Artículo Original

Polimorfismos del gen VDR y porcentaje de células citotóxicas naturales en pacientes con pérdida gestacional recurrente: un estudio preliminar

VDR gene polymorphisms and natural killer cell percentages in patients with recurrent pregnancy loss: A preliminary study

Teppa, Alejandro; Mayora, Soriuska; Cores, Lucía; Salazar, Eva; Fernández, Mercedes; Zabaleta, Mercedes

Revista Digital de Postgrado
Universidad Central de Venezuela, Venezuela
ISSN-e: 2244-761X
Periodicidad: Cuatrimestral
vol. 15, núm. 3, e470, 2026
revistadpgmeducv@gmail.com

Recepción: 12 de mayo de 2026
Aprobación: 08 de octubre de 2026

DOI:https://doi.org/10.37910/RDP.2026.15.3.e470

Cómo citar: Teppa, A; Mayora, S; Cores, L; Salazar E; Fernández, M; Zabaleta M. Polimorfismos del gen VDR y porcentaje de células citotóxicas naturales en pacientes con pérdida gestacional recurrente: un estudio preliminar. Rev. Digit Postgrado 2026; 15(3): e470.doi. 10.37910/RDP. 2026.15.3.e470

Alejandro Teppa G.
ateppa@gmail.com
Médico Ginecoobstetra, Doctor en Ciencias Médicas. Centro Reproducción Asistida Fertigenetics, Santa Paula.

Soriuska Mayora
sorieskamayora@gmail.com
Maestría en Inmunología. Docente en Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

Lucia Cores
luciasalazara@gmail.com
Bióloga, en Entrenamiento en Centro Medicina Experimental, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

Eva Salazar
evasalazar@gmail.com
Dr. en Inmunología, en Entrenamiento en Centro Medicina Experimental, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

Mercedes Fernández M.
mfernandezmestre@gmail.com
Dr. en Inmunología, Jefe de Centro de Medicina Experimental, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

Mercedes Zabaleta L.
mercedeszabaleta@hotmail.com
Médico Internista e inmunólogo, Directora del Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

Resumen: Introducción: La pérdida gestacional recurrente (PGR), es una patología multifactorial donde la tolerancia inmunológica materna es fundamental. Las células Natural Killer (NK) y la vitamina D (VD), a través de su receptor (VDR), actúan como moduladores claves de esta respuesta. Dada la variabilidad genética, los resultados sobre la asociación entre polimorfismos del gen VDR y la PGR son heterogéneos a nivel mundial. Objetivo: Analizar la relación entre las proporciones de células NK periféricas y la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs2228570 y rs731236 del gen VDR en un grupo de pacientes venezolanas con PGR. Métodos: Estudio observacional, transversal y exploratorio en 31 mujeres (23 casos con PGR y 8 controles). Se cuantificaron las células NK (CD3-CD16+CD56+) y NKT (CD3+CD16+CD56+) mediante citometría de flujo. La genotipificación de los polimorfismos rs2228570 y rs731236 se realizó mediante PCR-RFLP en 24 muestras. El análisis incluyó la prueba t de Student, equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), y modelos de asociación genotípica. Resultados: Se observó un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de células NK en el grupo PGR en comparación con los controles (15± 6,17 vs. 9± 3,06; p = 0,0015), sin variaciones en las células NKT. No se hallaron asociaciones significativas entre los polimorfismos rs2228570 o rs731236 y la PGR (p = 0,5; OR = 1,00). Se detectó un fuerte desequilibrio de ligamiento (D' = 0,9985), entre ambos polimorfismos. El haplotipo más frecuente fue T-T (50% en casos; 58,3% en controles). Conclusiones: La PGR en la muestra analizada se vincula más estrechamente con una desregulación inmunológica periférica (elevación de células NK), que con las variantes genéticas analizadas del gen VDR. El perfil genómico de la población venezolana y el tamaño muestral limitado, podrían influir en la ausencia de asociación genotípica, sugiriendo la necesidad de estudios integradores que incluyan concentraciones séricas de VD para esclarecer el papel de este eje en la patología.

Palabras clave: Pérdida gestacional recurrente, Células NK, Receptor de vitamina D, Polimorfismos, Inmunología gestacional.

Abstract: Introduction: Recurrent pregnancy loss (RPL) is a multifactorial pathology in which maternal immunological tolerance is fundamental. Natural Killer

(NK) cells and vitamin D (VD), through its receptor (VDR), act as key modulators of this response. Given the genetic variability across populations, results regarding the association between VDR gene polymorphisms and RPL remain heterogeneous worldwide. Objective: To analyze the relationship between peripheral NK cell proportions and the distribution of genotypic and allelic frequencies of the rs2228570 and rs731236 polymorphisms of the VDR gene in a group of Venezuelan patients with RPL. Methods: An observational, cross-sectional, and exploratory study was conducted on 31 women (23 RPL cases and 8 controls). NK (CD3-CD16+CD56+) and NKT (CD3+CD16+CD56+) cells were quantified using flow cytometry. Genotyping of the rs2228570 and rs731236 polymorphisms was performed by PCR-RFLP in 24 samples. Statistical analysis included Student's t-test, Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), and genotypic association models. Results: A statistically significant increase in the percentage of NK cells was observed in the RPL group compared to controls (15 ± 6.17$ vs. 9 ± 3.06; p = 0.0015), with no variations in NKT cells. No significant associations were found between rs2228570 or rs731236 polymorphisms and RPL (p = 0.5; OR = 1.00). Strong linkage disequilibrium (D' = 0.9985) was detected between both polymorphisms. The most frequent haplotype was T-T (50% in cases; 58.3% in controls). Conclusions: In the analyzed sample, RPL is more closely linked to peripheral immunological dysregulation (elevated NK cells) than to the analyzed genetic variants of the VDR gene. The genomic profile of the Venezuelan population and the limited sample size could influence the lack of genotypic association, suggesting the need for integrative studies that include serum vitamin D levels to clarify the role of this axis in the pathology.

Keywords: Recurrent pregnancy loss, NK cells, Vitamin D receptor, Polymorphisms, Gestational immunology.

INTRODUCCIÓN

La pérdida gestacional recurrente (PGR), se define como la pérdida de dos o más embarazos antes de las 24 semanas de gestación y se asocia a factores uterinos, genéticos, endocrinos, trombóticos e infecciosos [(1)]. En este contexto, la tolerancia inmunológica gestacional es crítica, lo que destaca el papel de las células citotóxicas naturales o natural killer (NK), linfocitos con funciones citotóxicas y regulatorias, cuya actividad depende del equilibrio entre receptores activadores e inhibidores [(2)]. La alteración en la proporción

o función de las NK, particularmente el aumento de las formas citotóxicas periféricas, se ha vinculado estrechamente con fallas en la implantación y abortos recurrentes [3]. Un regulador clave de esta respuesta es la vitamina D (VD), cuya forma activa, la 1,25(OH)2D3, modula la inmunidad innata y adaptativa al interactuar con el receptor de VD (VDR, por sus siglas en inglés, Vitamin D Receptor), expresado en células NK, monocitos y linfocitos T y B [4]. La deficiencia de VD (< 20 ng/ml), es frecuente en gestantes y se asocia con un perfil inflamatorio alterado (predominio Th1/Th17), y una reducción en la capacidad inmunomoduladora de las células Treg [5].

La relevancia clínica de los polimorfismos del gen VDR en la salud reproductiva ha sido objeto de estudio en diversas latitudes, mostrando resultados heterogéneos que sugieren una fuerte influencia de la base genética poblacional. Mientras que, en poblaciones europeas, como la eslovena y croata, se ha identificado una asociación significativa del polimorfismo rs2228570 con la PGR [6], otros estudios en Polonia han señalado al polimorfismo rs1544410, como el principal factor de riesgo, sin hallar asociación con rs731236 o rs2228570 [7]. En contraste, investigaciones en Irán sugieren que el genotipo T/C y ciertos haplotipos podrían actuar como factores protectores frente a patologías gestacionales como la preeclampsia [8]. Esta variabilidad se extiende a otras regiones; en la India, rs731236 se ha vinculado con las concentraciones de VD, pero no con el riesgo clínico per sé [9], mientras que en Brasil se han asociado variantes del VDR con el parto pretérmino [10]. Sin embargo, la extrapolación de estos hallazgos a nuestro entorno debe interpretarse con cautela. La población venezolana posee una mezcla genética única, caracterizada por una composición ancestral de origen amerindio, europeo y africano, que configura una estructura genómica distinta de la de poblaciones europeas o asiáticas [11]. Esta variabilidad étnica hace que los resultados obtenidos en otras latitudes no sean necesariamente aplicables, lo que justifica la necesidad de investigaciones locales. En Venezuela, antecedentes de otras patologías inmunológicas han descrito una frecuencia del genotipo C/C del 15%, aunque sin riesgo aparente de enfermedades infecciosas crónicas [12]. Estos hallazgos contradictorios subrayan la necesidad de caracterizar la influencia de dichas variantes, y su relación con el perfil inmunológico local en mujeres con fallas reproductivas. El VDR, codificado por un gen en el cromosoma 12q13.11, actúa como un factor de transcripción que regula genes involucrados en la proliferación y diferenciación inmunitaria [13]. No obstante, la funcionalidad de esta vía puede verse alterada por polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés). Entre las variantes más estudiadas del gen VDR, destaca el polimorfismo rs2228570 [NM_000376.3(VDR):c.2T>C (p.Met1Thr)], históricamente conocido como FokI. Esta variante, ubicada en el exón 2, altera el sitio de inicio de la traducción y genera una proteína de longitud variable (424 vs. 427 aminoácidos). La isoforma más corta (424 aa) suele presentar una mayor eficiencia funcional en la transactivación de genes diana mediados por la VD.

Por otro lado, el polimorfismo rs731236 [NM_000376.3(VDR):c.1056T>C (p.Ile352=)], anteriormente referido como TaqI y situado en el exón 9, constituye un cambio sinónimo que influye significativamente en la estabilidad del ARNm del receptor. Ambas variantes pueden condicionar la respuesta de las células inmunitarias, tales como las células NK y los linfocitos T, ante la VD, comprometiendo potencialmente la tolerancia inmunológica necesaria para el éxito gestacional. En consecuencia, estas variantes podrían explicar diferencias en la susceptibilidad a la PGR y en la función de las células NK, incluso ante concentraciones séricas normales de VD. El presente estudio analiza de forma preliminar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs2228570 y rs731236 del gen VDR, así como el porcentaje de células NK, para describir su posible vinculación con la PGR en nuestra población.

El protocolo de investigación fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Inmunología "Dr. Nicolás Bianco C." (IDI), de la Universidad Central de Venezuela (UCV), fecha 29 de abril del 2025.

MÉTODOS

Diseño y tipo de estudio: Se realizó un estudio de tipo observacional, comparativo y transversal. El protocolo se centró en la evaluación de variantes genéticas del gen VDR y parámetros inmunológicos en pacientes con fallas reproductivas, comparándolos con un grupo control sano.

Población de estudio

La población consistió en mujeres en edad reproductiva (18 a 41 años), referidas a la consulta del IDI-UCV, quienes fueron categorizadas en dos grupos:
Grupo de pacientes: Mujeres con antecedente clínico de PGR, definida como la pérdida de dos o más embarazos consecutivos antes de la semana 24 de gestación.
Grupo control: Mujeres sanas, con al menos un embarazo a término exitoso y sin antecedentes personales ni familiares de fallas reproductivas.
Todas las participantes otorgaron su consentimiento informado por escrito previo a su inclusión. Para garantizar la homogeneidad de la muestra y evitar variables confusoras en la respuesta inmunológica, se aplicaron los siguientes criterios de exclusión: presencia de enfermedades autoinmunes conocidas, anomalías uterinas estructurales, edad pareja mayor 44 años, procesos infecciosos activos al momento de la toma de muestra o causas genéticas confirmadas de PGR, tales como alteraciones en el cariotipo parental.

Centros de investigación: El estudio se desarrolló de manera colaborativa en dos unidades: Instituto de Inmunología (para captación de pacientes y cuantificación inmunofenotípica de células NK, bajo la dirección de la Dra. Mercedes Zavaleta); y Sección de Inmunogenética, Laboratorio de Fisiopatología, IVIC (para procesamiento de muestras y genotipificación de polimorfismos del gen VDR, bajo la dirección de la Dra. Mercedes Fernández Mestre).
Obtención y procesamiento de las muestras: De cada participante (pacientes y controles), se recolectaron 4 ml de sangre periférica mediante punción venosa en tubos con anticoagulante EDTA. El volumen total se distribuyó equitativamente para los dos análisis principales del estudio:

1. Estudio de citometría (0,5 ml): Destinados a la caracterización y cuantificación inmunofenotípica de las subpoblaciones de células NK.
2. Estudio molecular (3,5 ml): Utilizados para la extracción de ADN genómico y la posterior genotipificación de los polimorfismos del gen VDR.
   Inmunofenotipaje de subpoblaciones de linfocitos T y células NK

La caracterización celular se realizó mediante citometría de flujo multiparamétrica 14. Para la identificación de subpoblaciones, se empleó una tinción de superficie con anticuerpos monoclonales (Biolegend™): CD3/FITC y CD16-CD56/PE. Esta combinación permitió diferenciar las células NK periféricas (CD3-/CD56+), en sus subtipos citotóxicos (CD56dim/CD16+), e inmunorreguladores (CD56bright/CD16-). Las muestras se incubaron en oscuridad y se procesaron en una estación automatizada Beckman Coulter Q-prep, utilizando un sistema de lisis y fijación de tres reactivos (reactivos A, B y C). La adquisición de datos se realizó en un citómetro NovoCyte Advanteon (Agilent), previa calibración y compensación de fluorescencia para FITC (λexc492 nm /λem 520 nm), y PE (λ exc 488 nm / λ em 580 nm).

Estudio Molecular: Extracción de ADN genómico: El material genético se obtuvo a partir de leucocitos de sangre periférica mediante la técnica de extracción por solvente orgánico (cloroformo) descrita por Bunce [15]. Este método permitió la precipitación de la malla de ADN tras la lisis celular y la purificación mediante fases acuosas, asegurando la eliminación de proteínas y lípidos contaminantes.

Evaluación de concentración y pureza del ADN genómico: La cuantificación de la concentración del ADN se determinó mediante espectrofotometría de microvolumen en un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Se determinaron las relaciones A260/A280 (rango óptimo 1.8 - 2.1). y A260/A230 (rango óptimo 2.0 - 2.2), con el fin de descartar la presencia de solventes o proteínas residuales.
Verificación de la calidad del ADN

Para confirmar que el ADN no presentaba degradación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7 %. Los resultados fueron digitalizados y visualizados mediante un sistema de fotodocumentación ChemiDoc® XRS (Bio-Rad).

Análisis de variantes genéticas del VDR mediante PCR-RFLP

La detección de los polimorfismos se llevó a cabo mediante la técnica de PCR-RFLP. Inicialmente, la amplificación de los segmentos del gen VDR que contienen los sitios polimórficos de interés, rs2228570 y rs731236, se realizó utilizando iniciadores de secuencia específica previamente descritos 16, y la mezcla maestra Classic++ Taq DNA Polymerase Master Mix (Tonbo). Para el polimorfismo rs2228570, se

emplearon los iniciadores *Forward* 5'-GATGCCAGCTGGCCCTGGCACTG-3' y Reverse 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCCTTCTCCCTC-3'. La mezcla de reacción (20 µL) consistió en Master Mix 1X, 0.3 µM de cada iniciador, 1 µL de ADN genómico y H2O libre de nucleasas para completar el volumen final. El programa térmico incluyó una desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, seguida de 30 ciclos (94°C x 1 min, 60°C x 1 min y 72°C x 1 min) y una extensión final a 72°C por 7 min, permitiendo la obtención de un amplicón de 272 pb. Para el análisis del polimorfismo rs731236, se utilizaron los iniciadores Forward 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG-3' y Reverse 5'-GCAACTCCTCATGGGCTGAGGTCTCA-3'. En este caso, la mezcla de reacción (25 µL) se preparó con Master Mix 1X, 0.2 µM de cada iniciador, 2 µL de ADN genómico y H2O libre de nucleasas para completar el volumen final. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, seguida de 5 ciclos (94°C x 45 seg y 64°C x 1 min) y 25 ciclos posteriores (94°C x 30 seg, 64°C x 30 seg y 72°C x 45 seg), con una extensión final a 72°C por 7 min, generando un producto de 740 pb.

Posteriormente, los productos de PCR fueron sometidos a una digestión enzimática con las endonucleasas de restricción específicas, FokI y TaqI, respectivamente. Estas enzimas reconocen secuencias diana donde la presencia o ausencia del sitio de restricción origina fragmentos de distintas longitudes. En el caso de rs2228570, el alelo C se identifica por la ausencia del sitio de corte (banda intacta de 272 pb), mientras que el alelo T genera fragmentos de 198 pb y 75 pb. Para el polimorfismo rs731236, la presencia del alelo T produce fragmentos de 495 pb y 245 pb, mientras que el alelo C origina tres fragmentos de 290 pb, 245 pb y 205 pb. La separación y visualización de estos fragmentos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio. Finalmente, los genotipos se determinaron mediante la digitalización y análisis de los geles empleando el sistema de fotodocumentación Gel Doc XR+ System (Bio-Rad).

Análisis estadístico

Los datos demográficos de las participantes y las frecuencias de las subpoblaciones celulares se resumieron mediante estadística descriptiva, empleando la media y la desviación estándar (±DE). La normalidad de las variables numéricas se verificó previamente, y la comparación de estas entre el grupo de pacientes con PGR y el grupo control se realizó mediante la prueba t de Student para muestras independientes. Para los análisis genéticos, se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas mediante el conteo directo. El cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), la determinación de las frecuencias haplotípicas, el desequilibrio de ligamiento (DL), y la evaluación de los modelos de herencia (asociaciones), se realizaron utilizando el programa estadístico especializado SNPStats[17]. En todas las pruebas se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$. El procesamiento estadístico general y la elaboración de gráficos se realizaron con los programas GraphPad Prism v.9.0 o SPSS v.25.0.

RESULTADOS

Características de la población de estudio: La muestra total estuvo compuesta por 31 mujeres con una edad media de 33,72 ± 5,80 años (gama: 21-40 años). Al desglosar por grupos, el grupo de casos (PGR), estuvo conformado por 23 mujeres con una edad promedio de 36 ± 4,7 años, mientras que el grupo control incluyó a 8 mujeres con una edad promedio de 30 ± 7,3 años. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la edad entre ambos grupos ($p > 0,05$), lo que permite la comparabilidad de los resultados genéticos.

Caracterización de subpoblaciones linfocitarias

La identificación de las subpoblaciones de células NK y NKT se realizó mediante citometría de flujo multiparamétrica, empleando una estrategia de selección (gating) basada en la expresión diferencial de los marcadores de superficie CD3, CD16 y CD56. El perfil inmunofenotípico definido fue el siguiente: Células NK: CD3- / (CD16, CD56) +. Células NKT: CD3+ / (CD16, CD56) +. Linfocitos T: CD3+ / (CD16, CD56) – . Linfocitos B: CD3– / (CD16, CD56) – .

Análisis comparativo de células NK y NKT

El análisis comparativo reveló diferencias significativas en la distribución celular entre los grupos estudiados. Se halló un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de células NK en las

mujeres con PGR en comparación con el grupo control (15 ± 6,17 vs. 9 ± 3,06; p= 0,0015). En contraste, las células NKT no mostraron variaciones significativas entre ambos grupos (p=0,6060).

Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW)

Se evaluó el EHW como parámetro de control de calidad analítico. El análisis mediante la prueba $\chi 2$ (Ji cuadrado) confirmó que tanto el grupo de pacientes como el de controles se encuentran en equilibrio para ambos polimorfismos: para rs2228570 se obtuvieron valores de p = 0,69 en casos y p = 0,82 en controles, mientras que para rs731236 los valores fueron de p = 0,90 en casos y p = 0,94 en controles. Aunque se reconocen las limitaciones estadísticas del EHW en muestras pequeñas, estos valores significativamente superiores al umbral de significancia (p > 0,05) apoyan la consistencia técnica del proceso de tipificación y sugieren que las frecuencias observadas en la muestra son representativas para este estudio.

Distribución de frecuencias del polimorfismo rs2228570 del gen VDR

La distribución de frecuencias genotípicas, reveló que el genotipo T/T es el más frecuente en la población (83%), seguido por el heterocigoto T/C (17%). Cabe destacar que para este marcador se tipificaron 24 muestras (18 casos y 6 controles), observándose una ausencia total del genotipo homocigoto recesivo C/C en ambos grupos.

Asociación y modelos de herencia del polimorfismo rs2228570 del gen VDR

Debido a la ausencia del genotipo homocigoto recesivo (C/C) en la muestra analizada, el análisis de modelos de herencia mediante SNPStats se vio limitado. No obstante, el análisis de asociación no mostró una diferencia significativa entre el grupo de casos y el grupo control (OR = 1,00; IC 95%: 0,08 - 11,92; p = 1,0). Estos resultados sugieren que el polimorfismo rs2228570 no actúa como un factor de riesgo para la PGR en la población estudiada, aunque se reconoce que el tamaño muestral y la distribución genotípica limitan la capacidad para detectar efectos de asociación menores.

Distribución de frecuencias del polimorfismo rs731236 del gen VDR

Para este polimorfismo, se identificaron los tres genotipos posibles. El heterocigoto C/T fue el más frecuente (50%), seguido del homocigoto dominante T/T (33%) y el recesivo C/C (17%). Los resultados muestran una distribución proporcional similar entre el grupo de casos y el grupo control.

Asociación y modelos de herencia del polimorfismo rs731236 del gen VDR

La identificación de los tres genotipos permitió evaluar los modelos de herencia codominante, dominante, recesivo y sobredominante (Tabla 1). El análisis realizado con el software SNPStats arrojó valores de p = 1,0 y un OR = 1,00 (IC 95%: 0,11 – 8,74) para todos los modelos evaluados. Estos hallazgos indican la ausencia de asociación estadística entre el polimorfismo rs731236 y la susceptibilidad o protección frente a la PGR en el grupo de estudio analizado.

TABLA 1. Asociación del polimorfismo rs731236 del gen VDR con PGR

Modelo	**Genotipos**	**Pacientes n=18**	**Controles n=6**	**OR (95% CI)**	**p**
Dominante	T/T	6 (33,3%)	2 (33,3%)	1,00	0,5
	T/C-C/C	12 (66,7%)	4 (66,7%)	(0,14-7,10)	
Recesivo	T/T-T/C	15 (83,3%)	5 (83,3%)	1,00	0,5
	C/C	3 (16,007%)	1 (16,7%)	(0,08-11,93)	
Sobredominante	T/T-C/C	9 (50%)	3 (50%)	1,00	0,5
	T/C	9 (50%)	3 (50%)	(0,16-6,35)	

No obstante, es importante señalar que el tamaño de la muestra (n=24), para el análisis genético y el amplio intervalo de confianza obtenido limitan la potencia estadística para detectar efectos de asociación sutiles. Por consiguiente, los modelos presentados en la Tabla 1 se exponen con fines descriptivos, debiendo interpretarse estos resultados como una aproximación preliminar en nuestra población.

Análisis de desequilibrio de ligamiento (DL)

Se determinó la asociación no aleatoria entre los alelos de los dos polimorfismos del gen VDR (rs2228570 y rs731236) mediante el cálculo de los parámetros de desequilibrio de ligamiento: D' y del coeficiente de correlación r. El valor obtenido de D' = 0,9985 indica un fuerte DL, lo que evidencia que los alelos de ambos

polimorfismos se encuentran estrechamente asociados físicamente en el mismo cromosoma y tienden a heredarse conjuntamente como un bloque haplotípico. Por su parte, el valor de r = -0,2544 refleja una correlación negativa de magnitud débil a moderada. Esta aparente discrepancia es común en estudios genéticos y sugiere que, si bien existe una proximidad física que impide la recombinación frecuente, la distribución alélica en la población no es perfectamente predictiva de forma lineal. Estos parámetros de DL se presentan como una caracterización estructural preliminar de la región genómica estudiada en este grupo de pacientes. La solidez del valor de D' apoya la existencia de un bloque de ligamiento estrecho, lo cual es relevante para la interpretación de futuros estudios funcionales y meta-análisis que incluyan poblaciones latinoamericanas, a pesar de las limitaciones inherentes al tamaño muestral.

Análisis de los haplotipos rs2228570-rs731236 del gen VDR: Considerando el fuerte DL detectado entre los polimorfismos rs2228570 y rs731236, se procedió a estimar la frecuencia de los cuatro haplotipos posibles derivados de esta combinación (Tabla 2). La combinación T-T (Haplotipo 1), resultó ser la más frecuente en la población estudiada, representando el 50 % de los haplotipos en los casos y el 58,33 % en los controles. Por otro lado, la combinación C-T (Haplotipo 3), solo fue identificada en el grupo de casos con una frecuencia baja (8,33%), encontrándose ausente en el grupo control. Finalmente, la combinación C-C (Haplotipo 4), no fue detectada en ninguno de los individuos analizados. Esta ausencia guarda una relación directa con la baja frecuencia del alelo C observada previamente en el polimorfismo rs2228570 y confirma la fuerte asociación alélica entre ambos polimorfismos en esta población. A pesar de las variaciones observadas, el análisis estadístico reveló que no hubo asociación significativa entre los haplotipos del gen VDR y la PGR (p > 0,05). La presencia del haplotipo C-T exclusivamente en el grupo de casos no alcanzó niveles de significancia, lo cual podría atribuirse al carácter preliminar del estudio y al tamaño de la muestra tipificada. Estos hallazgos sugieren que la configuración alélica combinada de estos polimorfismos no representa un factor de riesgo ni de protección para la PGR en la población analizada bajo el diseño actual.

TABLA 2. Distribución de frecuencias de los haplotipos rs2228570/rs731236 del gen VDR en la muestra estudiada

Halotipo	rs2228570	rs731236	Total (n=24)	Casos (n=18)	Controles
1	T	T	0,5000	0,5000	0,5833
2	T	C	0,4167	0,4167	0,3333
3	C	T	0,0833	0,0833	0,0000
4	C	C	0,0000	0,0000	0,0000

DISCUSIÓN

En el presente estudio se observó una proporción significativamente mayor de células NK circulantes en mujeres con PGR en comparación con el grupo control, mientras que no se identificaron diferencias en la frecuencia de células NKT. Este hallazgo refuerza la hipótesis de que las células NK desempeñan un papel relevante en la fisiopatología de la PGR, posiblemente a través de mecanismos de desregulación inmunológica que afectan la tolerancia materno-fetal. Estos resultados son consistentes con estudios observacionales previos que describen un aumento de células NK, tanto periféricas como uterinas, en mujeres con fallas reproductivas [3]. No obstante, la heterogeneidad metodológica entre los distintos trabajos sigue siendo un desafío para la comparación directa. En relación con los polimorfismos del gen VDR, la distribución de genotipos de rs2228570 fue idéntica entre pacientes y controles, con un predominio del genotipo T/T (83,3%) y un OR de 1 (p = 0,5). Resultados equivalentes se obtuvieron para rs731236, indicando una ausencia de asociación genotípica directa con la PGR en la muestra analizada. La evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg confirmó la consistencia poblacional y respalda la calidad del proceso de genotipificación, reduciendo la probabilidad de sesgos técnicos.

Desde la perspectiva de la genética poblacional, el análisis de haplotipos mostró un valor de D' = 0,9985, indicando un fuerte desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs2228570 y rs731236. Esto sugiere que ambos polimorfismos se heredan conjuntamente como bloques de alelos adyacentes [18]. Sin embargo,

la correlación r fue baja y negativa, lo que implica que la presencia de un alelo en rs2228570 no predice de manera confiable el alelo en rs731236. Este patrón es compatible con diferencias marcadas en las frecuencias alélicas y la existencia de haplotipos antiguos y estables que han persistido sin recombinación significativa en nuestra población. [18]

Un hallazgo principal de este estudio es que la PGR no parece estar vinculada a polimorfismos en el gen VDR, sino a una alteración en las células del sistema inmunitario. Es fundamental considerar que la VD ejerce sus efectos inmunomoduladores primordiales a través de su unión al VDR, un factor de transcripción nuclear que regula la expresión de múltiples genes en la inmunidad innata y adaptativa, y modula la respuesta inflamatoria mediante la supresión de citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF-α e IL-1β), y la promoción de vías antiinflamatorias. Sin embargo, la eficiencia de esta regulación está sujeta a polimorfismos genéticos en el gen VDR; por ejemplo, el polimorfismo rs2228570 en el exón 2 es la única variante que altera la estructura de la proteína, donde el alelo C genera una isoforma de la proteína más corta y activa de 424 aminoácidos frente a la proteína de 427 aminoácidos del alelo T [19]. Por otro lado, variantes como rs7975232, rs1544410 y rs731236, situadas en la región reguladora 3', influyen en la estabilidad del ARNm y la expresión génica, contribuyendo a la variabilidad interindividual en la respuesta inmunitaria [19]. Resulta de especial interés contrastar la presencia de estos polimorfismos con la respuesta inmunitaria celular identificada en nuestra cohorte. A pesar de la relevancia funcional teórica de los polimorfismos del gen VDR en la regulación de la inmunidad, los polimorfismos evaluados (rs2228570 y rs731236), no mostraron una asociación significativa con la patología; no obstante, se detectó un aumento crítico en el porcentaje de células NK circulantes en las pacientes con PGR. La interacción entre el complejo $1,25(OH)_2D_3$-VDR y los promotores de genes en células NK regula a la baja la producción de citoquinas proinflamatorias (IFN-γ). Una alteración en la funcionalidad del receptor de VD, debida a polimorfismos como el rs2228570 en su gen codificante (VDR), podría correlacionarse con una falla en la regulación de la expansión de células NK citotóxicas ($CD56^{bright}$ vs. $CD56^{dim}$), promoviendo un ambiente hostil para el trofoblasto. Dado que el eje VD/VDR ejerce un control inhibitorio sobre la proliferación de las NK y su secreción de citoquinas, la falta de asociación genética sugiere que la expansión de estas células podría no estar condicionada por variantes estructurales del receptor en esta muestra, sino por otros factores moduladores. Estos podrían incluir concentraciones séricas deficientes de VD (hipovitaminosis), que limitarían la activación del VDR independientemente de su genotipo, o polimorfismos en otros nodos de la vía metabólica (como CYP27B1 o GC), que no fueron evaluados en esta aproximación preliminar [20]. Así, la desregulación inmunológica observada parece ser un evento independiente de las variantes rs2228570 y rs731236 en la población estudiada, lo que refuerza el carácter multifactorial de la PGR.

La ausencia de asociación observada en este trabajo contrasta con reportes internacionales que subrayan la importancia funcional de la vía de la VD en la gestación. Mientras que en poblaciones eslovenas y croatas se ha vinculado a rs2228570 con la PGR [6], en Polonia se ha señalado el polimorfismo rs1544410 como marcador de riesgo, hallando —al igual que nosotros— una falta de asociación con rs731236 o rs2228570 [7]. Estas variaciones reflejan diferencias en la estructura genómica. La población venezolana presenta una mezcla de tres componentes ancestrales (amerindio, europeo y africano), lo que explica una arquitectura genética distinta a la de poblaciones europeas o asiáticas [11].

CONCLUSIONES

En conjunto, nuestros resultados apoyan la noción de que la PGR es una condición multifactorial. La alteración inmunológica, evidenciada por el aumento de células NK, parece tener un papel más determinante en esta muestra que los polimorfismos específicos del VDR aquí analizados. Es importante destacar que el presente trabajo constituye un estudio preliminar y que, dado el tamaño muestral, los valores obtenidos se presentan como una aproximación inicial. Estos hallazgos sientan las bases para futuras investigaciones integrativas que cuenten con una mayor potencia estadística para profundizar en la arquitectura genética de esta patología en la población venezolana.

Limitaciones y perspectivas futuras: Es imperativo reconocer que el presente estudio posee un poder estadístico limitado, derivado principalmente de un tamaño muestral reducido y de la notable homogeneidad

genética observada para los polimorfismos rs2228570 y rs731236 del gen VDR. Por lo tanto, los hallazgos aquí expuestos deben interpretarse como una aproximación preliminar y no pretenden ser definitivos para la población venezolana en su totalidad.

La limitación fundamental de este trabajo, tal como se desprende de los resultados, es la ausencia de la determinación de las concentraciones séricas de VD y de la expresión cuantitativa de su receptor (VDR) en las muestras de pacientes y controles. Al desconocer si los sujetos presentan, per sé, deficiencias en estos parámetros, no es posible establecer si la desregulación observada en las células NK está vinculada a una carencia de ligando o a una baja densidad de receptores, independientemente de las variantes genéticas analizadas. La ausencia de asociación estadística en esta cohorte no excluye la participación biológica del eje VD/VDR, pero subraya que el impacto de este sistema podría depender más de factores biodisponibles que de los polimorfismos aquí estudiados.

En consecuencia, para futuras investigaciones es fundamental ampliar el tamaño de la muestra y robustecer el análisis genético mediante la inclusión de otros polimorfismos clave del gen VDR, como rs1544410 y rs7975232, que permitan una caracterización haplotípica más extensa. Asimismo, se recomienda integrar la medición de concentraciones circulantes de 25(OH)D (25-hidroxi VD, o calcidiol), y profundizar en la caracterización funcional de las subpoblaciones de células NK, distinguiendo específicamente entre los fenotipos $CD56^{bright}$ (inmunomoduladoras), y $CD56^{dim}$ (citotóxicas). Estos enfoques integradores serán fundamentales para esclarecer el impacto biológico real de estos factores en la fisiopatología multifactorial de la PGR.

REFERENCIAS

1. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. Fertil Steril. 2020;113(3):533-535. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.11.025.
2. Kiessling R, Klein R, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. Eur J Immunol. 1975; 5(2): 112-117. doi: 10.1002/eji.1830050208.
3. Vomstein K, Voss P, Molnar K, Ainsworth AJ, 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 Immunol. 2020; 141: 103166. doi: 10.1016/j.jri.2020.103166.
4. Manolagas SC, Provvedini DM, Tsoukas CD. Interactions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and the immune system. Mol Cell Endocrinol. 1985; 43(2-3): 113-122. doi: 10.1016/0303-7207(85)90074-7.
5. Dabrowski FA, Grzechocinska B, Wielgos M. The role of vitamin D in reproductive health. A Trojan horse or the golden fleece? Nutrients. 2015; 7(6): 4139-4153. doi: 10.3390/nu7064139.
6. Barišić A, Pereza N, Hodžić A, Gašparović M, Ostojić S, Peterlin B. Genetic variation in the maternal vitamin D receptor FokI gene as a risk factor for recurrent pregnancy loss. J Matern Fetal Neonatal Med. 2021; 34(14): 2221-2226. doi: 10.1080/14767058.2019.1660768.
7. Wolski H, Kurzawińska G, Ożarowski M, Mrozikiewicz AE, Drews K, Karpiński TM, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and haplotypes in the etiology of recurrent miscarriages. Sci Rep. 2021; 11(1): 4646. doi: 10.1038/s41598-021-84317-3.
8. Farajian-Mashhadi F, Eskandari F, Rezaei M, Eskandari F, Najafi D, Teimoori B, et al. The possible role of maternal and placental vitamin D receptor polymorphisms and haplotypes in pathogenesis of preeclampsia. Clin Exp Hypertens. 2020; 42(2): 171-176. doi: 10.1080/10641963.2019.1601203.
9. Bhanushali AA, Lajpal N, Kulkarni SS, Chavan SA, Bagadi SA, Das BR. Frequency of FokI and TaqI polymorphism of vitamin D receptor gene in Indian population and its association with 25-hydroxyvitamin D levels. Indian J Hum Genet. 2009; 15(3): 108-113. doi: 10.4103/0971-6866.60186.
10. Dutra LV, Affonso F, Ramires F, Kassai M, Barbosa C, Santos F, et al. Association between vitamin D plasma concentrations and VDR gene variants and the risk of premature birth. BMC Pregnancy Childbirth. 2019; 20(1): 3. doi: 10.1186/s12884-019-2671-2.

11. Martínez H, Rodríguez A, Izaguirre MH, Castro de Guerra D. Admixture estimates for Caracas, Venezuela, based on autosomal, Y-chromosome, and mtDNA markers. Hum Biol. 2007;79(2):201-213. doi: 10.1353/hub.2007.0032.
12. Fernández M, Villasmil A, Takiff H, Fuentes Z. NRAMP1 and VDR gene polymorphisms in susceptibility to tuberculosis in Venezuelan population. Dis Markers. 2015; 2015: 860628. doi: 10.1155/2015/860628.
13. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. Curr Opin Pharmacol. 2010; 10(4): 482-496. doi: 10.1016/j.coph.2010.04.001.
14. Cossarizza A, Dong H, Radbruch A, Abrignani S, Addo R, Akdis M, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (third edition). Eur J Immunol. 2021; 51(12): 2708-3145. doi: 10.1002/eji.202170126.
15. Bunce M. PCR-SSP typing. In: Bidwell JL, Navarrete C, editors. Histocompatibility testing. London: Imperial College Press; 2000. p. 167-176.
16. Curran JE, Vaughan T, Lea RA, Weinstein SR, Morrison NA, Griffiths LR. Association of a vitamin D receptor polymorphism with sporadic breast cancer development. Int J Cancer. 1999; 83(6): 723-726. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19991210)83:6<723::aid-ijc4>3.0.co;2-3.
17. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. Bioinformatics. 2006; 22: 1928-1929. doi: 10.1093/bioinformatics/btl268.
18. Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, van Leeuwen JP, Pols HA. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to vitamin D related disease states. J Steroid Biochem Mol Biol. 2004; 89-90(1-5): 187-193. doi: 10.1016/j.jsbmb.2004.03.083.
19. Arai H, Miyamoto KI, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, et al. A Vitamin D Receptor Gene Polymorphism in the Translation Initiation Codon: Effect on Protein Activity and Relation to Bone Mineral Density in Japanese Women. J Bone Miner Res. 1997; 12: 915-921. doi: 10.1359/jbmr.1997.12.6.915.
20. Voltan G, Cannito M, Ferrarese M, Ceccato F, Camozzi V. Vitamin D: An overview of gene regulation, ranging from metabolism to genomic effects. Genes. 2023;14(9):1691. doi:10.3390/genes14091691.