



PROYECTO FIN DE MÁSTER
2018-2019

TÍTULO:
PÉRDIDA RECURRENTE DEL
EMBARAZO: MECANISMOS
INMUNOLÓGICOS INVOLUCRADOS,
DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO
(REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA)

AUTOR:
JUAN MARTÍN VILLALOBOS VARGAS
LIMA, PERÚ
JULIO, 2019

PÉRDIDA RECURRENTE DEL EMBARAZO: MECANISMOS INMUNOLÓGICOS INVOLUCRADOS, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

INTRODUCCIÓN

De todos los embarazos clínicamente detectados, aproximadamente de 10 a 15% terminan en aborto durante el primer trimestre. Hay muchos más que se pierden antes de ser detectados clínicamente. Solo 30% de todos los embarazos resultan en un nacido vivo (1,2).

Clásicamente, una paciente es diagnosticada de abortadora recurrente o pérdida recurrente del embarazo (PRE) si presenta tres o más abortos espontáneos consecutivos. En la actualidad es recomendable iniciar el estudio de la pareja luego de dos o más abortos consecutivos, con base en datos epidemiológicos, como el riesgo de aborto de 30% luego de dos pérdidas consecutivas y 33% luego de tres pérdidas consecutivas, en pacientes sin historia de nacidos vivos (1,3).

Aunque la mayoría de abortos son esporádicos y no recurrentes, de 1% a 2% de las parejas sufren de PRE (1,4). Las causas de PRE se clasifican como genéticas, endocrinológicas, anatómicas, inmunológicas, hematológicas, infecciosas e inexplicables.

Las anomalías cromosómicas han sido identificadas en 55% de las pérdidas de abortadoras recurrentes, y es mayor en las abortadoras primarias que en las abortadoras secundarias (5). Se definen como abortadoras primarias, aquellas en las que todos sus embarazos terminaron en aborto y como abortadoras secundarias, aquellas que tienen al menos un nacido vivo previo a los abortos.

En 50% de los casos de PRE, la etiología es desconocida. Gracias a las técnicas inmunológicas y genéticas sofisticadas se ha podido definir con mayor claridad los mecanismos de inmunorregulación, tanto en embarazos normales como patológicos. Las alteraciones inmunológicas se diferencian en autoinmunes y aloinmunes.

Se postula que las alteraciones inmunológicas son responsables hasta de 80% de los casos de PRE de etiología desconocida (5,6) Así mismo, se ha estimado que los factores aloinmunes están presentes en 40% a 60% de las parejas con PRE de etiología desconocida (4).

Durante el embarazo, las células fetales que expresan antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad ocupan las estructuras del útero y son capaces de sobrevivir al rechazo inmunológico materno (7). La tolerancia semiinjerto fetal por el sistema inmune materno

constituye un enigma que ha estimulado a la investigación durante los últimos cincuenta años. En 1953, Medawar y Billingham publicaron un artículo en el que trataban de explicar cómo el embrión evita el ataque materno (8). En esa ocasión postularon cuatro posibles mecanismos:

- La separación anatómica entre la madre y el feto.
- La inmadurez antigénica del feto, o sea, la falta de inmunogenicidad.
- Disminución de la respuesta inmune materna.
- La tolerancia inmunológica materna (9).

Hoskin y Murgueta evidenciaron la generación de una respuesta inmune materna hacia células fetales y demostraron que el embrión es inmunogénico. Por otra parte, las observaciones médicas y la evaluación de la respuesta inmune de mujeres embarazadas sometidas a distintos estímulos demostraron que la respuesta inmune materna no se encuentra disminuida durante el embarazo. Por último, la posibilidad de embarazos ectópicos demuestra que el útero no es el único sitio inmunológicamente privilegiado. Por estos motivos, se ha postulado que la tolerancia materna es el mecanismo de mayor relevancia, y la placenta tendría un papel activo en su generación.

El feto constituye un semiinjerto (ya que posee antígenos maternos propios y paternos alogénicos). La tolerancia a los antígenos paternos involucraría mecanismos activos que evitarían el reconocimiento y rechazo fetal. Existen evidencias de que el repertorio de linfocitos T maternos, específico hacia antígenos de histocompatibilidad de clase I paternos, se encuentran en un estado de tolerancia transitoria durante el embarazo. Este fenómeno podría explicarse a través de la participación de diversas poblaciones celulares presentes en la decidua materna, de citoquinas producidas por estas células o de factores que aún no han sido bien caracterizados. Más aún, la presencia de células fetales en la circulación materna demuestra que el sistema inmune materno entra en contacto con las moléculas inmunológicas fetales. Es posible que en este estado de tolerancia participen factores reguladores locales y/o sistémicos. Estos mecanismos son múltiples y actúan en forma sinérgica (10).

RECONOCIMIENTO MATERNO-PATerno

El reconocimiento de los antígenos paternos puede jugar un rol fundamental en la implantación del embrión humano y en el mantenimiento del embarazo normal.

Giacomucci introdujo el término de “aborto mediado inmunológicamente”, lo describió como

una entidad clínica ocasionada por una reacción inmune materna anormal contra los antígenos paternos embrionarios (11).

El sistema inmunológico puede rechazar al embrión por dos mecanismos diferentes, según la fase de interacción entre el embrión y la madre. Durante la preimplantación y hasta el final del período de implantación el rechazo mediado por inmunidad celular se postula como el mecanismo de aborto de causa inmunológica. Los linfocitos T ya están presentes en el endometrio cuando la predecidualización ocurre en los días 6 ó 7 después de la ovulación. Su presencia continua durante 48 horas después del inicio de la interacción entre el embrión y la madre, rodeando al blastocisto hasta el final de la implantación, sugiere que pueden estar implicados en la regulación de la implantación y el crecimiento embrionario, como una parte funcional del sistema inmunológico materno (11).

Además, las similitudes o las diferencias en las regiones D/DR y B del complejo mayor de histocompatibilidad pueden jugar un rol importante en el estudio temprano del desarrollo del embrión (12).

RECONOCIMIENTO MATERNO-FETAL

Cuando la implantación es completada, los lagos vasculares proveen intercambios entre la madre y el embrión. En este momento, se puede asumir que tanto la respuesta inmune humoral como la respuesta inmune celular, así como las patologías autoinmunes, pueden causar aborto. Para sobrevivir, el embrión debe estimular una respuesta inmunológica de la madre que lo proteja de las moléculas citotóxicas (11).

El trofoblasto es una estructura crucial, que puede tener varias funciones inmunológicas como las siguientes que derivan de estudios en otras especies: antigenicidad débil al daño inmune por los linfocitos o anticuerpos citotóxicos; barrera física; reclutamiento de señales que causan la migración hacia los linfáticos uterinos y decidua de linfocitos capaces de suprimir la reactividad materna; producción local de progesterona y otras hormonas inmunosupresoras; producción incrementada de factores bloqueadores capaces de unirse a varios sitios antigénicos (13).

Como parte del reconocimiento materno-fetal, y para poder entenderlo mejor es importante mencionar la expresión de moléculas HLA I no clásicas (HLA-G) y el balance Th1/Th2.

FACTORES REGULATORIOS LOCALES

1. BALANCE DE LA RESPUESTA Th1/Th2

Los linfocitos Th1 y Th2 son las principales subpoblaciones de los LT CD4+ y sus funciones diferenciales es la respuesta inmune se correlacionan con su patrón de secreción de citosinas. Se postula que el embarazo normal se caracteriza por una carencia de inmunidad antifetal mediada por células (Th1) y por una respuesta humoral (Th2) de forma dominante (14).

Se ha demostrado una desviación hacia una respuesta Th2 en el embarazo normal. Los tejidos feto-placentarios secretan espontáneamente un patrón de citoquinas Th2: IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. El trofoblasto fetal expresa receptores de baja afinidad para las citoquinas relacionadas a un perfil Th1, tales como TNFalfa, INFy e IL-2. L IL-2 induce la actividad Natural Killer y la secreción de TNFalfa. El INFy y el TNFalfa inhiben el desarrollo embrionario y la proliferación de trofoblasto. El TNFalfa media la muerte apoptótica del trofoblasto (14, 15, 16).

Existen evidencias de que un adecuado perfil Th2 favorece la aparición de anticuerpos de la madre contra antígenos del padre (anticuerpos antipaternos). Estos anticuerpos están dirigidos contra algunos antígenos HLA fetales, como una respuesta aloinmune tolerante que generaría anticuerpos “protectores”, para evitar la destrucción de antígenos trofoblásticos, o como una red antiidiotipo, para proteger al feto de una reacción inmune mediada por células (17).

Se ha demostrado que antes de la implantación, el endometrio humano no presenta un patrón de citoquinas característico. En cambio, la decidua materna evidencia un patrón tipo Th2 dominante que podría deberse a que la producción de citoquinas en la decidua no se limita a los leucocitos inflamatorios. Más aún, el trofoblasto constituye la principal fuente de IL-4 e IL-10, éstas son las citoquinas responsables de la diferenciación de los linfocitos precursores hacia un patrón tipo Th 2 (18).

La presencia de un balance Th1/Th2 es útil para explicar un embarazo exitoso, sin embargo, puede constituir una sobresimplificación. Estudios recientes realizados en modelos murinos muestran que la expresión de nuevas citoquinas, como las IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL17 e IL-18, no encajan perfectamente en el paradigma clásico Th1/Th2. Por ejemplo, la citoquina proinflamatoria IL-2 (característica del patrón Th1 asociado a efecto abortivo) (19). Otro ejemplo lo constituye el INFy, que, en dosis altas, promueve la pérdida fetal activando células NK; sin embargo, se requieren dosis bajas para lograr una vascularización exitosa

(20). Estas evidencias sugieren una intrincada regulación de citoquinas y que éstas no sólo juegan un rol inmunológico, sino también están involucradas en eventos de remodelación vascular, tisular y angiogénesis.

En la generación de la tolerancia materna, también se ha postulado la participación de la población T tipo Th3. Estas células son productoras de TGF-B2, una citoquina que participa en la inducción de tolerancia hacia antígenos ingeridos por vía oral y que también es producida por la subpoblación linfocitaria tipo gama delta (LT yS). En los roedores, la población LTyS es mayoría en la decidua. Utilizando un modelo murino, se demostró que un anticuerpo anti-TGF-B aumentaba el porcentaje de reabsorción fetal, y este aumento se correlacionaba con un incremento en la expresión de TNFalfa (21). Sin embargo, en los seres humanos, la población LT yS en la decidua se encuentra en baja proporción, por tanto, se cuestiona su relevancia en la inhibición del patrón Th1.

2. BALANCE DE CÉLULAS NK CITOTÓXICAS O PRODUCTORAS DE FACTOR DE CRECIMIENTO

La población leucocitaria predominante en el endometrio humano son los linfocitos granulares endometriales (LGE). Estas células aumentan su frecuencia en la fase secretora del ciclo menstrual, y en el momento de la implantación, llegan a constituir un 70-80% de los leucocitos del endometrio. Su número aumenta aún más si la concepción progresa, para luego descender rápidamente durante el segundo trimestre del embarazo (22).

Los LGE expresan algunos marcadores característicos de células NK, como la expresión intensa de la molécula CD56 (CD56^{brigh}) pero no expresan la molécula CD16 y aumentan su actividad lítica por acción de la IL-2. Por estas características, son consideradas una subpoblación de células NK, capaz de producir citoquinas como GM-CSF (productora del crecimiento y controladora de la invasión del trofoblasto). Las células EGL CD16⁻ CD56^{brigh} sólo se encuentran en un 2% en la sangre periférica, y la población CD16⁺CD56^{dim} con función citotóxica es mayoritaria (23). Entonces durante un embarazo temprano, en la mucosa uterina existiría un reclutamiento selectivo de la población NK productora de citoquinas y una disminución de la población NK citotóxica. Recientemente, se ha identificado a MIP-1alfa (proteína inflamatoria de macrófagos como la quimioquina responsable del reclutamiento selectivo de dicha población (24). El sincitiotrofoblasto produciría MIP-1alfa y las células

CD16⁺CD56^{brigh} serían atraídas a través de una gradiente quimiotáctica. Otra hipótesis sostiene que dicha población sería capaz de proliferar en el útero bajo la presencia de ciertos estímulos, como por la prolactina secretada por las células estromales.

3. EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS HLA EN CÉLULAS TROFOBLÁTICAS

El sincitiotrofoblasto, la capa más externa del trofoblasto en contacto con la circulación materna, no expresa moléculas de complejo de histocompatibilidad (en el hombre, HLA), y evita así –en parte- el reconocimiento materno (25). A medida que avanzamos a capas más internas, el citotrofoblasto, se observa que si bien no expresa moléculas HLA, puede detectar el RNA que las codifica. En el citotrofoblasto extraveloso, se detecta una débil expresión de HLA-C, pero no de las otras moléculas clásicas HLA-A y HLA-B. Además de esta expresión selectiva de moléculas clásicas de histocompatibilidad, el citotrofoblasto extraveloso expresa moléculas HLA no clásicas, como son HLA-G y HLA-E, a las que se le atribuye un papel en la inhibición de la capacidad citotóxica de los LGE (26). Esta función la realiza a través de su interacción con la molécula CD94, expresada en las células NK con los ligandos HLA-G, HLA-E y HLA-C expresados por el citotrofoblasto extraveloso (26,27).

4. EXPRESIÓN SELECTIVA DE PROTEÍNAS REGULADORAS DEL COMPLEMENTO

En las etapas tempranas de cualquier respuesta inmune, la activación del sistema de complemento es un mecanismo importante para controlar una infección. En esta activación, se genera una cascada de proteínas catalíticas que provoca la lisis de la célula infectada. El reconocimiento de antígenos paternos sobre la superficie del sincitiotrofoblasto podría inducir la activación de la cascada del complemento, lo que deriva en la lisis de células trofoblásticas. Ciertas moléculas son capaces de reducir este fenómeno bloqueando los sitios de unión de las proteínas del complemento (por ejemplo, CMP) o elevando la destrucción de estas proteínas (por ejemplo, DAF), en consecuencia, logran inhibir la cascada proteolítica del complemento sobre las células fetales.

5. PRODUCCIÓN DE QUIMIOQUINAS

Las quimioquinas constituyen otro grupo de moléculas involucradas en la formación de la red celular, en la interfase materno-fetal. Son moléculas con capacidad quimioattractantes que, a través de la interacción con sus receptores específicos, median entre otras actividades la migración celular. Uno de estos ejemplos lo constituye la producción de MIP-1a por el sincitiotrofoblasto, que por medio de un gradiente quimioattractante contribuye al reclutamiento de las células CD16⁻CD56^{brigh} (24)

La quimoquinas también participan en reacciones inflamatorias, en la angiogénesis y en la hematopoyesis. Además, pueden tener efectos diferentes de acuerdo con la etapa del ciclo menstrual (por ejemplo, la IL-8 producida por el estroma endometrial participa durante la fase proliferativa en la neovascularización y crecimiento del endometrio) (28).

6. PARTICIPACIÓN DE CÉLULAS REGULADORAS

El epitelio glandular y el estroma endometrial del útero humano contienen un gran número de células linfoideas con la capacidad potencial de reconocer y activarse frente a la presencia de estímulos antigénicos. Existen evidencias de que los leucocitos endometriales expresan antígenos de activación tempranas (CD69) y tardíos (HLA-DR) (29,30) Esta observación llevó a postular que los leucocitos endometriales se encuentran en un estado de permanente activación.

En varios modelos animales de tolerancia, se ha descrito la participación de poblaciones celulares con diversas funciones reguladoras (31). Estas funciones estarían mediadas por la producción de citoquinas y/o quimioquinas, o mediante la interacción célula-célula.

7. FACTOR INHIBIDOR DE LEUCEMIAS Y SU RECEPTOR

En biopsias de endometrio de mujeres fértiles, se ha detectado la expresión del ARNm que codifica una molécula hidrosoluble denominada factor inhibidor de leucemias (LIF) en la fase posovulatoria/secretora (día 18-28) del ciclo menstrual. Durante el embarazo, el LIF es sintetizado por la decidua y por los linfocitos Th2, mientras que el sincitiotrofoblasto expresa el receptor para LIF durante el primer trimestre del embarazo. Cuando el LIF interacciona con su receptor, favorece el crecimiento y la diferenciación del trofoblasto, En humanos, se ha reportado que los defectos en la producción de este factor se asocian a esterilidad, ya que es

imprescindible para la implantación del blastocisto (32). Sin embargo, la producción de LIF no es un mecanismo de “todo o nada”, recientemente, se ha descubierto que existe una regulación de la expresión tejido-específica, y además, se generan isoformas con distintas actividades biológicas (33).

8. ROL DEL SISTEMA ENDOCRINO

En la formación de esta red de citoquinas y quimioquinas, también participa el sistema endocrino, particularmente la progesterona, que se acumula durante el embarazo y es imprescindible para que éste continúe. Por acción de la progesterona secretada por el cuerpo lúteo luego de la ovulación, el endometrio se diferencia pasando de la fase proliferativa a la secretora y prepara el útero para la recepción del óvulo fertilizado. Junto con estos cambios se induce en el endometrio la diferenciación de células precursoras hacia un patrón tipo Th2. Simultáneamente, en la sangre periférica, los linfocitos T y S son inducidos a expresar receptores para progesterona. Se ha descrito que estos linfocitos T producen una proteína de 34 KD llamada PIBF (factor bloqueante inducido por progesterona), cuya función es inhibir la actividad citotóxica de las células NK, favoreciendo de esta manera un embarazo exitoso (34). En la decidua, la progesterona inhibe la producción de la IL-8, un potente quimioattractante de neutrófilos. Al evitar el reclutamiento de estos, la progesterona sería responsable de inducir un efecto antiinflamatorio que coincidiría con el momento de la implantación (28).

Por otra parte, cuando se logra en un embarazo, las citoquinas como la IL-4, la IL-6, el LIF, o el M-CSF (factor estimulador de colonia de monocitos) promueven la liberación por parte del trofoblasto de la gonadotropina coriónica (hCG) y previene de este modo la apoptosis del cuerpo lúteo (28,29,30). La IL-4, la IL-6 y el LIF son producidos por los linfocitos T, mientras que el M-CSF es sintetizado por las células CD16⁻CD56^{brigh} estromales y del endometrio glandular (35).

9. INDOLAMINA 2,3 DIOXYGENASA

Otro factor supresor de la respuesta celular materna es la enzima indolamina di-oxigenasa (IDO). Esta enzima, expresada por el trofoblasto y por los macrófagos, cataliza el triptófano. La ausencia de este aminoácido esencial produce una pérdida de la actividad de linfocitos T y protege a la placenta del ataque citotóxico materno. El trofoblasto es el único que produce

IDO, lo que podría explicar porque el feto logra sobrevivir a pesar de ser un semiinjerto (36).

10. EXPRESIÓN DE CD95 Y SU LIGANDO

El sistema CD95 (CD95L) constituye un camino apoptótico fisiológico, ampliamente utilizado por el sistema inmune durante la linfopoyesis. Está principalmente implicado en la regulación del recambio celular, o sea, en la homeostasis de la respuesta inmune. Este sistema funciona de la siguiente manera: cuando el CD95L, expresado en las células efectoras, interacciona con el CD95 presente en la célula “blanco”, se induce el reclutamiento de varias proteínas citosólicas, denominadas caspasas; estas proteínas inician una cascada proteolítica que da como resultado final la fragmentación del ADN (muerte celular programada o apoptosis) (37,38). El CD95L se expresa en células trofoblásticas (in vivo e in vitro), que son capaces de matar células CD95 provenientes de la sangre materna. Este mecanismo también se ha reportado en otros órganos inmunológicamente privilegiados, como por ejemplo, el ojo y los testículos.

11. ANEXINA II

Las anexinas son proteínas asociadas a membrana, presentes en células normales y patológicas. La anexina II, un miembro de la familia de las glicoproteínas que unen fosfolípidos con carga negativa en forma dependiente de calcio, es capaz de inhibir parcialmente la linfoproliferación y la secreción de IgG e IgM, y de esta manera, brindaría protección al feto frente al ataque del sistema inmune materno (39).

MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA INMUNE SISTÉMICA

La principal evidencia de la inducción de una respuesta inmune materna sistémica es la generación de factores bloqueantes. Se ha observado que el suero materno de mujeres con embarazos exitosos tiene la capacidad de bloquear la respuesta alógena frente a los aloantígenos paternos. Ese bloqueo puede evidenciarse in vitro a través del cultivo mixto linfocitario (CML). En este modelo, al enfrentar células mononucleares maternas con células paternas irradiadas se evidencia una fuerte respuesta hacia los antígenos de histocompatibilidad paternos. Los factores bloqueantes del CML (FB CML) se generan durante el embarazo y aumentan con los sucesivos embarazos (40,26). Si bien estos factores

han sido asociados al éxito de un embarazo, hasta el momento, se desconoce su naturaleza. Lo que es aún más importante, se desconoce si su presencia en el suero de mujeres constituye un epifenómeno asociado a un embarazo exitoso o si cumplen un papel protagónico en el control de la respuesta alógena materna (41,42).

RESPUESTA INMUNE HUMORAL

Genera la producción de anticuerpos antileucocitos paternos y autoanticuerpos. Estos últimos, tanto antinucleares como antifosfolípidos.

1. ANTICUERPOS ANTILEUCOCITOS PTERNOS

La mitad del genoma (HLA) del embrión es contribuido por la madre y la otra mitad por el padre. Cuando una mujer se embaraza, su sistema inmune usualmente reconoce el genoma del padre (HLA) como referente del suyo y los leucocitos en su útero producen anticuerpos bloqueadores, que protegen, enmascaran o camuflan los antígenos (HLA) paternos en las células del bebé. Así protege al embrión de las células NK maternas, lo que permite su implantación y posterior desarrollo (43,44).

Los anticuerpos bloqueadores y la resultante tolerancia materno-fetal están presentes en los embarazos exitosos, mientras que los abortos ocurren en ausencia de estos factores (45). Una manifestación de esta respuesta inmune es la capacidad materna para expresar anticuerpos antileucocitos paternos (46).

Si el HLA paterno es muy similar al de la madre, sus células pueden no reconocer diferencias que son vitales para la producción de los anticuerpos bloqueantes (alteración aloinmune). Se ha observado que las parejas que sufren de aborto recurrente presentan similitud en HLA, principalmente en los loci DQ, DR y B (47,48).

2. AUTOANTICUERPOS

2.1. ANTICUERPOS ANTINUCLEARES

Algunas mujeres producen anticuerpos antinucleares dirigidos hacia el ADN de doble cadena, simple cadena, polinucleótidos e histonas. En un primer momento los anticuerpos generados son de tipo IgM, pero cuando cambian hacia los isotipos IgG e IgA, tienen efectos perjudiciales sobre el útero, los que incluyen inflamación alrededor del embrión en el

momento de la implantación o inflamación de la placenta luego de la implantación (49).

2.2. ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS

Estos anticuerpos actúan contra los fosfolípidos de membrana de carga negativa o contra las proteínas unidas a estos, inhibiendo de esta manera la vía de coagulación dependiente de fosfolípidos (50,51).

Existen seis tipos distintos de estructuras blanco (fosfolípidos) de estos anticuerpos: cardiolipina, la etanolamina, el glicerol, el inositol, el ácido fosfatídico y la serina. La muerte o lesión celular permitirían la producción de anticuerpos hacia todos o hacia algunos de los fosfolípidos mencionados. En particular, la serina y la etanolamina sirven como moléculas de anclaje de la placenta al útero durante la implantación (49).

Pueden activar el sistema de complemento, generando productos de degradación que resultarían en trombosis (52).

Los anticuerpos antifosfolípidos se relacionan con trombosis e infarto de la placenta. Aunque puede causar pérdida del embarazo antes del crecimiento y desarrollo de la vasculatura placentaria. Estudios in vitro han demostrado que los anticuerpos antifosfolípidos pueden alterar los mecanismos de transducción de señales que controlan la decidualización de células endometriales (53). También se ha demostrado que la unión de dichos anticuerpos reduce la secreción de la gonadotropina coriónica humana, y puede desencadenar una respuesta inflamatoria, lo que resulta en daños al trofoblasto (54).

PÉRDIDA RECURRENTE DEL EMBARAZO DE CAUSA INMUNOLÓGICA

Se considera cuando en una mujer se ha presentado dos o más abortos de etiología inmunológica. Se describen dos tipos de etiología inmunológica: Autoinmune y aloinmune.

PRE DE ETIOLOGÍA AUTOINMUNE

1. DIAGNÓSTICO

Se evalúa mediante la detección de anticuerpos antinucleares (ANA) y anticuerpos antifosfolípidos (AAF).

1.1. ANTICUERPOS ANTINUCLEARES

En general los ANA son positivos y con altos títulos en las mujeres con enfermedades autoinmunes sistémicas o específicas de órgano, como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn, entre otras. En cambio, en las mujeres con abortos a repetición o fallas en la fecundación se suelen observar títulos más bajos, por lo tanto, su presencia no implica siempre que las pacientes tengan una enfermedad autoinmune asociada (49).

Pareciera que la presencia de ANA en títulos de 1:80 o más en suero materno está relacionada con la pérdida recurrente del embarazo del primer trimestre.

Si se obtienen títulos de ANA positivos, se debe tener un patrón de tinción por inmunofluorescencia, ya que el patrón moteado o nuclear está más relacionado con la pérdida recurrente del embarazo. (50).

1.2. ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS

Están presentes en el síndrome antifosfolipídico (SAF), al que se le considera como la trombofilia que más se correlaciona con la PRE. El diagnóstico se fundamenta en los criterios establecidos en el consenso de Sapporo, modificado en Sidney (55), cuyo resumen se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Criterios de clasificación para el Síndrome Antifosfolipídico
Para ser considerado como síndrome antifosfolipídico se necesita la presencia de un criterio y un criterio de laboratorio
CRITERIOS CLINICOS
1. Trombosis vascular: Uno o más episodios documentados de trombosis arterial, venosa o de pequeños vasos en algún órgano o tejido.
2. Morbilidad obstétrica: a. Una o más muertes inexplicadas de un feto morfológicamente normal con 10 o más semanas de gestación, o b. Uno o más nacimiento prematuros de un neonato morfológicamente normal antes de las 34 semanas de gestación debido a: preeclampsia grave o eclampsia; o insuficiencia

placentaria.

c. Tres o más abortos espontáneos consecutivos inexplicados antes de las 10 semanas de gestación, excluyendo alteraciones anatómicas, hormonales y cromosómicas.

CRITERIOS DE LABORATORIO

Todos los criterios de laboratorio deberían estar presentes en dos o más ocasiones con al menos 12 semanas de diferencia.

1. Anticoagulante lúpico en plasma.
2. Anticuerpos anticardiolipinas IgG y/o IgM en suero o plasma presentes en títulos medio o altos (> 40 GPL o MPL, o > percentil 99).
3. Anticuerpos anti-beta-2 glicoproteína IgG y/o IgM (en títulos > percentil 99).

Los criterios de consenso internacional fueron diseñados para facilitar los estudios clínicos sobre el tratamiento y la etiología del SAF y no intentan ser criterios diagnósticos para la práctica clínica. No obstante estos criterios pueden ser útiles para evaluar la aplicabilidad de los resultados de los ensayos clínicos a un paciente individual. Es importante destacar que los pacientes con SAF pueden tener otras características clínicas, incluidas trombocitopenia, livedo reticularis, lesiones valvulares del corazón y nefropatía, pero estas características no son formalmente parte de los criterios diagnósticos del consenso. Del mismo modo, estos pacientes pueden tener anticuerpos antifosfolípidos distintos, entre ellos, anticuerpos contra protrombina y otras proteínas o fosfolípidos, que tampoco están incluidos en los criterios de consenso actuales (56).

La sensibilidad y la especificidad de las pruebas son variables, por lo que una prueba negativa no puede excluir el diagnóstico (57).

La presencia de anticuerpos antifosfolípidos en la población general es de 2%, mientras que en las pacientes con pérdida recurrente del embarazo es de 15%. /38/. La asociación del anticoagulante lúpico con eventos tromboembólicos o con morbilidad durante la gestación es mayor en comparación con los anticuerpos anticardiolipina y beta-2 glicoproteína 1 (57).

TRATAMIENTO

En los casos con ANA positivos (títulos bajos) se describe el uso de corticoides a dosis bajas. (58).

Con respecto al SAF, existen varios estudios que demuestran buenos resultados con el uso de heparina (de bajo peso molecular o no fraccionada) sola o asociada con ácido acetilsalicílico (AAS) (59, 60, 61).

En la revisión sistemática de Empson, que analizó 13 estudios, con un total de 849 gestantes con SAF y abortos recurrentes, se llegó a la conclusión de que la combinación de heparina no fraccionada más AAS reducía en 54% las pérdidas fetales comparándola con ASS como único tratamiento. Esta reducción es estadísticamente significativa (RR=0,46; IC95%:0,29-0,71). No hubo ventaja alguna al usar altas dosis en comparación con las bajas dosis. La heparina de bajo peso molecular (HBPM) combinada con AAS solo también redujo la pérdida de embarazos, pero sin significancia estadística (RR=0,78; IC95%:0,39-1,57) (62). Aunque hay que tener en cuenta que la calidad de los estudios no fue tan buena.

En la revisión sistemática de Empson no hubo ningún estudio que compare la eficiencia del tratamiento de la HBPM vs. La heparina fraccionada. Actualmente el único estudio aleatorizado, al respecto, aunque con una muestra pequeña, es el de Fouda et al., en el que se encuentra 80% (24/30) de partos con neonato viable en el grupo de HBPM vs. 66,6% (20/30) en el grupo de heparina no fraccionada, con diferencia no significativa ($p=0,243$) (63).

Sin embargo, la mayoría de clínicos prefiere usarla HBPM, por las ventajas que ofrece en comparación con la heparina no fraccionada: mayor tiempo de vida media, menor volumen inyectado, menor riesgo de sangrado con mayor efecto antitrombótico y menor riesgo de trombocitopenia (51).

En las pacientes con SAF, la recomendación es el uso de dosis profilácticas de heparina (heparina no fraccionada, 5 000 IU, dos veces al día, o HBPM, 40mg/g), en combinación con AAS, 75 a 100mg/d (64, 65, 66).

En pacientes con SAF refractarias al tratamiento convencional (heparina y AAS), se describe el uso de la inmunoglobulina intravenosa (67).

PRE DE ETIOLOGÍA ALLOINMUNE

1. DIAGNÓSTICO

Se evalúa mediante la detección de anticuerpos antileucocitos paternos y células natural killer (NK) (68,69).

1.1. ANTICUERPOS ANTILEUCOCITOS PTERNOS

Esta prueba es usada como una medición indirecta de la respuesta materna a los antígenos fetales de origen paterno (70). La prueba puede realizarse mediante inmunofluorescencia indirecta o por citometría de flujo.

La prueba consiste en determinar el nivel de anticuerpos antileucocitos paternos en el suero materno. Mediante la inmunofluorescencia, el suero materno es incubado con los linfocitos paternos para detectar la unión Ag-Ac, previo uso de un reactivo fluorescente. Si los anticuerpos antileucocitos (IgG) están presentes en el suero materno, se unirán con los antígenos de superficie los linfocitos paternos, pudiendo ser identificadas las células con fluorescencia (linfocitos positivos) mediante inmunofluorescencia. Se considera que el porcentaje de células positivas es proporcional a la cantidad de anticuerpos bloqueadores.

Las mujeres con embarazos exitosos y que no tienen antecedentes de abortos tienen altos niveles de anticuerpos antileucocitos paternos aún si estar embarazadas en comparación con aquellas mujeres con pérdida recurrente del embarazo cuyos niveles tienden a ser más bajos aun estando embarazadas.

Cuando el nivel de anticuerpos antileucocitos paternos se encuentra por encima de 40% se considera como normal (70).

1.2. CÉLULAS NATURAL KILLER

El nivel de células NK en sangre periférica se determina mediante citometría de flujo. Se ha demostrado en gestantes sin antecedente de aborto o infertilidad que tuvieron posteriormente bebe en brazos, que el nivel de células NK CD56⁺ no varió significativamente durante los tres trimestres del embarazo (71).

Kwak et al. demostraron que 37,3% de mujeres con PRE manifiestan un leve a moderado aumento (12%-18%) y 14,7% presentan un aumento marcado (mayor de 18%) de las células NK CD56⁺ de sangre periférica (72). El nivel de células NK menor de 12% se asocia

fuertemente con un embarazo a término subsecuente (73). Yamada et al., reportaron también el porcentaje de células NK CD56⁺ como predictor de embarazo bioquímico y aborto espontáneo con cariotipo normal (CD56⁺ mayor de 1,4%) (74).

El número y el porcentaje de células NK son significativamente más altos en las pacientes con SAF y PRE que en aquellas que solo presentan SAF (71).

Lachapelle et al., reportaron un aumento del porcentaje de células NK CD56^{dim} CD16⁺ y una disminución del porcentaje de células NK CD56^{bright} CD16⁻ en la fase secretoria de pacientes con PRE en comparación con pacientes fértiles de control (75).

Fukui et al., en pacientes a las que se les realizó FIV, demostraron que el porcentaje de células CD56⁺ y de células CD56⁺ CD16⁺ en sangre periférica el día de la transferencia fue significativamente más alto en el grupo que falló en comparación con el grupo que implantó. Y en el tejido endometrial obtenido en la fase previa al ciclo de FIV, demostraron que el aumento del porcentaje de células CD56^{dim} CD16⁺ y la disminución del porcentaje de células CD56^{bright} CD16⁻ fueron significativas en el grupo de pacientes que abortó en comparación con aquellas pacientes que llegaron a dar a luz (76).

Junovich et al. demostraron en pacientes con infertilidad inexplicada con falla de implantación, que las células NK endometriales CD16⁺ (citotóxicas) aumentaban durante la ventana de implantación y se correlacionaban con una disminución de los niveles endometriales de IL-6 y VEGF (citocinas reguladoras y angiogénicas) (77). Es decir, a nivel endometrial, el porcentaje de células NK citotóxicas aumentó y el porcentaje de las células NK que producen citosinas inmunoreguladoras y angiogénicas (que favorecen el crecimiento placentario) disminuyó en las pacientes que abordaron y en las pacientes con falla de implantación.

La activación de las células NK periféricas (CD56⁺ CD69⁺) determinadas por el marcador de activación CD69 presenta un aumento significativo en pacientes con PRE, y falla de implantación comparadas con grupos control (71,78,79).

Esto sugiere que las modificaciones en la citotoxicidad o subpoblación de las células NK podrían contribuir a mejorar los resultados de la FIV.

TRATAMIENTO

1. TERAPIA CON LEUCOCITOS PTERNOS

Un estudio multicéntrico que incluyó dieciséis centros de distintos lugares del mundo demostró que la terapia con leucocitos paternos genera un embarazo exitoso en un porcentaje de 8-10% mayor que el registrado en el grupo control. Este grupo control estuvo constituido por parejas no inmunizadas o que recibieron placebo (80). Este pequeño porcentaje indica que es necesario definir más claramente la indicación de quiénes son posibles de recibir este tratamiento.

Estudios realizados por Ramhorst y col. demostraron resultados similares; la tasa de embarazo de las mujeres inmunizadas fue del 58% y del 46% en los controles, y la tasa de niños nacidos vivos fue del 71% en los no inmunizados versus 88% en las inmunizadas (81).

La racionalidad de este tratamiento radica en estimular el sistema inmune materno para que genere una respuesta inmune adecuada hacia antígenos semialogénicos fetales. De acuerdo con algunos investigadores, las inmunizaciones con células mononucleares activarían células CD8 que expresarían el receptor de progesterona y secretarían un factor que inhibe las células NK (80). Al mismo tiempo, se generarían citoquinas, como por ejemplo, TGF β , IL-10 e IL-4, las que, como se relacionarían con un embarazo exitoso.

Un estudio reciente investigó los cambios en la respuesta inmune en mujeres inmunizadas con leucocitos parenterales. El estudio demostró que al mes de la aloinmunización, se detecta un aumento significativo de una actividad supresora mediada por las quimioquinas RANTES, MIP1ALFA Y MIP1B. Para detectar esta actividad supresora, se obtuvieron sobrenadantes de linfocitos CD8 previamente enriquecidos, provenientes de sangre de mujeres inmunizadas con leucocitos paternos (82). Este sobrenadante fue capaz de suprimir la replicación de la cepa de HIV con tropismo para macrófagos. La inmunoterapia también indujo la pérdida de expresión de los receptores de quimioquinas (CCR5 y CXCR4). Debemos recordar que CCR5 es un co-receptor para el HIV. Esta investigación constituye la primera evidencia de un efecto modulador in vivo de la respuesta inmune de mujeres inmunizadas con leucocitos parenterales.

2. TERAPIA CON INMUNOGLOBULINAS INTRAVENOSAS (IGIV)

Un meta-análisis del uso de la IGIV, realizado en dos centros estadounidenses y dos europeos, mostró un 10% de éxito con respecto al grupo control en un estudio realizado sin previa estandarización de criterios de inclusión (83). El grupo estadounidense mostró que las IGIV producen una reducción en el número de células NK citotóxicas dentro de los primeros 7 días de tratamiento, lo que sugiere que este tratamiento debería aplicarse previo a implantación. Otro mecanismo de acción sugerido para la IGIV ha sido la capacidad de modular la expresión de moléculas de adhesión en linfocitos T activados modulando de esa manera su interacción con los principales componentes de la placenta humana: fibronectina, elastina y colágeno tipo IV (84). Los linfocitos de pacientes con ARE, activados con PHA, evidencian un aumento significativo de su adhesión a fibronectina y a elastina cuando se comparan con mujeres que lograron embarazos exitosos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ford HB, Schust DJ. Recurrent Pregnancy Loss: Etiology, Diagnosis, and Therapy, *Rev Obstet Gynecol*. 2009;2:76-83.
2. Zinaman MJ, Clegg ED, Brown CC, O'Connor J, Selevan SG. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril*. 1996;65:503-509.
3. Management of recurrent early pregnancy loss. Practice Bulletin N° 24. American College of Obstetricians and Gynecologists *Int. J Gynecol Obstet*. 2002;78:179-90.
4. Caetano MR, Couto E, Passini Junior R, Simoni RZ, Barini R. Gestational prognostic factors in women with recurrent spontaneous abortion. *Sao Paulo Med J*. 2006;124:181-185.
5. Coulam CB, Stephenson M, Stern JJ, Clark DA. Immunotherapy for recurrent pregnancy loss: analysis of results from clinical trials. *Am J Reprod Immunol*. 1996;35:352-359.
6. McIntyre JA, Coulam CB, Faulk WP. Recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol*. 1989;21:100-104.
7. Mowbray J, Gibbings C, Lidell H, Regionald P, Underwood J, Beard R. Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortions by immunization with paternal cells. *Lancet*: 1985:941-943.
8. Billingham RE, Medwar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells, *Nature*: 1953;172:603-606
9. Coulam C. Epidemiology of recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol*: 1991;26:23-27.
10. Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. Tolerance to the foeto-placental "graft": ten ways to support a child for nine months. *Curr Op Immunol*: 2000;12:731-737.
11. Giacomucci E, Bulletti C, Polli V, Prefetto RA, Flamigni C. Immunologically mediated abortion (IMA). *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1994;49:107-121.

12. Coulam CB, Moore SB, O'Fallon WM. Association between major histocompatibility antigen and reproductive performance. *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 1987;14:54-58.
13. Bulletti C, Flamigni and Giacomucci E. Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update.* 1996;2:118-136.
14. Iglesias M, et al. Inmunología de la reproducción. *Acta Méd Colomb.* 2002;27:170-180.
15. Raghupathy R. Th1 - type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today.* 1997;18:478-482.
16. Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, et al. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod.* 2000;15:713-718.
17. Gutierrez A, Donato RM, Mindin AD. Aspectos inmunológicos del embarazo normal. *Arch Alergia Inmunol Clín.* 2006;37:92-95.
18. Chaouat G, Cayol V, Mairovitz V, Dubanchet S. Localization of TH2 cytokines IL-3, IL-4, IL-10 at the fetomaternal interface during human and murine pregnancy and lack of requirement for Fas/Fas ligand interaction for a successful allogeneic pregnancy. *Am J. Reprod Immunol:*1999;42:1-13.
19. Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, et al. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-fetal interface which might challenge the classical th1/th2 dichotomy. *J Reprod Immunol.* 2002;53:241-253.
20. Ashkar A, Di Santo J, Croy A. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity and uterine natural killer cell modulation during normal murine pregnancy. *J Exp Med:* 2000;17:25-269.
21. Clark D, Arck P, Chaouat G. Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environment selective pressure expressed at the uterine level. *Am J Reprod Immunol.* 199;41:5-22.
22. Lachapelle M, Miron P, Hemmings R, Roy D. Endometrial T, B, and NK cells in patients with Recurrent Spontaneous Abortion. *The J Immunol.* 1996;156:4027-4034.
23. Quenby S, Bates M, Doig T, et al. Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage. *Human Reprod.* 1999;9:2386-2391.

24. Drake P, Gunn M, Charo I, et al. Human placental cytotrophoblasts attract monocytes and CD56 bright natural killer cells via the actions of monocyte inflammatory protein 1 alfa. *J Exp Med.* 2001;21:1199-1212.
25. King A, Boockock C, Sharly AM, et al. Evidence for the expression of HLA-C class I mRNA and protein by human first trimester trophoblast. *J Immunol.* 1996;15:2068-2076.
26. Proll J, Blaschitz A, Huntter H, Dohr G. First trimester human endovascular trophoblast cells express both HLA-C and HLA-G. *Am J Reprod Immunol.* 1999;42:30-36.
27. Bignon J, Viña M. Genetic diversity of HLA functional and medical implication. París. 1997.
28. Garcia J, Arici A. Chemokines and human reproduction: *Fertil Steril.* 1999;71:983-993.
29. Vassiliadou N, Searle R, Bulmer J. Elevated expression of activation molecules by decidual lymphocytes in women suffering spontaneous early pregnancy loss. *Human Reprod.* 1999;5:1194-1200.
30. Vassiliadou N, Bulmer J. Expression of CD69 activation marker by endometrial granulated lymphocytes throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Inmunol.* 1998; 94:368-375.
31. Fraunce D, Stein-Streilein J. NKT Cell-derived RANTES recruits APCs and CD8 + T cells to the spleen during the generation of regulatory T cells in tolerance. *J Immunol.* 2002;169:31-38.
32. Laird S y cols. The production of leukemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushing and production by cells in culture. *Hum Reprod:* 1997; 12:569-574.
33. Haines BP, Voyle RB, Pelton TA, et al. Complex conserved organization of the mammalian leukemia inhibitory factor gene: regulated expression of intracellular and extra celular cytokines. *J Immunol.* 1999;162:4637-4646.
34. Szekeres-Bartho J, Barokonyi B, Polgar G, et al. The role of gd T cells in progesterone-mediated immunomodulation during pregnancy: A review. *Am J Reprod Immunol.* 1999;42:44-48.

35. Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol*: 2000;47:87-103.
36. Munn D, Zhou M, Attwood, et al. Prevention of Allogenic Fetal Rejection by Tryptophan Catabolism. *Science*: 1998;281:1191-1193.
37. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, et al. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*: 1995;270:1189-1192.
38. Bellegrau D, Gold D, Selawry H, et al. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature*: 1995;377:630-632.
39. Aarli A, Matre R. Supression of immunoglobulin secretion by soluble annexin II. *Scan J Immunol*: 1998;48:522-526.
40. Coulam. C. Immunologic test in the evaluation of reproductive disorders: A critical review. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;167:1844-1851.
41. Hwang J, Ho H, Yang Y, et al. The role of blocking factors and antipaternal lymphocytotoxic antibodies in the success of pregnancy in patients with recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril*. 1992;58:691-696.
42. Johnson P, Barnes R, Risk J, et al. Immunogenetic studies of recurrent spontaneous abortions in humans. *Exp Clin Immunogen*. 1985;2:77-83.
43. Beer A, Kwak J. Immunology of normal pregnancy *Immunol Allerg Clin North Am*. 1998;18:249-327.
44. Scott JR, Branch DW. Potencial aloimmune factors and immunotherapy in recurrent miscarriage. *Clin Obstet Gynecol*. 1994;37:761-767.
45. Fraser E, Grimes D, Schulz K. Immunization as therapy for recurrent spontaneous abortion: a review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 1993;82:854-859.
46. Elram T, Siomon A, Israel S, et al. Treatment of recurrent IVF failure and human leucocyte antigen similarity by intravenous immunoglobulin. *Reprod Biomed Online*. 2005;11:745-749.
47. Koyama M, Saji F, Takahashi S, et al. Probabilistic assessment of the HLA of recurrent spontaneous abortion couples in the japanese population. *Tissue Antigens*. 1991;37:211-217.

48. Reznikoff-Etievant M, Bonneau J, Alcalay P, et al. HLA antigen sharing in couples with repeated spontaneous abortions and the birthweight of babies in successful pregnancies. *Am J Reprod Immunol.* 1991;25:25-27.
49. Ramhorst R, Garcia V, Corigliano A, Rabinovich G y Fainboim L. Inmunología de los abortos recurrentes espontáneos. En: Rabinovich G. 204:367-375.
50. Teppa J. Pérdida recurrente del embarazo En: Urbina MT y Lerner J Fertilidad y reproducción asistida. 2008:207-222.
51. Bozzini S, Ciarmatori S, Elberger L, Gheller M, Grabia A. Trombofilias y reproducción 2011;26:127-136.
52. Pierangeli S, Giraldi G, Vega-Ostertag M, et al. et al. Requirement of activation of complement C3 and C5 antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis Rheum.* 2005;52:2120-2124.
53. Mak I, Brosens J, Christian M, et al. Regulated expression of signal transducer and activator of transcripción, Stat5, and its enhancement of PRL expression in human endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab,* 2002;87:2581-2588.
54. Mulla M, Brosens J, Chamley L, et al. Antiphospholipid antibodies induce a pro-inflammatory response in first trimester trophoblast via the TLR/My D88 pathway. *Am J Reprod Immunol.* 2009;62:96-111.
55. Miyakis S, Lockshin M, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006;4:295-306.
56. Lim W. Antiphospholipid antibody syndrome. *Hematology.* 2009(1):233-239.
57. Rand JH. The antiphospholipid syndrome. *Hematology.* 2007;2007(1):138-142.
58. Kwak JY, Gilman-Sachs A, Beaman KD, Beer AE. Reproductive outcome in women with recurrent spontaneous abortions of alloimmune and autoimmune causes; preconception versus postconception treatment. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;166:1795-1798.
59. Lockshin MD, et al. Answers to the antiphospholipid antibody syndrome? (editorial). *N Engl J Med.* 1995;332:1025.
60. Kutteh WH. Antiphospholipid antibody – associated recurrent pregnancy loss: Treatment with heparin and low dose aspirin is superior to low – dose aspirin alone. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;174:1584.

61. Cowchock FS, et al. Repeated fetal losses associated with antiphospholipid antibodies: A collaborative randomized trial comparing prednisone with low dose heparin treatment. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;166:1318.
62. Empson M, Lassere M, Craig J, Scott J. Prevention of recurrent miscarriage for women with antiphospholipid antibody or lupus anticoagulant. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2005, issue 2.
63. Fouda UM, Sayed AM, Abdou AM, Ramadan DI, Fouda IM, Zaki MM. Enoxaparin versus unfractionated heparin in the management of recurrent abortion secondary to antiphospholipid syndrome. *Int J Gynecol Obstet.* 2011;112:211-215.
64. Rand JH. The antiphospholipid syndrome. *Hematology.* 2007;2007(1):136-142.
65. Bates SM, Greer IA, Middeldorp S, et al. American College of Chest Physicians. VTE, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis. 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest.* 2012;141(2 Suppl).
66. Antiphospholipid syndrome. Practice Bulletin N° 118. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol.* 2011;117:192-199.
67. Piette JC, Le Thi Huong D, Wechsler B. Therapeutic use of intravenous immunoglobulins in the antiphospholipid syndrome. *Am Med interne (Paris)* 2000; 151 (suppl 1):1551-1554.
68. Pandey MK, Thakur S, Agrawal S. Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism in the maintenance of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol obstet.* 2004; 269:161-172.
69. Shetty S, Ghosh K. Anti-phospholipid antibodies and other immunological causes of recurrent fetal loss-a review of literature of various therapeutic protocols. *Am J Reprod Immunol.* 2009;62:9-24.
70. Lucena E, Cubillos J. Immune abnormalities in endometriosis compromising fertility in IVF-ET patients. *J Reprod Med.* 1999;44:458-464.
71. Kwak JY, Gilman-Sachs A. Clinical implication of natural killer cells and reproduction. *Am J Reprod immunol.* 2008;59:388-400.
72. Kwak JY, Beaman KD, Gilman-Sachs A, Ruiz JE, Schewitz D, Beer AE: Up-regulated expression of CD56+, CD56+, CD16+, and CD19+ cells in peripheral

- blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol.* 1995;34:93-99.
73. Beer AE, Kwak JY, Ruiz JE. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles. *Am J Reprod Immunol.* 1996;35:376-382.
74. Yamada H, Morikawa M, Kato EH, Shimada S, Kobashi G, Minakami H. Pre-conceptional natural killer cell activity and percentage as predictors of biochemical pregnancy and spontaneous abortion with normal chromosome karyotype. *Am J Reprod Immunol.* 2003;50:351-354.
75. Lachapelle MH, Miron P, Hemmings R, Roy DC. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *J Immunol.* 1996;156:4027-4034.
76. Fukui A, Fujii S, Yamaguchi E, Kimura H, Sato S, Saito Y. Natural killer cell subpopulations and cytotoxicity for infertile patients undergoing in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol.* 1999;41:413-422.
77. Junovich G, Azpiroz A, Incera E, Ferrer C, Pasqualini A, Gutierrez G. Endometrial CD16⁻ NK cell count in fertility and unexplained infertility. *Am J Reprod Immunol.* 2013;70:182-189.
78. Sacks G, Yang Y, Gowen E, Smith S, Fay L, Chapman M. Detailed analysis of peripheral blood natural killer cells in women with repeated IVF failure. *Am J Reprod Immunol.* 2012;67:434-442.
79. Thum MY, Bhaskaran S, Abdalla HI, Ford B, Sumar N, Shehata H, Bansal A. An increase in the absolute count of CD56^{dim}CD16⁺CD69⁺ NK cells in the peripheral blood is associated with a poorer IVF treatment and pregnancy outcome. *Hum Reprod.* 2004;19:2395-2400.
80. Clark: Worldwide Collaborative Observational Study and Meta-Analysis on Allogeneic Leukocyte Immunotherapy for Recurrent Spontaneous Abortion. *Am J Reprod Immunol.* 1994;32:55-72.
81. Ramhorst R, Agriello E, Zittermann S, et al. Is the paternal mononuclear cells immunization a successful treatment for recurrent spontaneous abortion? *Am J Reprod Immunol.* 2000; 44:129-135.

82. Wang Y, Tao L, Mitchell E, Bravery C, et al. Allo-immunization elicits CD8+ T cell- derived chemokines, HIV supresor factors and resistance to HIV infection in women. *Nature Med*: 1999;5:1004-1009.
83. Daya S, Gunby J, Clark D. Intravenous immunoglobulin therapy for recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis. *Am J Reprod*: 1998;39:69-76.
84. Jerzak M, Rechberger T, Gorski Andrzel: Intravenous Immunoglobulin therapy influences T cell adhesión to extracellular matrix in women with a history of recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol*: 2000;44:336-341.