

Caracterización multimodal de células NK en la pérdida gestacional recurrente mediante citometría de flujo, microscopía electrónica de barrido ambiental y microscopía confocal láser

Multimodal characterization of NK cells in recurrent pregnancy loss using flow cytometry, environmental scanning electron microscopy, and confocal laser microscopy

Alejandro Teppa Garrán^{1a*}, Soriuska Mayora^{2b}, Rafael Danilo García^{3c}, Pura Bolaños^{4d}

RESUMEN

Introducción: La caracterización de las células natural killer (NK), una población inmunológica de interés en la pérdida gestacional recurrente (PGR), requiere análisis fenotípicos y morfológicos complementarios. **Objetivo:** Describir la caracterización integrada de células NK mediante citometría de flujo, microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) y microscopía confocal láser (MCL). **Materiales y métodos:** Se analizaron muestras de sangre periférica mediante citometría de flujo multiparamétrica para identificar subpoblaciones de NK según la expresión de CD3, CD16 y CD56. Las células fueron posteriormente evaluadas mediante ESEM para caracterizar su morfología superficial y mediante MCL para analizar las señales fluorescentes celulares. **Resultados:** La citometría de flujo permitió identificar subpoblaciones de NK y NKT según su inmunofenotipo. El ESEM permitió visualizar

características morfológicas superficiales, como irregularidades de la membrana y proyecciones celulares, mientras que la MCL aportó información complementaria mediante la detección de marcadores fluorescentes asociados al fenotipo celular. **Conclusión:** La integración de la citometría de flujo, el ESEM y el MCL constituye una estrategia complementaria para la caracterización fenotípica y morfológica de las células NK, lo que aporta una plataforma útil para estudios descriptivos en inmunología reproductiva.

Palabras clave: Microscopía electrónica, microscopio electrónico de barrido ambiental, microscopio confocal, fluorescencia, fluoróforo, citometría de flujo, células NK, células citotóxicas naturales

ORCID:

¹ [0009-0004-3047-5370](https://orcid.org/0009-0004-3047-5370)

² [0000-0002-7194-7264](https://orcid.org/0000-0002-7194-7264)

³ [0009-0005-9815-1193](https://orcid.org/0009-0005-9815-1193)

⁴ [0000-0002-0999-7666](https://orcid.org/0000-0002-0999-7666)

*Autor de correspondencia: Dr. Alejandro Teppa Garrán,
E-mail: ateppa@gmail.com

Recibido: 9 de abril 2026

Aceptado: 17 de julio 2026

- a. Doctor en Ciencias Médicas. Profesor Asociado. Coordinador de la Sección de Medicina Reproductiva de la Sociedad de Obstetricia y Ginecología de Venezuela. Instituto de Inmunología "Dr. Nicolás E. Bianco C." Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas - Venezuela.
- b. Bioanalista, MSc Inmunología. Especialista en Citometría de flujo. Instituto de Inmunología "Dr. Nicolás E. Bianco C." Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas - Venezuela.
- c. MSc. Fisiología y Biofísica. Especialista En Microscopía Electrónica. Director Unidad Microscopía Electrónica. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas - Venezuela.
- d. Bióloga. Investigadora Asociada. Especialista en microscopía confocal. Centro de Bioquímica y Biofísica. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas - Venezuela.

SUMMARY

Background: *The characterization of natural killer (NK) cells, an immunological population of interest in recurrent pregnancy loss (RPL), requires complementary phenotypic and morphological analyses. Objective:* *To describe the integrated characterization of NK cells using flow cytometry, environmental scanning electron microscopy (ESEM), and confocal laser microscopy (CLM). Materials and Methods:* *Peripheral blood samples were analyzed by multiparametric flow cytometry to identify NK subpopulations according to the expression of CD3, CD16, and CD56. The cells were subsequently evaluated by ESEM to characterize their surface morphology and by CLM to analyze cellular fluorescent signals. Results:* *Flow cytometry identified NK and NKT cell subpopulations by immunophenotype. ESEM allowed visualization of surface morphological features, including membrane irregularities and cellular projections, whereas CLM provided complementary information through the detection of fluorescent labeling associated with the cellular phenotype. Conclusion:* *The integration of flow cytometry, ESEM, and CLM constitutes a complementary strategy for the phenotypic and morphological characterization of NK cells, providing a useful platform for descriptive studies in reproductive immunology.*

Keywords: *Electron microscope, environmental scanning electron microscope, confocal microscope, fluorescence, fluorophore, flow cytometry, NK cells, natural killer cells*

digital de las señales emitidas por la muestra (1, 2). Por otra parte, la microscopía confocal láser (MCL) emplea iluminación láser y un sistema que elimina la señal fuera de foco, lo que permite obtener secciones ópticas y reconstrucciones tridimensionales (3D) de muestras fluorescentes, sin necesidad de cortes físicos (3). Mientras que la citometría de flujo (CF) permite el análisis multiparamétrico de células individuales mediante marcadores fluorescentes, lo que facilita la identificación y cuantificación de poblaciones específicas, como las células *natural killer* (NK), con aplicaciones relevantes en inmunología reproductiva (4).

En este trabajo se describe la aplicación integrada de la CF, el ME y la MCL para la caracterización fenotípica y morfológica de las NK en pacientes con pérdida gestacional recurrente (PGR). La combinación de estas metodologías proporciona información complementaria sobre su inmunofenotipo y su arquitectura celular, destacando el potencial de las tecnologías avanzadas de imagen para el estudio descriptivo de poblaciones inmunitarias en la investigación biomédica.

Células NK

Las NK son linfocitos de la inmunidad innata descritos inicialmente por Kiessling y col. (5) en 1975, por su capacidad para lisar células tumorales sin necesidad de una sensibilización previa. Su función está regulada por un equilibrio entre receptores activadores e inhibidores, incluidos los receptores KIR (*Killer Immunoglobulinlike Receptors*), que interactúan con moléculas de HLA (*Human Leukocyte Antigen*) de clase I (6). Representan aproximadamente el 10% de los linfocitos circulantes y se identifican mediante citometría de flujo por la expresión de CD56 y la ausencia de CD3 (7). A su vez, según la expresión de CD56 y CD16, se clasifican principalmente en subpoblaciones CD56+dim, de mayor actividad citotóxica, y CD56+bright, con funciones inmunorreguladoras (8).

INTRODUCCIÓN

La resolución de un sistema óptico se define como su capacidad para distinguir estructuras próximas entre sí. Aunque el ojo humano posee un límite de resolución aproximado de 0,1 mm, el estudio de estructuras biológicas de menor tamaño requirió el desarrollo del microscopio óptico (MO), cuya resolución está limitada a ~200 nm por la longitud de onda de la luz visible y por los principios de difracción de Rayleigh y Abbe (1, 2). Para superar esta restricción, se desarrollaron los microscopios electrónicos (ME), que utilizan haces de electrones con longitudes de onda inferiores a las de la luz visible, lo que permite alcanzar resoluciones nanométricas y estudiar la ultraestructura celular mediante la reconstrucción

Células NK en la pérdida gestacional recurrente: relevancia inmunológica y caracterización fenotípica

La PGR, definida como la presencia de ≥ 2 abortos, es un síndrome heterogéneo en el que aproximadamente el 50% de los casos permanece sin etiología definible tras la evaluación convencional (9,10). En este contexto, las NK han sido objeto de investigación por su participación en la regulación de la respuesta inmunológica en la interfaz materno-fetal. La determinación de las NK en sangre periférica mediante CF multiparamétrica constituye una herramienta objetiva y reproducible para su caracterización inmunofenotípica. Diversos estudios han evaluado la asociación entre alteraciones en la frecuencia y la distribución de las subpoblaciones de las NK y los trastornos reproductivos, como la PGR (11,12). En mujeres sanas, se han descrito valores generalmente inferiores al 12%, con predominio de células CD56+bright, caracterizadas por un perfil predominantemente inmunorregulador (7,11,12).

La citometría de flujo

La CF es una técnica multiparamétrica ampliamente utilizada en inmunología que permite analizar células individuales en suspensión mediante la medición simultánea de la dispersión de la luz y de la emisión de fluorescencia (4, 13). La dispersión frontal y lateral, generadas cuando las células atraviesan el haz láser, proporcionan información sobre el tamaño celular y su complejidad o granularidad interna, respectivamente (Figura 1). Estos parámetros permiten establecer estrategias de selección celular (*gating*), mientras que los fluoróforos conjugados a anticuerpos monoclonales posibilitan la detección de moléculas específicas de superficie o intracelulares mediante inmunofenotipaje (4,13). Por consiguiente, con base en el corrimiento de Stokes, la detección simultánea de múltiples señales fluorescentes permite distinguir y cuantificar poblaciones celulares según su perfil de expresión molecular, incluidas las diferentes subpoblaciones de células NK, mediante la

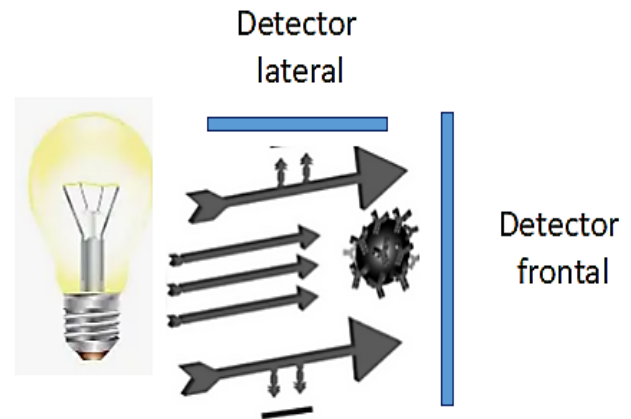


Figura 1. Ilustración del fenómeno de dispersión frontal y lateral en un citómetro de flujo convencional. La dispersión lateral es captada por un detector y convertida en información sobre la complejidad de la partícula analizada, mientras que la dispersión frontal indica su tamaño

evaluación de marcadores de superficie como CD3, CD56 y CD16 (Figura 2) (12,14).

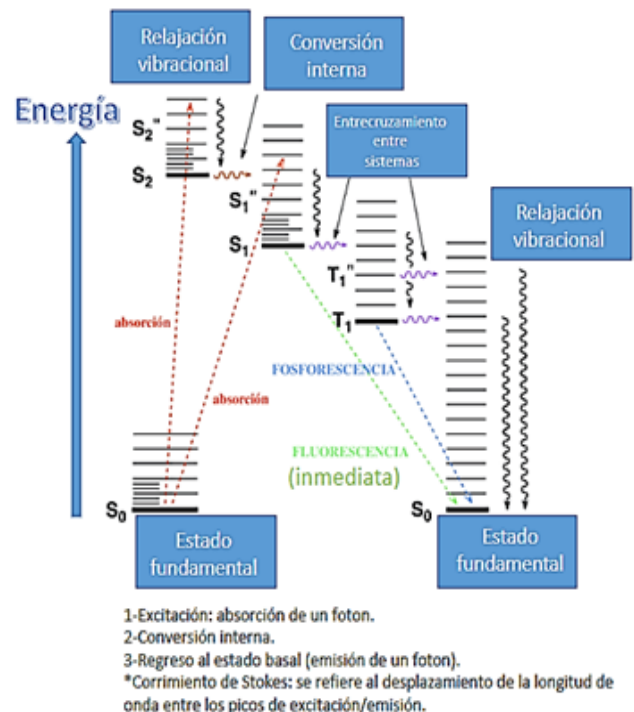


Figura 2. Diagrama de Jablonski. Permite visualizar los procesos de una molécula al ser excitada, con un salto a un nivel energético superior y su retorno a su estado fundamental, mediante la emisión de fluorescencia y fosforescencia

Microscopía electrónica

Existen diferentes tipos de ME, entre los más utilizados se encuentran el ME de transmisión (MET) y el ME de barrido (MEB) (15). El MET permite evaluar la ultraestructura interna de las muestras mediante cortes ultrafinos obtenidos por técnicas de ultramicrotomía (16). Uno de los métodos más utilizados es el corte mecánico con cuchillas de diamante, cuya tecnología fue patentada en Venezuela por Fernández Morán (17). En contraste, el MEB analiza la arquitectura superficial de las muestras mediante el barrido progresivo de un haz de electrones (18). Las imágenes se generan a partir de los electrones secundarios y retrodispersados producidos por la interacción del haz con la muestra, lo que proporciona una representación 3D de alta resolución y una elevada profundidad de campo (16,18). Una de sus modalidades es el MEB ambiental (ESEM, por sus siglas en inglés, *Environmental Scanning Electron Microscope*), diseñado para el análisis de muestras biológicas en condiciones ambientales controladas y utilizado en este estudio para caracterizar las células NK (1, 18).

Microscopía confocal láser

La MCL es una modalidad de microscopía de fluorescencia que permite obtener imágenes de un único plano focal, lo que limita la detección de la fluorescencia procedente de los planos adyacentes y posibilita la adquisición de secciones ópticas seriadas y de reconstrucciones 3D de la muestra (3,19). Su fundamento se basa en el fenómeno de fluorescencia y el corrimiento de Stokes (Figura 2), en el que los fluoróforos emiten luz a una longitud de onda característica tras ser excitados, lo que permite identificar estructuras celulares específicas (20). Profundizando en los detalles, a diferencia de la microscopía de fluorescencia convencional, la MCL utiliza iluminación láser puntual y un orificio espacial (pinhole o agujero estenopeico) que delimita el plano focal en el eje Z y elimina la señal fuera de foco, lo que mejora el contraste y la resolución de las imágenes (21,22). Adicionalmente, mediante sondas fluorescentes

y anticuerpos conjugados con fluoróforos, es posible identificar células, organelos y moléculas específicas. Entre los marcadores más utilizados se encuentran FITC (del inglés *fluorescein isothiocyanate*) y la ficoeritrina (PE), empleados como fluoróforos conjugados a anticuerpos para la detección de antígenos específicos; DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), utilizado para la tinción nuclear; MitoTracker Red/Green, para el marcaje de mitocondrias; LysoTracker, para lisosomas; y anticuerpos anti-citoceratina conjugados con fluoróforos para la identificación de células epiteliales (23). Tras la excitación por el láser, estos marcadores emiten fluorescencia o revelan la localización de sus respectivas estructuras diana, según el componente celular de interés (21-23). Estas características convierten a la MCL en una herramienta relevante para la caracterización morfológica y subcelular de poblaciones celulares en investigación biomédica, incluyendo células inmunes como las NK en el contexto de la inmunología reproductiva (24).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se diseñó un estudio observacional, descriptivo y de corte transversal. Se incluyeron especímenes de sangre periférica de 20 pacientes en edad reproductiva (23-37 años), con antecedente de dos o tres abortos, con consentimiento informado firmado y aprobación del Comité de Bioética. Las participantes fueron referidas al Instituto de Inmunología “Dr. Nicolás Bianco C” (IDI) de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela (UCV). Todas las muestras analizadas presentaron porcentajes elevados de células NK en sangre periférica (14–24%), con predominio de la subpoblación CD56+dim/CD16+, cuya caracterización inmunofenotípica se realizó mediante CF, mientras que las características morfológicas y de señal fluorescente se evaluaron mediante ESEM y MCL, respectivamente.

Permiso bioético

El protocolo de estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética del IDI,

UCV. La investigación se realizó de acuerdo con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki y con la normativa nacional vigente en materia de estudios con seres humanos. Todas las participantes firmaron un consentimiento informado previo a la obtención de las muestras, autorizando su participación voluntaria y el manejo confidencial de la información recopilada.

Laboratorios de investigación participantes

1. IDI, UCV, a cargo de la Dra. Mercedes Zavaleta, directora. Una Institución Universitaria dedicada a la enseñanza e investigación en inmunología clínica y básica, reconocida por la FOCIS (en inglés, *Federation of Clinical of Immunology Societies*), donde se realiza la CF en forma cotidiana, a cargo de la experta MSc Soriuska Mayora.
2. Unidad de ME. Centro de Química del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), a cargo del investigador MSc Rafael Danilo García Pérez, donde se encuentra el ESEM, modelo *Quanta 250 FEI* (Thermo Fisher Scientific) (Figura 3).

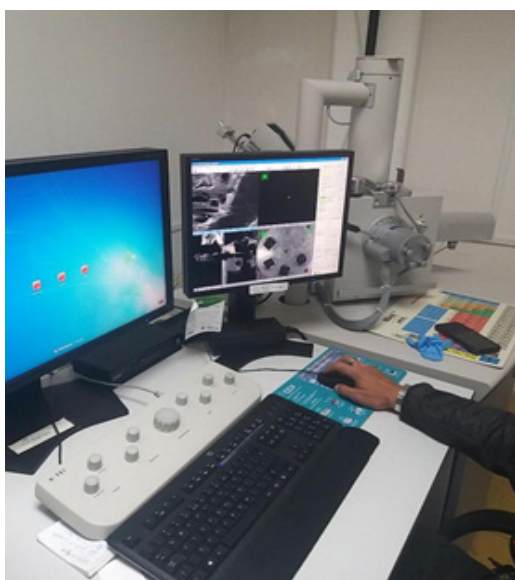


Figura 3. ESEM, modelo *Quanta 250 FEI*. Unidad de Microscopía Electrónica. Centro de Química. IVIC

3. Unidad de MCL, Laboratorio de Fisiología Celular. Centro de Biofísica y Bioquímica (CBB), IVIC, a cargo de la Dra. Pura Bolaños. Se empleó un MCL, marca *Nikon C1* (Nippon Kogaku KK), acoplado a un microscopio invertido de epifluorescencia *Nikon Eclipse TE 2000* (Nippon Kogaku KK) (Figura 4), que usa 3 láseres para emitir: uno de zafiro a 488 nm de fase sólida, y dos de helio-neón de diodo, de fase gaseosa, que emiten a 543 nm y 633 nm. Filtros de emisión 535/50, 590/50 (BP) y 650 (LP). Visualización promedio con objetivos de inmersión en agua 60X, 1.2 AN, con *pinholes* pequeños y medianos de 30 y 60 μm , 2 fluoróforos: FITC, con excitación/emisión de 492/520 nm, y PE, con excitación a 488 nm y emisión a 580 nm, que identifican los marcadores de superficie de las NK, CD3⁺ y CD16⁺/CD56⁺, respectivamente. Análisis con los programas informáticos *Nikon EZ-C1 3.4* y *Nikon EZ-C1 Free-Viewer 3.9* (Nippon Kogaku KK), para la adquisición y el procesamiento de las imágenes, de forma correspondiente.

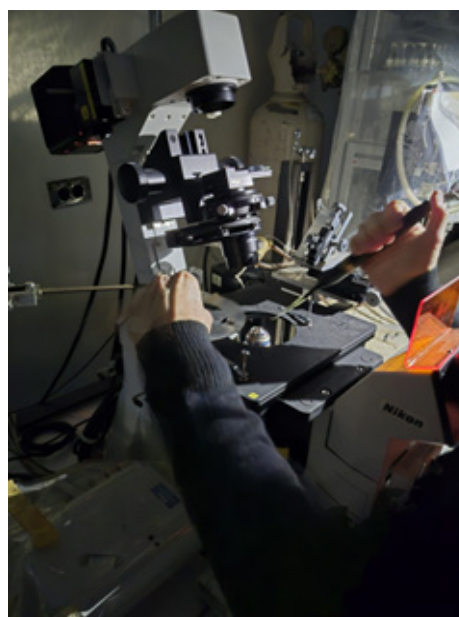


Figura 4. MCL, *NIKON C1* acoplado a *Nikon Eclipse TE 2000*. Unidad de Microscopía Confocal, Laboratorio de Fisiología Celular. CBB, IVIC

Caracterización de las subpoblaciones de linfocitos T y células NK mediante CF

La caracterización inmunofenotípica de los linfocitos T y de las células NK se realizó en el IDI de la UCV, siguiendo las recomendaciones internacionales para los estudios inmunológicos mediante citometría de flujo (25). Se obtuvieron muestras de sangre periférica (4 mL) en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y, posteriormente, se procesaron mediante tinción de superficie con anticuerpos monoclonales conjugados a fluoróforos (Biolegend™). El panel utilizado incluyó el CD3 marcado con FITC y el CD16/CD56 conjugado con PE, lo que permitió identificar y cuantificar las principales poblaciones celulares según su perfil de expresión. Mediante este esquema de marcaje se diferenciaron las subpoblaciones de las NK, CD3-CD56+dim/CD16+, asociadas a un perfil predominantemente citotóxico; CD3-CD56+bright/CD16+, con características inmunorreguladoras; y las células NKT CD3+CD56/CD16+. Tras la lisis de los eritrocitos mediante una estación automatizada Beckman Coulter Q-prep (Figura 5), las muestras fueron analizadas en un CF *Novocyte Advanteon* (Agilent), equipado con tres láseres (405, 488 y 640 nm) (Figura 6). La calibración instrumental,



Figura 5. Estación de trabajo automatizada Beckman Coulter Q-prep. IDI, UCV



Figura 6. Citómetro de flujo Novocyte Advanteon (Agilent). IDI, UCV. Las señales de dispersión captadas por el citómetro de flujo se utilizan para discriminar las subpoblaciones de células NK

la compensación de la fluorescencia y los controles negativos permitieron optimizar la adquisición de datos. P previo a la adquisición, se calibró el equipo y se compensó la fluorescencia mediante tinciones individuales para cada fluorocromo y células no teñidas para ajustar la autofluorescencia. El análisis multiparamétrico se representó mediante diagramas de dispersión de fluorescencia, lo que permitió identificar de manera diferencial las subpoblaciones de linfocitos evaluadas (Figura 7). Las muestras remanentes se utilizaron para los estudios de microscopía realizados el mismo día.

RESULTADOS

Evaluación morfológica y ultraestructural de las células NK mediante ESEM y MCL

La edad de las pacientes fue de $30,1 \pm 4,2$ años, con un rango de 23-37 años. El porcentaje de NK presentó un promedio de $19,2 \pm 3,1\%$ en los 20 casos evaluados, con un rango de 14-24%. El recuento absoluto de células NK mostró un promedio de $379,8 \pm 96,6$ células/mm³, con un rango de 249-533 células/mm³.

Las NK fueron evaluadas mediante ESEM para caracterizar su morfología y su topografía superficial (Figura 3). Debido a la naturaleza líquida de las muestras, la observación se realizó

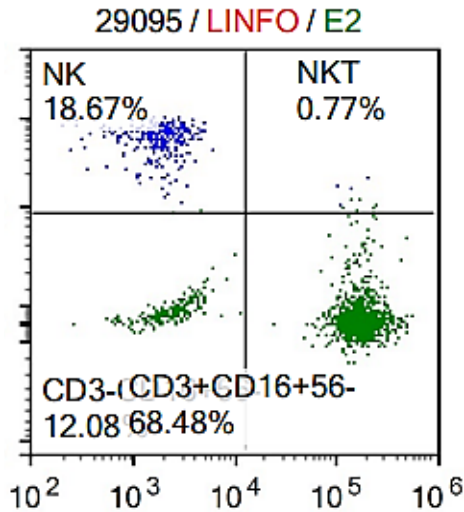


Figura 7. Histograma doble con los 2 fluoróforos (PE/FITC), que permite distinguir las diferentes subpoblaciones de linfocitos T, según su marcaje: linfocitos T y B, células NK y NKT

preferentemente el mismo día de su obtención, una vez completado el análisis por CF y el procesamiento celular correspondiente, con el fin de preservar sus características estructurales (Figuras 8 y 9). En algunos casos, las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 2,5% y conservadas a 4 °C para su evaluación posterior. Su función es detener de inmediato toda la actividad biológica y estabilizar la arquitectura celular, manteniendo la morfología lo más cercana posible a su estado *in vivo*. La preparación incluyó procesos de deshidratación y, en muestras seleccionadas, el recubrimiento superficial con oro mediante pulverización catódica con un evaporador de alto vacío Quorum 150R ES (Figura 10), con el objetivo de incrementar la conductividad eléctrica de las muestras, minimizar la acumulación de carga durante la adquisición y optimizar el contraste y la resolución de las imágenes obtenidas (Figura 11). Las imágenes obtenidas mediante ESEM permitieron visualizar las características superficiales y la arquitectura 3D de las NK, incluidos detalles de su morfología celular (Figuras 8, 9 y 11).

Las muestras fueron analizadas adicionalmente mediante MCL (Figuras 12 y 13), utilizando excitación láser y la detección de señales

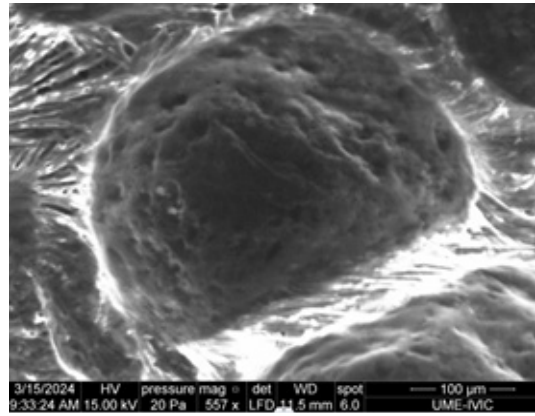


Figura 8. Micrografía de microscopía electrónica de barrido. Detalles 3D de la superficie de una célula NK (redondeada) citotóxica (redondeada)

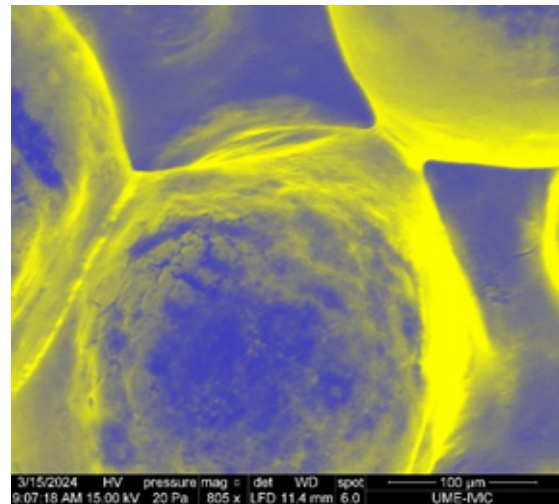


Figura 9. Micrografía de microscopía electrónica de barrido. Superficie de una célula NK citotóxica con pseudocolor

fluorescentes asociadas a los fluoróforos empleados. El marcaje con PE permitió visualizar señales fluorescentes intensas en el espectro rojo, mientras que el marcaje con FITC presentó una señal verde diferencial (Figuras 12 y 13). Estas diferencias pueden estar relacionadas con la intensidad del marcaje, la abundancia del antígeno evaluado o las características propias de cada fluoróforo, y son concordantes con la identificación fenotípica de las NK CD3⁺/CD16⁺/CD56⁺ previamente determinada mediante CF.



Figura 10. Evaporador de alto vacío de plasma (*Quorum 150R ES*). Unidad de Microscopía Electrónica. Centro de Química. IVIC

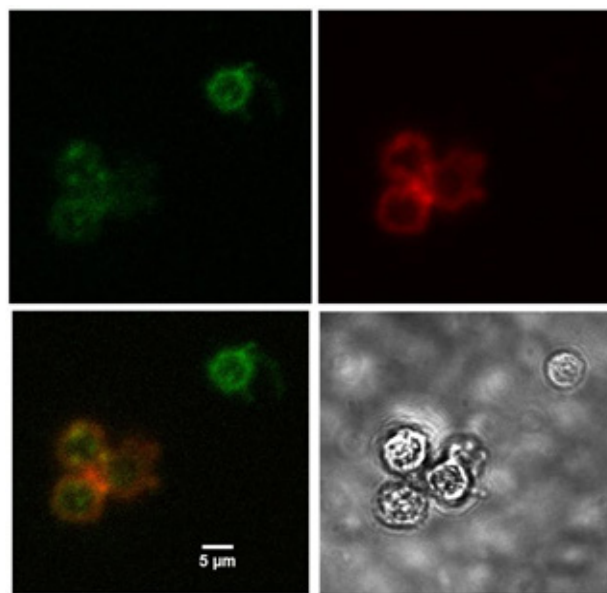


Figura 12. Microscopía confocal. El marcaje con el anticuerpo FITC-fluorocromado para CD3, de color verde. Mientras que el anticuerpo con PE es para CD16/CD56, de color rojo. Aquí observamos células con Verde y Rojo presentes (CD3+) y CD16+/CD56+, compatibles con una célula NKT

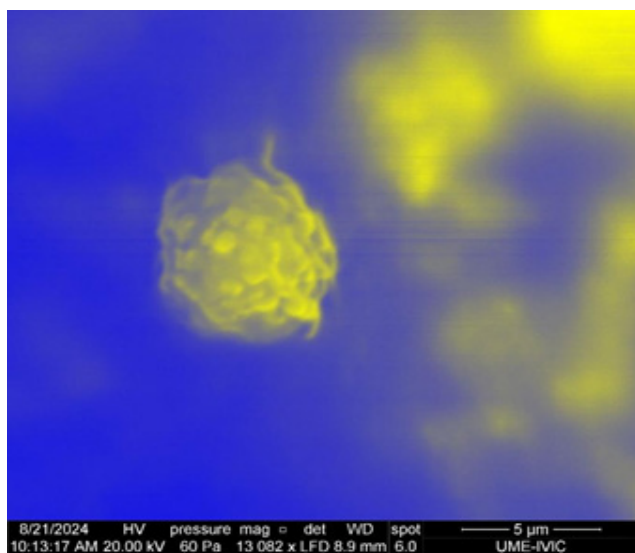


Figura 11. Micrografía de microscopía electrónica de barrido. Célula NK citotóxica con pseudocolor luego de pulverización catódica de grano ultrafino en oro (*sputtering*, en inglés)

DISCUSIÓN

La integración de la CF, el ESEM y la MCL permitió una caracterización complementaria de las células NK, combinando información inmunofenotípica con parámetros morfológicos y ultraestructurales (Figura 14). La CF permitió identificar subconjuntos celulares mediante marcadores específicos, mientras que el ESEM aportó información sobre la arquitectura superficial 3D, evidenciando irregularidades de la membrana y proyecciones celulares, así como estructuras compatibles con gránulos citoplasmáticos. Estas características son concordantes con la morfología clásica descrita previamente para los linfocitos NK humanos mediante ME, en la que se han identificado superficies con microproyecciones, una reorganización de la membrana y gránulos citotóxicos asociados a su función efectora

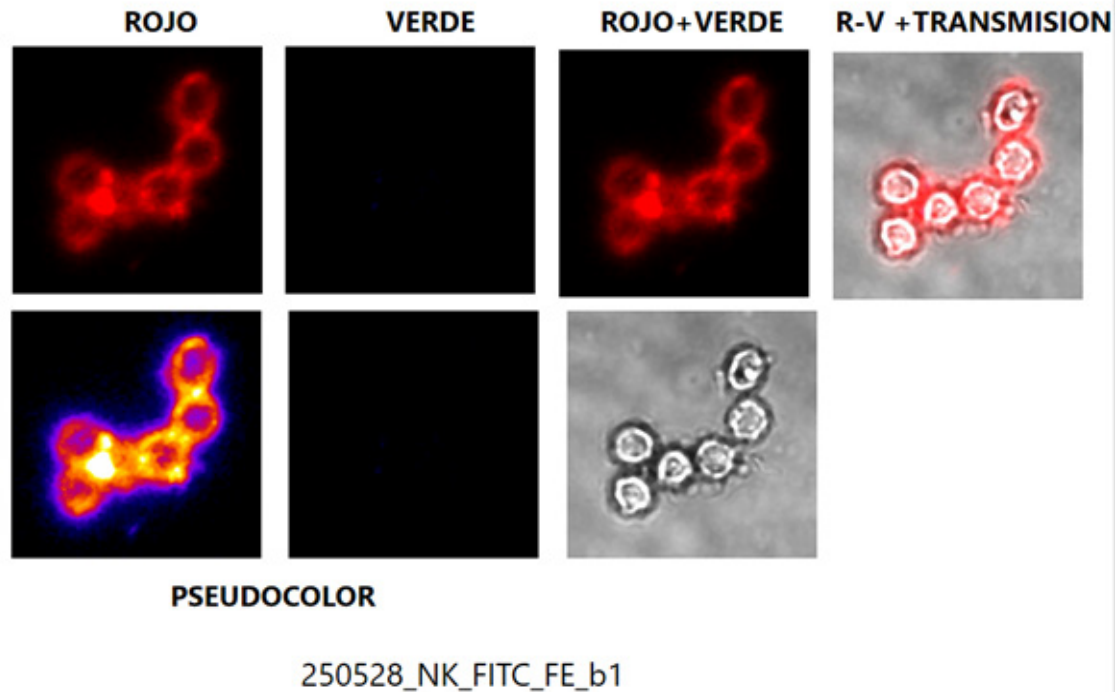


Figura 13. Microscopía confocal. El marcaje con el anticuerpo con el fluoróforo FITC para CD3, color verde. Mientras el anticuerpo con PE es para CD16/CD56, color rojo. Aquí observamos células con verde ausente (CD3-) y rojo presente (CD16+/CD56+), compatibles con células NK citotóxicas

(26). En este sentido, el valor agregado de la ME en biomedicina radica en su capacidad para revelar detalles morfológicos que pueden pasar inadvertidos con técnicas convencionales. Por ejemplo, el ESEM ha demostrado utilidad en la identificación de alteraciones superficiales tempranas, como las descritas en modelos de metástasis de cáncer gástrico peritoneal (27), así como en la evaluación de cambios ultraestructurales del sincitiotrofoblasto en la mola hidatidiforme, proporcionando una representación 3D complementaria al tradicional “ribete festoneado” observado mediante MO e histología convencional (28). Es importante destacar la investigación de Fernández-Segura y col. (29), quienes demostraron mediante ESEM los cambios ultraestructurales asociados a la citotoxicidad mediada por NK humanas, evidenciando la formación de conjugados NK/célula diana, la polarización de las células efectoras, alteraciones de la superficie celular, pérdida de microvellosidades y lesiones de

membrana compatibles con apoptosis, lo que destacó la utilidad de esta técnica para visualizar los mecanismos morfológicos implicados en la lisis celular mediada por las NK. De manera similar, la MCL ha ampliado las posibilidades de análisis en medicina reproductiva al permitir la evaluación de estructuras celulares y tisulares con resolución subcelular, incluida la caracterización del endometrio normal y de lesiones premalignas o malignas (30,31). Estudios recientes mediante MCL han demostrado una elevada concordancia con el análisis histopatológico convencional, lo que respalda su potencial como herramienta complementaria para la evaluación tisular en tiempo real (31). En biología reproductiva, la MCL ha permitido caracterizar procesos como la distribución mitocondrial, la dinámica del huso meiótico, la migración de gránulos corticales, la organización del citoesqueleto, la calidad embrionaria, la apoptosis y la viabilidad celular en ovocitos, blastocistos y tejido ovárico humano, ampliando la comprensión de los mecanismos

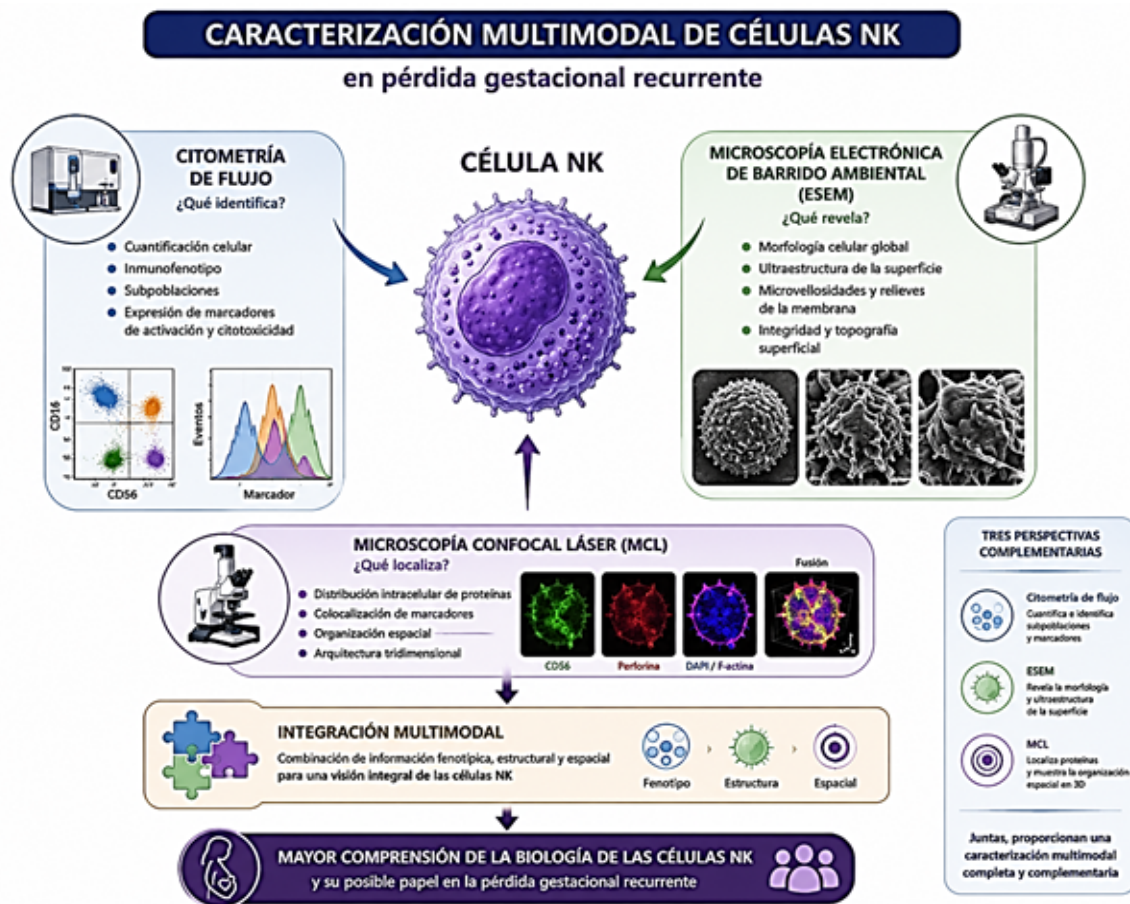


Figura 14. Caracterización multimodal de células NK mediante citometría, ESEM y MCL

celulares relacionados con la fertilidad y el desarrollo temprano (32,33).

En resumen, la aplicación combinada de estas tecnologías ofrece una aproximación integral para la caracterización de poblaciones inmunes como las células NK, y permite relacionar parámetros inmunofenotípicos con características morfológicas. Esta estrategia constituye una herramienta complementaria para futuros estudios orientados a comprender la heterogeneidad celular en la PGR y en otras alteraciones reproductivas.

CONCLUSIONES

El presente estudio permitió caracterizar las NK en pacientes con PGR mediante un enfoque multimodal que integró la evaluación de marcadores

de superficie y el análisis morfológico mediante CF, ESEM y MCL. La integración de estas plataformas permitió combinar datos cuantitativos derivados de la inmunofenotipificación con información estructural y morfológica celular, lo que proporcionó una caracterización complementaria de los subconjuntos de células NK en este contexto clínico.

Valor agregado y proyección de la microscopía avanzada en biomedicina

La contribución científica de este estudio consiste en integrar técnicas complementarias para una caracterización multidimensional de las células NK, combinando información fenotípica, estructural y funcional. Esta estrategia permite una comprensión más amplia de la

biología de NK y favorece la identificación de biomarcadores con potencial de aplicación clínica. Estas tecnologías avanzadas de análisis celular constituyen herramientas relevantes para la investigación biomédica al permitir integrar información cuantitativa, estructural y molecular en la caracterización de sistemas celulares complejos. Sin embargo, su implementación requiere infraestructura especializada, inversión sostenida y personal con formación técnica específica, lo que puede limitar su disponibilidad, en particular en entornos con restricciones al desarrollo científico y tecnológico. En este escenario, la incorporación progresiva de estas metodologías representa una oportunidad para fortalecer las capacidades de investigación biomédica en Venezuela y ampliar las estrategias disponibles para el estudio multidimensional de procesos celulares complejos, integrando aspectos fenotípicos, estructurales y funcionales en el análisis de sistemas biológicos.

Limitaciones

A pesar de los avances tecnológicos, la caracterización de las células NK continúa limitada por la heterogeneidad metodológica entre estudios, las diferencias entre poblaciones periféricas y uterinas de NK y la ausencia de criterios estandarizados para definir alteraciones inmunológicas clínicamente relevantes. Aunque la CF, el ESEM y la MCL aportan información complementaria sobre el fenotipo, la estructura y la función celulares, sus hallazgos deben interpretarse considerando las limitaciones propias de cada técnica y el contexto biológico específico.

REFERENCIAS

1. Ipohorski M, Bozzano PB. Microscopia electrónica de barrido en la caracterización de materiales. *Ciencia e Investigación*. 2013;63:43-53.
2. Bogner A, Jouneau P, Basset D, Gauthier C. A history of scanning electron microscopy developments: Towards wet-STEM imaging. *Micron*. 2007;38(4):309-41.
3. Paddock S. Confocal Laser Scanning Microscopy. *BioTech*. 1999;27:992-1004.
4. Mayora S. Citometría de flujo como herramienta biotecnológica. *Rev Fac Farm, UCV*. 2022;85:44-50.
5. Kiessling R, Klein E, 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):112-7.
6. Pende D, Falco M, Vitale M, Cantoni C, Vitale C, Munari E, et al. Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation. *Front Immunol*. 2019;10:1179-1195.
7. Vivier E. What is natural in natural killer cells? *Immunol Lett*. 2006;107(1):1-7.
8. Mariotti F, Petrini S, Ingegnere T, Tumino N, Besi F, Scordamaglia F, et al. PD-1 in human NK cells: evidence of cytoplasmic mRNA and protein expression. *Oncoimmunology*. 2018;8(6):1-10.
9. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2026;125(6):1023-1041.
10. ESHRE Guideline Group on RPL; Bender Atik R, Christiansen OB, Elson J, Kolte AM, Lewis S, Middeldorp S, et al. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss: an update in 2022. *Hum Reprod Open*. 2023;2023(1):hoad002.
11. Seshadri S, Sunkara S. Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2014;20(3):429-38.
12. Bryceson Y, Fauriat C, Nunes J, Wood S, Björkström N, Long E, et al. Functional analysis of human NK cells by flow cytometry. *Methods Mol Biol*. 2010;612:335-52.
13. McKinnon K.M. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018;120: 5.1.1-5.1.11.
14. Barteneva N, Fasler-Kan E, Vorobjev I. Imaging flow cytometry: coping with heterogeneity in biological systems. *J Histochem Cytochem*. 2012;60(10):723-33.
15. Yang DS, Mohammed OF, Zewail AH. Scanning ultrafast electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(34):14993-8.
16. Williams D, Carter C. Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science. Second edition: Springer. 2009.
17. Fernández Morán H. A diamond knife for ultrathin sectioning. *Exp Cell Res*. 1953; 5(1):255-256.
18. Elias C, Ávalos M, Riquelme B. Estudio comparativo sobre diferentes protocolos de trabajo para caracterizar la morfología eritrocitaria mediante microscopía electrónica de barrido.

- En: Riquelme B, D'Arrigo M, Risso P, Hidalgo M, editores. Publicaciones Reológicas. Editora UNR;2013.p.89-100.
19. López-Macay A, Fernández-Torres J, Zepeda A. Principios y aplicaciones de la microscopía láser confocal en la investigación biomédica. Invest Disc. 2016;5:156-164.
20. Sheppard C. Confocal Microscopy, Principles, Practice and Options. In: Watson WT, editor. Fluorescent and Luminiscent Probes for Biological Activity. Academic Press;1999 p. 303-309.
21. Gantenbein-Ritter B, Sprecher C, Chan S, Illien-Jünger S, Grad S. Confocal imaging protocols for live/dead staining in three-dimensional carriers. Methods Mol Biol. 2011;740:127-40.
22. Wright S, Centonze V, Stricker S, DeVries P, Paddock S, Schatten G. Introduction to confocal microscopy and three-dimensional reconstruction. Methods Cell Biol.1993;38:1-45.
23. Neikirk K, Marshall A, Kula B, Smith N, LeBlanch S, Hinton A. MitoTracker: A useful tool in need of better alternatives. European J Cell Biol. 2023;102(4):151371.
24. Swaim W.D. Overview of confocal microscopy. Methods Mol Biol. 2010;588:187-201.
25. Cossarizza A, Chang 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.
26. Carpen O, Virtanen I, Saksela E. Ultrastructure of human natural killer cells: nature of the cytolytic contacts in relation to cellular secretion. J Immunol. 1982;128(6):2691-2697.
27. Burdiles P, Olea N, Csendes A, Rencoret G, Parada F, Cárcamo C, et al. Estudio de microscopía electrónica de barrido en superficie peritoneal en controles y pacientes con cáncer gástrico. Rev Chil Cir. 2007;59:22-30.
28. Castejon S, Castejon O. Microscopía electrónica de barrido de la hiperplasia en la vellosidad molar. Rev Chil Obstet Ginecol. 2010;75:101-106.
29. Fernández-Segura E, García J, Campos A. Scanning electron microscopic study of natural killer cell-mediated cytotoxicity. Histol Histopathol.1990;5(3):305-10.
30. Elliott A.D. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. Curr Protoc Cytom. 2020;92(1):e68.
31. Wen J, Yang X, Ye G, Chen R, Feng Y, Liao Q. Preliminary study of confocal laser endomicroscopy for in vitro specimens of the endometrium. BMC Cancer. 2022;22(1):1094.
32. Jonkman J, Brown CM, Wright GD, Anderson KI, North AJ. Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy. Nat Protoc. 2020;15:1585-1611.
33. Reynaud K, Nogueira D, Cortvrindt R, Kurzawa R, Smits J. Confocal microscopy: principles and applications to the field of reproductive biology. Folia Histochem Cytobiol. 2001;39(2):75-85.