD4 positivo, células T CD8 positivo, células Treg_CD25^{high}.

5.3 Metodología clínica.

5.3.1 Reclutamiento de pacientes. Inclusión y exclusión

En la Consulta de Reproducción asistida, bien del HCSC o de los centros colaboradores externos, así como desde la consulta de Inmunología Reproductiva del HCSC se realizó una historia clínica completa de cada paciente, con la correspondiente anamnesis para identificar aquellas pacientes que cumplen o no criterios de inclusión para participar en el estudio.

Además, desde la perspectiva ginecológica, a todas ellas se les realiza un estudio reproductivo completo con ecografía ginecológica para recuento folicular y exclusión de patología ovárica/ uterina, así como analítica completa con determinación de hemograma, bioquímica, perfil de coagulación, perfil hormonal y serologías que deben ser aptos para realizar posteriormente un ciclo de fecundación in vitro en cuya punción ovárica se recogerán las muestras de líquido folicular, endometrio y sangre periférica para analizar los biomarcadores inmunológicos posiblemente asociados a nuestro estudio de iFRR.

A todas aquellas pacientes que cumplan criterios de inclusión, se les explica detalladamente y entregan los documentos de Consentimiento informado y Anexo del Consentimiento informado (ANEXOS I y II). Se les entrega para su lectura completa, y en la siguiente visita a consulta de medicina reproductiva se resuelven las posibles dudas y se procede a la firma en caso de que estén de acuerdo en participar en el proyecto.

Las pacientes son informadas con detalle de las características del estudio en el que participan, especificándose que ellas no serán conocedoras de los resultados de sus muestras, y que por tanto, no obtendrán beneficio personal alguno de la participación en este proyecto de investigación.

Por otro lado, en la práctica clínica diaria de la medicina reproductiva, es habitual utilizar como herramientas de trabajo la vitrificación de embriones. En algunos contextos clínicos, como el riesgo de hiperestimulación ovárica, se hace necesario realizar la vitrificación de todos los embriones o “freeze all” difiriendo la transferencia hasta un ciclo en el que las condiciones clínicas de la paciente sean favorables. A las pacientes participantes en este proyecto se les explica insistentemente que la biopsia endometrial para el estudio de biomarcadores inmunológicos no es compatible con una posible transferencia de embriones en fresco, y por tanto, los embriones deben ser vitrificados, medida que no se aparta de la práctica habitual de las Unidades de reproducción asistida y que no implica perjuicio en el éxito global del tratamiento. Este aspecto es importante puesto que habrá pacientes que al no poder recibir transferencia “en fresco” decidan no participar en el estudio como más adelante se detalla.

Se debe informar a las pacientes de que no hay otras pruebas o estudios adicionales para ellas más que los requeridos en la práctica clínica habitual.

A la paciente se le entrega el Anexo del consentimiento informado y una copia del Consentimiento informado, mientras que el original se custodia por el equipo de investigación.

Tabla 4. Participación de pacientes (casos y controles) en el estudio iFRR.

| PACIENTES | CONTROLES | FIR | AR |
|---------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| CANDIDATAS PROPUESTAS | 16 | 15 | 12 |
| PACIENTES RECLUTADAS Y PARTICIPANTES | 13 | 13 | 7 |
| % PARTICIPACIÓN | 81.25% | 86.67% | 58.33% |

Teniendo en cuenta la cohorte total de pacientes a las que se les ofreció participar en el estudio, la continuidad en el proyecto fue menor. Entre los motivos de pérdida de pacientes destacan los siguientes:

- En el grupo de controles: problemas técnicos en el laboratorio de citometría. Por motivos infraestructurales, no se pudo procesar de manera satisfactoria las muestras de tres de las pacientes controles a las que se les había ofrecido el estudio y ellas habían decidido participar. En conclusión, en el grupo control se trabajó con 16 muestras iniciales y 3 se perdieron, en total 13 muestras útiles, lo que equivale a una participación del 81,25%.
- En el grupo casos FIR: dos de las pacientes a las que se le había propuesto participar en el estudio solicitaron en la medida de lo posible la transferencia embrionaria en fresco, la cual es incompatible con la biopsia de endometrio. Estas pacientes directamente no fueron reclutadas. Dado que de las 15 pacientes FIR propuestas, 13 se incluyeron y continuaron en el estudio hasta el final, diremos que 2 se perdieron y que la participación en este grupo fue del 86.67%.
- En el grupo casos AR: en este grupo es donde más destaca la caída de la participación. En tres de las cinco pacientes el motivo fue que se quedaron embarazadas espontáneamente tras la firma del CI y el inicio del tratamiento de estimulación ovárica para la FIV; y en los otros dos casos fue, porque habiendo iniciado el tratamiento de estimulación ovárica para la recuperación de ovocitos, revocaron el CI dado que estas pacientes solicitaban la transferencia embrionaria “en fresco”. En total se perdieron 7 pacientes, siendo la participación final en este grupo del 58,33%.

A todas las candidatas se les explica el proyecto de investigación en consulta de Medicina Reproductiva o de Inmunología Reproductiva, donde se le hace entrega del Consentimiento informado y el Anexo al consentimiento informado. En las sucesivas

siguientes consultas la paciente comunicará si desea o no participar, y en caso positivo entrega el CI que será custodiado por el Equipo Investigador.

En el momento en que la paciente participante en el estudio inicia el tratamiento hormonal para el ciclo de FIV (unos 10-12 días) el equipo de Ginecología reproductiva informa al equipo de Inmunología de la llegada de nuevas muestras para procesar. Dicha información se confirma con la programación quirúrgica de la punción ovárica para la preparación de infraestructuras por parte del Equipo de Inmunología/ Análisis (margen de unas 48 horas).

5.3.2 Obtención de las muestras: quirófano y laboratorio de Reproducción Asistida.

La intervención para la recuperación de ovocitos es realizada por el equipo de Ginecología de la Unidad de Medicina Reproductiva en el quirófano destinado a FIV.

El equipo de Inmunología – Unidad de análisis e investigación es informado previamente, unas 48-72 horas antes.

El ginecólogo realiza la punción ovárica bilateral bajo sedación y con control ecográfico para la recuperación del líquido folicular a través de un sistema específico de aspiración, el cual se almacena en tubos de ensayo estériles en una gradilla sobre una placa térmica a 37°C.

Del líquido folicular obtenido en la punción, unos 20 mL habitualmente, se destinan 2-5 ml del primer tubo recuperado para evitar la contaminación hemática. Tras haber separado los ovocitos, dicho líquido folicular se conservará en vasos de orina estériles (de 120 mL).

Tras la realización de la punción ovárica, el ginecólogo realiza también la toma de la biopsia de endometrio, mediante curetaje o *scratching*, con cánula de Cornier, entrando a la cavidad uterina a través del cérvix y sin precisar control ecográfico. El material se

recoge un vaso de orina estéril de 120 mL “en fresco”, sin ningún otro medio complementario (suero, formol, etc.).

El equipo de anestesia que realiza la sedación de la paciente para la punción ovárica se encarga de coger la muestra de sangre periférica (tubo malva de 5 ml con EDTA). Dicha muestra, junto con la de sangre periférica, se guarda en frío (en nevera a 4°C), mientras se espera el procesamiento del líquido folicular.

El equipo de embriólogas del Laboratorio de Reproducción Asistida procesa la muestra de líquido folicular, recuperando los ovocitos para la realización de la técnica de FIV, y almacenando el líquido folicular en un vaso de orina estéril cerrado.

Una vez que se tienen las tres muestras, son entregadas en mano junto con el consentimiento informado original, en la Unidad de análisis e Investigación del Servicio de Inmunología para su procesamiento en las 2-3 horas siguientes.

En los casos en los que en el mismo día de la recuperación de las muestras éstas no puedan ser procesadas, todas ellas se conservan y custodian en nevera a 4°C. En el caso de las muestras de endometrio, se debe hidratar la misma con suero fisiológico.

El equipo de investigación decidió por consenso no procesar las muestras pasadas 24 horas de su extracción para no perder homogeneidad en la cohorte.

5.3.3 Evolución posterior de las pacientes.

Tras la recuperación de las muestras, la paciente prosigue su tratamiento de FIV con normalidad.

A corto plazo, el mismo día de la punción ovárica la paciente recibe el alta médica y puede hacer vida con normalidad, salvo algún caso excepcional. Las pacientes participantes no van a presentar ningún signo/síntoma diferente al del proceso habitual por haber recogido las muestras para el estudio.

A medio plazo, los embriones obtenidos del proceso de fertilización de los ovocitos en el Laboratorio de Embriología se vitrifican hasta el siguiente período menstrual en el que el médico de reproducción asistida dé el visto bueno a la paciente para iniciar la preparación del endometrio y recibir la transferencia embrionaria.

5.4 Metodología analítica.

5.4.1 Determinación biomarcadores inmunofenotípicos en endometrio, líquido folicular y sangre periférica

A continuación se detalla el listado de biomarcadores analizados en células NK y monocitos/ macrófagos para estudiar su relación con el iFRR en los tres tejidos descritos, endometrio, líquido folicular y sangre periférica.

Se describen previamente, en el apartado de “Recogida de datos poblacionales: variables cuantitativas y cualitativas”. En variables cualitativas.

La siguiente tabla hace un resumen de todos los biomarcadores analizados por tejido.

Tabla 5. Comparación de biomarcadores inmunofenotípicos analizados en cada tejido.

| BIOMARCADOR | ENDOMETRIO | LIQUIDO FOLICULAR | SANGRE PERIFERICA |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Linfocitos (%) Células NK totales (%) Células NK citotóxicas Células NKT Células NK reguladoras | Presentes | Presentes | Presentes |
| Subpoblaciones de NK reguladoras | Cél. NKreg TIGIT+ Cél. NKreg CD69+ Cél. NKreg NKp30+ Cél. NKreg Perforina+ | Cél. NKreg TIGIT+ Cél. NKreg CD69+ Cél. NKreg NKp30+ Cél. NKreg Perforina+ | Cél. NKreg TIGIT+ Cél. NKreg CD69+ Cél. NKreg NKp30+ Cél. NKreg Perforina+ Cél. NK reg TIM3+ |
| Subpoblaciones de NK citotóxicas | Cél. NKcit TIGIT+ Cél. NKcit CD69+ Cél. NKcit NKp30+ Cél. NKcit Perforina+ | Cél. NKcit TIGIT+ Cél. NKcit CD69+ Cél. NKcit NKp30+ Cél. NKcit Perforina+ | Cél. NKcit TIGIT+ Cél. NKcit CD69+ Cél. NKcit NKp30+ Cél. NKcit Perforina+ Cél. NKcit TIM3+ |
| Monocitos (%) Monocitos HLA-DR+ | Presentes | Presentes | Presentes |

| BIOMARCADOR | ENDOMETRIO | LIQUIDO FOLICULAR | SANGRE PERIFERICA |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Monocitos clásicos Subpoblaciones de clásicos | Mo clásicos CX3CR1+ Mo clásicos CD69+ Mo clásicos CCR2+ Mo clásicos CCR5+ | Mo clásicos CX3CR1+ Mo clásicos CD69+ Mo clásicos CCR2+ Mo clásicos CCR5+ | Mo clásicos CX3CR1+ Mo clásicos CD69+ Mo clásicos CCR2+ Mo clásicos CCR5+ Mo clásicos CD11b_ACT+ |
| Monocitos intermedios Subpoblaciones de intermedios | No determinado | Mo intermedios CX3CR1+ Mo intermedios CD69+ Mo intermedios CCR2+ Mo intermedios CCR5+ | Mo intermedios CX3CR1+ Mo intermedios CD69+ Mo intermedios CCR2+ Mo intermedios CCR5+ Mo intermedios CD11b_ACT+ |
| Monocitos No clásicos Subpoblaciones de no clásicos | No determinado | No determinado | Mo no clásicos CX3CR1+ Mo no clásicos CD69+ Mo no clásicos CCR2+ Mo no clásicos CCR5+ Mo no clásicos CD11b_ACT+ |
| Células mielodes Células MDSCs_M Células granulocíticas Células MDSCs_MO. | Presentes | Presentes | Presentes |
| Células T CD4+ Células TregCD4+ Células T CD8+ Células Treg_CD25^{high} | Presentes | Presentes | Presentes |

5.4.2 Procesamiento/preparación de muestras: endometrio, líquido folicular y sangre periférica.

Todas las muestras recuperadas para este estudio fueron analizadas por la sección de Análisis e Investigación del Servicio de Inmunología, en casi el total de las ocasiones por el mismo facultativo, el doctor Nabil Shubi-Issa.

Los protocolos aplicados son diferentes para cada tipo de muestra, tal y como se detalla a continuación.

A. Procesamiento y marcaje de biopsia de endometrio.

A continuación se detallan los pasos del tratamiento de las muestras de endometrio.

Recepción de la muestra.

El tejido endometrial ha sido recogido en vasos estériles de 120 ml (de orina).

Las muestras de tejido se lavan con suero salino PBS estéril para evitar la contaminación con sangre y moco.

Preparación del medio completo:

Se prepara el medio RPMI (medio *Roswell Park Memorial Institute*, utilizado habitualmente para cultivo de células humanas o tejidos aislados) con 0.1 mg/ml de DNasa tipo I y 1 mg/ml de Colagenasa tipo IV (medio completo).

Digestión del tejido.

Se transfieren las muestras del tejido endometrial a un tubo Falcon de 50 ml que contiene 15 mL del medio completo previamente mencionado.

Los tubos con las muestras se incuban durante 30 minutos en un baño a 37°C, agitándolos ocasionalmente para facilitar la digestión enzimática (“agitación intermitente”).

Filtración y Centrifugación.

Posteriormente se recoge el sobrenadante resultante, el cual se pasa por un Strainer de 70 μm y se deposita en un tubo Falcon de 15 o 10 ml.

Las células filtradas se centrifugan durante 8 minutos a 1600 revoluciones por minuto (rpm), para posteriormente resuspender el pellet celular (la muestra) en 250-300 μL de solución de Buffer MACS[®] PBS + BSA azida (solución salina tamponada con fosfato -PBS- pH 7.2, 0.5% albúmina de suero bovino -BSA-).

Marcaje de Superficie.

A continuación se toman 200 μL de la suspensión anterior para realizar el marcaje de superficie, poniendo 4 μL de *cada anticuerpo* en los 200 μL . Se deja incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad.

Tras la incubación, se añade un buffer de lisis de eritrocitos (buffer RBL de la marca BD Biosciences[®]) y se deja incubar durante otros 15 minutos en las mismas condiciones.

Lisis y Lavado.

Finalmente se centrifuga durante otros 5 minutos a 1600 rpm.

El siguiente paso consiste en decantar el sobrenadante y lavar las células con medio Buffer FACS FLOW de BD Biosciences[®] para posteriormente volver a centrifugar durante 5 minutos a 1600 rpm (se realizan dos lavados)

Preparación para Citometría.

Por último, la muestra centrifugada se resuspende en 350 μL y las células quedan preparadas para pasar por el citómetro.

Tabla 6. Marcadores y fluorocromos para NKs y macrófagos en endometrio.

| | Marcador | Fluorocromo | Proveedor | Clon |
|------------|-----------|--------------|----------------|----------|
| NK | CD45 | APC-Cy7 | BD Biosciences | 2D1 |
| | CD56 | BV510 | BD Biosciences | NCAM16.2 |
| | CD16 | FITC | BD Biosciences | 3G8 |
| | CD3 | PerCP Cy5.5 | BD Biosciences | SK7 |
| | TIGIT | PE | Biolegend | A15153G |
| | NKp30 | AF647/ APC | BD Biosciences | p30-15 |
| | CD69 | PE Cy7 | BD Biosciences | FN50 |
| | PERFORINA | BV421 | BD Biosciences | δG9 |
| MACRÓFAGOS | CD45 | PerCP-Cy 5.5 | BD Biosciences | 2D1 |
| | HLADR | BV510 | BD Biosciences | G46-6 |
| | CD14 | APC-Cy7 | BD Biosciences | MΦP9 |
| | CD16 | FICT | BD Biosciences | 3G8 |
| | CD69 | PE-Cy7 | BD Biosciences | FN50 |
| | CCR5 | BV421 | BD Biosciences | 3A9 |
| | CX3CR1 | PE | Biolegend | 2A9-1 |
| | CCR2 | APC | BD Biosciences | 48607 |

LEYENDA:

- **Proveedor:** marca comercial.
- **Clon:** especificidad del Ac (necesario para la replicación del estudio hacia el epítipo de una diana).

B. Procesamiento y marcaje del líquido folicular.

A continuación se detallan los pasos del tratamiento de las muestras de líquido folicular que es discretamente diferente al de endometrio.

Filtración y Centrifugación.

El líquido folicular recibido en un envase de orina estéril se transfiere a tubos Falcon de 50 ml a través de un Strainer de 70 μm , para a continuación realizar un centrifugado de las células durante 8 minutos a 1600 rpm.

A continuación, se decanta el sobrenadante y las células se resuspenden en un volumen adecuado de Buffer (unos 200 μl por cada población celular a marcar).

Marcaje de Superficie.

Se cogen 200 μl de la suspensión celular para realizar el marcaje de superficie, añadiendo 4 μl de cada anticuerpo a dichos 200 μl de suspensión celular.

Se deja incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad.

Tras es primera incubación, se añade un Buffer de lisis de eritrocitos y se deja de nuevo incubar durante 15 minutos en las mismas condiciones.

Lisis y Lavado.

Se centrifugan de nuevo las células durante 5 minutos a 1600 rpm, para posteriormente decantar el sobrenadante y lavar las células con Buffer FACS Flow.

El lavado se repite y se realiza una segunda centrifugación durante 5 minutos a 1600 rpm.

Preparación para Citometría.

Finalmente, las células se resuspenden en 350 μl de Buffer y se procesaron mediante citometría de flujo.

Tabla 7. Anticuerpos y fluorocromos para NKs y macrófagos en líquido folicular.

| | Marcador | Fluorocromo | Proveedor | Clon |
|-------------------|------------------|--------------------|------------------|-------------|
| NK | CD45 | APC-Cy7 | BD Biosciences | 2D1 |
| | CD56 | BV510 | BD Biosciences | NCAM16.2 |
| | CD16 | FITC | BD Biosciences | 3G8 |
| | CD3 | PerCP Cy5.5 | BD Biosciences | SK7 |
| | TIGIT | PE | Biolegend | A15153G |
| | NKp30 | AF647/ APC | BD Biosciences | p30-15 |
| | CD69 | PE Cy7 | BD Biosciences | FN50 |
| | PERFORINA | BV421 | BD Biosciences | δG9 |
| MACRÓFAGOS | CD45 | PerCP-Cy 5.5 | BD Biosciences | 2D1 |
| | HLADR | BV510 | BD Biosciences | G46-6 |
| | CD14 | APC-Cy7 | BD Biosciences | MΦP9 |
| | CD16 | FICT | BD Biosciences | 3G8 |
| | CD69 | PE-Cy7 | BD Biosciences | FN50 |
| | CCR5 | BV421 | BD Biosciences | 3A9 |
| | CX3CR1 | PE | Biolegend | 2A9-1 |
| | CCR2 | APC | BD Biosciences | 48607 |
| | CX3CR1 | PE | Biolegend | 2A9-1 |
| | CCR2 | APC | BD Biosciences | 48607 |

A. Procesamiento y marcaje de la sangre periférica.

Recogida de muestras.

Las muestras de sangre periférica se obtienen por vía venosa, y se recogen en tubos con EDTA de 5 mL al inicio, durante o inmediatamente después de la punción ovárica para la recuperación del líquido folicular y la biopsia de endometrio para su procesamiento en las 2-3 horas siguientes a su recogida.

Filtración y Centrifugación.

No procede.

Marcaje.

Se marcan 100 μ L de sangre con cada uno de los anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio, divididos en 4 tubos que permite la evaluación de las *células NK* y de los *monocitos* a través de un panel de anticuerpos por citometría de flujo multiparamétrica.

Los *leucocitos* de sangre periférica se tiñen con los anticuerpos monoclonales detallados en la siguiente tabla de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Lisis y Lavado.

Tras una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad, las muestras se someten a lisis con 2 mL de tampón de lisis (Lysis Solution, BD Biosciences®) durante otros 10 minutos en las mismas condiciones (oscuridad y temperatura ambiente).

Posteriormente, se centrifuga de nuevo las células durante 5 minutos a 1600 rpm, para posteriormente decantar el sobrenadante y lavar las células con Buffer FACS Flow.

El lavado se repite y se realiza una segunda centrifugación durante 5 minutos a 1600 rpm seguido de una segunda centrifugación con tampón (FACSFlow, BD Biosciences®).

Preparación para Citometría.

Finalmente, las células se resuspenden en 350 μ l de Buffer y se procesaron mediante citometría de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) tras realizar los controles y calibraciones necesarios, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor comercial.

Los datos se analizaron en el software de análisis de datos FlowJo, LLC (versión 10.6.1; Becton Dickinson). Las poblaciones celulares se dividieron en tres tubos para la

identificación de células NK, monocitos y células T reguladoras. Los paneles de anticuerpos utilizados en cada tubo se resumen en la Tabla X. Asimismo, se utilizó un tubo sin etiquetar como control negativo y FMO para cada anticuerpo.

Tabla 8. Anticuerpos y Fluorocromos utilizados como marcadores para sangre periférica.

| | Anticuerpo | Fluorocromo | Proveedor | Clon |
|-----------|------------|----------------------|----------------|----------|
| NK | CD56 | BV510 | BD Biosciences | NCAM16.2 |
| | TIGIT | PE | Biolegend | A15153G |
| | NKp30 | Alexa Fluor (AF) 647 | BD Biosciences | p30-15 |
| | Perforina | BV421 | BD Biosciences | δG9 |
| | TIM3 | APC Cy7 | Biolegend | F38-2E2 |
| | CD3 | PerCP Cy5.5 | BD Biosciences | SK7 |
| | CD69 | PE Cy7 | BD Biosciences | FN50 |
| | CD16 | FITC | BD Biosciences | 3G8 |
| MONOCITOS | CCR2 | Alexa Fluor 647 | BD Biosciences | 48607 |
| | CCR5 | BV421 | BD Biosciences | 3A9 |
| | CX3CR1 | PerCP Cy5.5 | Biolegend | 2A9-1 |
| | HLA-DR | BV510 | BD Biosciences | G46-6 |
| | CD16 | FITC | BD Biosciences | 3G8 |
| | CD69 | PE Cy7 | BD Biosciences | FN50 |
| | CD14 | APC Cy7 | BD Biosciences | MΦP9 |
| | CD11b ACT | PE | Biolegend | CBRM1/5 |

5.4.3 Citometría de Flujo Multiparamétrica (CFM).

La Citometría de Flujo Multiparamétrica (CFM) es una técnica avanzada usada en biología y medicina para analizar rápidamente características físicas y químicas de células en suspensión. Permite examinar miles de células por segundo y es crucial para estudios de poblaciones celulares complejas.

Su principio de funcionamiento es que las células suspendidas en fluido son inyectadas en un tubo estrecho donde pasan individualmente por un láser. El láser dispersa luz en distintas direcciones, proporcionando datos sobre el tamaño (dispersión frontal, FSC) y la complejidad interna (dispersión lateral, SSC) de las células. Además, los marcadores fluorescentes específicos permiten identificar características moleculares cuando son excitados por el láser y detectados por fotomultiplicadores en diferentes canales.

Para realizar el análisis se deben configurar determinados datos del citómetro, como voltaje y compensación, que se ajustan para optimizar la sensibilidad y precisión. En estudios complejos, se seleccionan paneles de anticuerpos y fluorocromos adecuados para detectar múltiples marcadores sin interferencia, maximizando el brillo para detectar células con marcadores menos abundantes.

El gating permite seleccionar subpoblaciones celulares específicas, estableciendo umbrales que diferencian entre señales positivas y de fondo. Los controles de isotipo, negativos no teñidos y FMO (Fluorescence Minus One) se utilizan para definir la fluorescencia de fondo y ajustar umbrales, mejorando la precisión en la detección de marcadores específicos.

La CFM permite así un análisis detallado de subpoblaciones celulares en tiempo real, siendo una herramienta indispensable en investigaciones biomédicas avanzadas.

5.4.4 Diseño del panel para citometría de flujo y Estrategias de gating.

A. Descripción del panel de citometría para este estudio.

Este estudio se basa en la hipótesis de que las mujeres con fallo reproductivo recurrente bien en forma de AR o FIR, presentan un perfil inflamatorio diferente a las pacientes con fertilidad probada o controles sanos.

El estudio se centra en el análisis de **NK y monocitos/macrófagos** por ser las células del sistema innato más relacionadas con la inflamación.

Con esos biomarcadores ya seleccionados el equipo de Análisis/ Investigación diseña el panel para la citometría de flujo, que realiza la selección de los fluorocromos. A modo de información, es importante para la selección de los fluorocromos la abundancia del marcador en las células revisadas, el brillo del fluorocromo y que no se solapen los espectros de emisión de los fluorocromos.

B. Estrategias de gating para NK y monocitos en endometrio, líquido folicular y sangre periférica.

Como se describe previamente, el gating es el proceso de seleccionar subpoblaciones de células en base a sus características medidas.

Los pasos comunes incluyen:

- Gating Inicial para eliminar eventos no celulares (ruido) usando parámetros como *FSC* y *SSC* o poblaciones caracterizadas en sangre.
- Identificación de Subpoblaciones: Usar combinaciones de marcadores específicos para definir subpoblaciones celulares.
- Establecimiento de Señal Positiva o Negativa para un Marcador: Determinar si una célula es positiva o negativa para un marcador específico. Este proceso implica haber establecido un umbral que diferencie claramente entre la señal de fondo (negativa) y la señal específica (positiva).

Se capturó un mínimo de 100.000 eventos dentro de la región de linfocitos/monocitos, caracterizados por su tamaño (Forward Scatter, *FCS*) y complejidad (Side Scatter, *SSC*). Se diseñaron varias estrategias de selección en función de la población específica examinada, incluidas las células NK (figura) y los monocitos (figura) que se describen a continuación.

ENDOMETRIO.

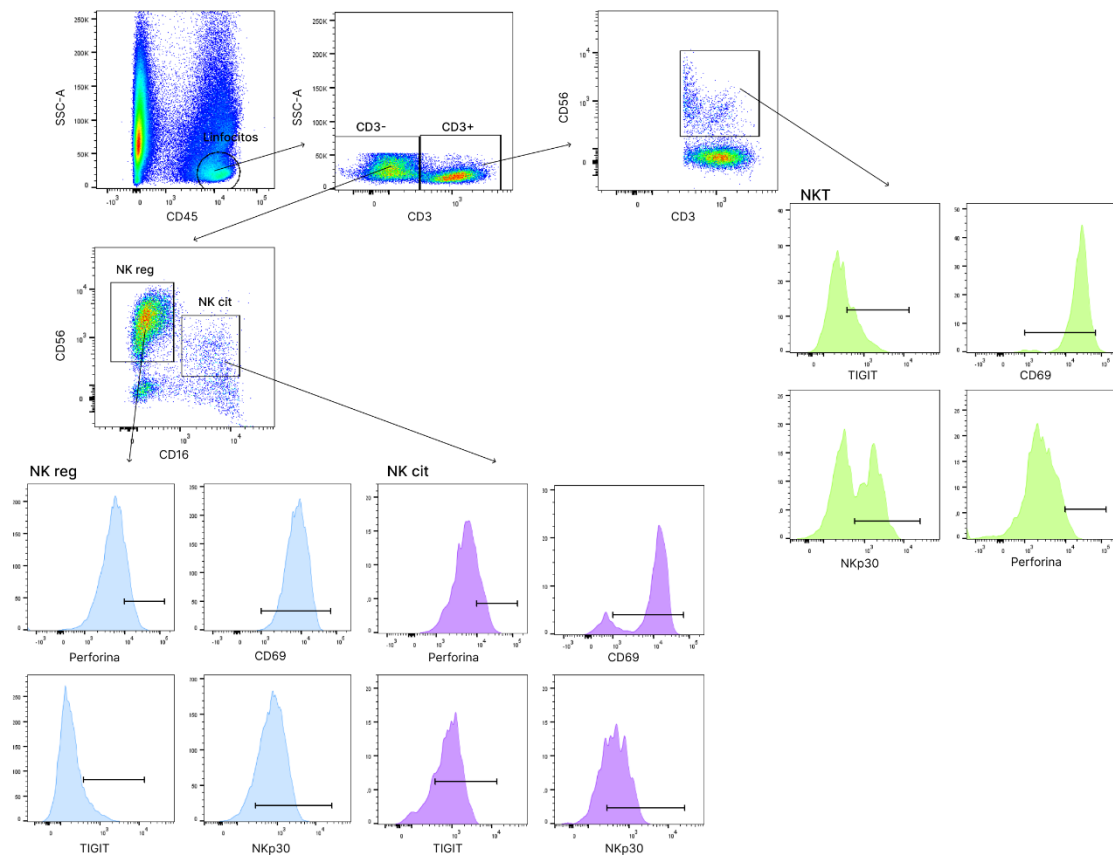


Figura 2. Estrategia de gating para endometrio.

Descripción.

En la primera gráfica se observa la detección de leucocitos en la muestra de endometrio gracias al marcaje con CD45 (+), siendo la población de linfocitos los que presenta un SSC-A bajo (en color azul celeste, señalado por un gate con forma de círculo). Lo que queda en azul oscuro son otras poblaciones como monocitos, macrófagos, etc. que en este momento no se van a estudiar.

A través de la segunda gráfica la citometría indica qué población de linfocitos son CD3+ (positivos) y CD3 – (negativos) ambos con un SSC-A bajo.

En la tercera gráfica se muestran los CD3+ que a su vez son CD56+ marcados por el gate en forma de cuadrado (en azul oscuro), correspondiendo estos últimos a la población de

NKT. Mediante histogramas en verde claro se representa la expresión de los diferentes receptores para las NKT, diferenciándose cuatro biomarcadores: TIGIT, CD69, NKp30 y Perforina. La raya del histograma representa el punto de corte a partir del cual el resultado es positivo.

En la cuarta gráfica vemos como dentro de los CD3 negativos se encuentran los CD16- (negativos) y CD56+ (positivos); y los CD-16 positivos con CD-56 positivos.

Los CD16- (negativos) y CD56+ (positivos) están marcados por un gate cuadrado con tonos azul oscuro, verde flúor y rojo corresponden a los NKreg, y mediante histogramas azules (azul claro) se representan los biomarcadores TIGIT, CD69, NKp30 y Perforina (de nuevo la raya establece el punto de corte para un resultado positivo).

Por otro lado, se observan los CD-16 positivos con CD-56 positivos marcados por un gate cuadrado y en color azul oscuro, que corresponden a los NKcyt con cuatro histogramas en morado que representan sus subpoblaciones TIGIT, CD69, NKp30 y Perforina (de nuevo la raya establece el punto de corte para un resultado positivo).

LÍQUIDO FOLICULAR.

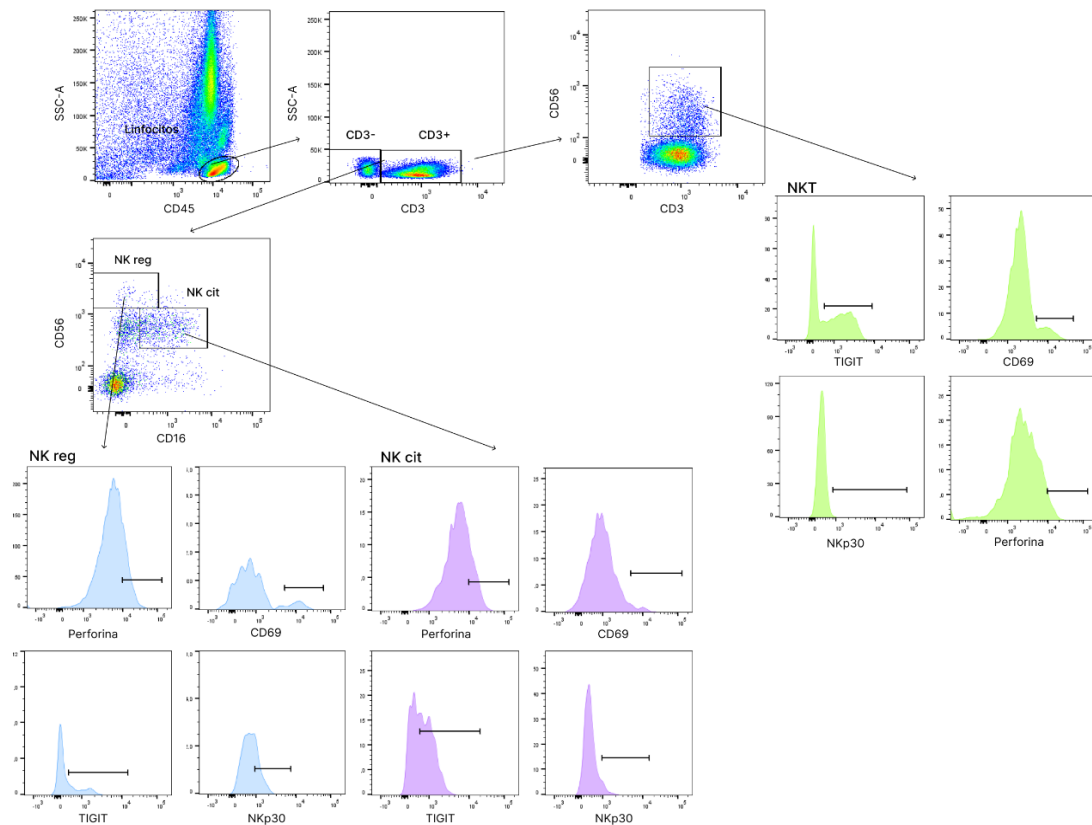


Figura 3. Estrategia de gating para líquido folicular.

Descripción

En la primera gráfica se ve como en la muestra de líquido folicular se encuentran los leucocitos gracias al marcador CD45, siendo los linfocitos los que presentan un patrón CD45+ y SSC-A bajo (verde flúor y rojo) marcados con un gate circular.

De dichos linfocitos, a través de la segunda gráfica se diferencian dos subpoblaciones. Los CD3+ y los CD3 -, ambos con un SSC-A bajo.

La tercera gráfica muestra como dentro de los CD3 positivos con CD56 positivo/intermedio en color azul marino y marcado con un gate cuadrado se encuentra la población de NKT representándose a través de histogramas en verde claro las subpoblaciones de TIGIT, CD69, NKp30 y perforina. La raya representa el punto de corte a partir del cual se considera positivo.

Finalmente, la cuarta gráfica señala como dentro de los CD3 negativos se diferencian los CD16 negativos y CD56 + que teñidos en azul marinos y marcados con un gate cuadrado corresponde a las NKreg con cuatro subpoblaciones que corresponden a TIGIT, CD69, NKp30 y perforina, todas ellas representadas a través de histogramas en azul claro y siendo la raya el punto de corte para discriminar lo positivo.

También en esta cuarta gráfica se distinguen los CD16 intermedios con CD56 +/intermedios en azul marino y con un gate rectangular que corresponden a los NKcyt con cuatro subpoblaciones señaladas a través de histogramas morados para TIGIT, CD69, NKp30 y perforina y la raya representa el punto de corte para discriminar lo positivo.

SANGRE PERIFÉRICA.

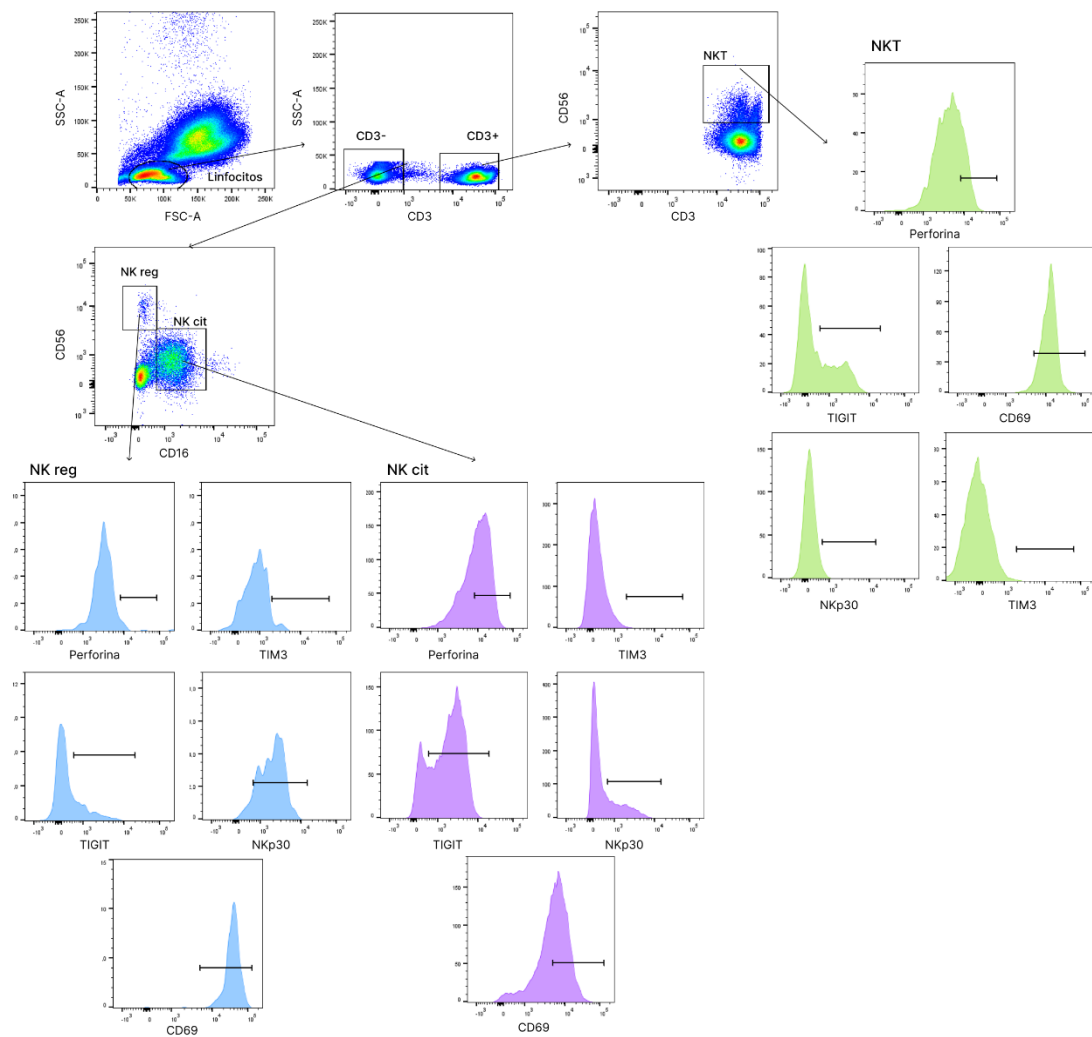


Figura 4. Estrategia de gating para sangre periférica.

Descripción

La primera gráfica muestra como en la sangre periférica se diferencia inicialmente el grupo de los linfocitos caracterizado por tener un FSC-A bajo y un SSC-A bajo (en color rojo y marcados con un gate redondeado).

A través de la segunda gráfica se ve como dentro de los linfocitos, se distinguen los CD3 negativos y positivos. Dentro de éstos, en la tercera gráfica se representa que hay una población con CD3+ y CD56 + en azul marino y marcados con un gate cuadrado que corresponde a los NKT con cinco subpoblaciones identificadas mediante histogramas verde claro para TIGIT, CD69, NKp30, perforina y TIM3. La raya en el histograma representa el punto de corte para discriminar lo positivo.

En la cuarta gráfica se observa como dentro de los CD3 negativos con bajo SSC-A se encuentran los CD16 negativos con CD56 positivos en color azul marino y señalados por un gate cuadrado que corresponde a los NKreg con 5 subpoblaciones: TIGIT, CD69, NKp30, perforina y TIM3 representadas por histogramas en color azul claro, y siendo la raya el punto de corte para positivo.

También la cuarta gráfica muestra los CD16 positivo/ intermedio con CD56 positivo/ intermedio que corresponde a las NKcyt, color verde flúor y azul marino dentro de un gate cuadrado, y ahí se diferencian 5 subpoblaciones representadas por histogramas morados para TIGIT, CD69, NKp30, perforina y TIM3, siendo la raya el punto de corte para discriminar lo positivo.

5.5 Metodología estadística.

Se trata de un estudio prospectivo observacional de casos y controles, con dos cohortes: una de pacientes con fallo reproductivo recurrente de posible origen inflamatorio (iFRR), dentro de la cual se diferencian dos subgrupos: pacientes con abortos de repetición, AR, y pacientes con fallo de implantación recurrente, FIR; y otra de controles sanos, formada por mujeres sin patología reproductiva y fertilidad probadas según los criterios de inclusión/exclusión descritos en el apartado correspondiente.

En el análisis descriptivo de los datos las variables cualitativas se resumirán con su distribución de frecuencias.

Las variables cuantitativas con distribución simétrica se presentarán con media y desviación estándar, ya que estos valores reflejan mejor el centro y la dispersión de los datos; mientras que para las variables de distribución asimétrica se utilizan la mediana y el rango intercuartílico porque la mediana es la medida más robusta para el centro y el rango intercuartílico (Q1-Q3) muestra la dispersión de los datos sin verse influido por valores extremos. En nuestro caso la distribución de las variables es no normal.

El análisis de asociación entre los grupos de estudio (controles y FIR) y las variables independientes, se analizará a través del test Mann-Whitney ya que el tamaño de cada grupo es pequeño. El grupo de AR solo se mostrará descriptivamente ya que es demasiado pequeño para tenerlo en cuenta en contraste de hipótesis. Se considerará un nivel de significación del 5%.

Respecto al análisis de correlación se aplica el Coeficiente de Spearman, ρ (ro), con un nivel de significación positivo si el p valor es menor a 0,05 , y muy significativo si p valor menor 0,01. Los valores varían entre -1 y 1, interpretándose de la siguiente forma:

- Un valor positivo indica que a medida que una variable aumenta, la otra también tiende a aumentar, y cuanto más se acerque a uno, más correlación hay.
- Un valor negativo indica que cuando una variable aumenta, la otra tiende a disminuir, y cuanto más se acerque a menos 1, mayor es la diferencia entre esas variables.
- Un valor cercano a 0 indica poca o ninguna correlación.

Tabla 9. Coeficiente de correlación de Spearman: valores e interpretación.

| NIVELES DE CONFIANZA | |
|----------------------|---------------------------------|
| VALORES | INTERPRETACIÓN DE LA ASOCIACION |
| De 0 a 0,2 | POBRE |
| De 0,2 a 0,4 | BAJA |
| De 0,4 a 0,6 | MODERADA-BAJA |
| De 0,6 a 0,8 | MODERADA-ALTA |
| De 0,8 a 1 | FUERTE |

El software estadístico utilizado es IBM SPSS Statistics v26.

RESULTADOS

6. RESULTADOS.

6.1 Datos demográficos de la población: análisis descriptivo, global y por grupos.

6.1.1 Análisis descriptivo de la población del estudio desde su perspectiva global.

El estudio incluye un total de 33 mujeres, de las cuales 13 son controles sanos con fertilidad probada (39,4%) y 20 presentan fallo reproductivo de origen inflamatorio (iFRR). Esta cohorte está dividida en dos grupos: el de fallo de implantación recurrente (FIR), con 13 mujeres (39,4%), y el de aborto de repetición (AR) con 7 pacientes (21,21%).

Tabla 9. Total y porcentaje de participantes

| PACIENTE | N (%) |
|----------|-------------|
| FIR | 13 (39,40%) |
| AR | 7 (21,20%) |
| CONTROL | 13 (39,40%) |

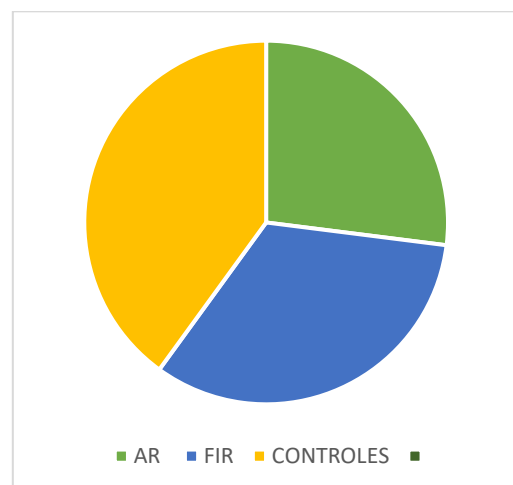


Figura Distribución población reclutada.

Datos de la población total por característica demográfica estudiada.

- Respecto a la edad:

El 46.9% de las mujeres son menores de 34 años. Un 31.3% tienen entre 35 y 39 años, y un 21.9% son mayores de 40 años.

La menor edad registrada son 18 años, y la mayor 43 años.

La edad media para los controles/donantes es 24,53 años; para los FIR, 37,9 años, y para los para los AR, 39,14 años.

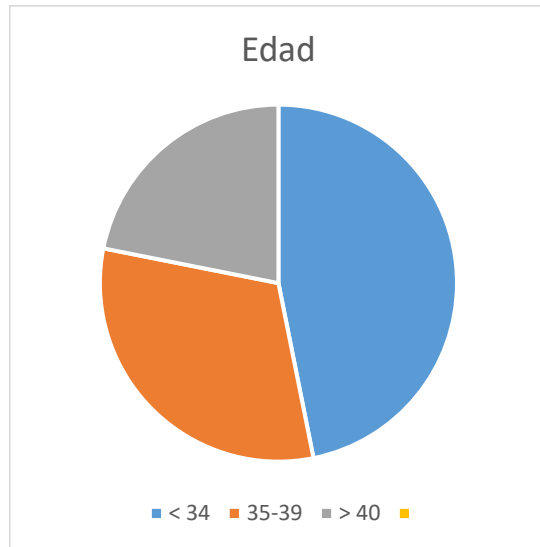


Figura distribución por edad.

- Respecto a la raza (según la clasificación americana):

Un 81.8% de las mujeres participantes son caucásicas.

Un 12.1% son hispanoamericanas,

Un 3% negras y un 3% asiáticas.

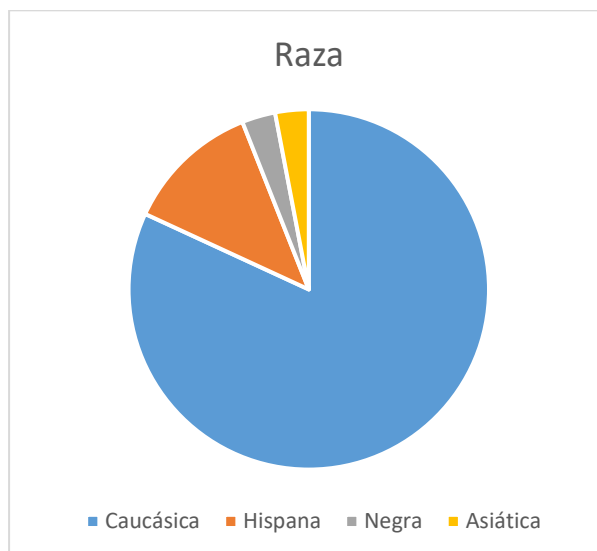


Figura distribución por raza.

- Teniendo en cuenta el índice de masa corporal (IMC):

Un 78.1% de las mujeres participantes presentan un IMC normal (entre 18.5 y 24.9); un 9.4% de las pacientes se encuentran en rango de delgadez (IMC menor a 18.5) y también un 9.4% presentan sobrepeso (un IMC entre 25 y 29.9). Finalmente, un 3.1% de las pacientes presentan obesidad (IMC por encima de 30).

No habrá pacientes con obesidad mórbida porque éstas se excluyen de los tratamientos de fertilidad.

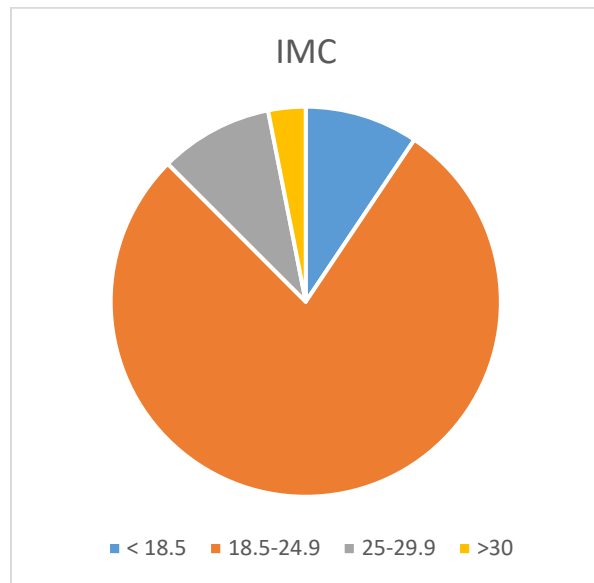


Figura distribución por IMC.

Tabla 10. Número y porcentaje de pacientes según rango de IMC.

| IMC | N.º PACIENTES | % PACIENTES |
|-----------|---------------|-------------|
| < 18,4 | 3 | 9,4% |
| 18.5-24,9 | 25 | 78,13% |
| 25-29,9 | 3 | 9,4% |
| > 30 | 1 | 3,1% |

- Respecto al grupo sanguíneo:

El 56.7% de las mujeres participantes son A positivo y el 20.0% son O positivo. El resto de los grupos presentan un porcentaje menor: 6.7% son B positivo; un 3.3% son O negativo; un 3.3% son A negativo; un 3.3% son AB positivo; habiendo un 6,7% de pacientes sin este análisis.



Figura distribución por grupo sanguíneo.

- Respecto al estudio genético o cariotipo:

Un 87.5% de las mujeres participantes presentan un cariotipo normal.

El 3.1% presentaba anomalías (mutación CACNA1A)

De la población reclutada, un 9.4% no tenía estudio cromosómico realizado a pesar de las guías de manejo de FIR.

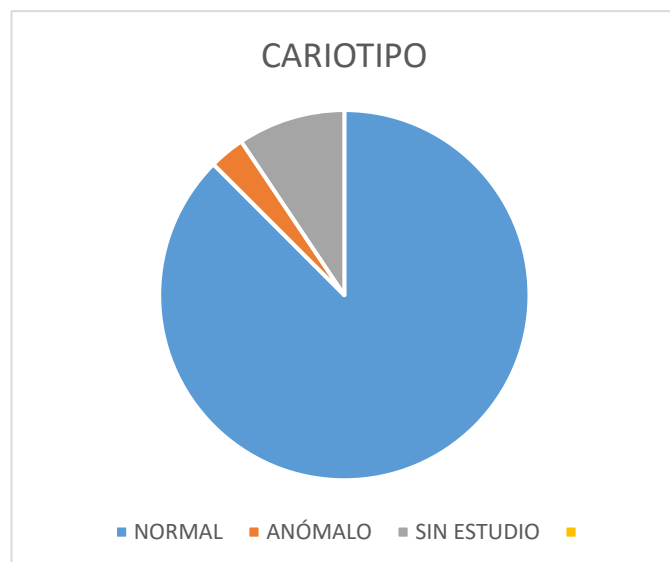


Figura de distribución del cariotipo.

- En cuanto a los embarazos propios, un 39,4% de las pacientes habían gestado en algún momento previo al estudio.
- En cuanto a hijos vivos, el 78,1% de las participantes no tenía.
- Respecto a los abortos clínicos, el 33,3% del total de las pacientes habían presentado aborto en algún momento de su historia reproductiva.
- En cuanto a fallo de implantación, el 39,4% de las pacientes lo habían presentado (grupo FIR) y lo mismo para embarazos externos que son los controles sanos de este estudio, un 39,4%.
- En cuanto al consumo de tóxicos:

Tabaco:

un 75.8% de las mujeres no son fumadoras, un 12.1% son fumadoras; un 6.1% son fumadoras ocasionales y un 6.1% son exfumadoras.

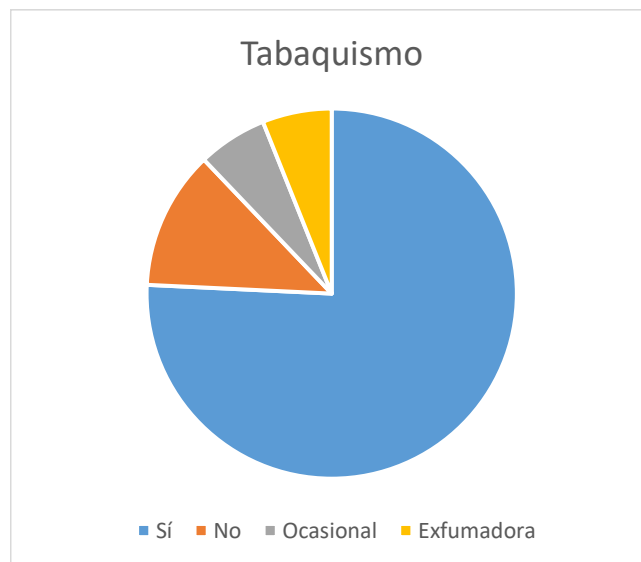


Figura de distribución por tabaquismo.

Alcohol: un 81.8% nunca consumen alcohol, y un 18.2% lo consumen de manera ocasional.

Otras drogas: ninguna paciente consume o habían consumido sustancias tóxicas o adictivas.

- Respecto a los antecedentes de salud:

- Antecedentes oncológicos: ninguna paciente los presenta.
- Antecedentes de enfermedades ginecológicas que pueden afectar a la reproducción tales como endometriosis, malformaciones uterinas o trombofilias: un 24.2% de las participantes las presentaba y un 75.8% de las pacientes no las tenía.
- Antecedentes quirúrgicos como metroplastia, mastoplastia, hernia inguinal, etc.: un 12.1% de las participantes los presentaban y un 87.9%, no.

Tabla 11. Características demográficas de la población general: FIR+ AR+ CONTROLES.

| CARACTERISITICA | RANGOS | N (%) |
|---------------------|-----------------|------------|
| EDAD | < 34 | 15 (46.9%) |
| | 35-39 | 10 (31.3%) |
| | >40 | 7 (21.9%) |
| RAZA | Caucásica | 27 (81.8%) |
| | Hispana | 4 (12.1%) |
| | Negra | 1 (3.0%) |
| | Asiática | 1 (3.0%) |
| IMC | <18.5 | 3 (9.4%) |
| | 18.5-24.9 | 25 (78.1%) |
| | 25-29.9 | 3 (9.4%) |
| | >30 | 1 (3.1%) |
| GRUPO SANGUÍNEO | 0 Rh positivo | 6 (20.0%) |
| | 0 Rh negativo | 1 (3.3%) |
| | A Rh positivo | 17 (56.7%) |
| | A Rh negativo | 1 (3.3%) |
| | B Rh positivo | 2 (6.7%) |
| | AB Rh positivo | 1 (3.3%) |
| | Sin estudio | 2 (6.7%) |
| CARIOTIPO | Normal (46XX) | 28 (87.5%) |
| | Otras variantes | 1 (3.1%) |
| | Sin estudio | 3 (9.4%) |
| EMBARAZOS PROPIOS | NO | 20 (60.6%) |
| | SI | 13 (39.4%) |
| HIJOS VIVOS PROPIOS | NO | 25 (78.1%) |

**(Continuación Tabla 11. Características demográficas de la población general:
FIR+ AR+ CONTROLES.**

| CARACTERÍSTICA | RANGO | N (%) |
|----------------------|------------|-------------|
| | SI | 7 (21.9%) |
| ABORTOS CLINICOS | NO | 22 (66.7%) |
| | SI | 11 (33.3%) |
| FALLO IMPLANTACIÓN | NO | 20 (60.6%) |
| | SI | 13 (39.4%) |
| EMBARAZOS EXTERNOS | NO | 20 (60.6%) |
| | SI | 13 (39.4%) |
| FUMADORA | NO | 25 (75.8%) |
| | SI | 4 (12.1%) |
| | OCASIONAL | 2 (6.1%) |
| | EXFUMADORA | 2 (6.1%) |
| ALCOHOL | NO | 27 (81.8%) |
| | SI | 6 (18.2%) |
| OTRAS DROGAS | NO | 33 (100.0%) |
| ANTEC. ONCOLOGICOS | NO | 33 (100.0%) |
| ANTEC. GINECOLOGICOS | NO | 25 (75.8%) |
| | SI | 8 (24.2%) |
| ANTEC. QUIRÚRGICOS | NO | 29 (87.9%) |
| | SI | 4 (12.10%) |

**A. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN POR GRUPOS DE ESTUDIO Y
CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y DEMOGRAFICAS.**

Grupo de pacientes con Abortos de Repetición (AR).

Los resultados se muestran en la tabla 12.

En total hubo 7 pacientes reclutadas.

El 50% de las pacientes tenían entre 35 y 39 años, y el otro 50% eran mayores de 40 años aunque ninguna paciente de la rama de AR era mayor a 41 años ni menor a 34 años. La media de edad para este grupo es 39,28.

Respecto a la raza, el 71,4% de mujeres AR son caucásicas, seguidas de un 14,3% de negras, y un 14,3% de hispanas (no hubo asiáticas en este grupo).

Teniendo en cuenta el IMC, un 66,7% presenta un IMC normal, mientras que un 16,7% presenta sobrepeso y otro 16,7%, obesidad. No hay mujeres con IMC menor a 18.5 en AR.

En la evaluación del grupo sanguíneo, predomina el A Rh positivo en el 60% de las pacientes, seguido del O positivo y O negativo en un 20% cada uno.

Todas las pacientes AR reclutadas presentan un cariotipo normal.

Desde la perspectiva de los embarazos, todas estas mujeres han presentado embarazos propios y todas ellas han tenido más de dos abortos. Un 66,7% ha tenido hijos vivos (4 pacientes en valor absoluto).

Respecto a si alguna de estas pacientes ha tenido fallo de implantación además de los abortos de repetición, sólo una ha tenido (un 14,29%) y el 85,71% restante, no.

Ninguna de estas mujeres ha donado ovocitos y por tanto, no ha dado lugar a “embarazos externos”.

En cuanto al consumo de tóxicos, ninguna es fumadora, o consumidora de alcohol o ha tomado otras drogas.

Y finalmente, respecto a los antecedentes de salud, ninguna de las pacientes con AR reclutadas presenta antecedentes oncológicos ni quirúrgicos, aunque sí un 28,6% de estas mujeres presentan alguna enfermedad ginecológica asociada.

Grupo de pacientes con Fallo de implantación recurrente (FIR).

Los resultados se muestran en la tabla 12.

Se reclutan 13 pacientes con FIR.

El 53,8% de las pacientes con FIR tienen entre 35 y 39 años, mientras que un 30,8% son mayores de 40 años y un 15,4% son menores de 34. La edad máxima registrada en este grupo son 40 años, y la edad mínima son 32 años.

Respecto a la raza, un 76,9% son caucásicas, un 15,4% son hispanas y un 7,7% son mujeres asiáticas (no hubo pacientes FIR negras en este estudio).

Teniendo en cuenta el IMC, un 92,3% de mujeres son normales y un 7,7% son delgadas, pero no hay mujeres con sobrepeso u obesidad.

En cuanto al grupo sanguíneo, un 61,5% de las mujeres son A positivo, mientras que un 7,7% son O positivo, O B positivo o AB positivo. Cabe destacar que hay un 15,4% de las pacientes FIR que no tienen estudio del grupo sanguíneo (2 pacientes en frecuencia absoluta).

En la evaluación del estudio genético o cariotipo, un 76,9% presenta un cariotipo normal, mientras que el 7,7% presenta alguna anomalía genética. Dicha anomalía es la mutación CACNA1A. Un 15,4% de las pacientes FIR no realizó este estudio.

Respecto a los embarazos, un 53,8% no ha tenido embarazos y un 46,2%, sí.

De las que han tenido embarazo, un 15,4% ha tenido hijos vivos (y un 84,6%, no), en valor absoluto 2 y 11 respectivamente.

Además del FIR, en cuanto a los abortos, un 30,8%, sí ha tenido y un 69,2%, no.

Todas estas pacientes han presentado al menos dos fallos de implantación, y ninguna ha dado lugar a embarazos externos (ninguna ha donado ovocitos).

En cuanto al consumo de sustancias tóxicas o adictivas, el 61,5% de estas mujeres no fuma, el 23,1% fuma ocasionalmente y el 15,4% son exfumadoras. Teniendo en

cuenta el alcohol, el 84,6% no bebe nunca y el 15,4% bebe ocasionalmente. Ninguna de estas pacientes consume otras drogas.

Finalmente, respecto a los antecedentes de salud, ninguna tiene antecedentes oncológicos. Un 46,2% presenta alguna otra enfermedad ginecológica y un 30,8% ha presentado algún antecedente quirúrgico.

Tabla 12. Características demográficas para el grupo CASOS: ABORTOS DE REPETICIÓN Y FALLO DE IMPLANTACIÓN RECURRENTE.

| CARACTERISTICA | RANGOS | AR N (%) | FIR N (%) |
|----------------------------|------------------------|------------|-------------|
| TOTAL PACIENTES | | 7 | 13 |
| EDAD | < 34 | 0 (0%) | 2 (15,40%) |
| | 35-39 | 3 (50,00%) | 7 (53,80%) |
| | >40 | 3 (50,00%) | 4 (30,80%) |
| RAZA | Caucásica | 5 (71,40%) | 10 (76,90%) |
| | Hispana | 1 (14,30%) | 2 (15,40%) |
| | Negra | 1 (14,30%) | 0 (0,0%) |
| | Asiática | 0 (0,0%) | 1 (7,70%) |
| IMC | < 18.5 | 0 (0,0%) | 1 (7,70%) |
| | 18.5-24.9 | 4 (66,70%) | 12 (92,30%) |
| | 25-29.9 | 1 (16,70%) | 0 (0%) |
| | >30 | 1 (16,70%) | 0 (0%) |
| GRUPO SANGUÍNEO | 0 positivo | 1 (20,00%) | 1 (7,70%) |
| | 0 negativo | 1 (20,00%) | 0 (0%) |
| | A positivo | 3 (60,00%) | 8 (61,50%) |
| | B positivo | 0 (0%) | 1 (7,70%) |
| | AB positivo | 0 (0%) | 1 (7,70%) |
| | Sin estudio | 2 (28,60%) | 2 (15,40%) |
| CARIOTIPO | Normal: 46XX | 7 (100%) | 10 (76,90%) |
| | Otras variantes | 0 (0%) | 1 (7,70%) |
| | Sin estudio | 0 (0%) | 2 (15,40%) |
| EMBARAZOS PROPIOS | SI | 7 (100%) | 4 (30,80%) |
| HIJOS VIVOS PROPIOS | SI | 4 (66,70%) | 6 (46,20%) |
| ABORTOS CLINICOS | SI | 7 (100%) | 4 (30,80%) |

(Continuación Tabla 12. Características demográficas para el grupo CASOS: ABORTOS DE REPETICIÓN Y FALLO DE IMPLANTACIÓN RECURRENTE.

| CARACTERÍSTICA | RANGOS | AR N (%) | FIR N (%) |
|-----------------------|------------|------------|-------------|
| EMBARAZOS EXTERNOS | NO | 7 (100%) | 13 (100%) |
| FALLO DE IMPLANTACIÓN | SÍ | 1 (14,29%) | 13 (100%) |
| FUMADORA | NO | 7 (100%) | 8 (61,50%) |
| | SI | 0 (0%) | 3 (23,10%) |
| | EXFUMADORA | 0 (0%) | 2 (15,40%) |
| ALCOHOL | NO | 7 (100%) | 11 (84,60%) |
| OTRAS DROGAS | NO | 7 (100%) | 13 (100%) |
| ANTEC.ONCOLÓGICOS | NO | 7 (100%) | 13 (100%) |
| ANTEC. GINECOLÓGICOS | NO | 5 (71,40%) | 7 (53,80%) |
| | SI | 2 (28,60%) | 6 (46,20%) |

Grupo de pacientes controles.

Los resultados se muestran en la tabla 13.

Se reclutan un total de 13 pacientes con fertilidad probada o controles sanos.

Todas las participantes son menores de 34 años, ya que la edad máxima para donar ovocitos permitida por la *Ley de Reproducción Asistida en España* son 35 años (incluidos). La edad mínima de este grupo fue 18 años y la máxima 34 años. La media de edad del grupo fue 24,53 años.

Respecto a la raza, el 92,3% de las mujeres son blancas y el 7,7% son mujeres hispanas (no hubo mujeres negras ni asiáticas en este grupo).

Teniendo en cuenta el IMC, un 69,2% presentaban un IMC normal, mientras que un 15,4% eran delgadas y/o con sobrepeso, pero no participaron mujeres obesas.

En cuanto al grupo sanguíneo, el 50% de las pacientes son A positivo y un 33,3% son O positivo. Los grupos A negativo y B positivo tuvieron una representación de un 8,3% cada uno.

Y sobre el estudio genético, el 92,3% presenta un cariotipo 46XX normal, mientras que un 7,7% no tiene el estudio hecho (2 pacientes en valor absoluto). No se han recogido pacientes que presenten anomalías genéticas.

Respecto a los embarazos, ninguna de estas pacientes ha presentado embarazos propios, y por tanto, tampoco hijos biológicos/ propios. Tampoco ninguna ha presentado abortos o fallos de implantación.

El 100% de estas pacientes fueron reclutadas como controles por haber dado lugar a embarazos externos tras donación de ovocitos.

En cuanto al consumo de tóxicos, para el tabaco, el 76,9% no fuma, el 15,4% fuma ocasionalmente y el 7,7% fuma habitualmente, y respecto al alcohol, el 69,2% no bebe, y el 30,8% bebe ocasionalmente. Ninguna consume otras drogas.

Tabla 13. Características demográficas para el grupo CONTROLES.

| CARACTERISITICA | RANGOS | N (%) |
|----------------------|-------------|--------------|
| EDAD | < 34 | 13 (100,00%) |
| RAZA | Caucásica | 12 (92,30%) |
| | Hispana | 1 (7,70%) |
| IMC | <18.5 | 2 (15,40%) |
| | 18.5-24.9 | 9 (69,20%) |
| | 25-29.9 | 2 (15,40%) |
| GRUPO SANGUÍNEO | 0 positivo | 4 (33,30%) |
| | A positivo | 6 (50,00%) |
| | A negativo | 1 (7,70%) |
| | B positivo | 1 (7,70%) |
| | Sin estudio | 1 (7,70%) |
| CARIOTIPO | NORMAL 46XX | 12 (92,30%) |
| | Sin estudio | 1 (7,70%) |
| EMBARAZOS PROPIOS | NO | 13 (100,00%) |
| HIJOS VIVOS PROPIOS | NO | 13 (100,00%) |
| ABORTOS CLINICOS | NO | 13 (100,00%) |
| FALLO IMPLANTACIÓN | NO | 13 (100,00%) |
| EMBARAZOS EXTERNOS | SI | 13 (100,00%) |
| FUMADORA | NO | 10 (76,90%) |
| | SI | 1 (7,70%) |
| | OCASIONAL | 2 (15,40%) |
| ALCOHOL | NO | 9 (69,20%) |
| | SI | 4 (33,30%) |
| OTRAS DROGAS | NO | 13 (100,00%) |
| ANTEC.ONCOLÓGICOS | NO | 13 (100,00%) |
| ANTEC. GINECOLÓGICOS | NO | 13 (100,00%) |
| ANTEC. QUIRÚRGICOS | NO | 13 (100,00%) |

Finalmente, respecto a los antecedentes de salud, ninguna presenta antecedentes oncológicos ni alguna enfermedad ginecológica, ni antecedentes quirúrgicos de otro tipo.

6.2 Biomarcadores inmunofenotípicos: descripción de datos y cálculos de significación estadística clasificados por grupo de paciente (AR, FIR y controles) y origen de la muestra (endometrio, líquido folicular y sangre periférica).

6.2.1 RESULTADOS OBTENIDOS POR CITOMETRÍA Y ANÁLISIS DE SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA.

A continuación se detallan los resultados obtenidos en cada muestra analizada (endometrio, líquido folicular y sangre periférica) comparando a su vez los distintos grupos clínicos (pacientes caso FIR, pacientes caso AR y controles). Es muy importante destacar que al ser la población total reclutada para AR muy pequeña, sólo puede hacerse un estudio descriptivo. Por su parte, para el grupo FIR y los respectivos controles se hará tanto un estudio descriptivo como de significación estadística.

Al tratarse de una distribución no normal se utiliza para la descripción de los biomarcadores los parámetros estadísticos mediana y rango intercuartílico. Los estudios de significación se hicieron con la prueba de Mann-Whitney considerando significativo un p valor menor a 0.05(*) y muy significativo un p valor menor a 0,01 (**).

Por su parte, se considerará tendencia estadística cuando el p valor está entre 0,051 y 0,08, y significación marginal cuando p esta entre 0,100 y 0,199, pero si aumentase el tamaño muestral p podría ser significativo.

6.2.2 RESULTADOS ABORTOS DE REPETICIÓN. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS BIOMARCADORES ANALIZADOS EN CADA TEJIDO.

Los resultados se describen a continuación con la media y el recorrido intercuartílico. Al no haber tamaño muestral suficiente, no se puede comparar con controles sanos y no se pueden hacer cálculos de inferencia estadística.

Al hacer el análisis por citometría no se dispone de datos para monocitos intermedios, no clásicos y Células CD11b_ACT porque no se pudieron incluir en el panel de análisis por motivos técnicos.

Tabla 14. Resultados de los biomarcadores inmunofenotípicos en el grupo AR en los tres tejidos: endometrio, líquido folicular y sangre periférica.

| BIOMARCADOR | ENDOMETRIO N=7 | LIQUIDO FOLICULAR N=7 | SANGRE PERIFERICA N=7 |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Linfocitos (%) | 23,80 [13,35; 40,20] | 24.20 [23.75; 34.10] | 21,80 [15,30; 32,10] |
| Células NKs totales (%) | 32,20 [24,85;42,70] | 11.65 [7.83; 15.93] | 12,20 [6,15; 13,80] |
| Células NK citotóxicas | 11,40 [4,7; 17,05] | 7.90 [6.40; 13.45] | 11,40 [5,30; 13,25] |
| Cél. NKcit TIGIT+ | 57,70 [42,65 ; 71,90] | 80.30 [57.80; 86.60] | 84,40 [70,40; 93,70] |
| Cél. NKcit CD69+ | 29,30 [28,70 ; 72,85] | 9.70 [6.40; 15.05] | 15,30 [5,80; 66,95] |
| Cél. NKcit NKp30+ | 81,50 [39,05; 87,60] | 36.40 [9.60; 70.35] | 78,50 [48,80; 85,15] |
| Cél. NKcit Perforina+ | 69,30 [61,40; 83,05] | 96.80 [88.25; 98.55] | 90,20 [77,80; 94,30] |
| Cél. NKcit TIM3+ | No presentes | No presentes | 0,20 [0.10; 24.05] |
| Células NKT | 1,90 [1,45; 4,00] | 3.40 [1.65; 6.15] | 3,10 [1,40; 6,80] |
| Cél. NKT TIGIT+ | 28,90 [23,950; 59,45] | 34.90 [21.50; 70.55] | 28,50 [15,30; 65,50] |

| BIOMARCADOR | ENDOMETRIO N=7 | LIQUIDO FOLICULAR N=7 | SANGRE PERIFERICA N=7 |
|-------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Cél.NKtCit CD69+ | 65,20 [52,35; 79,35] | 100.00 [67.00; 100.00] | 14,80 [6,10; 71,80] |
| Cél. NKT NKp30+ | 2,40 [1,15; 20,25] | 95.50 [0.00; 99.95] | 5,10 [0,75; 9,30] |
| Cél. NKT Perforina+ | 4,80 [3,95; 19,30] | 93.80 [62.45; 98.95] | 15,10 [7,65; 23,10] |
| Cél. NKT cit TIM3+ | No presentes | No presentes | 0,70 [0,10; 7,25] |
| Células NK reguladoras | 33,40 [25,25; 78,40] | 7.60 [4.45; 11.65] | 2.60 [1.65; 3.35] |
| Cél. NKreg CD69+ | 92,90 [87,25; 97,70] | 97.40 [5.85; 99.75] | 70,00 [14,90; 89,80] |
| Cél. NKreg NKp30+ | 87,30 [38,50; 89,25] | 100.00 [9.95; 100.00] | 9,10 [0,30; 35,90] |
| Cél. NKreg Perforina+ | 14,10 [8,35; 48,25] | 94.20 [65.75; 98.00] | 95,60 [87,15; 97,80] |
| Cél. NK reg TIM3+ | No presente | No presente | 1,30 [0,60; 4,35] |
| Monocitos (%) | 10,05 [5,30; 13,38] | 3.10 [2.63; 16.55] | 7,00 [6,15; 8,25] |
| Monocitos con HLA-DR+ | 32,65 [24,68; 80,98] | 61.90 [36.93; 84.63] | 89,90 [89,90; 89,90] |
| Monocitos Clásicos | 22,00 [18,53; 45,28] | 69.00[29.55; 73.28] | 68,60 [66,15 ; 74,80] |
| Mo clásicos CX3CR1+ | 70,75 [66,83; 77,53] | 19.15 [7.35; 80.75] | 3,80 [2,15; 23,50] |
| Mo clásicos CD69+ | 18,45 [9,90; 33,15] | 17.80 [8.45; 50.48] | 6,50 [2,70; 39,55] |
| Mo clásicos CCR2+ | 44,00 [14,18; 55,98] | 73.65 [46.15; 88.12] | 88,90 [73,05; 93,65] |
| Mo clásicos CCR5+ | 2,35 [0,80 ; 5,55] | 28.00 [7.13; 37.03] | 6,85 [2,73 ; 14,88] |
| Mo clásicos CD11b_ACT+ | ND | ND | 97,60 [71,75 ; 99,55] |
| Monocitos Intermedios | ND | ND | 5,70 [2,40; 8,35] |
| Mo intermedios CX3CR1+ | | | 47,40 [28,30; 82,30] |
| Mo intermedios CD69+ | | | 14,60 [6,70; 52,95] |

| BIOMARCADOR | ENDOMETRIO N=7 | LIQUIDO FOLICULAR N=7 | SANGRE PERIFERICA N=7 |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Mo intermedios CCR2+ | | | 64,00 [40,75; 74,30] |
| Mo intermedios CCR5+ | | | 22,80 [6,03; 36,65] |
| Mo intermedios CD11bACT+ | | | 99,50 [85,10; 100,00] |
| Monocitos No clásicos | ND | ND | 5,50 [3,43; 7,00] |
| Células CX3CR1_nc | | | 83,20 [56,50; 95,20] |
| Mo no clásicos CD69+ | | | 4,90 [2,30; 8,05] |
| Mo no clásicos CCR2+ | | | 0,80 [0,20; 15,35] |
| Mo no clásicos CCR5+ | | | 3,20[2,63; 13,83] |
| Mo no clásicos CD11bACT+ | | | 32,40 [17,50; 52,50] |
| Células mielodes | 4,90 [3,53; 7,48] | 4.00 [2.80; 5.35] | 6,20 [5,33; 6,93] |
| Células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs) | 39,65 [18,05; 62,38] | 49.70 [34.75; 80.25] | 4,75 [2,58; 6,33] |
| Células granulocíticas | 18,25 [6,85; 41,58] | 40.95 [29.52; 55.23] | 64,10 [51,08; 69,55] |
| Células supresoras mieloides derivadas de monocitos (MDSCs-Mo) | 9,00 [5,00; ..] | 11.70 [6.40; ...] | 6,40 [6,10; 8,10] |
| Células T CD4+ | 41,00 [39,40; ...] | 64.10 [64.00;...] | 54,30 [53,80; 63,40] |
| Células CD4+ Treg | 11,70 [4,20; ...] | 5.65 [4.80; ..] | 6,70 [6,10; 6,75] |
| Células T CD8+ | 37,00 [27,50; ...] | 24.90 [23.40; ..] | 28,20 [24,45; 28,65] |
| Células Treg_CD25^{high} | [;] | 3.50 [3.50; 3.50] | 5,30 [4,35; 7,25] |

(Leyenda. *ND*: sin datos).

DESCRIPCIÓN DE LA TABLA.

- Respecto a los linfocitos se determinan niveles similares en los tres tejidos, mientras que para las células NK totales se observan niveles más altos de NK totales en endometrio.

- En cuanto a las células NK citotóxicas totales, los niveles son similares en los tres tejidos, un poco más bajos en líquido folicular.
Para las subpoblaciones de NK citotóxicas, NK citotóxicas TIGIT positivo y Células NK citotóxicas con expresión de perforina se observan niveles más bajos en endometrio respecto a líquido folicular y sangre periférica, mientras que los niveles de NK citotóxicas CD69 positivo son más altos en endometrio que en líquido folicular y sangre periférica. Los niveles de células NK citotóxicas NKp30 positivo son más altos endometrio y sangre respecto a líquido folicular.

- En cuanto a las células NKT totales y las NKT TIGIT positivo presentan niveles similares en los tres tejidos, algo más elevados en líquido folicular; mientras que para Células NKT CD69 positivo, Células NKT Kp30 y Células NKT con sobreexpresión de perforina se observan niveles mucho más altos en líquido folicular que en endometrio y sangre periférica.

- En el análisis de células NK reguladoras totales se observan niveles más altos en endometrio. Respecto a las subpoblaciones, las NK reguladoras TIGIT positivo presentan niveles más altos en líquido folicular; NK reguladoras CD69 positivo y las NK reguladoras NKp30 positivo presentan niveles más altos y similares en endometrio y líquido folicular. Para la NK reguladoras con expresión de perforina se observan niveles mucho más altos en líquido folicular y sangre periférica.

- Para los monocitos los niveles son más bajos en líquido folicular, mientras que los monocitos HLA-DR y los monocitos clásicos son más bajos en endometrio.

- En cuanto a los clásicos totales, se observan cifras menores en endometrio, mientras que para monocitos clásicos CX3CR1 los niveles son más altos en

endometrio. Los niveles de monocitos clásicos CD69 positivo son más altos pero similares en endometrio y líquido folicular; y los de monocitos clásicos CCR2 son menores en endometrio (más altos y similares en líquido folicular y sangre). Los valores para células monocitos clásicos CCR5 son mayores en líquido folicular.

- El estudio de intermedios y de no clásicos no dio datos para endometrio ni líquido folicular.
- Para las células mieloides los niveles son similares en los tres tejidos, y para células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs_M) son mucho mayores y similares en endometrio y líquido folicular. Las células granulocíticas presentan niveles más altos en líquido folicular y sangre periférica, mientras que las Células MDSCs_MO presentan valores más altos en líquido folicular.
- En cuanto a las Células T CD4 positivo y las Células CD8 positivo presentan niveles similares en los tres tejidos, y las Células T reguladoras CD4 positivo son más altos en endometrio.
- Los niveles de Células Treguladoras CD25high son similares en líquido folicular y sangre periférica y no se pudieron determinar en endometrio.

6.2.3 RESULTADOS DE SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA PARA FIR Y CONTROLES EN ENDOMETRIO.

Se describen los resultados de las subpoblaciones linfocitarias y de monocitos estudiadas en el endometrio, tanto de pacientes con antecedente de FIR como en controles sanas. Como se observa en la Tabla 15, el análisis comparativo de las subpoblaciones celulares entre pacientes con FIR y mujeres controles fértiles en el endometrio demostró diferencias significativas en ciertas subpoblaciones. Las células NK citotóxicas (NKcit) fueron significativamente más altas en el grupo FIR ($5,73 \pm 2,33\%$) en comparación con los controles ($2,92 \pm 1,01\%$; $p=0,02$), mientras que las células NK reguladoras (NKreg) mostraron una menor proporción en FIR ($58,29 \pm 18,02\%$) respecto a las mujeres fértiles ($78,98 \pm 11,81\%$; $p=0,04$). En cuanto a las células NKT con perforina+ (Cél. NKT Perforina+), se observó un aumento significativo en pacientes FIR ($21,17 \pm 16,08\%$) en comparación con los controles ($7,48 \pm 6,18\%$; $p=0,019$).

Los valores determinados para las células NK citotóxicas totales y las células NK reguladoras resultan estadísticamente significativos ($p < 0,05$) mientras que los obtenidos para las células NKT que expresan perforina resultan muy significativos ($p < 0,01$).

Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en otras subpoblaciones como células NK totales, monocitos, células mieloides derivadas de monocitos (MDSCs-Mo) y células T reguladoras, lo que sugiere un perfil específico de alteración en las células inmunes asociadas con el entorno endometrial de las pacientes con fallo de implantación recurrente.

Tabla 15. Resultados de los biomarcadores inmunofenotípicos para los grupos FIR y controles en endometrio y análisis de significación estadística.

| BIOMARCADOR | FIR N: 13 | CONTROLES N: 13 | Prueba de Mann-Whitney (CONTROLES-FIR). Sig. Asintótica (bilateral) |
|------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Linfocitos (%) | 12,57 ± 7,29 9,00 [7,10; 20,50] | 7,76 ± 3,80 7,25 [4,22; 11,28] | 0,15 |
| Células NK totales (%) | 33,31 ± 13,24 35,80 [20,70; 41,95] | 26,91 ± 8,28 27,10 [21,10; 28,35] | 0,23 |
| Células NK citotóxicas | 5,73 ± 2,33 5,40 [3,80; 6,95]* | 2,92 ± 1,01 2,85 [2,10; 3,80]* | 0,02* |
| Cél. NKcit TIGIT+ | 40,36 ± 21,36 36,20 [26,15; 49,30] | 45,52 ± 25,78 47,00 [20,90; 70,23] | 0,710 |
| Cél. NKcit CD69+ | 47,59 ± 19,04 44,30 [31,60; 66,35] | 59,66 ± 19,64 58,65 [39,43; 79,60] | 0,121 |
| Cél. NKcit NKp30+ | 81,73 ± 14,59 86,20 [82,75; 89,35] | 84,54 ± 11,24 85,50 [74,45; 94,90] | 0,852 |
| Cél. NKcit Perforina+ | 64,34 ± 21,40 60,80 [46,40; 84,20] | 58,60 ± 22,53 60,20 [39,50; 79,15] | 0,627 |
| Células NKT | 3,48 ± 2,11 2,90 [1,55 ;5,85] | 3,00 ± 1,72 2,45 [1,65; 3,87] | 0,78 |
| Cél. NKT TIGIT+ | 38,52 ± 19,97 34,80 [24,80; 55,55] | 38,16 ± 25,45 32,10 [15,90; 69,28] | 0,852 |

| BIOMARCADOR | FIR N: 13 | CONTROLES N: 13 | Prueba de Mann-Whitney (CONTROLES-FIR). Sig. Asintótica (bilateral) |
|------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Cél.NKTcit CD69+ | 76,88 ± 19,12 78,60 [63,25; 93,05] | 83,68 ± 18,77 89,30 [76,30; 96,98] | 0,336 |
| Cél. NKT NKp30+ | 8,62 ± 9,32 7,900 [1,20; 12,15] | 11,80 ± 8,39 10,45 [5,80; 7,40] | 0,172 |
| Cél. NKT Perforina+ | 21,17 ± 16,08 19,40 [5,10; 12,15] | 7,48 ± 6,18 4,20 [2,85; 11,50] | 0,019** |
| Células NK reguladoras | 58,29 ± 18,02 63,40 [51,30; 72,70] | 78,98 ± 11,81 83,45 [71,10; 87,70] | 0,04* |
| Cél. NKreg TIGIT+ | 15,63 ± 9,11 15,90 [7,95; 19,00] | 19,90 ± 17,40 17,35 [7,15; 26,38] | 0,664 |
| Cél. NKreg CD69+ | 90,88 ± 13,42 96,50 [88,35; 97,75] | 90,63 ± 6,08 91,25 [87,25; 95,70] | 0,172 |
| Cél. NKreg NKp30+ | 80,95 ± 19,07 88,80 [83,45; 91,40] | 88,13 ± 5,80 89,90 [84,15; 92,95] | 0,402 |
| Cél. NKreg Perforina+ | 29,19 ± 20,26 27,60 [14,78; 41,68] | 27,64 ± 21,69 28,20 [8,95 ; 41,65] | 1,000 |
| Monocitos (%) | 4,32 ± 4,04 2,60 [2,00; 5,80] | 4,04 ± 3,94 2,40 [1,60; 6,05] | 0,616 |
| Monocitos con HLA-DR+ | 53,16 ± 19,60 57,30 [42,95; 66,90] | 37,79 ± 25,73 35,10 [14,20; 61,75] | 0,171 |

| BIOMARCADOR | FIR N: 13 | CONTROLES N: 13 | Prueba de Mann-Whitney (CONTROLES-FIR). Sig. Asintótica (bilateral) |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Monocitos Clásicos | 53,86 ± 22,00 51,20 [37,75; 72,60] | 44,27 ± 19,64 42,70 [28,40; 59,90] | 0,217 |
| Mo clásicos CX3CR1+ | 67,62 ± 21,00 75,50 [47,95; 84,75] | 64,53 ± 17,94 61,70 [52,30; 82,40] | 0,764 |
| Mo clásicos CD69+ | 57,39 ± 31,63 71,40 [31,00; 87,55] | 44,52 ± 32,81 34,00 [14,70; 79,60] | 0,333 |
| Mo clásicos CCR2+ | 40,96 ± 29,43 34,30 [15,80; 61,20] | 32,16 ± 16,68 32,20 [21,85; 43,45] | 0,570 |
| Mo clásicos CCR5+ | 20,79 ± 25,67 7,80 [2,30; 41,20] | 25,87 ± 34,80 8,10 [5,25; 51,00] | 0,443 |
| Células mielodes | 5,23 ± 3,73 4,00 [2,725 ; 6,98] | 5,18 ± 1,80 4,30 [3,85; 6,70] | 0,455 |
| Células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs) | 37,89 ± 23,24 36,00 [17,50; 62,18] | 28,80 ± 19,64 27,60 [8,95; 47,45] | 0,337 |
| Células granulocíticas | 21,10 ± 17,37 16,80 [12,78; 25,68] | 11,56 ± 7,23 7,60 [5,40; 19,10] | 0,136 |
| Células supresoras mieloides derivadas de monocitos (MDSCs-Mo) | 6,14 ± 3,36 5,40 [4,00 ; 9,10] | 6,90 ± 3,59 6,30 [4,15; 7,80] | 0,836 |

| BIOMARCADOR | FIR N: 13 | CONTROLES N: 13 | Prueba de Mann-Whitney (CONTROLES-FIR). Sig. Asintótica (bilateral) |
|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Células T CD4+ | 39,65 ± 8,33 40,75 [31,13; 47,08] | 34,57 ± 5,29 34,20 [31,40; 38,10] | |
| Células CD4+ Treg | 9,08 ± 2,05 9,15 [7,13; 10,95] | 12,45 ± 7,34 12,70 [5,93; 17,60] | |
| Células T CD8+ | 37,65 ± 8,33 39,25 [29,38; 44,33] | 41,33 ± 9,80 44,40 [32,40; 49,00] | |

Nota: se señalan con un asterisco (*) los valores con resultados con $p < 0,05$ y con dos asteriscos (**) los resultados con $p < 0,01$. Los resultados se expresan como media ± desviación típica; mediana (rango intercuartílico). En el análisis comparativo se utiliza la Prueba de Mann-Whitney.

A continuación se representan estos resultados través de gráficas box-plot donde se pueden comparar los datos obtenidos para cada biomarcador que resulta estadísticamente significativo entre FIR y controles en un tejido específico, en este caso, endometrio.

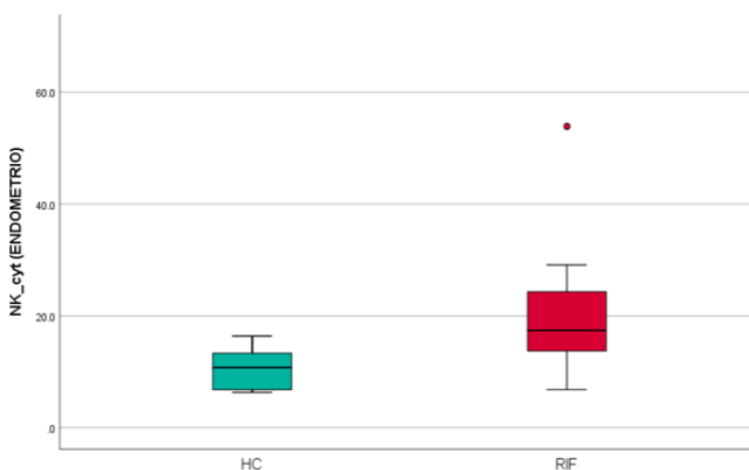


Figura 1 2 . Gráfica box-plot para células NK citotóxicas en FIR frente a controles en el endometrio.

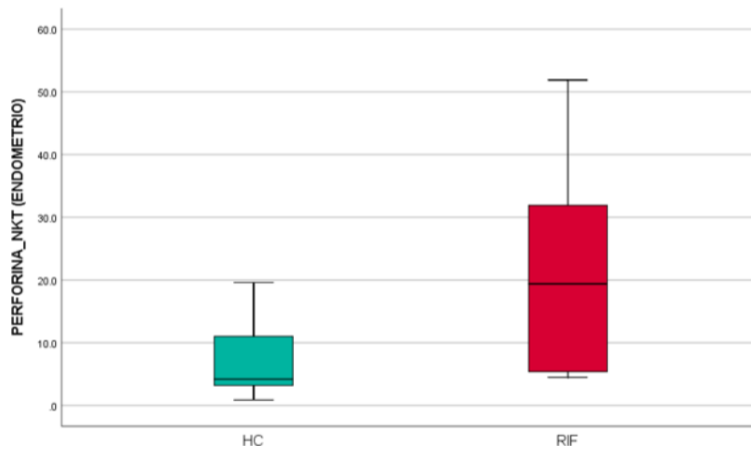


Figura 13. Gráfica box-plot para células NKT que expresan perforina en FIR y controles en el endometrio.

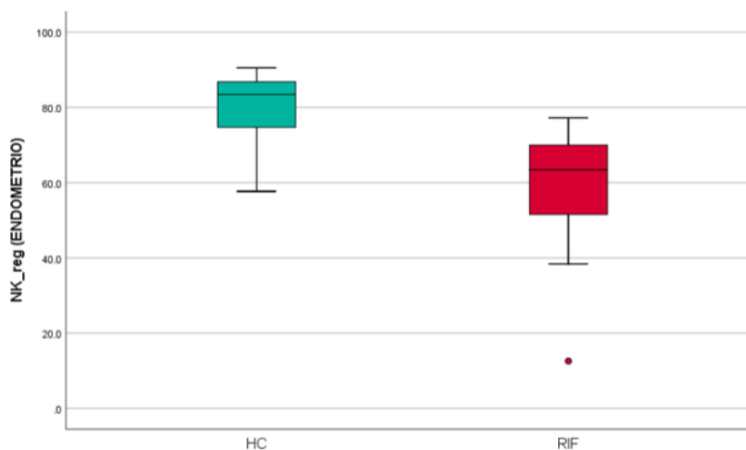


Figura 14. Gráfica box-plot para células NK reguladoras en FIR y controles en el endometrio.

6.2.4 RESULTADOS DE SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA PARA FIR Y CONTROLES EN LIQUIDO FOLICULAR.

A continuación se describen los resultados de las subpoblaciones linfocitarias y de monocitos estudiadas en el líquido folicular, tanto de pacientes con antecedente de FIR como en mujeres controles sanas. Como se observa en la Tabla 16, el análisis comparativo de las subpoblaciones celulares entre pacientes con FIR y mujeres

controles fértiles en el líquido folicular demostró diferencias significativas en ciertas subpoblaciones.

Las células NK citotóxicas que expresan NKp30 (Cél. NKcit NKp30+) fueron significativamente más altas en el grupo control ($55,14 \pm 38,12\%$) en comparación con las pacientes FIR ($13,70 \pm 23,18\%$; $p=0,003$), del mismo modo que para las células NK reguladoras que expresan NKp30 (Cél. NKreg NKp30+) se obtuvo un valor significativamente superior en controles ($64,29 \pm 31,56$) respecto a mujeres FIR ($25,88 \pm 44,77$; siendo $p=0,052$).

Por el contrario, se observaron resultados significativamente más altos en pacientes FIR que en controles en el caso de las células NKT que expresan CD69 (Cél. NKT CD69+) con unos valores en FIR de ($89,45 \pm 12,19\%$) y en controles de ($53,86 \pm 42,17\%$; $p= 0,055$); y también para las células NKT que expresan perforina (Cél. NKT Perforina+) siendo los valores en pacientes FIR ($89,11 \pm 6,55\%$) mientras que en controles eran ($48,19 \pm 34,19\%$; $p=0,013$). En último lugar, los resultados para las células NK reguladoras que expresan CD69 (Cél. NKreg CD69+) presentaron unos valores significativamente más altos en pacientes FIR ($47,13 \pm 40,73\%$) frente a controles ($14,68 \pm 17,19$; $p=0,043$), lo que sugiere un perfil específico de alteración en las células inmunes asociadas al entorno ovárico de las pacientes con fallo de implantación recurrente.

Resulta procedente comentar, que en el análisis del líquido folicular en determinados biomarcadores del estudio, si bien no se hallaron diferencias estadísticamente significativas, sí se encontró una tendencia estadística ($p: 0,05-0,08$). Para las células reguladoras NK que expresan perforina (Cél. NKreg Perforina+) se obtuvo un valor en FIR de ($89,18 \pm 12,46$) y en controles de ($45,66 \pm 40,26$, para $p=0,076$). En el caso de los monocitos clásicos CCR5+ (Mo clásicos CCR5+) el valor en las pacientes FIR fue de $64,71 \pm 30,20$ y en los controles de $38,94 \pm 32,09$, ($p= 0,089$). Por último, para las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) el valor en FIR fue $30,99 \pm 23,09$, mientras que en controles fue de $44,87 \pm 18,91$, ($p= 0,089$).

Tabla 16. Resultados de los biomarcadores inmunofenotípicos para los grupos FIR y controles en líquido folicular y análisis de significación estadística

| BIOMARCADOR | FIR N: 13 | CONTROLES N: 12 | Prueba de Mann-Whitney (CONTROLES- FIR). Sig. Asintótica (bilateral) |
|------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Linfocitos (%) | 30,16 ± 10,06 28.35 [26.175; 36.13] | 26,83 ± 9,85 25.40 [17.85; 37.25] | 0,453 |
| Células NK totales (%) | 9,26 ± 6,06 8.20 [3.90; 15.75] | 6,72 ± 3,08 6.20 [4.20 ; 8.60] | 0,424 |
| Células NK citotóxicas | 6,24 ± 4,74 5.40 [2.85; 7.93] | 4,52 ± 3,63 3.30 [1.60; 5.40] | 0,281 |
| Cél. NKcit TIGIT+ | 56,32 ± 20,70 57.65 [36.80; 71.80] | 65,68 ± 25,51 73.20 [41.90; 86.00] | 0,248 |
| Cél.NKcit CD69+ | 25,15 ± 25,43 15.00 [8.75; 36.38] | 17,14 ± 10,48 18.45 [5.63; 23.33] | 0,817 |
| Cél. NKcit NKp30+ | 13,70 ± 23,18 0.05 [0.00; 30.13]** | 55,14 ± 38,12 71.80 [12.90; 89.20]** | 0,003** |
| Cél. NKcit Perforina+ | 91,48 ± 9,60 95.95 [84.30; 99.03] | 93,72 ± 4,54 92.50 [90.00; 99.50] | 0,620 |
| Células NKT | 3,99 ± 2,95 3.00 [1.60; 6.35] | 4,90 ± 2,90 4.70 [2.20; 7.10] | 0,410 |
| Cél. NKT TIGIT+ | 52,60 ± 28,83 48.75 [29.25; 70.10] | 35,11 ± 20,91 32.85 [15.03; 57.60] | 0,119 |

| BIOMARCADOR | FIR N: 13 | CONTROLES N: 12 | Prueba de Mann-Whitney (CONTROLES- FIR). Sig. Asintótica (bilateral) |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Cél. NKT CD69+ | 89,45 ± 12,19 94.30 [77.98; 100.00]* | 53,86 ± 42,17 53.25 [13.45; 98.48]* | 0,055* |
| Cél. NKT NKp30+ | 20,05 ± 39,03 0.00 [0.00; 29.95] | 9,19 ± 23,08 1.05 [0.10; 7.18] | 0,242 |
| Cél. NKT Perforina+ | 89,11 ± 6,55 89.15 [82.55; 95.48] | 48,19 ± 34,19 29.30 [15.30; 86.40] | 0,013** |
| Células NK reguladoras | 7,39 ± 4,64 5.85 [3.78; 9.65] | 6,48 ± 4,65 5.45 [2.65; 8,88] | 0,603 |
| Cél. NKreg TIGIT+ | 42,00 ± 38,74 33.30 [7.75; 88.95] | 15,02 ± 10,27 10.85 [9.21; 20.00] | 0,248 |
| Cél. NKreg CD69+ | 47,13 ± 40,73 50.00 [4.98; 92.60] * | 14,68 ± 17,19 7.30 [2.23; 29.13] * | 0,043* |
| Cél. NKreg NKp30+ | 25,88 ± 44,77 0.00 [0.00; 77.35]* | 64,29 ± 31,56 72.00 [42.08; 88.05]* | 0,052* |
| Cél. NKreg Perforina+ | 89,18 ± 12,46 95.60 [76.80; 97.35] | 45,66 ± 40,26 22.80 [15.10; 97.10] | 0,076 |
| Monocitos (%) | 4,09 ± 2,84 3.80 [1.75; 5.30] | 6,59 ± 4,24 5.50 [3.65; 9.95] | 0.116 |

| BIOMARCADOR | FIR N: 13 | CONTROLES N: 12 | Prueba de Mann-Whitney (CONTROLES- FIR). Sig. Asintótica (bilateral) |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Monocitos con HLA-DR+ | 67,05 ± 24,40 74.80 [41.90; 87.10] | 52,49 ± 24,25 58.70 [23.45; 72.30] | 0.117 |
| Monocitos clásicos | 54,99 ± 17,42 56.80 [40.25; 70.40] | 57,64 ± 22,93 65.20 [32.35; 77.70] | 0.593 |
| Mo clásicos CX3CR1+ | 78,83 ± 32,63 98.30 [58.60; 99.75] | 68,16 ± 34,46 74.60 [41.20; 98.30] | 0.332 |
| Mo clásicos CD69+ | 47,99 ± 26,33 47.10 [29.30; 64.70] | 39,28 ± 32,33 25.90 [12.10; 77.55] | 0.350 |
| Mo clásicos CCR2+ | 63,83 ± 29,87 79.50 [37.15; 89.55] | 60,29 ± 24,53 64.40 [47.35; 78.95] | 0.616 |
| Mo clásicos CCR5+ | 64,71 ± 30,20 75.00 [43.90; 93.20] | 38,94 ± 32,09 30.10 [14.15; 72.20] | 0.089 |
| Células mieloides | 7,12 ± 4,78 6.00 [2.75; 11.85] | 7,95 ± 5,07 7.60 [4.05; 10.25] | 0.738 |
| Células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs) | 30,99 ± 23,09 22.60 [13.00; 58.55] | 44,87 ± 18,91 44.10 [24.80; 62.80] | 0.089 |
| Células granulocíticas | 30,40 ± 19,90 21.60 [17.25; 47.20] | 38,90 ± 15,42 39.30 [29.80; 45.30] | 0.243 |

| BIOMARCADOR | FIR N: 13 | CONTROLES N: 12 | Prueba de Mann-Whitney (CONTROLES- FIR). Sig. Asintótica (bilateral) |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Células supresoras mieloides derivadas de monocitos (MDSCs-Mo) | 15,61 ± 16,78 9.40 [5.90; 19.30] | 33,20 ± 39,08 7.60 [3.40; 75.80] | |
| Células T CD4+ | 58,57 ± 11,87 63.10 [45.10; ..] | 52,56 ± 7,79 54.30 [44.65; 59.60] | |
| Células CD4+Treg | 6,30 ± 3,15 7.20 [2.80; ..] | 5,94 ± 2,75 4.90 [3.60; 8.80] | |
| Células T CD8+ | 33,40 ± 11,96 27.00 [26.00; ..] | 30,70 ± 3,83 31.20 [27.55; 33.60] | |
| Células Treg_CD25 ^{high} | [... ; ...] | 6,20 ± ... 6.20 [6.20; 6.20] | |

Nota: se señalan con un asterisco (*) los valores con resultados con $p < 0,05$ y con dos asteriscos (**) los resultados con $p < 0,01$. Los resultados se expresan como media±desviación típica; mediana (rango intercuartílico). En el análisis comparativo se utiliza la Prueba de Mann-Whitney.

A continuación se presentan las gráficas box-plots de los biomarcadores estadísticamente significativos entre FIR y controles en líquido folicular:

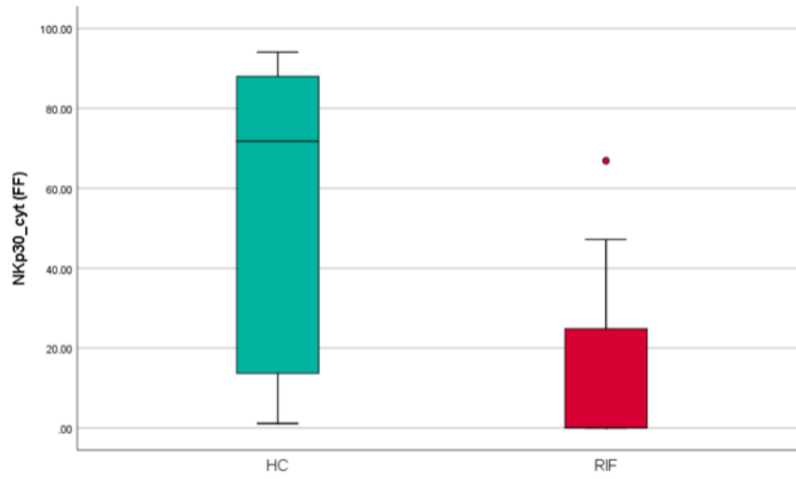


Figura 15. Gráfica box-plot para células citotóxicas NKp30 positivo en FIR y controles en líquido folicular.

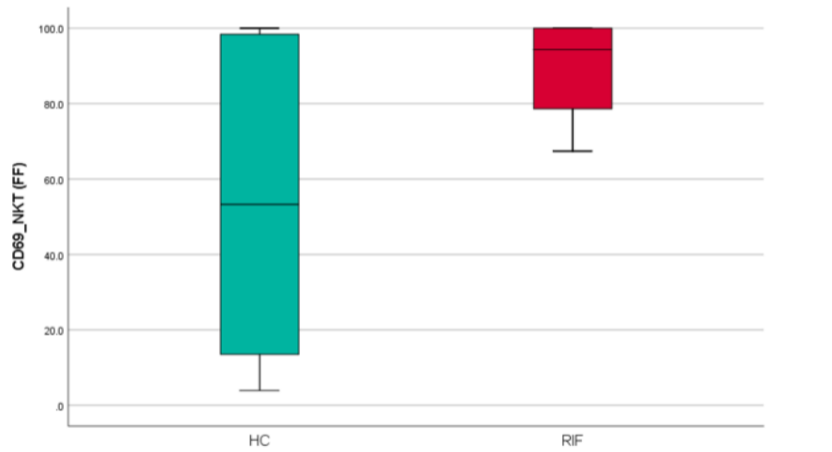


Figura 16. Gráfica box-plot para células NKT que expresan CD69 en FIR y controles en líquido folicular.

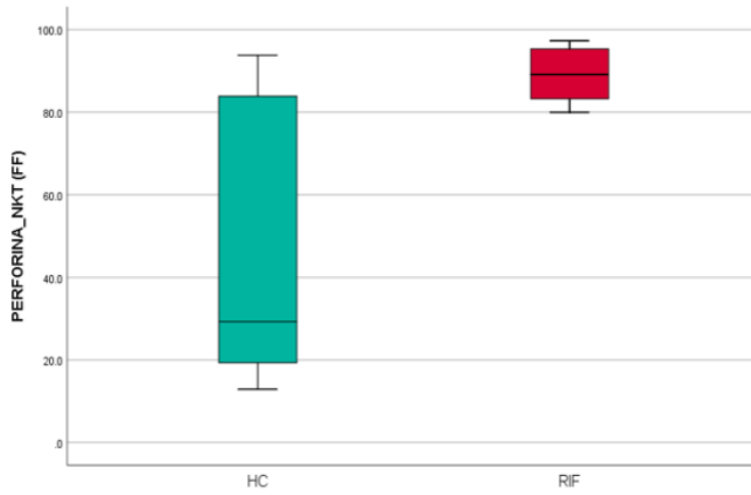


Figura 17. Gráfica box-plot para células NKT que expresan perforina en FIR y controles en líquido folicular.

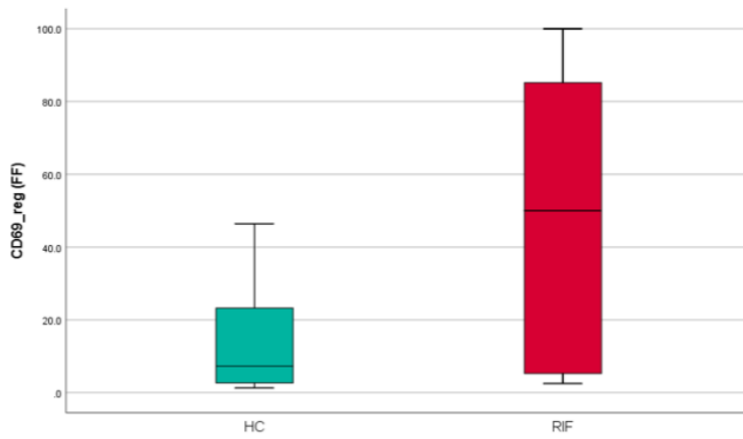


Figura 18. Gráfica box-plot para células reguladoras que expresan CD69 en FIR y controles en líquido folicular.

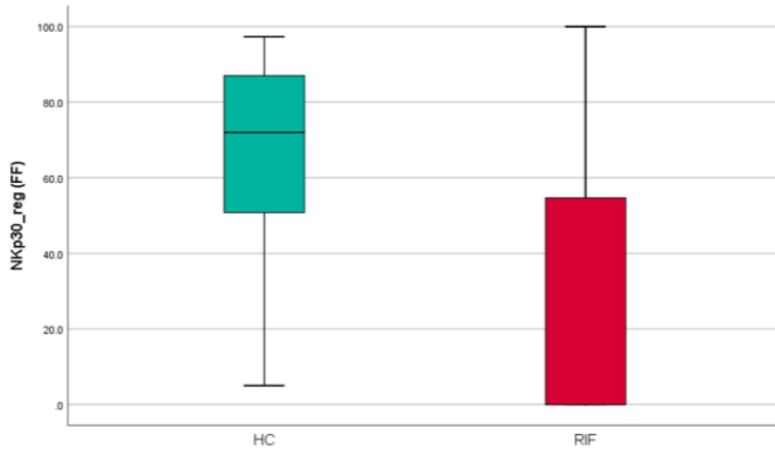


Figura 19. Gráfica box-plot para células reguladoras NKp30 positivo en FIR y controles en líquido folicular.

En cuanto a los biomarcadores que presentaron tendencia estadística se añaden las siguientes gráficas

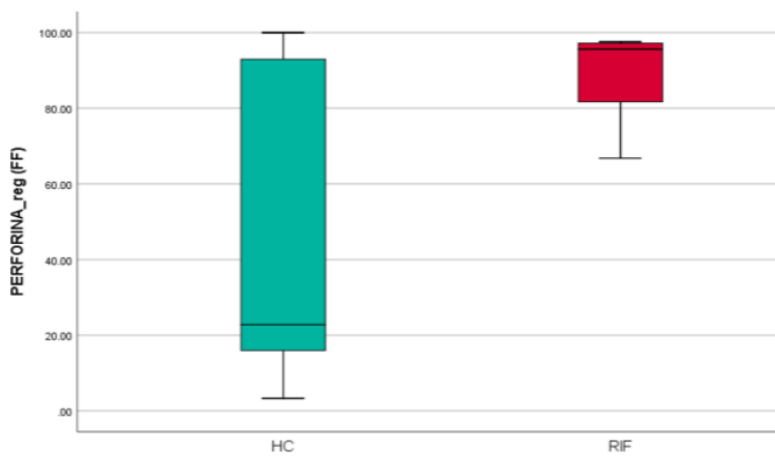


Figura 20. Gráfico box-plot para células NK reguladoras que expresan perforina en FIR y controles en líquido folicular.

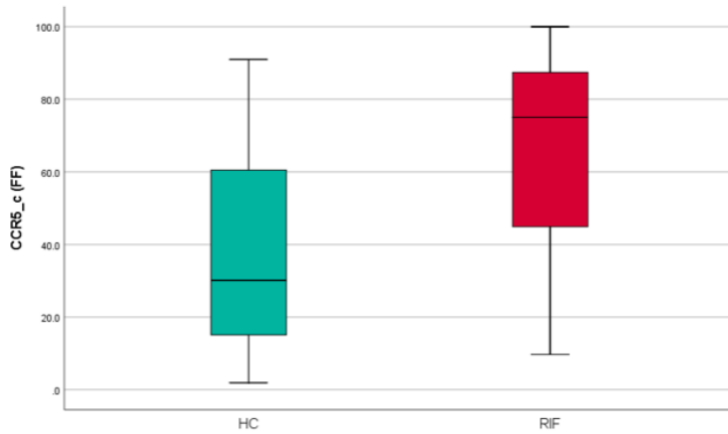


Figura 21. Gráfica box-plot para monocitos CCR5 positivo en FIR y controles en líquido folicular.

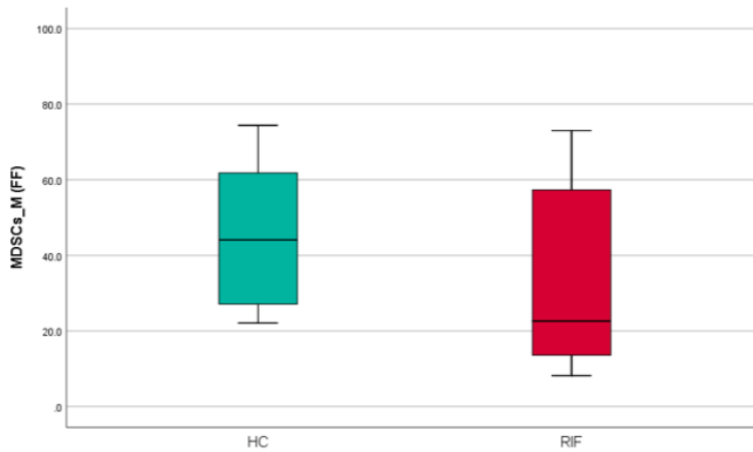


Figura 22. Gráfica box-plot para células supresoras de mieloides en FIR y controles en líquido folicular

6.2.5 RESULTADOS DE SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA PARA FIR Y CONTROLES EN SANGRE PERIFÉRICA.

A continuación, se describen los resultados de las subpoblaciones linfocitarias y de monocitos estudiadas en la sangre periférica, tanto de pacientes con antecedente de FIR como en controles sanas. Como se observa en la Tabla 17, el análisis

comparativo de las subpoblaciones celulares entre pacientes con FIR y mujeres controles fértiles en la sangre periférica demostró diferencias significativas en determinadas subpoblaciones.

Se observaron valores estadísticamente significativos y superiores en controles respecto a pacientes FIR para las células NK citotóxicas que expresan TIGIT (Cél. NKcit TIGIT+) con unos valores en controles de $78,30 \pm 12,79\%$ y en FIR de $67,17 \pm 14,03\%$; ($p= 0,043$); del mismo modo que para las células NK citotóxicas que expresan CD69 (Cél. NKcit CD69+) en las que se halló un valor de $50,18 \pm 32,33\%$ en controles respecto pacientes FIR de $15,89 \pm 17,94$; ($p=0,006$).

Por otra parte, se determinaron valores superiores en pacientes FIR respecto a controles en el caso de las células NKT que expresan perforina (Cél. NKT Perforina +) con un resultado en pacientes FIR de ($38,49 \pm 21,99\%$) respecto a controles ($16,10 \pm 15,08\%$) para $p=0,016$.

Por último, hacer referencia a dos biomarcadores que, aunque no llegaron a ser estadísticamente significativos, presentaron tendencia estadística. Fueron los monocitos con unos valores moderadamente superiores en controles ($7,27 \pm 2,23$) respecto a pacientes FIR ($5,65 \pm 1,50$, siendo $p=0,060$) y las células supresoras de mieloides derivadas de monocitos (MDSCs-Mo) que presentaron mayores resultados en FIR con un valor de ($7,32 \pm 2,57$) que en controles de ($5,63 \pm 1,95$) siendo $p=0,065$.

Tabla 17. Resultados de los biomarcadores inmunofenotípicos para los grupos FIR y controles en sangre periférica y análisis de significación estadística.

| BIOMARCADOR | FIR N: 13 | CONTROLES N: 13 | Prueba de Mann-Whitney (CONTROLES-FIR). Sig.asintótica(bilateral) |
|------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Linfocitos (%) | 23,69 ± 4,58 23,95 [20,35; 27,78] | 23,45 ± 7,53 22,95 [17,80; 30,75] | 0,931 |
| Células NK totales (%) | 9,19 ± 4,34 8,40 [5,98; 13,80] | 7,28 ± 2,46 7,55 [5,25; 9,40] | 0,370 |
| Células NK citotóxicas | 8,65 ± 4,18 7,95 [5,65 ; 13,15] | 6,55 ± 2,42 6,90 [4,50; 8,50] | 0,268 |
| Cél. NKcit TIGIT+ | 67,17 ± 14,03 64,75 [55,45; 8,43]* | 78,30 ± 12,79 79,85 [70,03; 89,15]* | 0,043* |
| Cél.NKcit CD69+ | 15,89 ± 17,94 8,40 [3,58; 25,75]** | 50,18 ± 32,33 41,30 [25,33; 4,70]** | 0,006** |
| Cél. NKcit TIM3+ | 7,15 ± 13,59 0,95 [0,30; 9,78] | 22,73 ± 26,52 15,05 [0,70; 43,05] | 0,105 |
| Cél. NKcit NKp30+ | 67,42 ± 25,09 76,40 [52,10; 90,53] | 75,15 ± 20,50 81,70 [76,85; 85,83] | 0,488 |
| Cél. NKT perforina+ | 84,83 ± 18,03 89,40 [73,25; 97,35] | 78,63 ± 16,70 83,50 [63,13; 92,50] | 0,191 |
| Células NKT | 6,80 ± 6,91 4,50 [1,73; 9,85] | 4,6 ± 3,96 3,75[2,58 ; 5,03] | 0,665 |

| BIOMARCADOR | FIR N: 13 | CONTROLES N: 13 | Prueba de Mann-Whitney (CONTROLES-FIR). Sig.asintótica(bilateral) |
|------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Cél. NKT TIGIT+ | 41,15 ± 18,75 41,50 [27,30; 54,18] | 36,06 ± 23,87 38,50 [11,88; 59,38] | 0,583 |
| Cél. NKT CD69+ | 21,23 ± 32,42 2,70 [0,93; 33,23] | 26,08 ± 32,75 6,30 [4,85; 46,15] | 0,141 |
| Cél. NKT TIM3+ | 1,45 ± 2,73 0,55 [0,05; 1,65] | 4,75 ± 7,59 1,10 [0,33; 6,83] | 0,148 |
| Cél. NKT NKp30+ | 3,12 ± 4,37 1,30 [0,33; 5,43] | 3,46 ± 4,61 0,90 [0,63; 4,55] | 0,544 |
| Cél. NKT Perforina+ | 38,49 ± 21,99 32,30 [22,25; 58,80]** | 16,10 ± 15,08 12,85 [4,73; 20,10]** | 0,016** |
| Células NK reguladoras | 2,19 ± 1,15 2,05 [1,33; 2,90] | 2,19 ± 1,25 1,90 [1,08; 2,78] | 0,840 |
| Cél. NKreg TIGIT+ | 14,73 ± 11,18 12,95 [5,48; 23,75] | 22,03 ± 18,71 12,80 [9,65; 31,00] | 0,356 |
| Cél. NKreg CD69+ | 32,48 ± 36,69 10,25 [4,05; 71,50] | 59,58 ± 40,08 72,50 [13,33; 98,30] | 0,133 |
| Cél. NKreg TIM3+ | 4,18 ± 6,13 0,70 [0,00; 8,40] | 17,37 ± 26,25 7,00 [0,20; 25,78] | 0,203 |
| Cél. NKreg NKp30+ | 85,36 ± 11,49 90,10 [76,43; 94,23] | 86,37 ± 12,18 91,35 [82,38; 94,48] | 0,686 |

| BIOMARCADOR | FIR N: 13 | CONTROLES N: 13 | Prueba de Mann-Whitney (CONTROLES-FIR). Sig.asintótica(bilateral) |
|-------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Cél. NKreg Perforina+ | 9,57 ± 8,06 8,30 [1,25; 16,50] | 5,77 ± 5,53 4,40 [1,40; 9,03] | 0,32 |
| Monocitos (%) | 5,65 ± 1,50 5,75 [4,33; 6,50]* | 7,27 ± 2,23 6,95 [5,30; 9,08]* | 0,060 |
| Monocitos con HLA-DR+ | 92,00 ± ... 92,00 [92,00; 92,00] | 77,15 ± 20,99 79,05 [60,95; 96,90] | 0,614 |
| Monocitos clásicos | 73,93 ± 7,82 73,10 [68,00; 80,13] | 76,33 ± 8,43 75,45 [68,70; 84,33] | 0,453 |
| Mo clásicos CD11b_ACT+ | 87,65 ± 28,20 99,30 [88,78; 99,68] | 89,73 ± 14,82 99,10 [73,23; 99,88] | 0,772 |
| Mo clásicos CX3CR1+ | 8,06 ± 10,28 3,10 [1,63 ; 15,88] | 7,83 ± 13,16 2,55 [0,38; 11,53] | 0,436 |
| Mo clásicos CD69+ | 10,14 ± 7,59 6,75 [5,25; 15,08] | 16,00 ± 19,48 9,95 [5,48; 18,03] | 0,488 |
| Mo clásicos CCR2+ | 75,92 ± 17,15 82,25 [62,58; 87,48] | 75,45 ± 20,91 84,95 [63,00; 91,80] | 0,729 |
| Mo clásicos CCR5+ | 12,45 ± 11,71 10,35 [4,35; 13,40] | 10,82 ± 6,41 9,30 [6,03; 13,60] | 0,931 |
| Monocitos intermedios | 8,98 ± 3,72 8,35 [5,70; 11,55] | 6,68 ± 4,87 6,85 [2,65; 8,45] | 0,088 |

| BIOMARCADOR | FIR N: 13 | CONTROLES N: 13 | Prueba de Mann-Whitney (CONTROLES-FIR). Sig.asintótica(bilateral) |
|---------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Mo intermedios CD11bACT+ | 90,22 ± 27,24 99,60 [96,85; 99,88] | 94,53 ± 8,81 99,55 [87,23; 100,00] | 0,930 |
| Mo intermedios CX3CR1+ | 27,53 ± 18,30 25,35 [10,03 ; 46,15] | 25,92 ± 23,78 21,60 [6,93; 39,53] | 0,603 |
| Mo intermedios CD69+ | 19,22 ± 16,25 15,60 [7,55; 26,35] | 32,50 ± 26,07 22,70 [15,48; 42,73] | 0,141 |
| Mo intermedios CCR2+ | 64,46 ± 18,37 69,60 [54,30 ; 80,23] | 60,75 ± 20,93 66,25 [41,00; 78,20] | 0,686 |
| Mo intermedios CCR5+ | 31,08 ± 20,06 28,40 [10,65; 47,43] | 37,25 ± 20,29 35,00 [24,03; 41,93] | 0,564 |
| Monocitos No clásicos | 6,38 ± 2,60 7,10 [4,00; 8,65] | 5,98 ± 3,18 5,50 [3,43; 7,00] | 0,326 |
| Mo no clásicos CD11bACT+ | 51,35 ± 21,66 51,10 [44,45; 67,08] | 48,67 ± 20,10 52,10 [31,65; 65,55] | 0,773 |
| Mo no clásicos CX3CR1+ | 57,30 ± 30,75 62,35 [29,58; 88,85] | 62,48 ± 30,24 70,95 [36,38; 87,98] | 0,644 |
| Mo no clásicos CD69+ | 11,38 ± 5,74 11,10 [6,73; 15,30] | 18,22 ± 20,58 9,35 [7,45; 21,20] | 0,977 |
| Mo no clásicos CCR2+ | 4,58 ± 4,15 3,20 [1,25; 6,40] | 5,85 ± 5,75 4,70 [1,23; 8,68] | 0,665 |

| BIOMARCADOR | FIR N: 13 | CONTROLES N: 13 | Prueba de Mann-Whitney (CONTROLES-FIR). Sig.asintótica(bilateral) |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Mo no clásicos CCR5+ | 24,08 ± 17,60 21,60 [7,50; 42,00] | 17,43 ± 14,58 13,30 [5,85; 28,30] | 0,453 |
| Células mielodes | 5,90 ± 1,91 5,70 [4,10; 7,93] | 7,37 ± 2,77 7,25 [5,05; 8,53] | 0,248 |
| Células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs) | 4,18 ± 2,09 4,50 [2,13; 6,20] | 3,60 ± 2,80 2,50 [1,68; 5,28] | 0,356 |
| Células granulocíticas | 64,31 ± 7,01 65,00 [57,35; 70,05] | 60,80 ± 13,54 62,05 [56,48; 70,00] | 0,598 |
| Células supresoras mieloides derivadas de monocitos (MDSCs-Mo) | 7,32 ± 2,57 7,85 [5,03; 9,20] | 5,63 ± 1,95 6,00 [3,80; 7,20] | 0,065 |
| Células T CD4+ | 53,93 ± 9,32 50,70 [46,00; 63,70] | 54,69 ± 7,43 53,60 [51,00; 59,00] | 0,646 |
| Células CD4+ Treg | 6,29 ± 1,97 6,30 [4,40; 7,70] | 6,39 ± 2,52 6,30 [4,08; 8,75] | 0,926 |
| Células T CD8+ | 30,64 ± 8,62 30,00 [24,90; 35,40] | 31,36 ± 3,71 32,60 [29,50; 33,20] | 0,393 |
| Células Treg_CD25^{high} | 5,06 ± 1,81 5,20 [4,10; 5,90] | 5,80 ± 3,03 5,10 [3,00; 8,70] | 0,870 |

Nota: se señalan con un asterisco (*) los valores con resultados con $p < 0,05$ y con dos asteriscos (**) los resultados con $p < 0,01$. Los resultados se expresan como $\text{media} \pm \text{desviación típica}$; mediana (rango intercuartílico). En el análisis comparativo se utiliza la Prueba de Mann-Whitney.

A continuación, se representan los resultados descritos a través de gráficas box-plots para cada una de las variables analizadas. A continuación se muestran los resultados de los biomarcadores estadísticamente significativos en sangre periférica:

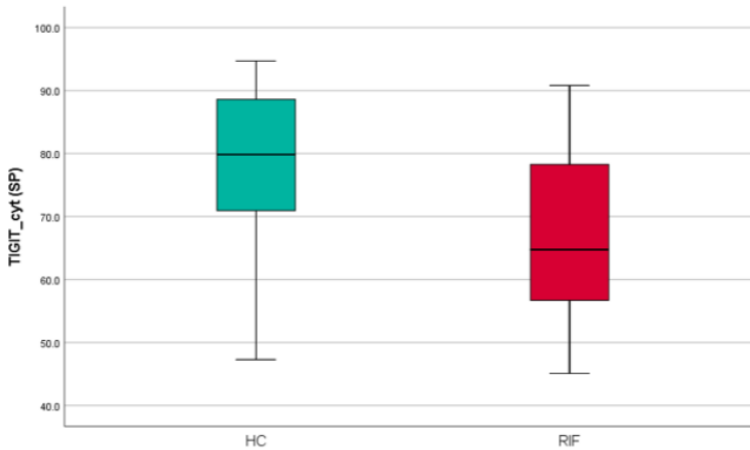


Figura 23. Gráfica box-plot para células NK citotóxicas TIGIT positivo en FIR y controles en sangre periférica.

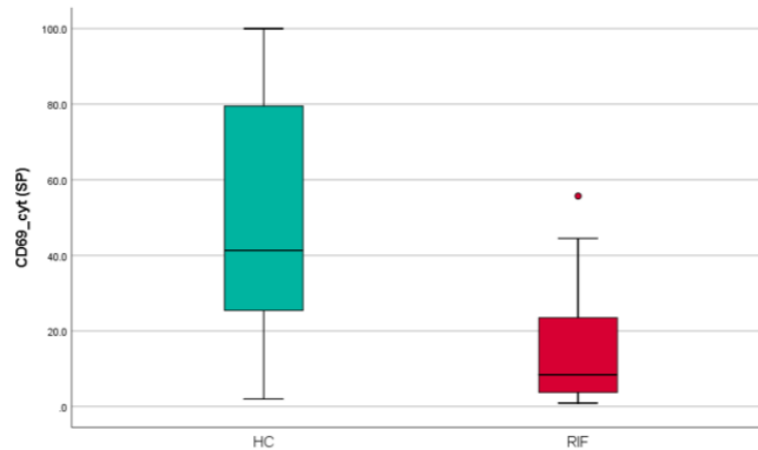


Figura 24. Gráfica box-plot para NK citotóxicas que expresan CD69 en FIR y controles en sangre periférica.

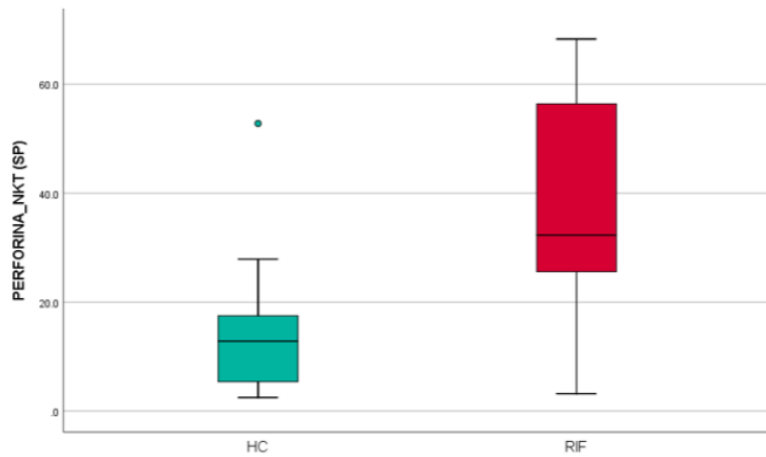


Figura 25. Gráfica box-plot para células NKT que expresan perforina en pacientes FIR y controles en sangre periférica.

A continuación se representan los gráficos box-plots correspondientes a los resultados con tendencia estadística en la comparativa entre pacientes FIR y controles en sangre periférica.

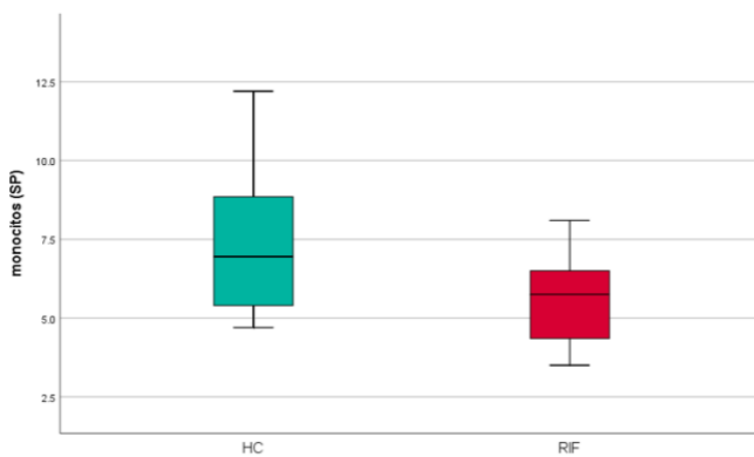


Figura 26. Gráfica box-plot para Monocitos totales en FIR y controles en sangre periférica.

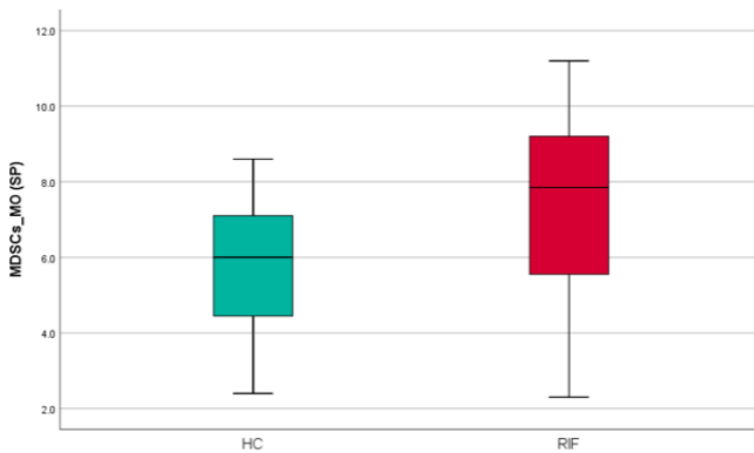


Figura 27. Gráfica box-plot para células supresoras mieloides derivadas de monocitos FIR y controles en sangre periférica.

RESUMEN DE RESULTADOS DE SIGNIFICACION ESTADÍSTICA COMPARATIVOS ENTRE FIR Y CONTROLES EN LOS TRES TEJIDOS ANALIZADOS

En cuanto al análisis de significación estadística se calcula con la prueba de Mann-Whitney y debido al tamaño muestral sólo se puede aplicar entre *pacientes FIR* y *controles sanos*. Se consideró significativo un p valor menor a 0,05 y muy significativo una p menor 0,01. Si el valor de p se sitúa entre 0,05 y 0,08 indica que presenta cierta tendencia estadística.

Resultados estadísticamente significativos:

En endometrio:

- Más presencia de las células NK citotóxicas totales y de las células NKT que expresan perforina en pacientes FIR respecto a controles sanos, mientras que para las células NK reguladoras se observa mayor presencia en controles respecto a pacientes FIR.

- Los valores hallados para las células NK citotóxicas totales y células NK reguladoras resultan estadísticamente significativos ($p < 0,05$) mientras que los obtenidos para las células NKT que expresan perforina resultan muy significativos ($p < 0,01$).

En líquido folicular:

- Las células citotóxicas NKp30 positivo y las células reguladoras NKp30 positivo tienen mayor expresión en líquido folicular de controles que en pacientes FIR. Por otro lado, las células NKT que expresan CD69, las células NKT que expresan perforina y las células reguladoras NK que expresan CD69 presentan mayor presencia en pacientes FIR respecto a controles.
- En cuanto a la significación estadística, los resultados obtenidos para las células NKT que expresan CD69, las células reguladoras que expresan CD69 y las células reguladoras NKp30 positivo son estadísticamente significativos ($p < 0,05$), mientras que los obtenidos para células NKT que expresan perforina y las células citotóxicas NKp30+ resultan muy significativos ($p < 0,01$).

En sangre periférica:

- Los resultados obtenidos para células citotóxicas TIGIT positivo y células citotóxicas que expresan CD69 tienen una mayor expresión en la sangre de controles respecto a FIR; mientras que las células NKT que expresan perforina tienen mayor presencia en FIR que de controles.
- Los resultados son estadísticamente significativos en el caso de las Células citotóxicas TIGIT positivo con una $p < 0,05$, y estadísticamente muy significativos para las células NKT que expresan perforina y para las células citotóxicas que expresan CD69 con una $p < 0,01$.

Tabla 18. Resumen de resultados con significación estadística en FIR y controles, en endometrio, líquido folicular y sangre periférica.

| TEJIDO | BIOMARCADORES ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVOS | |
|-------------------|-----------------------------------------------|------------------------------|
| | Aumento en FIR | Aumento en controles |
| Endometrio | Cél. NKT Perforina +* | Cél. NK reguladoras** |
| | Cél. NK citotóxicas** | |
| Líquido folicular | Cél. NKT CD69+* | Cél. NK reguladoras NKp30 +* |
| | Cél. NKreg CD69+* | Cél. Citotóxicas NKp30 +** |
| | Cél. NKT perforina +** | |
| Sangre periférica | Cél. NKT perforina +** | Cél. NK citotóxicas TIGIT +* |
| | | Cél. NK citotóxicas CD69 +** |

Nota: se señalan con un asterisco (*) los valores con resultados con $p < 0,05$ y con dos asteriscos (**) los resultados con $p < 0,01$.

Resultados con tendencia estadística:

En endometrio no se hallaron biomarcadores con tendencia estadística.

En líquido folicular.

Los resultados obtenidos para las células reguladoras que expresan perforina y los de monocitos CCR5 positivos presentaron una mayor presencia en la sangre periférica de las pacientes FIR respecto a los controles, mientras que los resultados indicaron una mayor presencia de células supresoras derivadas de mieloides en el líquido folicular de los controles respecto a las pacientes FIR.

En sangre periférica:

- Los valores obtenidos para los Monocitos totales indicaron una mayor expresión de los mismos en controles respecto a las pacientes FIR, mientras que los resultados para las células supresoras mieloides derivadas de monocitos revelaron mayores niveles en sangre de pacientes FIR respecto a los controles.

Tabla 19. Resumen de resultados con tendencia estadística en FIR y controles, en líquido folicular y sangre periférica.

| TEJIDO | BIOMARCADORES CON TENDENCIA ESTADÍSTICA | |
|-------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| | Aumento en FIR | Aumento en controles |
| Líquido folicular | Cél. reguladoras perforina + | Cél. supresoras derivadas de mieloides (MDSCs) |
| | Monocitos CCR5 + | |
| Sangre periférica | Cél. supresoras mieloides derivadas de monocitos (MDSCs_MO) | Monocitos totales |

6.3 Biomarcadores inmunofenotípicos: estudios de correlación estadística.

A continuación, se detallan los datos del estudio de correlación de las variables significativas entre los dos grupos de participantes, FIR y controles, en cada uno de los tejidos analizados.

Tabla 21. Resultados de correlaciones de Spearman en endometrio para controles.

| CONTROLES N: 10 | Perforina+ NKcit | TIGIT+ NKcit |
|----------------------------|-------------------------|---------------------|
| TIGIT+ NKcit | -0,68 P< 0,05 | |
| NKp30+ NKcit | 0,77 P<0,05 | -0,77 P< 0,01 |
| MDSCs_M | 0,71 P<0,05 | |

En el análisis de correlación de Spearman realizado entre los biomarcadores inmunológicos significativos en el endometrio de pacientes controles, se identificaron asociaciones relevantes en un total de 10 casos analizados (Tabla 21). Los biomarcadores evaluados incluyeron TIGIT+ NKcit, un marcador de regulación inmunológica en células citotóxicas; NKp30+ NKcit, un receptor activador en células NK; Perforina+ NKcit, una proteína clave en la citotoxicidad mediada por células NK; y MDSCs_M, células supresoras derivadas de mieloides implicadas en la modulación del sistema inmunitario.

Entre los resultados significativos, se observó una fuerte correlación negativa entre TIGIT+ NKcit y NKp30+ NKcit ($r = -0,77$, $P < 0,01$), indicando que a medida que los niveles de TIGIT+ NKcit aumentan, los de NKp30+ NKcit disminuyen de manera significativa. Asimismo, se encontró una correlación negativa moderada entre TIGIT+ NKcit y Perforina+ NKcit ($r = -0,68$, $P < 0,05$), sugiriendo una asociación entre estos dos biomarcadores.

Por el contrario, se identificaron correlaciones positivas significativas. Entre NKp30+ NKcit y Perforina+ NKcit, la correlación fue fuerte y positiva ($r = 0,77$, $P < 0,05$), lo que implica que un incremento en NKp30+ NKcit se asocia con un aumento concomitante de la subpoblación Perforina+ NKcit. Del mismo modo, se observó una correlación positiva moderada entre las subpoblaciones Perforina+ NKcit y MDSCs_M ($r = 0,71$, $P < 0,05$), indicando que niveles elevados de perforina sobre las células NK citotóxicas se relacionan con un aumento en las células supresoras derivadas de mieloides.

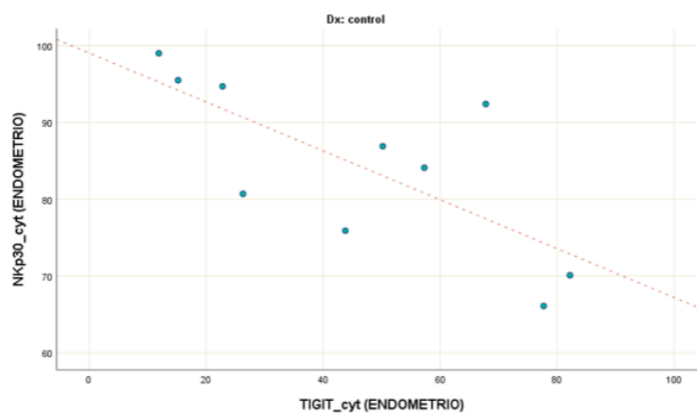


Figura 28. Gráfica de dispersión NKp30+ NKcit/ TIGIT+ NKcit para controles en endometrio.

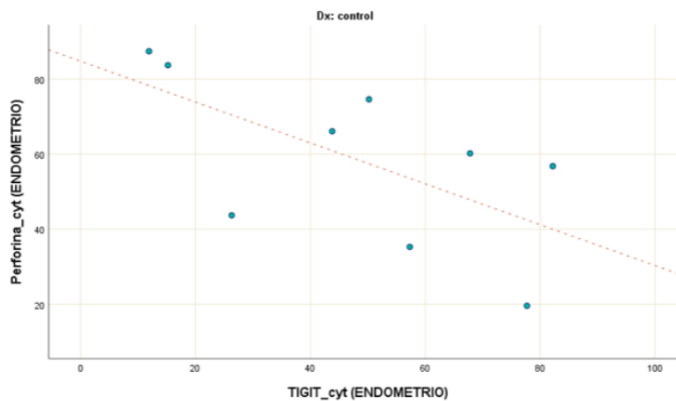


Figura 29. Gráfica de dispersión Perforina+ NKcit/ TIGIT+ NKcit para controles en endometrio.

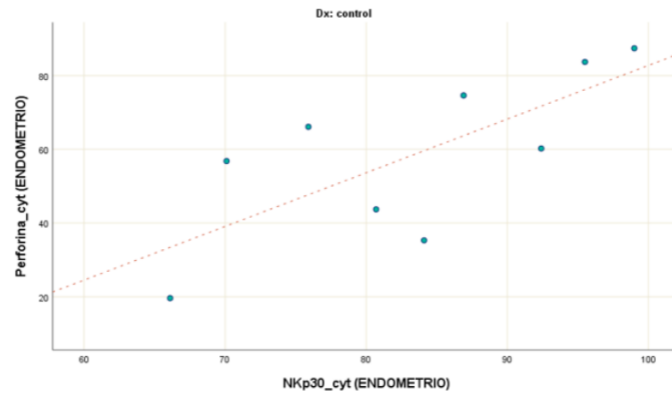


Figura 30. Gráfica de dispersión Perforina+ NKcit/ NKp30+ NKcit para controles en endometrio.

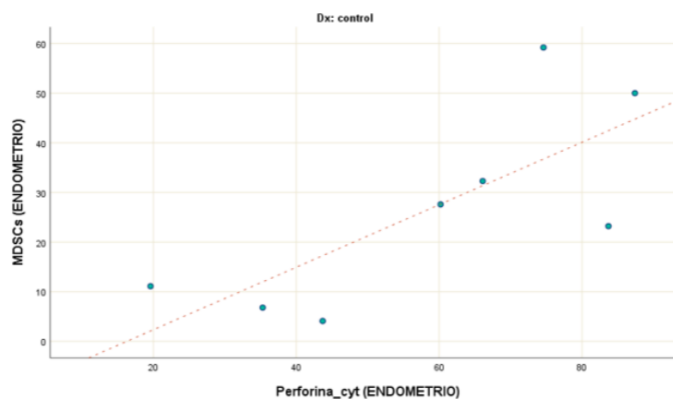


Figura 31. Gráfica de dispersión MDSCs_M/ Perforina+ NKcit para controles en endometrio.

Tabla 22. Resultados correlaciones de Spearman en endometrio para casos FIR.

| FIR N: 13 | NKcit |
|-------------------------|------------------|
| TIGIT+ NKcit | -0,73 P<0,01 |
| CD69+ NKcit | -0,59 P< 0,05 |
| Perforina+ NKcit | 0,67 P< 0,05 |

El análisis de correlación de Spearman en pacientes controles y pacientes con FIR (tabla 22) revela patrones consistentes y diferencias clave en las asociaciones entre biomarcadores inmunológicos en el endometrio. En ambos grupos se observa una fuerte correlación negativa entre la citotoxicidad (NKcit) y el marcador regulador TIGIT+ NKcit ($r = -0,77$, $P < 0,01$ en controles; $r = -0,73$, $P < 0,01$ en FIR), indicando una relación inversa robusta en ambos contextos. Asimismo, la subpoblación Perforina+ NKcit muestra correlaciones positivas con marcadores citotóxicos en ambos grupos, aunque en el grupo FIR la relación con NKcit es moderada ($r = 0,67$, $P < 0,05$), mientras que en controles incluye además correlaciones significativas con NKp30+ NKcit ($r = 0,77$, $P < 0,05$) y con MDSCs_M ($r = 0,71$, $P < 0,05$), destacando una mayor diversidad de interacciones. En FIR, el marcador CD69+ NKcit, no significativo en controles, presenta una correlación negativa moderada con NKcit ($r = -0,59$, $P < 0,05$), sugiriendo un posible mecanismo de regulación específico en estos pacientes. Estas diferencias podrían reflejar variaciones en las dinámicas inmunológicas entre controles y pacientes con FIR, con un perfil inmunológico más diversificado en los controles frente a una regulación más específica en FIR.

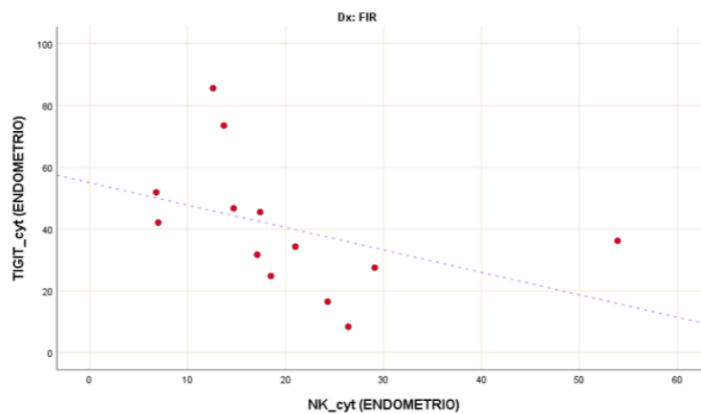


Figura 32. Gráfica de dispersión TIGIT+ NKcit/ NKcit para FIR en endometrio.

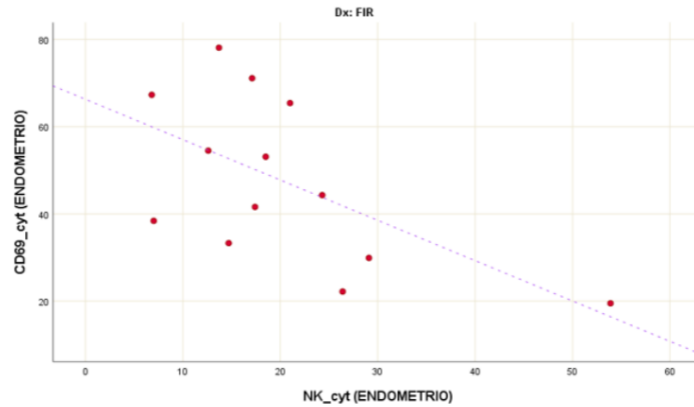


Figura 33. Gráfica de dispersión CD69+ NKcit/ NKcit para FIR en endometrio.

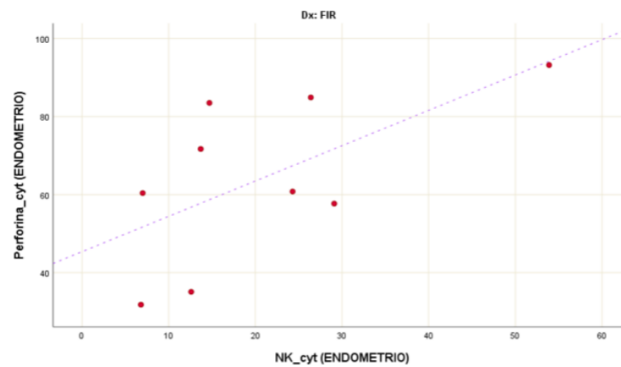


Figura 34. Gráfica de dispersión Perforina+ NKcit/ NKcit para FIR en endometrio.

Interpretación general.

En endometrio, los resultados en los controles muestran unos biomarcadores inmunológicos más equilibrados, con una respuesta inmunológica que tiende a la regulación mediada por TIGIT+ NKcit y MDSCs_M, mientras que en pacientes FIR, se observa un aumento de los marcadores citotóxicos como NKcit y Perforina+ NKcit con disminución de CD69+ NKcit y TIGIT+ NKcit que son fundamentalmente reguladores. Este desequilibrio podría estar contribuyendo al fallo de implantación.

Tabla 23. Resultados de correlaciones de Spearman en líquido folicular para controles.

| CONTROLES N: 12 | NKcit | MDSC_MO |
|----------------------------|-----------------|----------------|
| NKp30+ NKcit | -0,64 P<0,05 | 1,00 P<0,01 |
| MDSCs_MO | -0,90 P<0,05 | |

En el análisis de correlación de Spearman realizado entre los biomarcadores inmunológicos significativos en el líquido folicular de pacientes controles, se identificaron asociaciones relevantes en un total de 12 casos analizados (Tabla 23). Los biomarcadores evaluados incluyeron células NK citotóxicas totales (NKcit), células con función citotóxica; NKp30+ NKcit, un receptor activador en células NK, y MDSCs_MO, células supresoras mieloides derivadas de monocitos implicados modulación del sistema inmunitario.

Entre los resultados significativos, se observó una moderada-alta correlación negativa entre NKcit y NKp30+ NKcit ($r = -0,64$, $P < 0,05$), indicando que una elevación en los niveles de NKcit se asocian a una disminución de los niveles de células NKcit que sobreexpresan NKp30+. Asimismo, se encontró una fuerte correlación negativa entre NKcit y MDSCs_MO ($r = -0,90$, $P < 0,05$), que se indica que el aumento de células NK citotóxicas implica un detrimento en los niveles de células supresoras mieloides derivadas de monocitos (MDSCs_MO).

Por el contrario, se identificó una fuerte correlación significativa positiva entre NKp30+ NKcit y MDSC_MO ($r = 1,00$, $P < 0,01$), lo que implica que un incremento en NKp30+ NKcit se asocia con un aumento concomitante de las células supresoras mieloides derivadas de monocitos (MDSCs_MO).

Tabla 24. Resultados de correlaciones de Spearman en líquido folicular para casos- FIR.

| FIR N: 12 | NKcit | MDSCs_M |
|-------------------------|-----------------|-----------------|
| TIGIT+ NKcit | -0,73 P<0,01 | |
| CD69+ NKcit | -0,59 P<0,05 | -0,64 P<0,05 |
| Perforina+ NKcit | 0,83 P<0,05 | 0,83 P<0,05 |
| MDSCs_M | 0,76 P<0,01 | |

El análisis de correlación de Spearman en pacientes con FIR (tabla 22) revela las siguientes asociaciones entre biomarcadores inmunológicos en el líquido folicular. Los biomarcadores evaluados incluyeron NKcit (número total de células NK citotóxicas) TIGIT+ NKcit, un marcador de regulación inmunológica en células citotóxicas; CD69+ NKcit proteína que indica que la célula NK está activa y lista para iniciar su actividad efectora; Perforina+ NKcit, otra proteína clave en la citotoxicidad mediada por células NK; y MDSCs_M, células supresoras derivadas de mieloides implicadas en la modulación..

Entre los resultados significativos, se observó una fuerte correlación negativa entre TIGIT+ NKcit y NKcit ($r = -0,73$, $P < 0,01$), indicando que a medida que los niveles de TIGIT+ NKcit aumentan, los de NK citotóxicas totales sufren un detrimento. Asimismo, se encontró una correlación negativa moderada entre CD69+ NKcit y NKcit, y CD69+ NKcit y MDSCs_M ($r = -0,59$, $P < 0,05$, y $r = -0,64$, $P < 0,05$ respectivamente), de manera que a medida que los niveles de CD69+ NKcit aumentan, los de NKcit y/o los de células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs_M) disminuyen.

Por el contrario, se identificaron tres correlaciones positivas significativas que se detallan a continuación: Perforina+ NKcit establece una fuerte asociación positiva con NKcit ($r: 0,83$ y $p < 0,05$) y también con MDSCs_M ($r = 0,83$ y $p < 0,05$), es decir, que niveles

altos de perforina sobre las células NK citotóxicas se relacionan con un aumento de las células NK citotóxicas totales y también con una elevación de las células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs_M).

Por otro lado, las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC_M) establecen una fuerte correlación positiva con las células NK citotóxicas totales ($r= 0,076$ y $p< 0,01$), indicando una elevación en los niveles de MDSC_M implica un aumento concomitante de células NK citotóxicas.

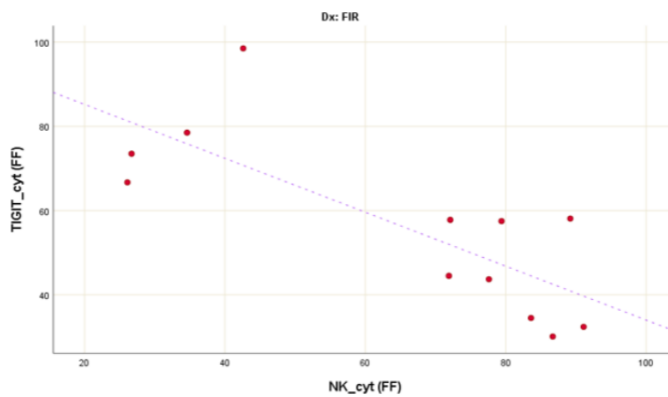


Figura 35. Gráfica de dispersión TIGIT+ NKcit/ NKcit para FIR en líquido folicular.

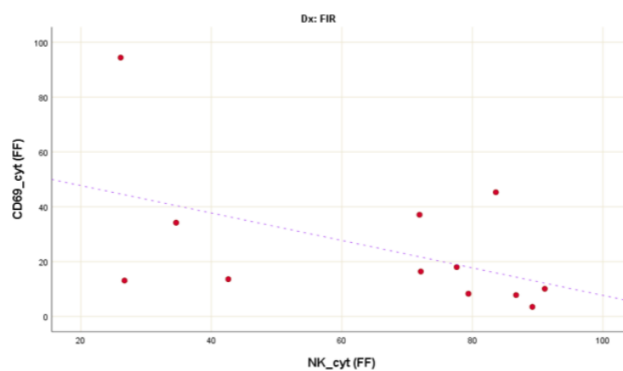


Figura 36. Gráfica de dispersión CD69+ NKcit/ NKcit para FIR en líquido folicular.

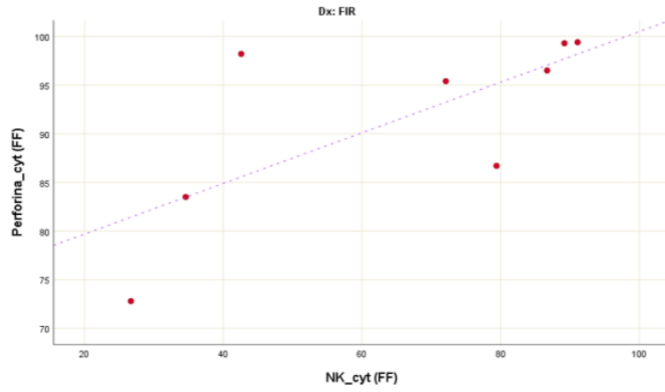


Figura 37. Gráfica de dispersión Perforina+ NKcit/ NKcit para FIR en líquido folicular.

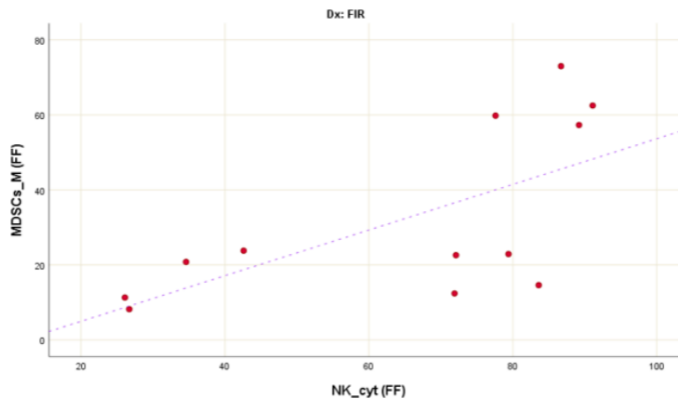


Figura 38. Gráfica de dispersión para MDSCs_M/ NKcit para FIR en líquido folicular.

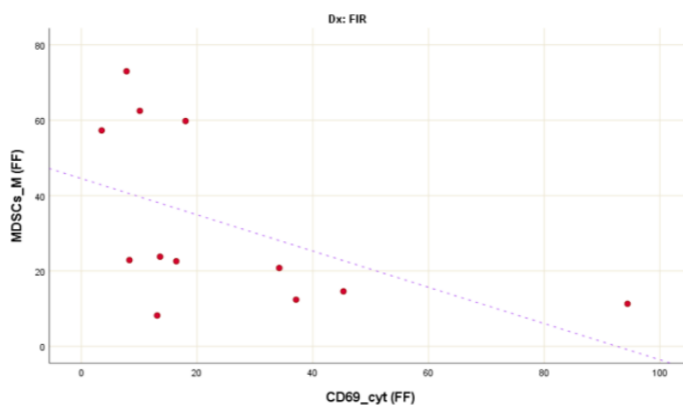


Figura 39. Gráfica de dispersión para MDSCs_M/ CD69+ NKcit para FIR en líquido folicular.

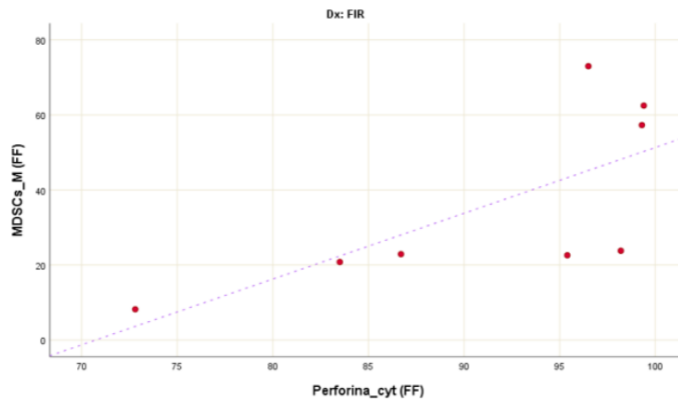


Figura 40. Gráfica de dispersión para MDSCs M/ Perforina+ NKcit para FIR en líquido folicular.

Interpretación general.

Los resultados en líquido folicular reflejan que en controles existe un equilibrio entre las células NK activadas y las células reguladoras (MDSCs_MO), mientras que en FIR se observa una actividad citotóxica mediada por NK citotóxicas totales y NK citotóxicas con sobreexpresión de perforina, con un aumento de expresión de elementos reguladores a través de NK citotóxicas TIGIT positivo y de células supresoras mieloides derivadas de monocitos (MDSCs_MO). Esta disregulación puede favorecer el fallo de implantación.

Tabla 25. Resultados de correlaciones de Spearman en sangre periférica para controles.

| CONTROLES N: 12 | TIM3+ NKcit | NKp30+ NKcit | MDSC_MO |
|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| NKcit | | | 0,70 P<0,05 |
| TIGIT+ NKcit | -0,62 p<0,05 | | |
| CD69+ NKcit | 0,65 P<0,05 | | |
| MDSCs_M | | 0,65 P<0,05 | |

En el análisis de correlación de Spearman realizado entre los biomarcadores inmunológicos significativos en la sangre periférica de controles se identificaron asociaciones relevantes en un total de 12 casos analizados (Tabla 25). Los biomarcadores evaluados incluyeron los ya descritos previamente NKcit, TIGIT+ NKcit, NKp30+ NKcit, CD69+ NKcit, MDSCs_M, MDSCs_MO y TIM3+ NKcit que presenta función reguladora en la activación y funcionalidad de las células NK.

Entre los resultados significativos, se observó una correlación negativa moderada entre TIGIT+ NKcit y TIM3+ NKcit ($r = -0,62$, $p < 0,05$), lo que indica que la elevación de los niveles de NK citotóxicas con sobreexpresión TIGIT se asocia a un detrimento de las células NK con sobreexpresión de TIM3. Por el contrario, se identificaron varias correlaciones positivas significativas que son las siguientes: una correlación moderada-baja entre CD69+ NKcit y TIM3+ NKcit ($r = 0,65$, $p < 0,05$); entre MDSCs_M y NKp30+ NKcit ($r = 0,65$, $p < 0,05$), y por último, una fuerte correlación positiva entre NKcit y células supresoras mieloides derivadas de monocitos (MDSCs_M) ($r = 0,70$, $p < 0,05$), lo que indica que un nivel más elevado de una variable se relaciona con un aumento de la otra.

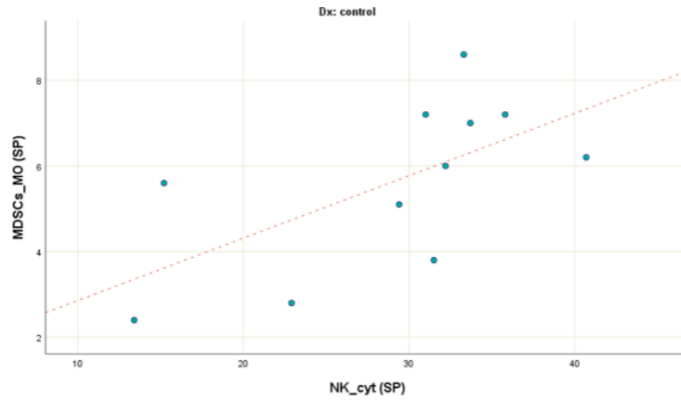


Figura 41. Gráfica de dispersión para MDSCs_MO/ NKcit para controles en sangre periférica.

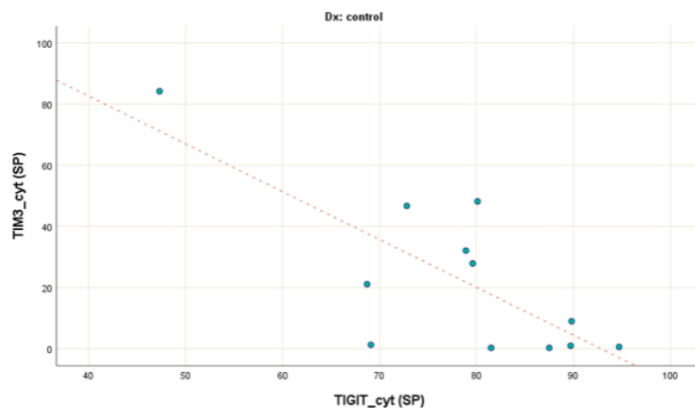


Figura 42. Gráfica de dispersión para TIM3+ NKcit/ TIGIT+ NKcit para controles en sangre periférica.

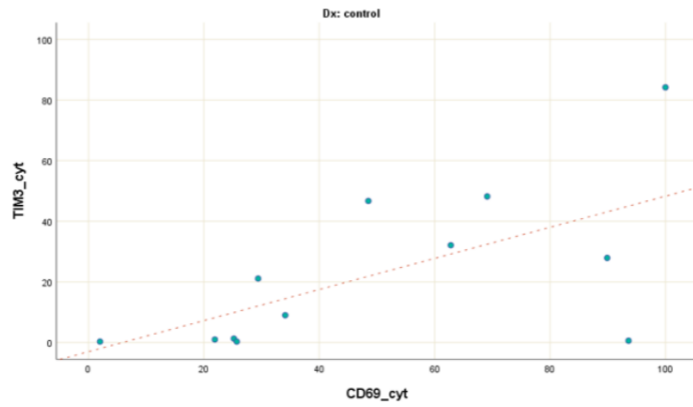


Figura 43. Gráfica de dispersión para TIM3+ NKcit/ CD69+ NKcit para controles en sangre periférica.

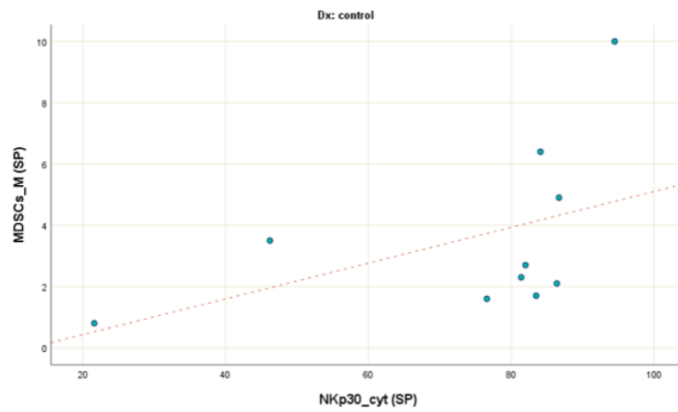


Figura 44. Gráfica de dispersión para MDSCs M/ NKp30+ NKcit para controles en sangre periférica.

Tabla 26. Resultados de correlaciones de Spearman en sangre periférica para casos-FIR.

| FIR N:12 | TIM3 + NKcit |
|------------------|-----------------|
| CD69+ NKcit | 0,67 P<0,05 |
| Perforina+ NKcit | -0,68 P<0,05 |

En el análisis de correlación de Spearman realizado entre los biomarcadores inmunológicos significativos en sangre periférica de pacientes FIR, se identificaron asociaciones relevantes en un total de 12 casos analizados (Tabla 26). Los biomarcadores evaluados incluyeron CD69+ NKcit, Perforina+ NKcit y TIM3 + NKcit, cuyas funciones ya han sido descritas en los apartados previos.

Entre los resultados significativos se observa, en primer lugar, una asociación negativa moderada-alta entre NKcit que sobreexpresa perforina con TIM3+ NKcit ($r = -0,68$, $p < 0,05$) lo que indica que a medida que se elevan los niveles de células NK citotóxicas con sobreexpresión de perforina se produce un detrimento de los niveles de células NK citotóxicas con sobreexpresión de TIM3.

Por el contrario se observa una correlación moderada-alta positiva entre CD69+ NKcit y TIM3+ NKcit ($r = 0,67$, $P < 0,05$), lo que indica que ante una elevación en los niveles de células NK citotóxicas que sobreexpresan CD69 se produce un consecuente aumento de células NK citotóxicas que expresan TIM3.

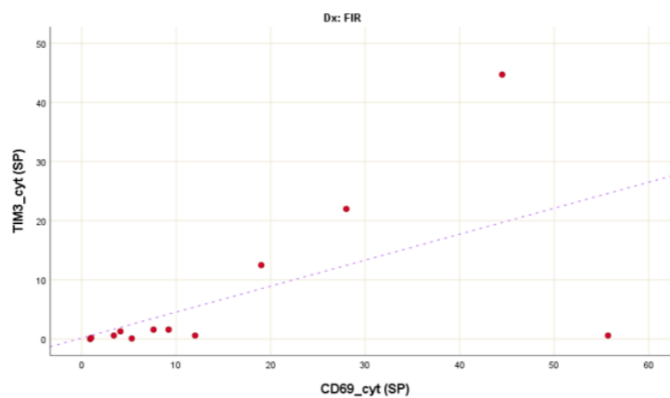


Figura 45. Gráfica de dispersión para TIM3+ NKcit/ CD69+ NKcit para FIR en sangre periférica.

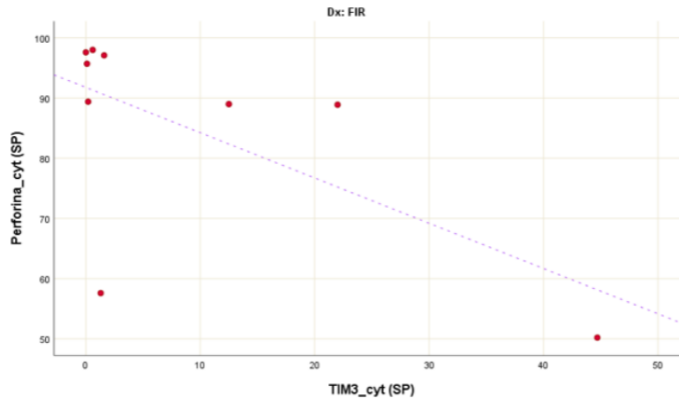


Figura 46. Gráfica de dispersión para Perforina+ NKcit/ TIM3+ NKcit para FIR en sangre periférica.

Interpretación general:

En el análisis de sangre periférica, los resultados en controles indican que los biomarcadores inmunológicos muestran un equilibrio entre activación y regulación como se ve en entre las células NK citotóxicas y las MDSCs_M; entre los biomarcadores de regulación, TIGIT y TIM3; así como las relaciones entre CD69+ NKcit (activación) y TIM3+ NKcit (regulación); y NKp30+ NKcit (activación) y MDSCs_M (supresión).

En pacientes con FIR, los resultados indican un desequilibrio entre los mecanismos de activación y regulación inmunológica. De la correlación positiva entre CD69 y TIM3 se interpreta que cuando se produce una activación de células citotóxicas (CD69+) se asocia un incremento de regulación (TIM3+) para compensar; mientras que de la correlación negativa entre TIM3+ NKcit y Perforina+ NKcit se infiere que el sistema de regulación mediado por TIM3 intenta inhibir la actividad citotóxica mediada por perforina.

RESUMEN RESULTADOS CORRELACION.

Tabla 27. Resumen de resultados de correlación en endometrio, líquido folicular y sangre periférica en pacientes FIR y controles.

| | | ASOCIACION POSITIVA | | ASOCIACION NEGATIVA | | |
|----------------------|-----------|---------------------|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| | | FUERTE (0,8-1) | MODERADA- ALTA (0,6-0,8) | FUERTE (0,8-1) | MODERADA- ALTA (0,6-0,8) | MODERADA- BAJA (0,4-0,6) |
| ENDOMETRIO | CONTROLES | | NKp30+ NKcit/ Perforina+ NKcit | | NKp30+ NKcit/ TIGIT+ NKcit | |
| | | | MDSCs_M/ Perforina+ NKcit | | Perforina+ NKcit /TIGIT+ NKcit | |
| | FIR | | Perforina+ NKcit/ NKcit | | TIGIT+ NKcit/ NKcit | CD69+ NKcit/ NKcit |
| LIQUIDO FOLICULAR | CONTROLES | | NKp30+ NKcit/ MDSC_MO | MDSCs_MO/ NKcit | NKp30+ NKcit/ NKcit | |
| | FIR | | Perforina+ NKcit/ NKcit | MDSCs_M/ NKcit | TIGIT+ NKcit/ NKcit | CD69+ NKcit/ NKcit |
| | | | | Perforina+ NKcit/ MDSCs_M | | CD69+ NKcit/ MDSCs_M |
| SANGRE PERIFÉRICA | CONTROLES | | NKcit/ MDSC_MO | | TIGIT+ NKcit/ TIM3+ NKcit | |
| | | | CD69+ NKcit TIM3+ NKcit | | | |
| | | | MDSCs_M/ NKp30+ NKcit | | | |
| | FIR | | CD69+ NKcit/ TIM3 + NKcit | | Perforina+ NKcit/ TIM3 + NKcit | |

Los datos recogidos en la tabla 27 que resumen todos los resultados del análisis de correlación en los tres tejidos analizados, en los dos grupos de pacientes, se describen a continuación:

En el endometrio se objetivaron las siguientes asociaciones significativas:

- En controles hay una asociación positiva moderada-alta para las células NKp30+ NKcit y las células Nkcit con sobreexpresión de Perforina; y para las células MDSCs_M y las NKcit con sobreexpresión de Perforina. Mientras que la asociación es negativa y moderada-alta para las células NK citotóxicas NKp30+ y las células NK citotóxicas TIGIT+, y las células NKcit con sobreexpresión de perforina y las NK citotóxicas TIGIT+.
- Para pacientes FIR se objetivó una asociación positiva y moderada-alta para las células NK citotóxicas con sobreexpresión de Perforina y las NK citotóxicas totales, mientras que se observa una asociación negativa moderada alta para las células NKcit TIGIT+ y las NK citotóxicas totales; y negativa y moderada- baja para las células NK citotóxicas con CD69+ y las NK citotóxicas totales.

En líquido folicular se determinaron las siguientes asociaciones significativas:

- En controles, una asociación positiva y fuerte para las células citotóxicas NKp30+ y las células MDSC_MO; y una asociación negativa y fuerte para las células MDSCs_MO y las NK citotóxicas totales. También se observó una asociación negativa pero moderada alta para las células NKcit NKp30+ y las NK citotóxicas totales.
- En pacientes FIR se observó una asociación positiva y fuerte para las células NK con sobreexpresión de perforina y las células MDSCs_M; así como para las NKcit con sobreexpresión de Perforina y las NK citotóxicas totales. La correlación encontrada fue moderada-alta para las células

MDSCs_M y las NK citotóxicas totales. Por otro lado se observó una relación negativa moderada-alta para las NK citotóxicas TIGIT+ y las NK citotóxicas totales; y para las NK CD69+ y las células MDSCs_M. Finalmente se determinó una relación negativa moderada-baja para las células NK citotóxicas CD69+ y las NK citotóxicas totales.

En sangre periférica se hallaron las siguientes asociaciones significativas:

- En controles una correlación positiva y moderada-alta para las células NK citotóxicas totales y las MDSC_MO; para las células NK citotóxicas que sobreexpresan CD69 y las células NK citotóxicas TIM3+; y para las MDSCs_M y las células citotóxicas NKp30+. Por otro lado, se determinó una correlación negativa y moderada-alta para las células NK citotóxicas TIGIT+ y las células NK citotóxicas TIM3+.
- En pacientes FIR se determinó una correlación positiva moderada-alta para las células NK CD69+ y las células NK citotóxicas TIM3+; así como una asociación negativa moderada-alta para las células NK citotóxicas con sobreexpresión de perforina y las NK citotóxicas TIM3+.

Interpretación general.

Los controles muestran un equilibrio entre activación y regulación inmunológica en los tres tejidos estudiados. En pacientes FIR, se identificó un perfil de activación aumentado y una regulación insuficiente, especialmente en endometrio y líquido folicular. Este desequilibrio en los mecanismos inmunológicos podría contribuir al fallo de implantación.

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN.

El FRR afecta entre el 1 % y el 5 % de las mujeres en edad reproductiva(1), según su definición más estricta, aunque puede alcanzar hasta un 10% dependiendo de los criterios diagnósticos(3). Este término incluye dos procesos con alteración a nivel de la interfaz materno-fetal: los abortos recurrentes (AR) y el fallo de implantación recurrente (FIR) en el contexto de los tratamientos de FIV.

Este trabajo versa sobre la identificación de biomarcadores de las posibles causas o patofisiología inflamatorias de ambos, para lo cual se ha realizado un análisis extenso de inmunofenotipo de subpoblaciones de células NK, monocitos y macrófagos en paralelo sobre muestras de endometrio, líquido folicular y sangre periférica de pacientes con FIR y controles sanos (mujeres fértiles). Por motivos de diseño del estudio, el análisis estadístico de significación y correlación se ha desarrollado únicamente en pacientes con FIR y mujeres con fertilidad probada (controles sanos) dado que en última instancia el tamaño muestral en la rama de AR no fue suficiente para aplicar estudios con una adecuada potencia estadística.

Los datos obtenidos son congruentes en varias áreas clave y refuerzan la idea de que el sistema inmunitario desempeña un papel central en el FIR. Los resultados sugieren diferencias inmunológicas significativas entre mujeres fértiles y pacientes con FIR en tres tejidos clave: endometrio, líquido folicular y sangre periférica. Estas diferencias abarcan subpoblaciones de células NK y NKT, incluyendo variaciones en marcadores de activación (CD69) y citotoxicidad (perforina).

A continuación se discuten los hallazgos más relevantes que hemos obtenido, en el contexto delo descrito en la literatura médica. Para favorecer su comprensión debido a la gran cantidad de subpoblaciones estudiadas, se ha organizado la discusión por tejido de origen (endometrio, líquido folicular y sangre periférica), y por grupo de estudio (FIR y controles sanos).

7.1 En endometrio:

A- Niveles más elevados de células NK citotóxicas totales y de células NKT que expresan perforina en pacientes con FIR.

Las células NK citotóxicas y las células NKT son linfocitos de la inmunidad innata, y de la inmunidad innata y adaptativa, respectivamente. Su función es la eliminación de otras dianas celulares (células infectadas, tumorales, etc.) a través de la secreción de diversas citocinas, y de enzimas contenidas en sus gránulos, como perforina o granzima. En el contexto del FIR, una desregulación de la actividad de las NK citotóxicas o de las células NKT puede favorecer un microambiente hostil que afecte a la tolerancia materno- embrionaria-fetal.

En nuestro estudio se observa una expresión significativamente mayor de células NK citotóxicas totales y de células NKT con expresión de que expresan perforina en el endometrio de pacientes con FIR, resultados compatibles con lo publicado en la literatura científica. Según un estudio reciente de Cuadrado-Torroglosa et al., 2023, se encontró que un mayor porcentaje de células NK con perfil citotóxico en el endometrio de pacientes con AR, si bien los autores, al no observarse una relación significativa entre ese aumento celular y los genotipados KIR, consideraron que dicho hallazgo no pueda ser considerado como la única causa inmunológica de los AR(122).

Un trabajo reciente de Braun et al., publicado en 2023 encontró que las pacientes con AR mostraban un aumento significativo de la proporción de células NKT en el endometrio, en una relación casi el doble respecto a las pacientes fértiles, lo que podría asociarse a un intento de modulación inmunológica en respuesta a las alteraciones locales de las pacientes con AR(123).

Otro trabajo de Fan et al (2023) para endometrio en el que se hace la secuenciación transcriptómica y el análisis inmunohistoquímico de las células inmunes endometriales más relevantes: NK, macrófagos, células T y células B, revela una proporción de células NK uterinas CD56+, células NKT CD57+, macrófagos CD68+ y células B significativamente elevadas en pacientes con FIR(124).

En conclusión, los estudios revelan que los niveles elevados de células NK citotóxicas y células NKT con expresión de que expresan perforina están asociadas con FIR. Se requiere ampliar esta investigación para considerarlos marcadores fiables.

B- Niveles más elevados de células NK reguladoras en el endometrio de mujeres fértiles.

Las células NK reguladoras (NKreg) son una subpoblación de linfocitos NK que desempeñan un papel inmunomodulador, principalmente mediante la secreción de citocinas antiinflamatorias, como IL-10 y TGF- β . Estas células ayudan a mantener la tolerancia inmunológica materno-fetal y equilibran la respuesta inmunológica para favorecer la implantación y el desarrollo embrionario.

Nuestros resultados muestran un porcentaje significativamente mayor de NKreg en el grupo control de mujeres fértiles respecto a las pacientes con FIR. El estudio publicado recientemente por Von Woon refiere que niveles elevados de NK uterinas (uNK) se pueden asociar con fallo reproductivo, tanto abortos recurrentes como fallos de implantación, sin referirse específicamente a NK reguladoras, pero a día de hoy todavía no existe un grado de evidencia biomarcador de fallo reproductivo de causa inflamatoria(83). Sí que existen investigaciones sobre los linfocitos T reguladoras (Treg) en el endometrio preimplantacional de pacientes con FIR, pero con resultados escasos y controvertidos hasta la fecha. Hay estudios con conclusiones discordantes que informan tanto un aumento como de una disminución de las cantidades de células Treg, respectivamente, en mujeres que sufren infertilidad, las cuales a priori tienen un papel fundamental en el establecimiento del embarazo y sus alteraciones pueden derivar en infertilidad, por lo que se necesita más investigación al respecto(125).

En resumen, se puede decir que las mujeres fértiles tienden a tener niveles más altos de células NK reguladoras en el endometrio en comparación con las pacientes con FIR, pero se debe seguir investigando.

7.2 En líquido folicular:

La investigación en líquido folicular es innovadora, ya que existen pocos estudios previos. El líquido folicular parece reflejar desequilibrios inmunitarios que pueden interferir con la maduración ovocitaria y, potencialmente, con el éxito de la implantación.

A- Las células NKT que expresan CD69, las células NKT que expresan que expresan perforina y las células NK reguladoras que expresan CD69 presentaron niveles más altos en pacientes FIR.

Células NKT que expresan CD69 y Células NKT que expresan perforina.

Las células NKT son una subpoblación híbrida con características de células T y NK, y desempeñan un papel crucial en la regulación inmunológica local ya que contribuyen a la tolerancia inmunológica en la interfaz materno-fetal mediante la secreción de citocinas y la regulación de otras células inmunes, como las Treg.

En nuestro estudio se observó una presencia significativamente mayor de células NKT con expresión de CD69 en el líquido folicular de pacientes FIR, lo que pudiera estar relacionado con la disfunción inmunológica observada en estas pacientes. CD69 es un marcador de activación temprana que se expresa en la superficie de diversas células inmunitarias, incluidas las células NKT, poco después de su activación. En el contexto del líquido folicular de pacientes con fallo reproductivo (FIR), la expresión de CD69 en células NKT adquiere especial relevancia debido a su papel en la modulación de la respuesta inmunitaria local. Este receptor ha sido asociado con la actividad citotóxica de las células NKT, actuando como un estímulo que potencia su capacidad para eliminar células anormales(126), un proceso crucial en el microambiente folicular. Además, la expresión de CD69 está vinculada a la producción de citoquinas proinflamatorias como IFN- γ y TNF- α , las cuales son esenciales para orquestar la respuesta inmune y potenciar las funciones citotóxicas de estas células(127). Asimismo, CD69 influye en la supervivencia, proliferación y

activación sostenida de las células NKT, aspectos críticos para mantener una respuesta inmunitaria eficaz en un entorno que requiere un equilibrio inmunológico delicado como el líquido folicular. Por último, CD69 contribuye a la retención de células NKT en los tejidos, promoviendo la regulación local y la homeostasis(128). Las células NK utilizan perforina, una proteína formadora de poros, como un mecanismo clave para mediar su citotoxicidad. Tras su activación, liberan perforina desde gránulos citoplasmáticos hacia la sinapsis inmunológica que se forma con la célula diana, donde esta proteína se oligomeriza para formar poros transmembrana en la membrana de la célula objetivo. Estos poros permiten la entrada de granzimas, serina proteasas que inducen apoptosis en la célula diana. Este mecanismo de citotoxicidad es fundamental en la vigilancia inmunológica, controlando la metástasis tumoral y las infecciones virales(129). Sin embargo, en el contexto del FIR, el papel de la perforina y de las células NK puede adquirir una dimensión patológica. En pacientes con FIR, una actividad excesiva o desregulada de las células NK mediada por perforina podría comprometer el equilibrio inmunológico necesario para un entorno folicular saludable o la tolerancia inmunológica materna al embrión. Se ha observado que la presencia de células NK citotóxicas (CD56+CD16+) en el líquido folicular puede estar asociada con efectos potencialmente perjudiciales sobre la maduración del folículo, ya que su número tiende a disminuir a medida que el folículo madura. Este hallazgo sugiere que un equilibrio adecuado entre las células NK citotóxicas y aquellas con funciones proangiogénicas es fundamental para un desarrollo folicular óptimo. Alteraciones en este equilibrio podrían contribuir a la disfunción folicular en pacientes con FIR, resaltando la importancia de una regulación precisa de las subpoblaciones de células NK en el microambiente folicular para asegurar una maduración folicular adecuada y, potencialmente, mejorar los resultados reproductivos(130). Este desequilibrio podría contribuir al deterioro de la calidad del microambiente folicular o al fracaso en la implantación embrionaria, lo que destaca la importancia de comprender y modular estas respuestas para mejorar los resultados reproductivos.

La información específica en literatura médica sobre la presencia de células NKT que expresan CD69 o las células NKT que expresan perforina en el líquido folicular de pacientes con FIR es limitada, ya que los estudios se han centrado más en la evaluación de estas células en endometrio o en sangre periférica.

En un trabajo antiguo de Krizan et al (2009) se observó que la población de células NKT en el líquido folicular de mujeres con tratamiento fallido de FIV, aumentó significativamente en comparación con aquellas con FIV exitosa(131), por lo que se trata de un resultado comparable al que nosotros hemos obtenido en nuestra investigación.

Aunque no se analizó el líquido folicular, resulta interesante mencionar un trabajo reciente publicado por Fan et al. (2023) sobre células NKT en endometrio en el que se concluye que la hiperactivación de las mismas a dicho nivel puede asociarse a una menor tolerancia endometrial y a más fallo de implantación recurrente, y la consecuente disminución de embarazo exitoso(124). Parece sencillo pensar que es pueda extrapolar esta evidencia al ovario y al líquido folicular, aunque se necesitan más estudios de investigación para confirmarlo.

Células NK reguladoras que expresan CD69.

Las células NKreg desempeñan múltiples funciones inmunológicas aunque de nuestro especial interés es su actividad en la modulación de la respuesta inmunitaria adaptativa inhibiendo una posible activación excesiva de las células T y de otras células inmunes a través de la secreción de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β . Además, promueven la tolerancia materno-fetal al suprimir respuestas inmunitarias citotóxicas contra el embrión, favoreciendo un microambiente uterino no hostil para la su implantación embrionaria y desarrollo temprano.

En nuestro trabajo se ha observado una expresión significativamente mayor de células NK reguladoras que expresan CD69 en líquido folicular de pacientes FIR respecto a mujeres fértiles, lo que pudiera estar en relación con un intento de

regulación de la situación prepatológica por el sistema inmunitario. Las células NK CD69⁺ pueden contribuir a la regulación inmunitaria mediante la producción de citoquinas y su interacción con otras células inmunitarias. En particular, las células NKreg CD69⁺ son capaces de producir IFN- γ tras su activación, modulando el microambiente inmunológico local. Además, la expresión de CD69 en células NK está implicada en la regulación de su actividad citotóxica y en la modulación de sus interacciones con otras células inmunitarias, como linfocitos T y células dendríticas(132).

En el contexto del líquido folicular, las células NKreg CD69⁺ podrían desempeñar un papel importante en el apoyo al desarrollo folicular y la ovulación. La presencia de estas células en el líquido folicular sugiere que contribuyen al entorno inmunitario local necesario para una foliculogénesis exitosa y la maduración del ovocito. En pacientes sometidas a FIV, la acumulación de células NK CD56^{bright}CD16⁻, conocidas por sus funciones regulatorias, en el líquido folicular refuerza la hipótesis de que las células NK, incluidas las subpoblaciones CD69⁺, están involucradas en la regulación de la función ovárica(133). Este papel regulador podría ser clave para mantener un equilibrio inmunológico que favorezca la maduración folicular y el éxito reproductivo. un incremento desregulado de su número o actividad podría generar un desequilibrio en el entorno inmunológico necesario para el desarrollo folicular óptimo.

En este contexto, un aumento excesivo de células NK CD69⁺ podría promover un estado inflamatorio que interfiera con la maduración del folículo o con la calidad del ovocito, especialmente si estas células favorecen una respuesta proinflamatoria desmedida. Por otro lado, un aumento selectivo de subpoblaciones regulatorias, como las células NK CD56^{bright}CD16⁻CD69⁺, podría indicar un intento del sistema inmunitario de contrarrestar el desequilibrio inmunológico característico en pacientes con FIR. Por tanto, el valor del aumento de estas células dependerá de su funcionalidad específica y de cómo interactúan con otras células y factores en el microambiente folicular. Estudios adicionales podrían arrojar luz sobre si su modulación terapéutica podría mejorar los resultados reproductivos en pacientes

con FIR, favoreciendo un entorno inmunológico más propicio para la maduración ovocitaria y la implantación embrionaria.

La revisión de la literatura médica específica sobre las NK reguladoras en el líquido folicular es limitada, ya que la mayoría de los trabajos han centrado en su estudio en endometrio y sangre periférica, y aunque se trata de un área en investigación, hay indicios de que las células NK reguladoras también podrían desempeñar un papel en el entorno folicular.

En el trabajo anteriormente mencionado de Krizan et al (2009) sobre las células NKT en líquido folicular de pacientes con fallo de FIV, se hace referencia a las células NK reguladoras, las cuales se encuentran significativamente disminuidas en pacientes que no lograron el embarazo después del tratamiento de FIV en comparación con las mujeres que quedaron embarazadas después de la FIV(131).

De la misma manera, el trabajo publicado por Donskoi et al (2014) se centra en el papel de las NK reguladoras con expresión en su superficie de CD69 en sangre periférica como predictor del éxito de la implantación en procedimientos de FIV . Los resultados muestran que niveles normales de NK CD69+ están asociados con una mayor probabilidad de implantación exitosa, mientras que niveles elevados o reducidos de CD69 se correlacionan con fallos de implantación, si bien en ningún caso desde la perspectiva del líquido folicular(134).

B- Las células NK citotóxicas NKp30 positivas y las células NK reguladoras NKp30 positivo presentan niveles superiores en mujeres fértiles respecto a mujeres con FIR.

Células NK citotóxicas NKp30 positivas.

Como se explica previamente, las células NK citotóxicas son linfocitos de la inmunidad innata cuya función es eliminar células alteradas (infectadas, tumorales, etc.).

En nuestro trabajo destaca una presencia mayor de células NK citotóxicas NKp30 positivo en líquido folicular de mujeres fértiles respecto a pacientes con FIR de una manera estadísticamente muy significativa ($p < 0,003$), dato no esperado a priori al tratarse de un marcador de citotoxicidad en pacientes con fertilidad probada en las cuales se esperarían niveles más bajos. Las células NK citotóxicas, incluidas aquellas que expresan NKp30, se consideran relevantes en el desarrollo y maduración folicular debido a su potencial impacto en el microambiente inmunológico local. Estudios han demostrado que la población de células NK citotóxicas (CD56+CD16+) disminuye a medida que el folículo ovárico madura, lo que sugiere que su presencia podría ser perjudicial para este proceso. Este descenso en las células NK citotóxicas se acompaña de un aumento en las células NK "proangiogénicas" (CD56+CD16-), las cuales están implicadas en la angiogénesis folicular y en el mantenimiento de la salud folicular general.

La función de las células NK citotóxicas NKp30+ en el líquido folicular probablemente está relacionada con su actividad citotóxica, que puede influir en el equilibrio inmunológico del entorno local y, en consecuencia, afectar la maduración del folículo ovárico. En pacientes con FIR, un desequilibrio en la proporción de estas subpoblaciones de células NK podría contribuir a un microambiente inmunológico desfavorable, comprometiendo tanto el desarrollo folicular como la calidad del ovocito. Estos hallazgos subrayan la importancia de comprender cómo las diferentes subpoblaciones de células NK interactúan en el líquido folicular para determinar estrategias que favorezcan la regulación inmunitaria y la salud reproductiva.

En la literatura médica no hay evidencia alguna que aluda a un aumento en la expresión de las células NK citotóxicas NKp30 en el líquido folicular de pacientes fértiles en comparación con pacientes con FRR. Por el contrario, sí hay varios trabajos relacionados con niveles elevados de células NK citotóxicas NKp30 positivos en sangre periférica de pacientes con FIR. Destaca el trabajo de nuestro propio grupo publicado por Comins-Boo et al., (2021) donde se reflejó que la expresión de células NK citotóxicas NKp30 es estadísticamente significativa mayor en la sangre de mujeres con FIR en comparación con controles sanos, y podría utilizarse como un biomarcador

de FIR, si bien no aborda el tema desde la perspectiva del líquido folicular. De hecho, este estudio también sugiere que la combinación de dos biomarcadores, las células NK citotóxicas NKp30 y las células citotóxicas TIGIT positivo, como algoritmo diagnóstico útil para identificar el subgrupo de pacientes con FIR(135).

Células NK reguladoras NKp30 positivo.

Las células NK reguladoras (NKreg) son una subpoblación de linfocitos NK que desempeñan un papel inmunomodulador, fundamentalmente a través de la secreción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β .

En nuestro estudio se ha determinado un aumento estadísticamente significativo de las células NK reguladoras NKp30 positivo en el líquido folicular de mujeres fértiles frente a pacientes con fallo de implantación recurrente.

Se ha encontrado información específica muy escasa sobre la presencia o aumento de células NK reguladoras NKp30 positivas en el líquido folicular de mujeres con fertilidad probada, ni tampoco en el de mujeres con AR o FIR. En el contexto del líquido folicular, las células NK reg, incluidas las NKp30+, desempeñan un papel crucial en la creación de un entorno inmunotolerante que favorece el desarrollo folicular y la maduración del ovocito. Estas células logran este efecto mediante la secreción de citoquinas inmunorreguladoras, como IL-10 e IL-21, las cuales ayudan a atenuar respuestas inmunitarias excesivas y promueven un microambiente propicio para la implantación del embrión y el mantenimiento del embarazo(131).

Además, la presencia y distribución de estas células NKreg en el líquido folicular se ha asociado con los resultados de la FIV. Estudios han demostrado que las mujeres que no logran el embarazo tras un tratamiento de FIV tienden a presentar una menor población de células NK inmunorreguladoras en el líquido folicular en comparación con aquellas que consiguen el embarazo. Esto sugiere que las funciones regulatorias de las células NKp30+ son fundamentales para el éxito reproductivo, ya que contribuyen a equilibrar las respuestas inmunitarias locales y a establecer un entorno

favorable para el desarrollo embrionario y la implantación. En el contexto de pacientes con FIR, este hallazgo destaca la importancia de optimizar la actividad de las células NKreg como posible estrategia para mejorar los resultados reproductivos.

De nuevo, en el trabajo de nuestro propio grupo de Comins-Boo et al. (2021) se investigaron los biomarcadores funcionales de células NK en pacientes con AR y FIR(135). En este trabajo se ha observado una expresión elevada de NKp30 en células NK citotóxicas en sangre de mujeres con RIF, lo que sugiere un posible papel en la patogénesis del fallo de implantación. Esta sobreexpresión podría reflejar una activación desregulada de las células NK citotóxicas, contribuyendo a un entorno inflamatorio que no es compatible con la implantación embrionaria exitosa. Sin embargo, no se abordó específicamente la presencia de células NK reguladoras NKp30 positivas en el líquido folicular o endometrio.

En el artículo publicado por Miko et al. (2010) se investigó la relación de las células NK y NKT-like en el fallo de implantación en pacientes bajo tratamiento de FIV, pero no desde la perspectiva del líquido folicular si no de la sangre y del endometrio, y sin hacer referencia a pacientes con fértiles o con FIR(136).

3.3. En sangre periférica:

A- Células NKT que expresan perforina tienen mayor expresión en FIR frente a mujeres fértiles.

Las células NKT se caracterizan por presentar funciones propias de células NK y de células T. La perforina es una proteína citotóxica efectora directa de la destrucción celular. Se almacena en los gránulos de células NK y de los linfocitos T citotóxicos. Su función es hacer poros en la membrana de las células diana para facilitar la entrada de otras moléculas, como granzimas, e inducir la apoptosis.

En nuestro estudio se determina un valor superior en las células NKT que expresan perforina en sangre de pacientes con FIR respecto a controles sanos, lo cual parece ser congruente con lo descrito en la literatura médica.

Así, el estudio de Miko et al. (2010), comentado previamente, refiere cambios hacia Th1, es decir, acción proinflamatoria, en las células NK y NKT de mujeres con FIR, incluyendo las células que sobreexpresan perforina, en comparación con mujeres que lograron una concepción exitosa(136). De una manera muy resumida, el artículo refiere un aumento significativo en la proporción de células NKT en sangre periférica en comparación con los valores de NKT de las mujeres con embarazos exitosos tras FIV. También hace referencia al endometrio, donde la sobreexpresión de perforina en las células NKT promueve una respuesta citotóxica en lugar de la tolerancia inmunológica necesaria para la implantación del embrión.

En cuanto a su relevancia clínica, la determinación de las células NKT que expresan perforina se podría utilizar como biomarcador para identificar a pacientes con mayor posibilidad de desarrollar FIR, y buscar estrategias terapéuticas que mejoren el embarazo exitoso.

B. Células citotóxicas NK TIGIT+ y las células citotóxicas NK que expresan CD69 tienen una mayor expresión en la sangre de mujeres fértiles.

En nuestro estudio se observó un aumento estadísticamente significativo de las células NK citotóxicas tanto TIGIT+ como de las que expresan CD69 en la sangre periférica de mujeres con fertilidad probada, hecho que parece incongruente con lo que cabría esperar en mujeres sanas.

En la literatura científica se han publicado varios trabajos sobre células citotóxicas en relación con FRR. Destaca el trabajo ya comentado de Comins-Boo et al. (2021), cuyo resultado describió un aumento estadísticamente significativo de la expresión de TIGIT en células NK citotóxicas en sangre de mujeres con FIR, al cual sugiere incluso como posible biomarcador para desarrollar un panel de identificación basal de mujeres con FIR(135).

Por otro lado, el estudio de Cai et al. (2022) hace un análisis de los posibles biomarcadores inmunológicos en sangre periférica que se relacionan con FIR. Específicamente se refiere a los linfocitos T CD3+, T CD8+, NKT y linfocitos B de memoria con cambio de isotipo, y no alude a las NK citotóxicas TIGIT y/o CD69 positivas como en nuestro trabajo. En cualquier caso, transmite la importancia de los biomarcadores inmunológicos en la identificación de pacientes FIR, y pretende sentar las bases para desarrollar estrategias diagnósticas y terapéuticas más efectivas para las pacientes afectadas(137).

Las células NK con receptores inhibitorios, como TIGIT y CD69, son esenciales para mantener el equilibrio entre las señales activadoras e inhibitorias en el sistema inmunitario innato. En mujeres con FIR, se observa una disminución de estas células, lo que podría llevar a un desbalance en su función reguladora. Este desajuste puede traducirse en una actividad citotóxica excesiva o en una falta de tolerancia adecuada hacia el embrión, comprometiendo la implantación y el desarrollo inicial del embarazo.

El papel de los receptores inhibitorios en las células NK, como KIR y LILRB, también ha sido destacado en la literatura. Estas moléculas interactúan con antígenos leucocitarios humanos (HLA) presentes en las células trofoblásticas del embrión. Específicamente, combinaciones como el haplotipo KIR AA materno con HLA-C2 fetal están asociadas con un mayor riesgo de fallo de implantación y complicaciones del embarazo. Esto sugiere que el reconocimiento adecuado de las células trofoblásticas por parte de las células NK a través de receptores como TIGIT y LILRB es crucial para evitar respuestas inmunitarias adversas.

La expresión de CD69, un marcador de activación temprana en las células NK, es otro factor clave. Estudios como el de Dons'koi et al. han mostrado que tanto niveles elevados como reducidos de células NK CD69+ están asociados con un mayor riesgo de fallo de implantación, en comparación con niveles moderados (30-60%), considerados óptimos(138). Esto indica que tanto la hiperactivación como la hipoactivación de las células NK pueden ser perjudiciales, ya que afectan procesos críticos como la remodelación vascular y la invasión del trofoblasto, esenciales para una implantación exitosa(91).

En contraste, en mujeres fértiles sanas, la mayor frecuencia de células NK TIGIT+ y CD69+ parece reflejar un estado inmunológico equilibrado que favorece la tolerancia hacia el embrión y regula adecuadamente la citotoxicidad. Este equilibrio permite una interacción óptima entre las células NK y el trofoblasto, promoviendo la invasión controlada del trofoblasto y la remodelación del endometrio necesarias para la placentación.

En conclusión, los datos sugieren que la disminución de células NK TIGIT+ y CD69+ en mujeres con FIR podría estar relacionada con una disfunción en la regulación inmunitaria en la interfaz materno-fetal, contribuyendo a los fallos de implantación. Intervenciones dirigidas a restaurar este equilibrio inmunológico podrían representar estrategias terapéuticas prometedoras para mejorar los resultados reproductivos en este grupo de pacientes.

Otro trabajo es el publicado por Salazar et al. (2022) donde se evaluó la citotoxicidad de las células NK en sangre periférica estableciendo su relación con FIR y AR. El ensayo en sangre periférica se realizó mediante citometría de flujo y las diferencias entre los grupos se analizaron utilizando la prueba t de Student, un análisis de regresión logística y el análisis del área bajo la curva. Se observó que tanto las mujeres fértiles no embarazadas como las embarazadas normales tuvieron niveles de NK citotóxicas significativamente menor en comparación con las mujeres con FIR y AR, así como las mujeres embarazadas con antecedentes de AR. Aunque este trabajo no menciona específicamente las células NK TIGIT y/o CD69 positivas, destaca la relevancia de la citotoxicidad de las células NK en el trasfondo de la etiopatogenia del FIR(85).

El estudio de biomarcadores inmunológicos en diferentes tejidos (endometrio, líquido folicular y sangre periférica) en pacientes con fallo de implantación recurrente (FIR) ha revelado información crucial sobre las alteraciones inmunológicas asociadas a esta condición. Aunque cada tejido ofrece ventajas y limitaciones particulares, los resultados destacan el potencial de integrar estos biomarcadores en el diagnóstico y manejo personalizado de la infertilidad.

El endometrio, al ser el sitio directo de implantación embrionaria, proporciona la información más específica sobre las interacciones inmunológicas materno-fetales. Las alteraciones observadas en subpoblaciones de células NK y NKT sugieren un papel central en la regulación de la tolerancia inmunológica. La ventaja principal de estudiar el endometrio es su relevancia directa en el microambiente de la implantación. Sin embargo, la obtención de muestras es invasiva, y su análisis puede no ser factible de manera rutinaria en un contexto clínico. El líquido folicular ofrece una perspectiva única sobre el entorno ovárico y la calidad ovocitaria, áreas críticas en la fertilización y el desarrollo embrionario temprano. Los hallazgos, aunque preliminares, señalan que las subpoblaciones de células NK y NKT en este tejido podrían ser indicadores relevantes de la calidad del microambiente folicular. La principal ventaja del líquido folicular es que su obtención es menos invasiva durante los procedimientos de FIV. Sin embargo, al no ser directamente responsable del éxito de la implantación, su utilidad podría ser complementaria más que determinante. Por último, la sangre

periférica, al reflejar el estado inmunológico sistémico, es el tejido más accesible para el análisis de biomarcadores. En este estudio, los cambios proinflamatorios observados en pacientes con FIR concuerdan con hallazgos previos en la literatura. Si bien su principal ventaja radica en su accesibilidad y bajo costo, presenta limitaciones en cuanto a especificidad, ya que los procesos sistémicos pueden no reflejar adecuadamente las alteraciones locales en endometrio o líquido folicular.

Los datos obtenidos en paralelo en las tres muestras tienen una coherencia significativa con estudios previos y abren nuevas líneas de investigación, especialmente en el análisis del líquido folicular. El líquido folicular resulta menos invasivo y relevante en el contexto de la FIV, pero su relación directa con la implantación requiere más estudios. Los hallazgos en endometrio refuerzan la importancia de subpoblaciones celulares específicas como las células NK reguladoras y citotóxicas, mientras que el líquido folicular destaca como una fuente novedosa para explorar el equilibrio inmunológico en la reproducción. El endometrio tiene mayor especificidad y relevancia directa, pero limitado por su obtención invasiva. La sangre periférica sigue siendo una herramienta valiosa para identificar alteraciones inmunológicas generales, pero su especificidad en FIR podría ser limitada.

Las diferencias observadas reflejan la función única de cada tejido en el proceso reproductivo. Por ejemplo, el endometrio está directamente implicado en la implantación, mientras que el líquido folicular refleja la calidad ovocitaria y la salud del microambiente ovárico. El líquido folicular muestra una mayor presencia de células inmunológicas activadas (NKT y NKreg con CD69) en pacientes con FIR, lo que podría representar un mecanismo compensatorio local frente al estado inflamatorio general. Este patrón difiere ligeramente del endometrio, donde la activación inmunológica parece más desregulada, con un predominio de células citotóxicas. La sangre periférica presenta resultados congruentes con un perfil proinflamatorio, pero su relación directa con las alteraciones locales en el endometrio o el líquido folicular no siempre es clara.

Por último destacar que el análisis de correlaciones reveló datos importantes como la asociación entre varias subpoblaciones celulares en los tres tejidos, aunque especialmente en líquido folicular, hecho destacado por lo innovador de nuestro estudio con el análisis de este tejido, así como por la fuerza de asociación alta que presentaron las variables.

Así, en el caso de las pacientes FIR, se encontró una correlación positiva fuerte entre las células NK citotóxicas, específicamente entre las NK citotóxicas totales y las células NK citotóxicas con sobreexpresión de perforina. De la misma manera, se encontró también una correlación positiva y fuerte entre células citotóxicas y reguladoras, en este caso para las NK citotóxicas que sobreexpresan perforina y las células supresoras derivadas de mieloides. En el caso de los controles se determinaron las correlaciones más fuertes, una asociación positiva máxima entre células citotóxicas y reguladoras (las NK citotóxicas NKp30+ y las células supresoras mieloides derivadas de monocitos); y una correlación negativa fuerte entre las células citotóxicas y reguladoras, concretamente entre las células NK citotóxicas totales y las células supresoras mieloides derivadas de monocitos.

No hay evidencia alguna en la literatura médica actual que describa las asociaciones previas en el líquido folicular ni en el campo de la inmunología reproductiva, aunque sí hay trabajos publicados (Zalfa et al., 2021) sobre las NK citotóxicas NKp30+ y las células supresoras mieloides derivadas de monocitos en el contexto del cáncer(139).

Perspectivas Futuras en el Manejo del FRR

La integración de biomarcadores inmunológicos de estos tres tejidos podría permitir la identificación precisa de subgrupos de pacientes con FIR, facilitando la personalización de tratamientos. La combinación de análisis locales (endometrio y líquido folicular) con datos sistémicos (sangre periférica) podría ofrecer un enfoque integral y efectivo para mejorar las tasas de éxito reproductivo. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para validar estos hallazgos y desarrollar protocolos

clínicos estándar basados en ellos. El desarrollo de algoritmos diagnósticos a través de variables clínicas e inmunológicas como los biomarcadores más relevantes que hemos determinado nos permitiría clasificar a las pacientes en subgrupos específicos y seleccionar terapias personalizadas para mejorar las tasas de éxito.

La aplicación de modelos de Inteligencia Artificial podría ayudar a la interpretación e integración de datos complejos, y construir perfiles de probabilidad de éxito de los tratamientos de fertilidad en base a las características de cada paciente.

En cuanto a líneas futuras de tratamiento, poco a poco se empiezan a ver trabajos basados en los biomarcadores inmunológicos analizados como las células NK o las citocinas, el bloqueo selectivo de moléculas como TNF- α o la administración de factores inmunorreguladores, que podrían transformar el manejo de pacientes con FRR.

Así, en el trabajo publicado recientemente por Genest et al. (2023) se examinan las terapias inmunomoduladoras actuales para tratar el fallo recurrente de implantación (RIF) de causa desconocida(140). El estudio evalúa la eficacia y seguridad de diversas intervenciones, como el uso de corticosteroides, inmunoglobulinas intravenosas (IVIg), intralípidos y terapias celulares, en la mejora de las tasas de implantación y embarazo en pacientes con RIF. Aunque los resultados son prometedores en ciertos casos, los autores subrayan la necesidad de realizar ensayos clínicos aleatorizados y controlados para establecer protocolos de tratamiento estandarizados y determinar con mayor precisión la eficacia de estas terapias en el manejo del FIR inexplicable.

En conclusión, los resultados cruzados entre los tejidos son coherentes y complementarios, destacando patrones comunes de inflamación y regulación inmunológica que contribuyen al FIR. Sin embargo, cada tejido ofrece información específica que es clave para entender las diferentes etapas del proceso reproductivo. Estos hallazgos refuerzan la importancia de combinar el análisis de múltiples tejidos para obtener un panorama integral del estado inmunológico en pacientes con FIR(140).

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES.

- Se identificaron y caracterizaron biomarcadores inmunofenotípicos asociados a células NK, monocitos y macrófagos lo que permitió demostrar patrones inmunofenotípicos diferenciales en pacientes con fallo reproductivo recurrente (FRR) de posible origen inflamatorio a nivel local, endometrio y líquido folicular, y sistémico, en sangre periférica.

El tamaño muestral del grupo AR no permitió realizar análisis estadísticos significativos ni estudios de correlaciones, aunque el análisis descriptivo ofrece información valiosa sobre este grupo.

- En el análisis del endometrio se observó un aumento estadísticamente significativo de células NK citotóxicas y de células NKT con expresión de perforina en pacientes con FIR, lo que sugiere un ambiente proinflamatorio basal. Por el contrario, las mujeres fértiles (controles) mostraron un predominio estadísticamente significativo de las células NK reguladoras, lo que sugiere un balance inmunológico más favorable para la implantación.
- El análisis del líquido folicular mostró un incremento significativo de marcadores activadores sobre la subpoblación de células NKT CD69+ y células NKT con expresión de perforina en pacientes con FIR, lo que podría estar relacionado con una peor tolerancia inmunológica materna al embrión. Paralelamente, se observó un aumento de marcadores reguladores en estas pacientes, evidenciado un aumento significativo en las células NK reguladoras con expresión de CD69 lo que podría sugerir un intento de inmunorregulación en estas pacientes.
- Asimismo, en líquido folicular de pacientes fértiles se observó una coexistencia de actividad citotóxica y reguladora de pacientes fértiles, con predominio de células NK citotóxicas NKp30+ y células NK reguladoras NKp30+, respectivamente.

- En la sangre de las pacientes con FIR se observó un aumento significativo de marcadores activadores en la subpoblación de células NKT que expresan perforina, lo que favorece un ambiente proinflamatorio.
- El análisis de correlaciones destaca las observadas en líquido folicular por su alto nivel de significación. En el caso de las pacientes FIR se encontró una fuerte correlación directa entre las NK citotóxicas totales y las células NK citotóxicas con expresión de perforina. De la misma manera se encontró una correlación fuerte entre las NK reguladoras y las células NK citotóxicas (en este caso NK citotóxicas que expresan perforina) y las células supresoras mieloides derivadas de monocitos, MDSCs).

En el caso de los controles las correlaciones más significativas demostraron una asociación positiva máxima entre células pro- y anti-inflamatorias: las NK citotóxicas con expresión de NKp30 y las células MDSCs; y una correlación negativa fuerte entre las células NK citotóxicas totales y MDSCs.

- El conocimiento del perfil inmunológico basado en la identificación de subpoblaciones celulares específicas de NK y MDSc en pacientes con FRR nos permitiría desarrollar un algoritmo diagnóstico que aplicar a posteriori para un manejo terapéutico personalizado con el fin de optimizar los resultados reproductivos de estas pacientes. Son necesarios más estudios prospectivos que nos permitan profundizar en el estudio del perfil inmunofenotípico de las pacientes con FRR.

ANEXOS

9. ANEXOS.

9.1 PERMISOS Y BECAS.

9.1.1 PERMISO I: COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA. HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS.



Hospital Clínico San Carlos

Comunidad de Madrid

Dictamen Protocolo Favorable

C.I. 19/478-E_BC 17 de febrero de 2020

CEIC Hospital Clínico San Carlos

Dra. Mar García Arenillas

Presidenta del CEIC Hospital Clínico San Carlos

CERTIFICA

Que el CEIC Hospital Clínico San Carlos en su reunión del día 06/11/2019, acta 11.1/19 ha evaluado la propuesta del proyecto:

Título: “ADVANCING ON PRECISION MEDICINE IN THE RECURRENT GESTATIONAL FAILURE OF INFLAMMATORY CAUSE”. AVANCES EN MEDICINA DE PRECISIÓN EN FALLO GESTACIONAL RECURRENTE DE ORIGEN INFLAMATORIO.

Código Interno: 19/478-E_BC

Versión Protocolo Evaluada:

Versión Hoja Información al Paciente Evaluada:

Que en este estudio:

- 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.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son adecuados para llevar a cabo el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto de los postulados éticos.
- Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa legal aplicable en función de las características del estudio.

Es por ello que el Comité **informa favorablemente** sobre la realización de dicho proyecto, por la **Dra. Silvia Sánchez Ramón**, del Servicio de Inmunología del Hospital Clínico San Carlos.

Lo que firmo en Madrid, a 17 de febrero de 2020




Dra. Mar García Arenillas

Presidenta del CEIC Hospital Clínico San Carlos

9.1.2 PERMISO II: BECA FIS.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: SILVIA SÁNCHEZ RAMÓN.

MÉDICO COLABORADOR: LYDIA PILAR SUÁREZ.

| | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------|---------------------|------------------|
|    | RESULTADO EXPEDIENTE - PI19/01450 | | | |
| Investigador Principal: SILVIA MARIA SANCHEZ RAMON | | | | |
| Centro Solicitante: FUNDACION INVESTIGACION BIOMEDICA HOSPITAL CLINICO SAN CARLOS | | | | |
| Centro Realizador: INSTITUTO DE INVESTIGACION SANITARIA DEL HOSPITAL CLINICO SAN CARLOS (IdiSSC) | | | | |
| Título: DESARROLLO DE MEDICINA DE PRECISIÓN EN EL FALLO GESTACIONAL RECURRENTE DE CAUSA INFLAMATORIA | | | | |
| RESOLUCIÓN PROVISIONAL DE CONCESIÓN | | | | |
| Ayuda susceptible de ser cofinanciada por el FEDER" | | | | |
| Estado de Resolución Provisional de Concesión : CONCEDIDO | | | | |
| ACEPTA RESULTADO RESOL. PROV. DE CONC. | | | | |
| Selecione <input type="text"/> | | | | |
| PRESUPUESTO CONCEDIDO PROVISIONAL | | | | |
| | 1ª ANUALIDAD | 2ª ANUALIDAD | 3ª ANUALIDAD | TOTAL |
| BIENES/SRV | 25.000,00 | 9.000,00 | 15.000,00 | 49.000,00 |
| PERSONAL | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| VIAJES | 0,00 | 0,00 | 2.000,00 | 2.000,00 |
| SUBTOTALES | 25.000,00 | 9.000,00 | 17.000,00 | 51.000,00 |
| Costes ind. 21,00 % | 5.250,00 | 1.890,00 | 3.570,00 | 10.710,00 |
| TOTALES | 30.250,00 | 10.890,00 | 20.570,00 | 61.710,00 |
| PERSONAL CONCEDIDO PROVISIONAL CON CARGO AL PROYECTO | | | | |
| Personal con Cargo | | Concedido Provisional | | |
| Doctor | | 0 | | |
| Master | | 0 | | |
| Grado | | 0 | | |
| Técnico Superior | | 0 | | |
| EQUIPO DE INVESTIGACIÓN | | | | |
| Nombre | Apellido 1 | Apellido 2 | Tipo | Ded. |
| SILVIA MARIA | SANCHEZ | RAMON | IP | UNICA |
| MIGUEL ANGEL | HERRAIZ | MARTINEZ | Colaborador | COMPARTIDA |
| MARTA | CALVO | URRUTIA | Colaborador | COMPARTIDA |
| MANUEL | SERRANO | BLANCO | Colaborador | COMPARTIDA |
| JULIANA LUCIA | OCHOA | GRULLON | Colaborador | COMPARTIDA |
| KISSY | GUEVARA | HOYER | Colaborador | COMPARTIDA |
| LYDIA | PILAR | SUAREZ | Colaborador | COMPARTIDA |
| GUSTAVO | CORDERO | TORRES | Colaborador | COMPARTIDA |
| CARMEN | IZQUIERDO | DELGADO | Colaborador | COMPARTIDA |
| ANA | SARNAGO | GONZALO | Colaborador | COMPARTIDA |
| RESOLUCIÓN PROVISIONAL DE CONCESIÓN | | | | |
| El órgano instructor, visto el informe emitido por la Comisión de selección, conforme a lo establecido en el art. 9 de la Convocatoria para el año 2019 de concesión de subvenciones para Proyectos de Investigación en salud, modalidad Proyectos de investigación en salud, de la Acción Estratégica en salud 2017-2020, de 28 de diciembre de 2018 (extracto publicado en el BOE 03/01/2019 – código BDNS 432481), en su reunión de 11 de julio de 2019 y, de acuerdo con las disponibilidades presupuestarias, propone la financiación de la ayuda solicitada para la realización de su proyecto en los términos económicos indicados. | | | | |

9.1.3 PERMISO III: CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Madrid, 2 de marzo de 2018

Prof. Dr. Angel L. Corbí López

Myeloid Cell Lab, CIB-CSIC (www.cib.csic.es)

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC

Ramiro de Maeztu, 9 28040 MADRID Cell. phone: +34-630230754 acorbi@cib.csic.es

ResearcherID B-7194-2011; Orcid 0000-0003-1980-5733

El Dr. Angel Luis Corbí López, con DNI 05225360J, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Centro de Investigaciones

Biológicas (CIB), y Responsable del “Laboratorio de Células Mieloides” de dicho Centro,

MANIFIESTA

- La disposición e interés de mi grupo de investigación en colaborar con el grupo liderado por la Dra. Silvia Sánchez Ramón en el abordaje de los objetivos del proyecto “*ADVANCING ON PRECISION MEDICINE IN THE RECURRENT GESTATIONAL FAILURE OF*

INFLAMMATORY CAUSE”, que la mencionada Dra. Sánchez Ramón presenta a la convocatoria de 2019 de la Acción Estratégica en Salud (Proyectos de investigación en salud, Modalidad Proyectos de investigación en salud)

- Que el “Laboratorio de Células Mieloides” del CIB colaborará en la realización de todas las aproximaciones experimentales que impliquen abordajes moleculares y celulares en el marco de los objetivos del proyecto, y generará los macrófagos humanos derivados de monocitos que sean necesarios para abordar dichos objetivos. En este sentido, el grupo de la Dra. Sánchez Ramón contará con la cooperación de la Dra. Angeles Domínguez Soto, miembro del “Laboratorio de Células Mieloides” con una dilatada experiencia en las aproximaciones experimentales moleculares y celulares a implementar.

Y para que así conste, firmo la presente en Madrid, a 2 de marzo de 2019

Prof. Dr. Angel L. Corbí

Ramiro de Maeztu 9. 28040 MADRID

www.cib.csic.es

9.2 CONVENIOS DE COLABORACIÓN CON OTROS CENTROS.

9.2.1 CENTRO REPRODUCTIVO: FERTILITY MADRID. MADRID.



fertility|madrid

Centro de Reproducción Asistida

Carmen Anarte Jimeno, con DNI 11.835.028X, Doctora en Ciencias de la Salud por la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid, y Directora Gerente de la Clínica Especializada en Reproducción asistida **Fertility Madrid** con CIF B-95827713, sita en la calle General Oráa, 47 de Madrid con Registro Sanitario CS14525, comunico:

La participación de Fertility Madrid, a través de la trabajadora la Dra. Lydia Pilar Suárez, en el proyecto de investigación realizado en el Hospital Clínico San Carlos titulado "*Estudio inmunológico de líquido folicular y biopsia endometrial en pacientes con abortos de repetición y fallo de implantación recurrente de origen inflamatorio*", dirigido por la Dra. Silvia Sánchez Ramón.

A través de nuestro centro, se procederá al reclutamiento de las pacientes "control" según los criterios de inclusión detallados en el proyecto de investigación. Podrán participar en el estudio aquellas pacientes que previamente hayan recibido, comprendido y firmado consentimiento informado específico.

De la recogida de muestras y su transporte a Hospital Clínico San Carlos, se encargará la Dra. Pilar Suárez, ginecóloga especialista en reproducción humana, colaboradora en nuestro centro e investigadora del proyecto.

Cabe destacar, que nuestro centro, Fertility Madrid, colabora en dicho proyecto de investigación sin ánimo de lucro, ni para las pacientes ni para la propia clínica.

Y para que así conste,

En Madrid, a 27 de febrero de 2019.

Carmen Anarte Jimeno



fertility|madrid
C.I.F.: B-95827713
C/ General Oráa 47
28006 - Madrid

9.2.2 CENTRO REPRODUCTIVO: URH-GARCÍA DEL REAL. MADRID. ARAVACA.



En nuestro centro, el Hospital Clínico San Carlos de Madrid, se está desarrollando un estudio de investigación entre los Servicios de Ginecología e Inmunología sobre pacientes con pérdidas gestacionales recurrente, llamado "Estudio inmunológico en líquido folicular y biopsia endometrial en pacientes con abortos de repetición y fallo de implantación recurrente", llevado a cabo por las Dras. Silvia Sánchez Ramón, Marta Calvo Urrutia y Lydia Pilar Suárez, entre otros investigadores.

Para aumentar la muestra de pacientes reclutados, se han establecido vínculos de colaboración altruista con otros centros externos al nuestro, tras la aceptación de participación por ambas partes y sin que ella repercuta de manera negativa sobre las pacientes, las cuales firmarán previamente a la participación en dicho estudio, el consentimiento informado respectivo.

Se insiste en que dicha participación es voluntaria y sin ánimo de lucro, ni para las pacientes ni para los centros colaboradores.

Así, la Dra. Sylvia Fernández Shaw, con DNI 51376156K y Número de Colegiado 42633 como Directora de la Unidad Reproducción Humana García del Real (URH García del Real), sito en el Camino de la Zarzuela 19 de Madrid (28023), se establece como persona responsable de las pacientes reclutadas en dicho centro.

De la recogida de muestras y su transporte al Hospital Clínico San Carlos para su procesamiento se encargarán las Dras. Calvo Urrutia y Pilar Suárez.

Y para que así conste,

En Madrid a 11 de enero de 2022.

Dra. Pilar Suárez.

Dra. Fernández Shaw.

9.3 CONSENTIMIENTO INFORMADO.



CONSENTIMIENTO INFORMADO.

HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO.

Pacientes adultos de los Grupos de Estudio y Control.

Título del Estudio: AVANCES EN MEDICINA DE PRECISIÓN EN FALLO GESTACIONAL RECURRENTE DE ORIGEN INFLAMATORIO.

(ADVANCING ON PRECISION MEDICINE IN THE RECURRENT GESTATIONAL FAILURE OF INFLAMMATORY CAUSE).

PI: Silvia SÁNCHEZ RAMÓN

Por favor, lea atentamente este documento en el cual le proponemos participar en un estudio.

El objetivo de este estudio, en el cual van a participar alrededor de 20 pacientes con fallo gestacional recurrente, y 20 controles sanos, es evaluar biomarcadores inmunológicos en sangre que permitan identificar causas inflamatorias asociadas al fallo gestacional.

¿QUÉ TENDRÁ QUE HACER EN ESTE ESTUDIO?

Este estudio **no** requiere más intervenciones **ni** más visitas clínicas para usted que las de la práctica clínica habitual. Vamos a extraerle una muestra de sangre, líquido folicular y biopsia endometrial adicional durante su tratamiento reproductivo habitual.

Recibirá el tratamiento para su enfermedad de base dictado por su especialista de acuerdo con los protocolos de manejo para la misma, sin que la participación en este estudio modifique dicho tratamiento, es decir, será tratado exactamente igual que si no estuviera participando en el estudio.

Participación voluntaria

La decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria y debe ser tomada libremente. Si no quiere participar en el estudio puede decirlo; si no desea hacerlo su médico continuará con su atención habitual y su negativa no le traerá ningún inconveniente. Incluso si decide que sí ahora, podrá cambiar de opinión más tarde y decir que no.

Para desarrollar esta línea de investigación, necesitamos su consentimiento para tener acceso a la información clínica relevante asociada a su situación clínica y además, solicitamos la donación de una muestra de tejido (indicar lo que proceda):

- sangre
- endometrio
- líquido folicular
- otros tejidos: especificar tejido _____

Beneficios y riesgos esperados

Su participación en el estudio permitirá determinar la utilidad diagnóstica de una serie de biomarcadores celulares y moleculares en sangre, líquido folicular y endometrio asociados al fallo gestacional recurrente de posible causa inflamatoria.

Su participación en el estudio no le proporcionará beneficios a nivel personal, pero si se espera que sea útil para personas que tengan su misma situación clínica en el futuro.

Por otro lado, los riesgos o molestias que se le ocasionarán serán los propios de la rutina, incluyendo la extracción de sangre, la punción ovárica o la biopsia endometrial.

Confidencialidad de los datos

Le pedimos que participe en el estudio y que podamos utilizar la información obtenida sobre usted para el estudio. No utilizaremos ni su nombre ni su dirección. Utilizaremos un número de paciente en vez de un nombre. Sus resultados, junto con los de los demás participantes en el estudio, serán analizados en conjunto en un informe final y se presentarán a las Autoridades Sanitarias.

Al firmar este asentimiento, usted concede permiso al investigador del estudio para que pueda realizar su trabajo y a las Autoridades Sanitarias en caso de inspección, para que tengan acceso a los documentos clínicos que le identifican, así como al Consentimiento Informado firmado por usted. Todas las partes citadas guardarán la más estricta confidencialidad acerca de sus datos, de forma que no se violen sus derechos. Así queda registrado, en el caso del equipo investigador, en un documento de compromiso de confidencialidad guardado en los archivos del Servicio de Inmunología Clínica del Hospital Clínico San Carlos.

Por favor no dude en preguntar al médico responsable del estudio acerca de cualquier duda que tengas, o si desea disponer de mayor información.

EXPONGO:

Que he sido debidamente INFORMADO/A por el Dr./a
(NOMBRE Y DOS APELLIDOS DEL FACULTATIVO QUE PROPORCIONA LA INFORMACIÓN)
en entrevista personal realizada el día....., sobre los beneficios y riesgos que podría
suponer la administración de la vacuna especificada.

Que he recibido explicaciones tanto verbales como escritas, sobre la naturaleza y propósitos del procedimiento, beneficios, riesgos, alternativas y medios con que cuenta el Hospital para su realización, habiendo tenido ocasión de aclarar las dudas que me han surgido.

También he sido informado/a de que mis datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero que está sometido a las garantías que fija la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de 13 de Diciembre.

MANIFIESTO:

Que he entendido y estoy satisfecho de todas las explicaciones y aclaraciones recibidas sobre el proceso médico citado y OTORGO MI CONSENTIMIENTO para que me sea realizado el procedimiento terapéutico:

- Y extracción de sangre.
- Y recuperación de líquido folicular.
- Y biopsia de endometrio.

CONSIENTO que, preservando mi anonimato, los resultados derivados del estudio inmunológico al que estoy sometido/a puedan ser publicados con fines científicos.

Asimismo, de acuerdo con la Ley de Investigación Biomédica 14/2007 y Real decreto 1716/2011, una vez finalizado el proyecto de investigación para el cual las muestras han sido obtenidas, se puede proceder a:

- o Destruir la(s) muestra(s).
- o Almacenamiento de la muestra (Biobanco)

Entiendo que este consentimiento puede ser revocado por mí en cualquier momento y me reservo el derecho a decidir si quiero saber o no el resultado de las pruebas realizadas.

Y para que así conste, firmo el presente documento.

En
(LUGAR Y FECHA)

Fdo: EL/LA MÉDICO

Fdo: EL PACIENTE

Fdo: EL/LA REPRESENTANTE LEGAL (si procede)

REVOCACIÓN

Don/Doña: de años de edad y DNI N°
.....
(nombre y dos apellidos)

Don/Doña: de años de edad y DNI N°
.....
(nombre y dos apellidos)

En calidad de de
Doña:
.....

(REPRESENTANTE LEGAL, FAMILIAR O ALLEGADO) (nombre y dos apellidos DEL PACIENTE)

REVOCO el consentimiento prestado en fecha.....y no deseo proseguir el seguimiento propuesto, que doy con esta fecha por finalizado.

En

(LUGAR Y FECHA)

Fdo: EL/LA MÉDICO

Fdo: EL PACIENTE

Fdo: EL/LA REPRESENTANTE LEGAL (si procede)

9.4 DOCUMENTO INFORMATIVO DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO.



HOJA DE INFORMACIÓN ANEXA AL CONSENTIMIENTO INFORMADO.

HOJA DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS, SU ALMACENAMIENTO O CONSERVACIÓN COMO COLECCIÓN Y SU UTILIZACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA ASOCIADA A UNA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN CONFORME A LA LEY 14/2007, DE 3 DE JULIO, DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y AL REAL DECRETO 1716/2011, DE 18 DE NOVIEMBRE.

MODIFICADO POR LA ECC/1404/2013, DE 28 DE JUNIO DE 2013.

Nombre de la Línea de Investigación: Inmunología Reproductiva.

Proyecto asociado a la línea de investigación: Medicina de Precisión en el Fallo Reproductivo Recurrente de Causa Inflamatoria.

Nombre del Investigador Responsable: Dra. Silvia Sánchez Ramón.

Nombre del Investigador secundario: Dra. Lydia Pilar Suárez.

Grupo de Investigación de Inmunología- Instituto de Investigación Sanitaria y **Unidad de Reproducción Asistida** - Servicio de Ginecología y Obstetricia- de Hospital Clínico San Carlos.

Nombre de los Investigadores Responsables de la colección de muestras: Dras. Lydia Pilar Suárez, Nabil Alberto Shubi- Issa Marín y Silvia Sánchez Ramón.

Fecha: 1 de Octubre de 2019.

Entrada en vigor: 1 de enero de 2020.

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Nos dirigimos a usted para solicitar su consentimiento para la donación de muestras con fines de investigación biomédica. En concreto, pedimos su participación en la línea de investigación en Inmunología Reproductiva para identificar y validar biomarcadores implicados en el fallo reproductivo recurrente de origen inflamatorio (FRRi) que engloba a pacientes con abortos de repetición (AR) y fallo de implantación recurrente (FIR).

Para desarrollar esta línea de investigación, necesitamos su consentimiento para tener acceso a la información clínica relevante asociada a su estado de salud o patología, y además, le solicitamos la donación de una muestra de **líquido folicular, endometrio y sangre**, coincidiendo con su tratamiento reproductivo (Fecundación in vitro -FIV-).

a) Descripción de la línea de investigación para la que usted da su consentimiento. La infertilidad ha sido definida según la OMS como una enfermedad que constituye un problema de salud pública que afecta a unos 80 millones de parejas en el mundo y aproximadamente 1.000.000 de parejas en España, lo que equivale a decir que un 10% de las parejas españolas son infértiles. La cifra se incrementa en 16.000 nuevas parejas diagnosticadas cada año, datos que indican la magnitud del impacto socio-sanitario.

El concepto de fallo reproductivo recurrente (FRR) engloba a dos patologías: abortos de repetición y fallo de implantación recurrente. Se define abortos recurrentes a la pérdida de dos o más embarazos espontáneos antes de la 24 semana de gestación y el fallo de implantación recurrente como el fracaso en conseguir un embarazo clínico tras la transferencia de al menos dos o tres embriones de buena calidad.

El fallo reproductivo recurrente (FRR) afecta hasta un 5% de las parejas en edad fértil. Puede presentar distintas causas y no existe un tratamiento consensuado. El inflamatorio se posiciona como uno de los orígenes más probables.

El objetivo primario de este proyecto es identificar nuevos biomarcadores inmunológicos asociados al fallo reproductivo recurrente.

Como objetivo secundario, se pretende construir un algoritmo diagnóstico futuro que permita la rápida identificación de pacientes con esta patología.

b) Identificación del investigador responsable. El grupo de investigación está formado por los miembros de la Unidad de Reproducción Asistida (Dra. L. Pilar Suárez y Dra. M. Calvo Urrutia) dirigidos por la Dra. S. Sánchez Ramón (Jefe de Servicio de Inmunología).

c) Finalidad de las muestras solicitadas para la investigación en una línea de investigación concreta. Las muestras biológicas donadas sólo se utilizarán para realizar el proyecto de relacionado con la línea de investigación de aquellos biomarcadores moleculares, proteicos y/o genéticos implicados en el fallo reproductivo recurrente, previamente aprobado por el Comité de Ética de la Investigación y el Comité de Investigación del Centro.

d) Información sobre los proyectos para los que se usarán las muestras donadas. Las doctoras L. Pilar Suárez y S. Sánchez Ramón serán las responsables de la colección de muestras, y tendrán a disposición del donante, previa petición expresa, la información sobre el proyecto de investigación en el que se han utilizado sus muestras.

e) Beneficios esperados del proyecto. Usted no recibirá el resultado directo de esta investigación y no tiene por qué tomar parte en este estudio si no lo desea. Su participación es voluntaria y permitirá aumentar nuestro conocimiento sobre cómo se desarrolla el fallo reproductivo recurrente, y determinar marcadores de diagnóstico y pronóstico precoces. Estos conocimientos permitirán diseñar nuevos tratamientos dirigidos a dicha patología. La decisión que tome no

afectará a la relación con su médico, y seguirá recibiendo el mejor tratamiento posible.

f) Posibles inconvenientes. Su participación en el estudio no exige la realización de pruebas clínicas adicionales. Si usted nos da su consentimiento, se utilizará una parte de las muestras sobrantes extraídas para analizar los biomarcadores implicados en el fallo reproductivo recurrente.

g) Lugar de realización del análisis y destino de la muestra.

La muestra de líquido folicular, endometrio y/o sangre, será recogida por los profesionales responsables de este proyecto de investigación, bien en este hospital y/o en el centro externo colaborador, y en ambos casos las muestras serán procesadas, analizadas y preservadas en el laboratorio de Inmunología de Hospital Clínico San Carlos.

Este grupo de investigación, dirigido por la Dra. S. Sánchez Ramón, usará sus muestras biológicas para permitir un mayor conocimiento sobre la fisiopatología del fallo reproductivo recurrente. Una vez analizadas, las muestras o sus componentes ya procesados (células, ADN, ARN) se preservarán congeladas en el Laboratorio de Inmunología por un tiempo indefinido, para una posible evaluación futura de las mismas y para realizar otros proyectos relacionados con esta línea de investigación de Inmunología Reproductiva, previamente aprobados por el Comité de Ética de la Investigación y el Comité de Investigación del centro. Asimismo, se almacenarán los datos clínicos relevantes para nuestra investigación por un tiempo indefinido.

h) Parte de la muestra o los datos clínicos asociados serán custodiados y podrán ser cedidos con fines de investigación siguiendo los términos previstos en la Ley 14/2007, de 3 de Julio de investigación biomédica.

i) Los resultados obtenidos a partir del análisis de su muestra biológica no le serán comunicados ni a usted ni su médico, excepto en el caso de que los hallazgos tuvieran una implicación significativa en su salud.

j) Confidencialidad. La información recopilada durante este estudio será confidencial.

Todos los datos recogidos para el estudio serán tratados con las medidas de seguridad establecidas en la LEY DE PROTECCION DE 2018. Ley Orgánica 3/2018, del 5 de diciembre, para la Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales en la normativa posterior que la desarrolla.

Las muestras serán codificadas y sometidas a un proceso de disociación que garantiza que su identidad permanezca en el anonimato durante todo el estudio, así como en la eventual publicación de los resultados. Tendrán acceso a los datos el equipo investigador, el Comité Ético de Investigación Clínica o las autoridades sanitarias competentes que lo soliciten.

K) Derecho de revocación. En cualquier momento usted puede decidir retirar su consentimiento para realizar este estudio, incluida la posibilidad de destrucción de la muestra, sin tener que dar ninguna explicación, poniéndose en contacto con los responsables de la investigación, la Dra. Pilar Suárez y/o la Dra. Sánchez Ramón. Hospital Clínico San Carlos C/ Profesor Martín Lagos SN. Madrid 2804

L) Usted puede restringir el uso de sus muestras (líquido folicular, biopsia de endometrio, sangre).

M) Si decide dar su consentimiento, usted participa voluntariamente y de forma altruista y renuncia a cualquier derecho de naturaleza económica.

N) Una vez terminada la investigación, las muestras serán cedidas al Biobanco del Hospital Clínico San Carlos para que puedan utilizarse en otras investigaciones biomédicas que cumplan los términos de la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica.

De esta Hoja de Información y Consentimiento Informado se expedirán tres ejemplares firmados: uno para usted, otro para el médico que lo guardará en su historia clínica y un tercero para entregar a los investigadores responsables, Dra. L. Pilar Suárez y Dra. S. Sánchez Ramón. No dude en recabar más información o en hablar con su médico para aclarar cualquier duda.

CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS, SU PROCESAMIENTO Y ALMACENAMIENTO FORMANDO PARTE DE LA COLECCIÓN DE MUESTRAS PARA LA INVESTIGACION DE BIOMARCADORES IMPLICADOS EN EL FALLO DE REPRODUCCIÓN RECURRENTE DE ORIGEN INFLAMATORIO, QUE SE DESARROLLA EN EL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS, POR EL GRUPO DE INMUNOLOGÍA Y LA UNIDAD DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA, ASÍ COMO PARA LA OBTENCIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y ANALÍTICOS Y PARA SU REGISTRO ASOCIADO A DICHA COLECCIÓN DE MUESTRAS.

Yo, DÑA. con DNI/NIE/
Pasaporte

Declaro que

He leído la Hoja de Información que me ha sido entregada.

1. He podido hacer preguntas sobre la obtención de la muestra (punción ovárica, biopsia endometrial, análisis de sangre), su almacenamiento y custodia, como parte de una colección de muestras para la investigación en el Hospital Clínico San Carlos, el tipo de análisis que se efectuará a la muestra y la cesión de datos clínicos asociados a la misma.
2. He hablado y he aclarado las dudas con el Dr. / Dra.
3. Entiendo que mi participación es voluntaria y altruista.
4. Comprendo que puedo solicitar la destrucción de la muestra donada y/o de la información clínica asociada a la misma en cualquier momento, sin tener que ofrecer explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos futuros.
5. Ejercicio mi derecho a no ser informado de los resultados obtenidos con los estudios realizados con las muestras donadas, incluso cuando los hallazgos tengan una implicación significativa para mi salud y exista una posibilidad real de mejora (firmar sólo si procede).
6. Doy mi consentimiento para donar la muestra y los datos clínicos asociados, según lo

estipulado en esta Hoja de Información, y para que así conste:

Nombre del paciente:

Firma del paciente:

Fecha:

Si usted desea incluir alguna restricción sobre el uso de las muestras y datos clínicos indíquelo a continuación.

A firmar por el personal que informa al participante (Firma y cumplimentación obligatoria).

Fecha:

Nombre del investigador que informa:

Firma del investigador:

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Por el presente documento, yo Dña.
..... con DNI/Pasaporte
....., expreso mi deseo de no participar en el estudio de Fallo reproductivo recurrente realizado en Hospital Clínico San Carlos, y restrinjo la utilización de mi información clínica así como las muestras donadas.

Y para que así conste:

Firma del paciente:

Fecha

BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Njagi P, Groot W, Arsenijevic J, Dyer S, Mburu G, Kiarie J. Financial costs of assisted reproductive technology for patients in low- and middle-income countries: a systematic review. *Hum Reprod Open*. 2023 Mar 1;2023(2):hoad007. DOI: 10.1093/hropen/hoad007.
2. Martín Cabrejas BM. Epidemiología de la esterilidad: definiciones y magnitud del problema. En: Pérez de la Blanca E (Ed). *Tratado de esterilidad e infertilidad humanas*. 1ª ed. Madrid: Panamericana; 2023. p. 3-14
3. Ma J, Gao W, Li D. Recurrent implantation failure: A comprehensive summary from etiology to treatment. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Jan 5;13:1061766. DOI: 10.3389/fendo.2022.1061766.
4. Mateo-Sánchez HA, Mateo-Sánchez E, Hernández-Arroyo L, Rivera-Ramírez P, Mateo-Madrigal M, Mateo-Madrigal V, Mateo-Madrigal D. Pérdida recurrente del embarazo: revisión bibliográfica [Recurrent pregnancy loss: a literature review]. *Ginecol Obstet Mex*. 2016 Aug;84(8):523-34. Spanish. DOI: 29424514.
5. Atik RB, Christiansen OB, Elson J, Kolte AM, Lewis S, Middeldorp S, et al. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod Open* [Internet]. 2018 Apr 1;2018(2). DOI: 10.1093/hropen/hoy004
6. Comins Boo A, Segovia AG, del Prado NN, Fuente L de la, Alonso J, Ramon SS. Evidence-based Update: Immunological Evaluation of Recurrent Implantation Failure. *Reproductive Immunology: Open Access*. 2016;01(04).
7. Azargoon A, Mirrasouli Y, Barough MS, Barati M, Kokhaei P. The state of peripheral blood natural killer cells and cytotoxicity in women with recurrent pregnancy loss and unexplained infertility. *Int J Fertil Steril*. 2019 Apr 1;13(1):12–7. DOI: 10.22074/ijfs.2019.5443
8. Bellver J. Aborto de repetición. En: Remohí Giménez J (Ed). *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Aspectos clínicos*. 5ª ed. Madrid: Panamericana; 2018. P. 485-506.
9. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2012;98(5):1103–11. Fertil Steril. 2012;1103–11. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.048

10. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions on infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2020;113 (3):533-5. *Fertil Steril.* 2020;111(3):533–5. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.11.025
11. Muñoz Cantero M, Bellver Pradas J, Fernández Olmedilla L, de la Fuente Hernández LA, Devesa Rodríguez de la Rúa M, Herrero García J, et al. *Pérdida gestacional recurrente: diagnóstico y abordaje.* Madrid: Sociedad Española de Fertilidad; 2021. ISBN: 978-84-09-40337-0.
12. Regan L, Rai R, Saravelos S, Li TC, Gynaecologists the RC of O and. Recurrent Miscarriage Green-top Guideline No. 17. *BJOG [Internet].* 2023 Nov 1;130(12):e9–39. DOI: 10.1111/1471-0528.17515
13. Toffol E, KP, & PT. Miscarriage and mental health: results of two population-based studies. *Psychiatry research,* 205(1-2), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2012.08.029>. *Psychiatry Res.* 2013 Jan 30;205(1–2):151–8. DOI: 10.1016/j.psychres.2012.08.029
14. de La Rochebrochard E, Thonneau P. Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. *Human Reproduction [Internet].* 2002 Jun 1;17(6):1649–56. DOI: 10.1093/humrep/17.6.1649
15. Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Maternal age and fetal loss: Population based register linkage study. *Br Med J.* 2000 Jun 24;320(7251):1708–12. DOI: 10.1136/bmj.320.7251.1708
16. Sauer M V. *Reproduction at an advanced maternal age and maternal health.* Vol. 103, *Fertility and Sterility.* Elsevier Inc.; 2015. p. 1136–43. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.03.004
17. Grande M, Borrell A, Garcia-Posada R, Borobio V, Muñoz M, Creus M, et al. The effect of maternal age on chromosomal anomaly rate and spectrum in recurrent miscarriage. *Human Reproduction.* 2012;27(10):3109–17. DOI: 10.1093/humrep/des274
18. Kolte AM, Olsen LR, Mikkelsen EM, Christiansen OB, Nielsen HS. Depression and emotional stress is highly prevalent among women with recurrent pregnancy loss. *Human Reproduction.* 2015 Sep 30;30(4):777–82. DOI: 10.1093/humrep/deu353

19. Ajayi OO, Charles-Davies MA, Arinola OG. Progesterone, selected heavy metals and micronutrients in pregnant Nigerian women with a history of recurrent spontaneous abortion. *African health sciences* 2012;12: 153-159. <https://doi.org/10.4314/ahs.v12i2.12>
20. Metwally M, Saravelos SH, Ledger WL, Li TC. Body mass index and risk of miscarriage in women with recurrent miscarriage. *Fertil Steril*. 2010 Jun;94(1):290–5. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.03.021
21. Lashen H, Fear K, Sturdee DW. Obesity is associated with increased risk of first trimester and recurrent miscarriage: Matched case-control study. *Human Reproduction*. 2004;19(7):1644–6. DOI: 10.1093/humrep/deh277
22. Hegaard HK, Ersbøll AS, Damm P. Exercise in Pregnancy: First Trimester Risks. *Clin Obstet Gynecol* [Internet]. 2016;59(3). DOI: 10.1097/GRF.0000000000000219
23. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006 Feb;4(2):295–306. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x
24. Raut M, Raut M. Recurrent Pregnancy Loss and Recurrent Implantation Failure. In: Raut M, Raut M, editors. *Lymphocyte Immunization Therapy (LIT) in Reproductive Failures: New Horizons* [Internet]. Singapore: Springer Nature Singapore; 2022. p. 5–13. DOI: 10.1007/978-981-19-2960-1_2
25. Bartel G, Walch K, Wahrmann M, Pils S, Küssel L, Polterauer S, et al. Prevalence and qualitative properties of circulating anti-human leukocyte antigen alloantibodies after pregnancy: No association with unexplained recurrent miscarriage. *Hum Immunol*. 2011 Feb 1;72(2):187–92. DOI: 10.1016/j.humimm.2010.11.005
26. Nielsen HS, Witvliet MD, Steffensen R, Haasnoot GW, Goulmy E, Christiansen OB, et al. The presence of HLA-antibodies in recurrent miscarriage patients is associated with a reduced chance of a live birth. *J Reprod Immunol*. 2010 Dec 1;87(1–2):67–73. DOI: 10.1016/j.jri.2010.06.002
27. Calleja-Agius J, Jauniaux E, Muttukrishna S. Inflammatory cytokines in maternal circulation and placenta of chromosomally abnormal first trimester miscarriages. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:175041. DOI: 10.1155/2012/175041.
28. Piosik ZM, Goegebeur Y, Klitkou L, Steffensen R, Christiansen OB. Plasma TNF- α Levels are Higher in Early Pregnancy in Patients with Secondary Compared with

- Primary Recurrent Miscarriage. *American Journal of Reproductive Immunology* [Internet]. 2013 Nov 1;70(5):347–58. DOI: 10.1111/aji.12135
29. Lee SK, Na BJ, Kim JY, Hur SE, Lee M, Gilman-Sachs A, et al. Determination of Clinical Cellular Immune Markers in Women with Recurrent Pregnancy Loss. *American Journal of Reproductive Immunology* [Internet]. 2013 Nov 1;70(5):398–411. Available from: DOI: 10.1111/aji.12137
 30. Ticconi C, Rotondi F, Veglia M, Pietropolli A, Bernardini S, Ria F, et al. Antinuclear Autoantibodies in Women with Recurrent Pregnancy Loss. *American Journal of Reproductive Immunology* [Internet]. 2010 Dec 1;64(6):384–92. Available from: DOI: 10.1111/j.1600-0897.2010.00863.x
 31. Cavalcante MB, Costa F da S, Araujo Júnior E, Barini R. Risk factors associated with a new pregnancy loss and perinatal outcomes in cases of recurrent miscarriage treated with lymphocyte immunotherapy. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* [Internet]. 2015 Jun 13;28(9):1082–6. DOI: 10.3109/14767058.2014.943175
 32. Christiansen OB. A fresh look at the causes and treatments of recurrent miscarriage, especially its immunological aspects. *Hum Reprod Update* [Internet]. 1996 Jul 1;2(4):271–93. DOI: 10.1093/humupd/2.4.271
 33. Chao KH, Yang YS, Ho GN, Chen SU, Chen HF, Dai HJ, et al. Decidual Natural Killer Cytotoxicity Decreased in Normal Pregnancy but Not in Anembryonic Pregnancy and Recurrent Spontaneous Abortion. *American Journal of Reproductive Immunology* [Internet]. 1995 Nov 1;34(5):274–80. DOI: 10.1111/j.1600-0897.1995.tb00953.x
 34. Carbone J, Gallego A, Lanio N, Navarro J, Orera M, Aguaron A, et al. Quantitative abnormalities of peripheral blood distinct T, B, and natural killer cell subsets and clinical findings in obstetric antiphospholipid syndrome. *Journal of Rheumatology*. 2009 Jun;36(6):1217–25. DOI: 10.3899/jrheum.081079
 35. Lee SK, Na BJ, Kim JY, Hur SE, Lee M, Gilman-Sachs A, et al. Determination of Clinical Cellular Immune Markers in Women with Recurrent Pregnancy Loss. *American Journal of Reproductive Immunology* [Internet]. 2013 Nov 1;70(5):398–411. Available from: DOI: 10.1111/aji.12137
 36. Katano K, Suzuki S, Ozaki Y, Suzumori N, Kitaori T, Sugiura-Ogasawara M. Peripheral natural killer cell activity as a predictor of recurrent pregnancy loss: A large cohort study. *Fertil Steril*. 2013;100(6):1629–34. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.1996

37. Michimata T, Ogasawara MS, Tsuda H, Suzumori K, Aoki K, Sakai M, et al. Distributions of Endometrial NK Cells, B Cells, T Cells, and Th2/Tc2 Cells Fail to Predict Pregnancy Outcome Following Recurrent Abortion. *American Journal of Reproductive Immunology* [Internet]. 2002 Apr 1;47(4):196–202. DOI: 10.1034/j.1600-0897.2002.01048.x
38. Tuckerman E, Laird SM, Prakash A, Li TC. Prognostic value of the measurement of uterine natural killer cells in the endometrium of women with recurrent miscarriage. *Human Reproduction* [Internet]. 2007 Aug 1;22(8):2208–13. DOI: 10.1093/humrep/dem141
39. Cuadrado-Torroglosa I, García-Velasco JA, Alecsandru D. Maternal–Fetal Compatibility in Recurrent Pregnancy Loss. Vol. 13, *Journal of Clinical Medicine*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024. DOI: 10.3390/jcm13010001
40. Yun Z, Duan L, Liu X, Cai Q, Li C. An update on the biologics for the treatment of antiphospholipid syndrome. Vol. 14, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1234567
41. Mathur N, Triplett L, Stephenson MD. Miscarriage chromosome testing: Utility of comparative genomic hybridization with reflex microsatellite analysis in preserved miscarriage tissue. *Fertil Steril*. 2014;101(5):1349–52. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.01.020
42. Robberecht C, Schuddinck V, Fryns JP, Vermeesch JR. Diagnosis of miscarriages by molecular karyotyping: Benefits and pitfalls. *Genetics in Medicine*. 2009 Sep;11(9):646–54. DOI: 10.1097/GIM.0b013e3181b2e52b
43. Sahoo T, Dzidic N, Strecker MN, Commander S, Travis MK, Doherty C, et al. Comprehensive genetic analysis of pregnancy loss by chromosomal microarrays: outcomes, benefits, and challenges. *Genetics in Medicine*. 2017 Jan 1;19(1):83–9. DOI: 10.1038/gim.2016.69
44. Shamseldin HE, Swaid A, Alkuraya FS. Lifting the lid on unborn lethal Mendelian phenotypes through exome sequencing. *Genetics in Medicine*. 2013 Apr;15(4):307–9. DOI: 10.1038/gim.2012.130
45. Dahdouh EM, Kutteh WH. Genetic testing of products of conception in recurrent pregnancy loss evaluation. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2021;43:120–6. DOI: 10.1016/j.rbmo.2021.04.008.

46. Flynn H, Yan J, Saravelos SH, Li TC. Comparison of reproductive outcome, including the pattern of loss, between couples with chromosomal abnormalities and those with unexplained repeated miscarriages. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* [Internet]. 2014 Jan 1;40(1):109–16. DOI: [10.1111/jog.12133](https://doi.org/10.1111/jog.12133)
47. Van Den Boogaard E, Cohn DM, Korevaar JC, Dawood F, Vissenberg R, Middeldorp S, et al. Number and sequence of preceding miscarriages and maternal age for the prediction of antiphospholipid syndrome in women with recurrent miscarriage. *Fertil Steril*. 2013 Jan;99(1):188–92. DOI: [10.1016/j.fertnstert.2012.09.010](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.09.010).
48. Abadi KK, Jama AH, Legesse AY, Gebremichael AK. Prevalence of Hypothyroidism in Pregnancy and Its Associations with Adverse Pregnancy Outcomes Among Pregnant Women in A General Hospital: A Cross Sectional Study. *Int J Womens Health*. 2023;15:1481–90. DOI: [10.2147/IJWH.S419123](https://doi.org/10.2147/IJWH.S419123)
49. van Dijk MM, Vissenberg R, Bisschop PH, Dawood F, van Wely M, Goddijn M, et al. Is subclinical hypothyroidism associated with lower live birth rates in women who have experienced unexplained recurrent miscarriage? *Reprod Biomed Online*. 2016 Dec 1;33(6):745–51. DOI: [10.1016/j.rbmo.2016.09.010](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.09.010)
50. Vissenberg R, Manders VD, Mastenbroek S, Fliers E, Afink GB, Ris-Stalpers C, et al. Pathophysiological aspects of thyroid hormone disorders/thyroid peroxidase autoantibodies and reproduction. *Hum Reprod Update*. 2015 May 1;21(3):378–87. DOI: [10.1093/humupd/dmu040](https://doi.org/10.1093/humupd/dmu040)
51. Marai I, Carp H, Shai S, Shabo R, Fishman G, Shoenfeld Y. Autoantibody Panel Screening in Recurrent Miscarriages. *American Journal of Reproductive Immunology* [Internet]. 2004 Mar 1;51(3):235–40. DOI: [10.1111/j.1600-0897.2004.00153.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2004.00153.x)
52. Watson H, Kiddy DS, Hamilton-Fairley D, Scanlon MJ, Barnard C, Collins WP, et al. Hypersecretion of luteinizing hormone and ovarian steroids in women with recurrent early miscarriage. *Human Reproduction* [Internet]. 1993 Jun 1;8(6):829–33. DOI: [10.1093/oxfordjournals.humrep.a138149](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138149)
53. Ispasoiu CA, Chicea R, Stamatian FV, Ispasoiu F. High fasting insulin levels and insulin resistance may be linked to idiopathic recurrent pregnancy loss: a case-control study. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:576926. DOI: [10.1155/2013/576926](https://doi.org/10.1155/2013/576926).
54. Triggianese P, Perricone C, Perricone R, De Carolis C. Prolactin and Natural Killer Cells: Evaluating the Neuroendocrine-immune Axis in Women with Primary

Infertility and Recurrent Spontaneous Abortion. *American Journal of Reproductive Immunology* [Internet]. 2015 Jan 1;73(1):56–65. DOI: 10.1111/aji.12335

55. Grimbizis GF, Gordts S, Di Spiezio Sardo A, Brucker S, De Angelis C, Gergolet M, et al. The ESHRE/ESGE consensus on the classification of female genital tract congenital anomalies. *Human Reproduction*. 2013;28(8):2032–44. DOI: 10.1093/humrep/det098
56. Chan YY, Jayaprakasan K, Tan A, Thornton JG, Coomarasamy A, Raine-Fenning NJ. Reproductive outcomes in women with congenital uterine anomalies: A systematic review. Vol. 38, *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2011. p. 371–82. DOI: 10.1002/uog.10056
57. Lozano FM, Bernabeu A, Lledo B, Morales R, Diaz M, Aranda FI, et al. Characterization of the vaginal and endometrial microbiome in patients with chronic endometritis. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* [Internet]. 2021 Aug 1;263:25–32. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2021.05.045
58. Atik RB, Christiansen OB, Elson J, Kolte AM, Lewis S, Middeldorp S, et al. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss: an update in 2022. *Hum Reprod Open*. 2023;2023(1). DOI: 10.1093/hropen/hoac052
59. Lund M, Kamper-Jørgensen M, Nielsen HS, Lidegaard Ø, Andersen AMN, Christiansen OB. Prognosis for Live Birth in Women With Recurrent Miscarriage: What Is the Best Measure of Success? *Obstetrics & Gynecology* [Internet]. 2012;119(1). DOI: 10.1097/AOG.0b013e31823d4276
60. Kolte AM, Nielsen HS, Moltke I, Degn B, Pedersen B, Sunde L, et al. A genome-wide scan in affected sibling pairs with idiopathic recurrent miscarriage suggests genetic linkage. *Mol Hum Reprod*. 2011 Jun;17(6):379–85. DOI: 10.1093/molehr/gar002
61. Kling C, Magez J, Hedderich J, von Otte S, Kabelitz D. Two-year outcome after recurrent first trimester miscarriages: prognostic value of the past obstetric history. *Arch Gynecol Obstet*. 2016 May 1;293(5):1113–23. DOI: 10.1007/s00404-015-3925-0
62. Nielsen HS, Steffensen R, Lund M, Egestad L, Mortensen LH, Andersen AMN, et al. Frequency and impact of obstetric complications prior and subsequent to unexplained secondary recurrent miscarriage. *Human Reproduction*. 2010;25(6):1543–52. DOI: 10.1093/humrep/deq090

63. Sun Y, Zhang Y, Ma X, Jia W, Su Y. Determining Diagnostic Criteria of Unexplained Recurrent Implantation Failure: A Retrospective Study of Two vs Three or More Implantation Failure. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Jul 22;12. DOI: 10.3389/fendo.2021.698032
64. Busnelli A, Reschini M, Cardellicchio L, Vegetti W, Somigliana E, Vercellini P. How common is real repeated implantation failure? An indirect estimate of the prevalence. *Reprod Biomed Online [Internet]*. 2020 Jan 1;40(1):91–7. DOI: 10.1016/j.rbmo.2019.10.014
65. Cimadomo D, Craciunas L, Vermeulen N, Vomstein K, Toth B. Definition, diagnostic and therapeutic options in recurrent implantation failure: An international survey of clinicians and embryologists. *Human Reproduction*. 2021 Feb 1;36(2):305–17. DOI: 10.1093/humrep/deaa317
66. Cimadomo D, De Los Santos MJ, Griesinger G, Lainas G, Le Clef N, McLernon DJ, et al. ESHRE good practice recommendations on recurrent implantation failure. *Hum Reprod Open*. 2023 Jun 15;2023(3):hoad023. doi: 10.1093/hropen/hoad023.
67. Vermeulen N, Le Clef N, Veleva Z, D'Angelo A, Tilleman K. European Recommendations for good practice in addition to an evidence-based guidelines programme: rationale and method of development. *BMJ Evid Based Med [Internet]*. 2019 Feb 1;24(1):30. <http://ebm.bmj.com/content/24/1/30.abstract>. DOI: 10.1136/bmjebm-2018-111032
68. Pirtea P, Cedars MI, Devine K, Ata B, Franasiak J, Racowsky C, et al. Recurrent implantation failure: reality or a statistical mirage?: Consensus statement from the July 1, 2022 Lugano Workshop on recurrent implantation failure. Vol. 120, *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc.; 2023. p. 45–59. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2023.03.015
69. Wyns C, De Geyter C, Calhaz-Jorge C, Kupka MS, Motrenko T, Smeenk J, et al. ART in Europe, 2017: Results generated from European registries by ESHRE. *Hum Reprod Open*. 2021;2021(3). DOI: 10.1093/hropen/hoab02
70. Reig A, Franasiak J, Scott RT, Seli E. The impact of age beyond ploidy: outcome data from 8175 euploid single embryo transfers. *J Assist Reprod Genet*. 2020 Mar 1;37(3):595–602. DOI: 10.1007/s10815-020-01739-0.
71. Pirtea P. Women with three normal embryos have 95% chance of pregnancy: Insights on recurrent implantation failure. Presented at the American Society for Reproductive Medicine (ASRM) Congress. New Jersey; 2018.

72. Kolibianakis EM, Collins J, Tarlatzis BC, Devroey P, Diedrich K, Griesinger G. Among patients treated for IVF with gonadotrophins and GnRH analogues, is the probability of live birth dependent on the type of analogue used? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2006 Dec 1;12(6):651–71. DOI: 10.1093/humupd/dml038
73. Ata B, Kalafat E, Somigliana E. A new definition of recurrent implantation failure on the basis of anticipated blastocyst aneuploidy rates across female age. *Fertil Steril*. 2021 Nov 1;116(5):1320–7. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2021.06.045
74. Boivin J, Griffiths E, Venetis CA. Emotional distress in infertile women and failure of assisted reproductive technologies: Meta-analysis of prospective psychosocial studies. *BMJ*. 2011 Feb 26;342(7795):481. DOI: 10.1136/bmj.d223
75. Moragianni VA, Jones SML, Ryley DA. The effect of body mass index on the outcomes of first assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril*. 2012 Jul;98(1):102–8. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.04.006
76. Bellver J, Brandão P, Alegre L, Meseguer M. Blastocyst formation is similar in obese and normal weight women: A morphokinetic study. *Human Reproduction*. 2021 Dec 1;36(12):3062–73. DOI: 10.1093/humrep/deab212
77. Baldini D, Malvasi A, Kosmas I, Baldini GM, Silvestris E. Increased bioavailability of Vitamin D improved pregnancy outcomes in in vitro fertilization cycles, only in patients over 36 years: a cross-sectional study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021;25(15):4964-4972. doi:10.26355/eurrev_202108_26453
78. Franasiak JM, Molinaro TA, Dubell EK, Scott KL, Ruiz AR, Forman EJ, et al. Vitamin D levels do not affect IVF outcomes following the transfer of euploid blastocysts. *Am J Obstet Gynecol*. 2015 Mar 1;212(3):315.e1-315.e6. DOI: 10.1016/j.ajog.2014.09.029
79. Moffett A, Colucci F. Uterine NK cells: Active regulators at the maternal-fetal interface. Vol. 124, *Journal of Clinical Investigation*. The American Society for Clinical Investigation; 2014. p. 1872–9. DOI: 10.1172/JCI68107
80. Alecsandru D, Barrio A, Garrido N, Aparicio P, Pellicer A, Moffett A, et al. Parental human leukocyte antigen-C allotypes are predictive of live birth rate and risk of poor placentation in assisted reproductive treatment. *Fertil Steril*. 2020 Oct 1;114(4):809–17. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.05.008>

81. Strunz B, Bister J, Jönsson H, Filipovic I, Crona-Guterstam Y, Kvedaraite E, et al. Continuous human uterine NK cell differentiation in response to endometrial regeneration and pregnancy. *Sci Immunol* [Internet]. 2021 Feb 19;6(56):eabb7800. DOI: 10.1126/sciimmunol.abb7800
82. Marron K, Walsh D, Harrity C. Detailed endometrial immune assessment of both normal and adverse reproductive outcome populations. *J Assist Reprod Genet*. 2019 Feb 15;36(2):199–210. DOI: 10.1007/s10815-018-1350-0
83. Von Woon E, Greer O, Shah N, Nikolaou D, Johnson M, Male V. Number and function of uterine natural killer cells in recurrent miscarriage and implantation failure: a systematic review and meta-analysis. Vol. 28, *Human Reproduction Update*. Oxford University Press; 2022. p. 548–82. DOI: 10.1093/humupd/dmac013
84. Donoghue JF, Paiva P, Teh WT, Cann LM, Nowell C, Rees H, et al. Endometrial uNK cell counts do not predict successful implantation in an IVF population. *Human Reproduction* [Internet]. 2019 Dec 1;34(12):2456–66. DOI: 10.1093/humrep/dez194
85. Salazar MD, Wang WJ, Skariah A, He Q, Field K, Nixon M, et al. Post-hoc evaluation of peripheral blood natural killer cell cytotoxicity in predicting the risk of recurrent pregnancy losses and repeated implantation failures. *J Reprod Immunol*. 2022 Mar 1;150:103487. DOI: 10.1016/j.jri.2022.103487
86. Ali SB, Jeelall Y, Pennell CE, Hart R, McLean-Tooke A, Lucas M. The role of immunological testing and intervention in reproductive medicine: A fertile collaboration? *American Journal of Reproductive Immunology* [Internet]. 2018 Mar 1;79(3):e12784. DOI: 10.1111/aji.12784
87. Huang C, Xiang Z, Zhang Y, Li Y, Xu J, Zhang H, et al. NKG2D as a Cell Surface Marker on $\gamma\delta$ -T Cells for Predicting Pregnancy Outcomes in Patients With Unexplained Repeated Implantation Failure. *Front Immunol*. 2021 Mar 10;12. DOI: 10.3389/fimmu.2021.641026
88. Harrity C, Bereir MM, Walsh DJ, Marron KD. Moving from peripheral blood to local uterine immunophenotype analysis in patients with poor reproductive history: pilot study of a novel technique. *Ir J Med Sci*. 2019 Aug 1;188(3):893–901. DOI: 10.1007 / s11845-018-1933-8
89. Lashley LE, van der Hoorn MLP, van der Mast BJ, Tilburgs T, van der Lee N, van der Keur C, et al. Changes in cytokine production and composition of

peripheral blood leukocytes during pregnancy are not associated with a difference in the proliferative immune response to the fetus. *Hum Immunol*[Internet]. 2011;72(10):805-11. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0198885911001431>

90. Zhao Y, Zhang T, Guo X, Wong CK, Chen X, Chan YL, et al. Successful implantation is associated with a transient increase in serum pro-inflammatory cytokine profile followed by a switch to anti-inflammatory cytokine profile prior to confirmation of pregnancy. *Fertil Steril*. 2021 Apr 1;115(4):1044–53. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.10.031>
91. Díaz-Hernández I, Alecsandru D, García-Velasco JA, Domínguez F. Uterine natural killer cells: from foe to friend in reproduction. Vol. 27, *Human Reproduction Update*. Oxford University Press; 2021. p. 720–46. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa062>
92. Lashley LE, van der Westerlaken LA, Haasnoot GW, Drabbels JJ, Spruyt-Gerritse MJ, Scherjon SA, et al. Maternal HLA-C2 and 14 bp insertion in HLA-G is associated with recurrent implantation failure after in vitro fertilization treatment. *Tissue Antigens* [Internet]. 2014 Dec 1;84(6):536–44. <https://doi.org/10.1111/tan.12452>
93. Papas RS, Kutteh WH. Genetic testing for aneuploidy in patients who have had multiple miscarriages: A review of current literature. Vol. 14, *Application of Clinical Genetics*. Dove Medical Press Ltd; 2021. p. 321–9. <https://doi.org/10.2147/TACG.S320778>
94. Hanson BM, Kim JG, Osman EK, Tiegs AW, Lathi RB, Cheng PJ, et al. Impact of paternal age on embryology and pregnancy outcomes in the setting of a euploid single-embryo transfer with ejaculated sperm: retrospective cohort study. *F and S Reports*. 2020 Sep 1;1(2):99–105. <https://doi.org/10.1016/j.xfre.2020.06.004>
95. De Sutter, P., Stadhouders, R., Dutré, M., Gerris, J., & Dhont, M. (2012). Prevalence of chromosomal abnormalities and timing of karyotype analysis in patients with recurrent implantation failure (RIF) following assisted reproduction. *Facts, views & vision in ObGyn*, 4(1), 59–65.
96. Meschede D, Lemcke B, Exeler JR, De Geyter C, Behre HM, Nieschlag E, et al. Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing

intracytoplasmic sperm injection--prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance. *Human Reproduction* [Internet]. 1998 Mar 1;13(3):576–82. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.3.576>

97. Insogna IG, Lanes & A, Dobson & L, Ginsburg ES, Racowsky & C, Yanushpolsky E. Blastocyst conversion rate and ploidy in patients with structural rearrangements. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02131-2>
98. Liao Z, Liu C, Cai L, Shen L, Sui C, Zhang H, et al. The Effect of Endometrial Thickness on Pregnancy, Maternal, and Perinatal Outcomes of Women in Fresh Cycles After IVF/ICSI: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 12, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2022. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.814648>
99. Jacobs EA, Van Voorhis B, Kawwass JF, Kondapalli LA, Liu K, Dokras A. Endometrial thickness: How thin is too thin? Vol. 118, *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc.; 2022. p. 249–59. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.05.033>
100. Haas J, Smith R, Zilberberg E, Nayot D, Meriano J, Barzilay E, et al. Endometrial compaction (decreased thickness) in response to progesterone results in optimal pregnancy outcome in frozen-thawed embryo transfers. *Fertil Steril*. 2019 Sep 1;112(3):503-509.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.05.001>
101. Bouet PE, El Hachem H, Monceau E, Gariépy G, Kadoch IJ, Sylvestre C. Chronic endometritis in women with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure: Prevalence and role of office hysteroscopy and immunohistochemistry in diagnosis. *Fertil Steril*. 2016;105(1):106–10. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.09.025>
102. Cicinelli E, Matteo M, Tinelli R, Lepera A, Alfonso R, Indraccolo U, et al. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy. *Human Reproduction*. 2015 Feb 1;30(2):323–30. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu292>
103. Vitagliano A, Saccardi C, Noventa M, Di Spiezio Sardo A, Saccone G, Cicinelli E, et al. Effects of chronic endometritis therapy on in vitro fertilization outcome in women with repeated implantation failure: a systematic

review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2018 Jul 1;110(1):103-112.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.03.017>

104. Cicinelli E, Trojano G, Mastromauro M, Vimercati A, Marinaccio M, Mitola PC, et al. Higher prevalence of chronic endometritis in women with endometriosis: a possible etiopathogenetic link. *Fertil Steril*. 2017 Aug 1;108(2):289-295.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.05.016>
105. Poppe K, Bisschop P, Fugazzola L, Minziori G, Unuane D, Weghofer A. 2021 European Thyroid Association Guideline on Thyroid Disorders prior to and during Assisted Reproduction. *Eur Thyroid J*. 2021 Feb 1;9(6):281–95. <https://doi.org/10.1159/000512790>
106. Yang T, Zhao J, Liu F, Li Y. Lipid metabolism and endometrial receptivity. *Hum Reprod Update*. 2022 Nov 1;28(6):858–89. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmac026>
107. Bellver J, Marín C, Lathi RB, Murugappan & G, Labarta E, Vidal C, et al. Obesity Affects Endometrial Receptivity by Displacing the Window of Implantation. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00631-1>
108. Bosch E, Labarta E, Crespo J, Simón C, Remohí J, Jenkins J, et al. Circulating progesterone levels and ongoing pregnancy rates in controlled ovarian stimulation cycles for in vitro fertilization: analysis of over 4000 cycles. *Human Reproduction [Internet]*. 2010 Aug 1;25(8):2092–100. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq125>
109. Shaulov T, Sierra S, Sylvestre C. Recurrent implantation failure in IVF: A Canadian Fertility and Andrology Society Clinical Practice Guideline. 2020. <https://doi.org/10.1016/j>.
110. Tan X, Yu Z, Sao J, Chen L, Shen Y, Ding J, et al. Association between in vitro fertilization outcomes and inherited thrombophilias: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2016 Aug 1;33(8):1093–8. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0726-0>
111. 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. *J Reprod*

112. Bamford T, Barrie A, Montgomery S, Dhillon-Smith R, Campbell A, Easter C, et al. Morphological and morphokinetic associations with aneuploidy: a systematic review and meta-analysis. Vol. 28, *Human Reproduction Update*. Oxford University Press; 2022. p. 656–86. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmac022>
113. Simón C, Gómez C, Cabanillas S, Vladimirov I, Castellón G, Giles J, et al. A 5-year multicentre randomized controlled trial comparing personalized, frozen and fresh blastocyst transfer in IVF. *Reprod Biomed Online*. 2020 Sep 1;41(3):402–15. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.06.002>
114. Liu Z, Liu X, Wang M, Zhao H, He S, Lai S, et al. The Clinical Efficacy of Personalized Embryo Transfer Guided by the Endometrial Receptivity Array/Analysis on IVF/ICSI Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 13, *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A.; 2022. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.841437>
115. Moreno I, Codoñer FM, Vilella F, Valbuena D, Martinez-Blanch JF, Jimenez-Almazán J, et al. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. In: *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Mosby Inc.; 2016. p. 684–703. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.09.075>
116. Franasiak JM, Werner MD, Juneau CR, Tao X, Landis J, Zhan Y, et al. Endometrial microbiome at the time of embryo transfer: next-generation sequencing of the 16S ribosomal subunit. *J Assist Reprod Genet*. 2016 Jan 1;33(1):129–36. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0614-z>
117. Singer M, Borg M, Ouburg S, Morré SA. The relation of the vaginal microbiota to early pregnancy development during in vitro fertilization treatment—A meta-analysis. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2019 Apr 1;48(4):223–9. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2019.01.007>
118. Duffy JMN, Adamson GD, Benson E, Bhattacharya S, Bofill M, Brian K, et al. Top 10 priorities for future infertility research: an international consensus development study. *Fertil Steril*. 2021 Jan 1;115(1):180–90. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.11.014>

119. Peduzzi P, Concato J, Kemper E, Holford TR, Feinstein AR. A simulation study of the number of events per variable in logistic regression analysis. *J Clin Epidemiol.* 1996 Dec 1;49(12):1373–9. [https://doi.org/10.1016/s0895-4356\(96\)00236-3](https://doi.org/10.1016/s0895-4356(96)00236-3)
120. Lin C, Jing M, Zhu W, Tu X, Chen Q, Wang X, et al. The Value of Anti-Müllerian Hormone in the Prediction of Spontaneous Pregnancy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021 Oct 13;12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.695157>
121. Elmaleh-Sachs A, Schwartz JL, Bramante CT, Nicklas JM, Gudzone KA, Jay M. Obesity Management in Adults: A Review. *JAMA [Internet].* 2023 Nov 28;330(20):2000–15. Available from: <https://doi.org/10.1001/jama.2023.19897>
122. Cuadrado-Torroglosa I, Pacheco A, Barrio A, Garrido N, Aparicio P, Pellicer N, et al. Increased cytotoxic natural killer cells in the endometrium alone cannot be considered the immunological cause of recurrent miscarriage. *Fertil Steril.* 2023 Jul 1;120(1):101–10. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2023.02.024
123. Braun AS, Vomstein K, Reiser E, Tollinger S, Kyvelidou C, Feil K, et al. NK and T Cell Subtypes in the Endometrium of Patients with Recurrent Pregnancy Loss and Recurrent Implantation Failure: Implications for Pregnancy Success. *J Clin Med.* 2023 Sep 1;12(17). <https://doi.org/10.3390/jcm12175585>
124. Fan X, Zhao Q, Li Y, Chen Z, Liao J, Chen H, et al. Immune profiling and RNA-seq uncover the cause of partial unexplained recurrent implantation failure. *Int Immunopharmacol.* 2023 Aug 1;121:110513. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110513>
125. Kofod L, Lindhard A, Hviid TVF. Implications of uterine NK cells and regulatory T cells in the endometrium of infertile women. *Hum Immunol [Internet].* 2018;79(9):693–701. DOI: 10.1016/j.humimm.2018.07.003
126. Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Peña J, Solana R. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94

inhibitory receptor. *Immunology*. 1999;97(1):159–65.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1999.00738.x>

127. Poggi A, Zocchi MR. NK cell autoreactivity and autoimmune diseases. Vol. 5, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Research Foundation; 2014.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00027>
128. Zingoni A, Palmieri G, Morrone S, Carretero M, Lopez-Botel M, Piccoli M, et al. CD69-triggered ERK activation and functions are negatively regulated by CD94/NKG2-A inhibitory receptor. *Eur J Immunol*. 2000;30(2):644–51.
[https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200002\)30:2<644::AID-IMMU644>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200002)30:2<644::AID-IMMU644>3.0.CO;2-H)
129. Law RHP, Lukoyanova N, Voskoboinik I, Caradoc-Davies TT, Baran K, Dunstone MA, et al. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature* [Internet]. 2010;468(7322):447–51. <https://doi.org/10.1038/nature09518>
130. Fainaru O, Hantisteanu S, Rotfarb N, Michaeli M, Hallak M, Ellenbogen A. Maturation of human ovarian follicles is accompanied by a decrease in the CD56+CD16+ natural killer cell population. *Fertil Steril*. 2011 Jun;95(7):2395–8. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.03.012>
131. Křížan J, Cuchalová L, Šíma P, Králíčková M, Madar J, Větvička V. Altered distribution of NK and NKT cells in follicular fluid is associated with IVF outcome. *J Reprod Immunol*. 2009 Oct 1;82(1):84–8. DOI: 10.1016/j.jri.2009.05.002
132. Fu B, Tian Z, Wei H. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. Vol. 141, *Immunology*. Blackwell Publishing Ltd; 2014. p. 483–9. <https://doi.org/10.1111/imm.12224>
133. Fainaru O, Amsalem H, Bentov Y, Esfandiari N, Casper RF. CD56brightCD16- natural killer cells accumulate in the ovarian follicular fluid of patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2010 Oct;94(5):1918–21. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.12.067
134. Dons'koi B V, Chernyshov VP, Sirenko VY, Strelko G V, Osypchuk D V. Peripheral blood natural killer cells activation status determined by CD69

upregulation predicts implantation outcome in IVF. *Immunobiology* [Internet]. 2014;219(3):167–71. DOI: 10.1016/j.imbio.2013.10.001

135. Comins-Boo A, Cristóbal I, Fernández-Arquero M, Rodríguez de Frías E, Calvo Urrutia M, Pilar Suárez L, et al. Functional NK surrogate biomarkers for inflammatory recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure. *American Journal of Reproductive Immunology* [Internet]. 2021 Aug 1;86(2):e13426. DOI: 10.1111/aji.13426
136. Miko E, Manfai Z, Meggyes M, Barakonyi A, Wilhelm F, Varnagy A, et al. Possible role of natural killer and natural killer T-like cells in implantation failure after IVF. *Reprod Biomed Online*. 2010 Dec;21(6):750–6. DOI: 10.1016/j.rbmo.2010.07.012
137. Cai JY, Tang YY, Deng XH, Li YJ, Liang G, Meng YQ, et al. Recurrent Implantation Failure May Be Identified by a Combination of Diagnostic Biomarkers: An Analysis of Peripheral Blood Lymphocyte Subsets. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Jul 22;13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.865807>
138. Dons'koi BV. Teoría de las acentuaciones inmunitarias: formación de un inmunofenotipo acentuado. *Lik. sprava*. junio 2023.(2):5–13. <https://liksprava.com/index.php/journal/article/view/658>
139. Zalfa C, Paust S. Natural Killer Cell Interactions With Myeloid Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment and Implications for Cancer Immunotherapy. Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.633205>
140. Genest G, Banjar S, Almasri W, Beauchamp C, Benoit J, Buckett W, Dzineku F, Gold P, Dahan MH, Jamal W, Jacques Kadoch I, Kadour-Peero E, Lapensée L, Miron P, Shaulov T, Sylvestre C, Tulandi T, Mazer BD, Laskin CA, Mahutte N. Immunomodulation for unexplained recurrent implantation failure: where are we now? *Reproduction*. 2023 Jan 4;165(2):R39-R60. DOI: 10.1530/REP-22-0150