

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Giovanna Galego Goulart da Silveira

Isabella Pereira Rezende dos Santos

**A RELAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS UNK COM O HLA
EMBRIONÁRIO NOS ABORTOS ESPONTÂNEOS E O DIAGNÓSTICO PRECOCE
POR KIR-HLA-C**

São Paulo

2022

Giovanna Galego Goulart da Silveira
Isabella Pereira Rezende dos Santos

**A RELAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS UNK COM O HLA
EMBRIONÁRIO NOS ABORTOS ESPONTÂNEOS E O DIAGNÓSTICO PRECOCE
POR KIR-HLA-C**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Profº Rodrigo Alessandro Riemma Vela, como requisito parcial para obtenção do título de biomédico.

São Paulo

2022

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo

Silveira, Giovanna Galego Goulart da

A relação da interação entre células UNK com o HLA embrionário nos abortos espontâneos e o diagnóstico precoce por KIR-HLA-C / Giovanna Galego Goulart da Silveira, Isabella Pereira Rezende dos Santos. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2022.

55 p.

Orientação de Rodrigo Alessandro Riemma Vela.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2022.

1. Antígeno HLA 2. Células matadoras naturais 3. Decídua 4. Implantação do embrião 5. Receptores KIR I. Santos, Isabella Pereira Rezende dos II. Vela, Rodrigo Alessandro Riemma III. Centro Universitário São Camilo IV. Título

CDD: 611.013

Giovanna Galego Goulart da Silveira
Isabella Pereira Rezende dos Santos

**A RELAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS UNK COM O HLA
EMBRIONÁRIO NOS ABORTOS ESPONTÂNEOS E O DIAGNÓSTICO PRECOCE
POR KIR-HLA-C**

Professor Orientador (Rodrigo Alessandro Riemma Vela)

Professor Examinador Interno (Renato Borges Tesser)

Professor Examinador Externo (Marcelo Stéfano Bellini Lucas)

DEDICATÓRIA

Dedicamos o trabalho à Deus que nos tem dado a graça de conhecermos e compreendermos os mistérios da sua criação. À Jesus Cristo que mediante ao seu sacrifício e ressurreição nos redimiou para que de nossas mãos algo de bom pudesse ser realizado e ao Espírito Santo que em tudo tem nos consolado e nos capacitado nesse processo de compreensão dos mistérios que envolvem a geração de uma nova vida.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos nossos familiares e amigos que nos auxiliaram ao longo de todo o processo se responsabilizando por demandas que não podíamos executar para que o tempo fosse dedicado ao desenvolvimento desse trabalho. Agradecemos também ao Centro Universitário São Camilo por nos oferecer todos os recursos necessários, inclusive, muito dos materiais utilizados como referência bibliográfica para elaboração dos textos que aqui se encontram e ao professor Rodrigo Vela pela orientação.

*“Deus os abençoou, e Ihes disse: “Sejam
férteis e multipliquem-se! [...]”*

Gênesis 1:28a, Bíblia Sagrada

RESUMO

As células Natural Killer (NKs) compõem a imunidade inata e são responsáveis pela manutenção da homeostase tecidual acarretando a morte de células sob estresse como células tumorais e células infectadas, contudo, novos grupos de NKs estão sendo descritos, tipos celulares que mantêm os marcadores de células NK, expressam novas moléculas e apresentam capacidade funcional diferenciada, como é o caso das células NK uterinas (uNKs), presentes na decídua do útero gravídico. Essas células possuem capacidade citotóxica reduzida e aumentam em proporção no início da gestação. Além disso, são produtoras de citocinas e quimiocinas envolvidas em processos gestacionais como implantação embrionária, vascularização e placentação. Para que essas células secretem suas citocinas e quimiocinas durante a implantação embrionária precisam receber um estímulo majoritariamente ativador por parte de seus receptores KIR quando esses entram em contato com ligantes específicos presentes no trofoblasto extraviloso. Essa comunicação entre célula imunológica e tecido fetal é influenciada pela condição decidual, por ligantes HLA expressos pelo trofoblasto e pelo tipo de receptor KIR. Células uNKs maternas que carregam KIRs de haplótipo A, de característica inibitória, são fortemente inibidas quando estimuladas por HLA-C2 fetal herdado pelo pai e dessa forma inativam a degranulação de uNKs comprometendo o desenvolvimento completo e adequado da implantação embrionária, fator esse que vem sendo associado à patogênese da Síndrome Do Aborto de Repetição. Diante disso, um novo método diagnóstico baseado em biologia molecular foi desenvolvido: o exame KIR-HLA-C que é realizado com base em técnica de PCR e aplicado em clínicas de reprodução humana com o intuito de reunir maiores informações a respeito de casais tentantes que tenham passado por falhas de implantação recorrente. Foi realizada uma revisão narrativa da literatura e um levantamento retrospectivo de dados entre os anos 2021 e 2022.

Palavras-chave: Implantação, Decídua, Antígeno HLA, Receptores KIR, Células uNKs

ABSTRACT

Natural Killer cells (NKs) make up the innate immunity and are responsible for maintaining tissue homeostasis, leading to the death of cells under stress such as tumor cells and infected cells, however, new groups of NKs are being described, cell types that maintain the markers of NK cells but also express new molecules and have a differentiated functional capacity, as is the case of uterine NK cells (uNKs), present in the decidua of the gravid uterus. These cells have reduced cytotoxic capacity and increase in proportion in early pregnancy. In addition, they are producers of cytokines and chemokines involved in gestational processes such as embryo implantation, vascularization and placentation. In order for these cells to secrete their cytokines and chemokines during embryo implantation, they need to receive a mostly activating stimulus from their KIR receptors when they come into contact with specific ligands present in the extravillous trophoblast. This communication between immune cell and fetal tissue is influenced by the decidual condition, by HLA ligands expressed by the trophoblast and by the type of KIR receptor. Maternal uNKs cells that carry KIRs of haplotype A, with an inhibitory characteristic, are strongly inhibited when stimulated by fetal HLA-C2 inherited from the father and, thus, inactivate the degranulation of uNKs, compromising the complete and adequate development of embryonic implantation, a factor that has been associated with the pathogenesis of recurrent miscarriage syndrome. Therefore, a new diagnostic method based on molecular biology was developed: the KIR-HLA-C exam, which is performed based on the PCR technique and applied in human reproduction clinics in order to gather more information about trying couples who have experienced recurring deployment failures. A narrative literature review and a retrospective data survey were carried out between the years 2021 and 2022.

Keywords: Implantation, Decidua, HLA Antigen, KIR Receptors, uNKs Cells

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	4
2	OBJETIVOS	6
2.1	OBJETIVO PRINCIPAL.....	6
2.1	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	6
3	MATERIAL E MÉTODOS	7
4	DESENVOLVIMENTO	8
4.1	O ENDOMÉTRIO RECEPTIVO.....	12
4.2	A DECÍDUA COMO UM TECIDO DE PROTEÇÃO AO INVASOR	14
4.3	A IMPLANTAÇÃO	16
4.4	O PAPEL DAS CÉLULAS UNKS E SUA RELAÇÃO COM O MICROAMBIENTE	20
4.4.1	As uNKs e a decídua	22
4.4.2	As uNKs e seus receptores KIRs	28
4.4.3	As dNKs e o trofoblasto extraviloso.....	33
4.5	O CÓDIGO IMUNOLÓGICO KIR-HLA-C E A SÍNDROME DO ABORTO DE REPETIÇÃO.....	37
4.6	MÉTODO DIAGNÓSTICO KIR-HLA-C.....	40
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A gestação é um processo multifatorial e por consequência, as complicações que envolvem esse processo biológico são diversas e ocorrem por variadas causas (ALECSANDRU; GARCÍA-VELASCO, 2017). Entre essas complicações está a Síndrome do Aborto de Repetição (AER) que acomete de 2 a 5% dos casais tentantes e é definida como sendo a interrupção espontânea de três ou mais gestações pela mesma mulher, provocada por comprometimentos relacionados a saúde materna ou fetal. Alguns serviços já consideram casos com dois abortos espontâneos ou mais como sendo AER (BARROS et. al., 2020). Entre as causas da AER estão: anormalidades cromossômicas; anormalidades uterinas adquiridas ou congênitas que representam boa parte dos casos (BARROS et.al., 2020). Outros fatores são os distúrbios endócrinos e aspectos imunológicos (MATTAR, TRAINÁ, DAHER, 2015).

Considerando que o abortamento espontâneo é uma realidade bastante frequente na população feminina e possui, muitas vezes, etiologia desconhecida, novos estudos começaram a ser realizados levando em conta o fator imunológico (OLIVEIRA MTS et al., 2020). Uma vez que ao considerarmos as reações teciduais envolvidas em uma gestação, podemos dizer que a gravidez é um tipo único de processo imunológico em que a implantação configura inflamação; a gestação, anti-inflamação e o parto, uma nova inflamação. (ZHANG e WEI, 2021). Além disso, as falhas presentes em uma gestação são o resultado de um processo e/ou componente debilitado de origem materna ou fetal. Experimentos clássicos de transplante demonstraram que as células embrionárias possuem facilidade de implantação frente à muitos tecidos, contudo, quando estão diante do endométrio, são rejeitadas a não ser que esse esteja sensibilizado por ação hormonal, inclusive, esse tecido quando lesado permite a invasão das células embrionárias ainda que não preparado por hormônios, demonstrando que o endométrio constitui uma grande barreira à implantação e a inflamação é componente fundamental em sua sensibilização (ASHARY; TIWARI et al., 2018).

Unindo os dois fatores: processo imunológico e endométrio como barreira à implantação, esforços começaram a ser direcionados para uma melhor

compreensão do papel de células imunológicas presentes nesses tecidos. Com isso, descobertas em relação ao papel das Natural Killer uterinas (uNKs) surgiram e uma relação entre esse papel e AERs passou a ser explorada. Ao contrário do que se pensava, as células NKs não são todas iguais e assumem funções e perfis fenotípicos diferentes a depender do local de atuação. Não o bastante, estão envolvidas em todo o processo gestacional, desde a implantação embrionária até a promoção do parto. Uma estimulação adequada dessas células é fundamental para o sucesso gestacional. Nessa revisão, aprofundaremos nosso entendimento a respeito das células uNKs interagindo com HLA-C através dos receptores do tipo KIR na implantação embrionária; como um desequilíbrio nessa interação KIR-HLA-C pode colaborar com AER e qual a contribuição do método diagnóstico KIR-HLA-C em casos de AER.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Apresentar o papel das células uNK e sua interação com o HLA embrionário no processo de implantação, relacionando com o abortamento espontâneo.

2.1 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Demonstrar o papel das células uNK e sua interação com o HLA embrionário no processo de implantação.

Apresentar as características do método diagnóstico KIR-HLA-C.

Verificar a possibilidade de estabelecer um diagnóstico precoce para evitar a ocorrência de abortos espontâneos relacionados à interação uNK e HLA embrionário.

3 MATERIAL E MÉTODOS

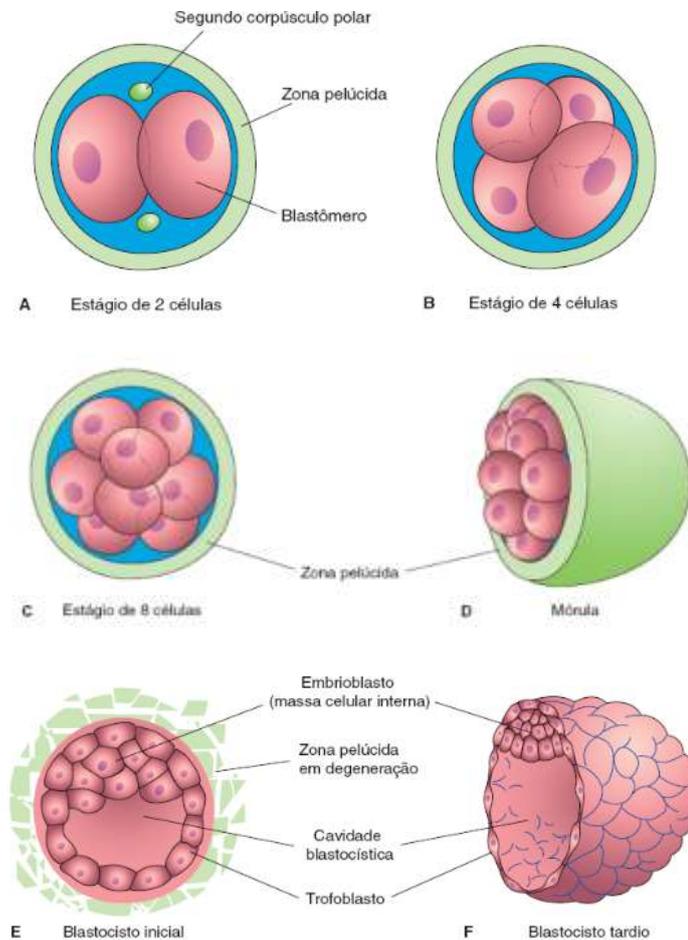
Foi realizada uma revisão narrativa da literatura e um levantamento retrospectivo de dados entre os anos 2021 e 2022. Utilizando as bibliografias nos idiomas português, inglês e espanhol nas bases de dados: LILACS (Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências Sociais e da Saúde), PubMed, Bireme e ScienceDirect, no portal de revista eletrônica Scielo (Scientific Electronic Library Online) e em livros relacionados com os temas envolvendo células uNKs e abortos espontâneos. Para a pesquisa foram utilizados os seguintes descritores: implantação, decídua, antígeno HLA, receptores KIR, células uNKs.

4 DESENVOLVIMENTO

A implantação embrionária é um dos processos envolvidos no desenvolvimento embrionário em uma gestação. Cerca de dez dias após o encontro dos gametas, o blastocisto já está incorporado por completo no estroma uterino e com o local de entrada recoberto por fibrina. Células epiteliais uterinas crescem sobre essa fibrina e a gestação prossegue para as próximas fases do desenvolvimento (MASSIMIANI; LACCONI et al., 2019).

Contudo, até que se chegue a esse ponto, muitos acontecimentos envolvendo endométrio e concepto foram necessários. O zigoto formado na ampola do útero passa por sucessivas divisões mitóticas formando até oito blastômeros, a esse processo damos o nome de clivagem, se inicia 30h após a fertilização e durante todo o processo a zona pelúcida é mantida. Ao alcançar oito blastômeros, as divisões mitóticas continuam e formam de 16 a 32 blastômeros, nessa altura, o concepto recebe o nome de mórula. Durante a formação da mórula ocorre a compactação das células, evento esse que aumenta as interações célula-célula, contribui com a formação de uma massa celular interna e estimula a polarização dos blastômeros em polo apical e basolateral. Cerca de 7 dias após a fertilização a mórula/blastocisto entra no útero e recebe um fluido uterino capaz de ultrapassar a zona pelúcida, promovendo a formação de uma cavidade blastocística. A blastogênese dará origem ao blastocisto. A figura 1 apresenta os estágios do concepto descritos acima. (MEZOMMO, GOMES; et. al, p.44-47, 2022).

Figura 1 – Estágios de desenvolvimento do Conceito até o nível de Blastocisto tardio



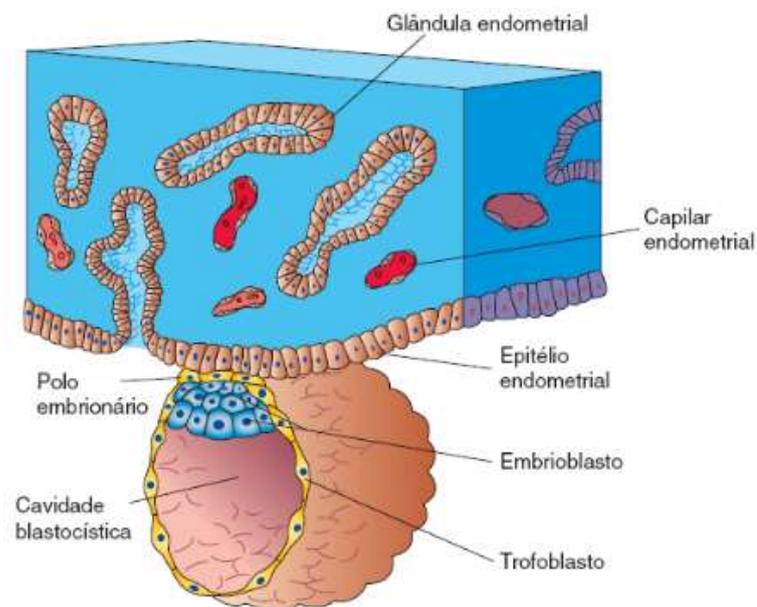
Fonte: Moore, 2022

Em A o início da clivagem; B, quando a divisão alcança o número de 4 células; C, o estágio de 8 células; D, a mórula; E, o blastocisto inicial com a degradação da zona pelúcida e F, blastocisto tardio já sem a zona pelúcida

O blastocisto, possui uma massa celular externa chamada de trofoblasto e uma massa celular interna (ICM), embrioblasto. O trofoblasto dará origem aos anexos embrionários e o embrioblasto, ao embrião. As células trofoblásticas são especializadas e são as primeiras a sofrerem diferenciação, sendo assim, o trofoblasto vai se diferenciar e formar uma camada externa chamada de sinciciotrofoblasto e uma interna, citotrofoblasto, essa possui vilosidades e a região é chamada de trofoblasto viloso, por sua vez, o trofoblasto extraviloso (EVT) é constituído por células que brotam

das vilosidades na invasão embrionária para substituírem as células endoteliais maternas e possibilitarem uma invasão profunda em decídua e miométrio. (WANG, QUALLS; et.al, 2021). A diferenciação do trofoblasto em citotrofoblasto e sinciotrofoblasto acontece a partir da fixação do blastocisto no epitélio endometrial. Antes disso, O blastocisto chega a migrar pelo útero cerca de 2 dias quando finalmente a zona pelúcida degenera e permite que ele cresça e receba nutrição de secreções das glândulas uterinas. O sinciotrofoblasto, uma massa multinucleada fruto de fusões celulares, possui capacidade altamente invasiva e células deciduais participam do controle da invasão promovida por esse tecido. Ao final da primeira semana, o blastocisto está superficialmente implantado no endométrio e recebe nutrição de tecidos maternos. A figura 2 abaixo representa a fixação do blastocisto no epitélio endometrial e a figura 3, a diferenciação do tecido em sinciotrofoblasto e citotrofoblasto (MEZOMMO, GOMES; et. al, p.44-47, 2022).

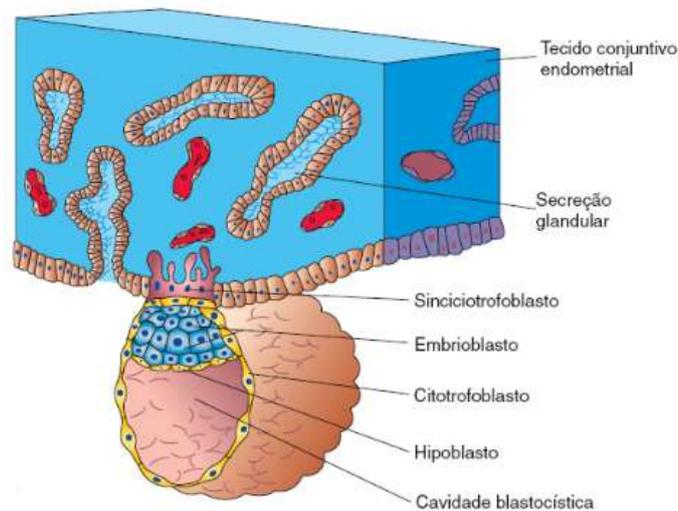
Figura 2 – Fixação do Blastocisto



Fonte: Moore, 2022

Blastocisto com cavidade blastocística fixado ao epitélio endometrial pelo polo embrionário.

Figura 3 – A diferenciação do trofoblasto em sinciotrofoblasto e citotrofoblasto



Fonte: Moore, 2022

Diferenciação do trofoblasto em sinciotrofoblasto (em roxo) e citotrofoblasto (em amarelo). Na imagem, observamos o início da invasão tecidual pelo sinciotrofoblasto.

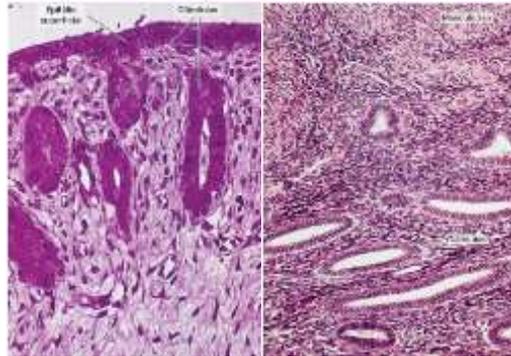
O endométrio, encontra-se receptivo antes mesmo da fertilização acontecer. Além de receptivo, ele é submetido a um processo de remodelamento morfológico e bioquímico para a formação da decídua, um microambiente adequado para abrigar e nutrir o embrião. Esse processo é chamado de decidualização. Com a decídua em desenvolvimento e o blastocisto com a zona pelúcida rompida, o processo de implantação é iniciado na primeira semana e finalizado na segunda semana de gestação. Esse processo possui três estágios: aposição, adesão e invasão, sendo dependente de uma série de interações moleculares presentes na interface materno-fetal chamadas de crosstalk entre endométrio e blastocisto. (MASSIMIANI; LACCONI et al., 2019). A implantação ocorre frequentemente na região superior do corpo do útero em sua parede posterior, mas também pode ocorrer na parede anterior e até em áreas extra útero como nos casos de gravidez ectópica. À medida que o blastocisto penetra o endométrio promovendo o contato entre o trofoblasto e o tecido endometrial,

novas células trofoblásticas passam a se diferenciar em citotrofoblasto, células mononucleadas e mitoticamente ativas que migram para a região de sinciotrofoblasto e se fundem, perdendo suas membranas. Além disso, enquanto ocorre a invasão, células do embrioblasto começam a se diferenciar, formando um disco embrionário bilaminar que dará origem às camadas germinativas de tecidos e órgãos embrionários (MEZOMMO, GOMES; et. al, p.44-47, 2022).

4.1 O ENDOMÉTRIO RECEPTIVO

O endométrio é a camada interna do útero, constituído de um epitélio e uma lâmina própria. Pode ser dividido em duas camadas: basal e funcional, essa segunda camada é mais submetida a mudanças ao longo do ciclo menstrual do que a primeira. A camada basal é formada por epitélio e tecido conjuntivo e a parte inicial de glândulas, enquanto a funcional, possui tecido conjuntivo, desembocadura de glândulas e epitélio superficial. O sangue que nutre o endométrio é proveniente de artérias espiraladas presentes no endométrio, essas se ramificam em artérias retas e espirais, o primeiro tipo irriga a camada basal e o segundo, a camada funcional (JUNQUEIRA e CARNEIRO, p.452, 2017). Quanto à composição celular encontramos, em geral, quatro tipos: estromais, epiteliais, imunes e endoteliais. As células estromais estão presentes em maior número no tecido; as epiteliais são divididas em epiteliais luminais, voltadas para o lúmen; e, as formadoras das glândulas uterinas, voltadas para o miométrio; as endoteliais formam os vasos sanguíneos da região e entre as imunes encontramos: células NKs, macrófagos e linfócitos T, sendo esses boa parte do tipo T reguladores (ASHARY; TIWARI et al., 2018). Abaixo vemos na figura 4 dois cortes histológicos do endométrio em fase proliferativa.

Figura 4 – Corte histológico, endométrio em fase proliferativa



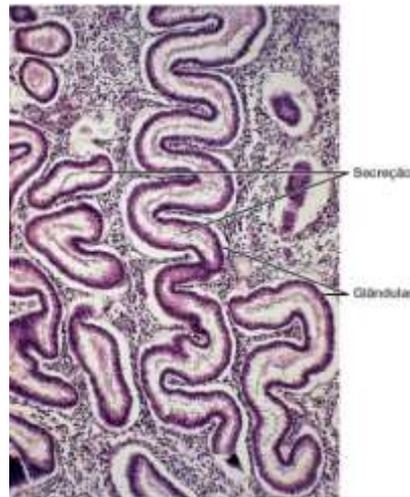
Fonte: Junqueira e Carneiro, 2017

A esquerda um corte histológico de tecido endometrial em fase proliferativa, é possível observar a presença de glândulas e de células epiteliais na parte superior do corte. A direita, um outro corte histológico de tecido endometrial em fase proliferativa que demonstra a hiper celularidade tecidual nesse período, o espessamento do endométrio, a presença de glândulas e células musculares na parte superior.

A refratariedade à implantação do endométrio está presente durante todo o ciclo menstrual, sendo alterada por investidas hormonais de estrogênios, progesterona e hormônios tireoidianos que tornam o endométrio receptivo na fase secretora (20°-24° dia do ciclo, cerca de 6 a 10 dias após um pico de hormônio luteinizante) (MASSIMIANI; LACCONI et al., 2019). Na fase proliferativa do ciclo há um crescimento de células epiteliais e de glândulas promovido pela ação de estrogênios, já na fase secretora, a progesterona atua nas células epiteliais e glandulares, potencializando esse crescimento e promovendo o armazenamento de glicogênio ao redor do núcleo, as glândulas se tornam tortuosas e o resultado é um endométrio espesso (JUNQUEIRA e CARNEIRO, p.453, 2017). Esse período de receptividade é chamado de Janela de Implantação ou Janela de Receptividade (WOI) e dura cerca de três a cinco dias. Durante a Janela de Receptividade, o endométrio receptivo possui epitélio luminal pseudoestratificado, colunar e polarizado com saliências apicais chamadas pinopodes; as glândulas, aumentam de tamanho, potencializam a secreção e tornam-se cilíndricas. O estroma, por sua vez, fica edematoso e mais vascularizado conforme representado pela figura 5. Quanto a assinatura molecular endometrial, essa é similar à lesão tecidual com resposta inflamatória e ativação da via do complemento (ASHARY; TIWARI et al., 2018).

Análises realizadas em endométrios de mulheres inférteis ou com falha recorrente de implantação demonstraram resposta inflamatória insuficiente e inibição da via do complemento nessa fase (MASSIMIANI; LACCONI et al., 2019).

Figura 5 – Corte histológico de tecido endometrial em fase secretora



Fonte: Junqueira e Carneiro, 2017

O corte histológico de tecido endometrial em fase secretora apresenta glândulas sinuosas e maiores do que na fase proliferativa, ocupando boa parte do tecido, e a presença de secreção na parte interna das glândulas. Também é possível observar a hiperplasia tecidual pela pigmentação de inúmeros núcleos no corte.

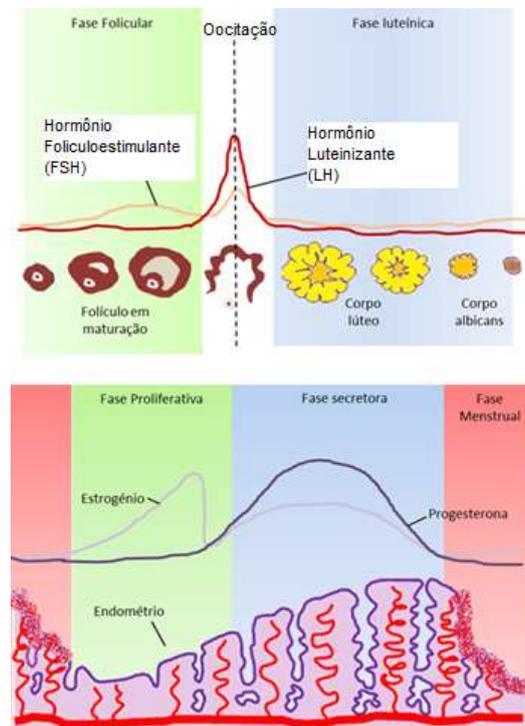
4.2 A DECÍDUA COMO UM TECIDO DE PROTEÇÃO AO INVASOR

O processo de decidualização começa na fase lútea e é desencadeado pela chegada do conceito à cavidade uterina com a produção de gonadotrofina coriônica humana (hCG) pelas células trofoblásticas o que mantém o corpo lúteo secretando progesterona e mantendo os níveis do hormônio até que a placenta e sua produção hormonal sejam estabelecidas (figura 6) (NG; et al., 2020). A reação decidual forma a decídua, um tecido com microambiente adequado para abrigar e nutrir o embrião. Na decídua, o estroma assume função secretora e as células estromais semelhantes a fibroblastos tornam-se células chamadas deciduais com funcionalidade epitelial. (ASHARY; TIWARI et al., 2018). Em relação as células estromais deciduais (dSC) que formam a maior parte desse tecido, já foram descritos

três subconjuntos: dS1, dS2, dS3 (WANG, QUALLS; et.al, 2021). Essas secretam novas moléculas e promovem modificações epigenéticas, atenuação do repertório imunológico com uNKs menos citotóxicas, linfócitos em número reduzido e com perfis de resposta do tipo regulador, influxo de uNKs e remodelação vascular. A decídua tem assinatura de metilação capaz de silenciar a transformação de células T frente ao trofoblasto, atenuação do sistema imunológico importante para evitar a rejeição fetal e finalizar a implantação. As dSCs estão envolvidas com o influxo de células uNKs produtoras de citocinas e quimiocinas pró-invasivas o que contribui com o sucesso da implantação embrionária (ASHARY; TIWARI et al., 2018). Não o bastante, participam do processo de educação de células NK em que há interação entre receptores inibitórios e moléculas MHC próprias. (WANG, QUALLS; et.al, 2021).

Assim como o endométrio receptivo se assemelha a um tecido lesado e inflamado, reduzindo a refratariedade do epitélio endometrial e recebendo o embrião, a decídua tem perfil inflamatório potencializado, permitindo a conclusão desse processo e criando ativamente um ambiente protetor ao embrião invasor para que a gestação possa progredir. A decidualização é considerada, inclusive, uma fase de diferenciação celular em resposta ao estresse oxidativo e metabólico gerado no tecido principalmente por investidas de progesterona e o hormônio gonadotrofina coriônica secretado pelo sinciciotrofoblasto. O processo tem como produto células deciduais resistentes a esse estresse, proliferação de células uNKs e células senescentes agudas. Essas últimas são resistentes a progesterona e possuem fenótipo secretor associado à senescência (SASP), ou seja, secretam citocinas pró-inflamatórias, proteinases e quimiocinas que promovem senescência secundária em outras células deciduais e inflamação estéril no tecido, contudo, as células deciduais sensíveis a progesterona secretam Interleucina-15, uma molécula envolvida no recrutamento e ativação de células uNKs que por meio de exocitose e liberação de grânulos contendo perforina e granzima eliminam células deciduais senescentes (CHOW, ORDOÑEZ; et. al, 2020). Com a aposição embrionária e a liberação de Gonadotrofina Coriônica e Interleucina-1beta pelo embrião, observamos uma reação na placa epitelial que potencializa a inflamação presente no endométrio, demonstrando a influência exercida pelo embrião nas transformações endometriais e a importância do processo inflamatório no início de uma gestação (ASHARY; TIWARI et al., 2018).

Figura 6 – O ciclo menstrual, a regulação hormonal e alterações no endométrio



Fonte: Adaptado de Metis Med, 2016

Na fase folicular vemos o folículo em maturação até a liberação do oócito quando há um pico de hormônio luteinizante, em paralelo temos a fase proliferativa com acréscimos de estrógeno iniciando as alterações endometriais. Com o corpo lúteo presente, acréscimos de progesterona são observados, assim como alterações endometriais características da decidualização: endométrio espesso, aumento no número de glândulas e maior vascularização, essas alterações correspondem à fase secretora. Por fim, é possível observar a menstruação, com a queda dos níveis de progesterona e descamação do endométrio.

4.3 A IMPLANTAÇÃO

Após a fertilização e segmentação, o blastocisto precisa encontrar um local de implantação apropriado na cavidade uterina. Para isso o blastocisto executa, na parede do útero, um processo chamado de rolamento, o qual está representado na figura 7, parte A. As microvilosidades das células embrionárias são recobertas por glicocálice embrio-uterino ancorado (zona pelúcida) formado por L-selectina que interage fracamente com oligossacarídeos presentes na parede uterina, essa interação fraca promove um rolamento e não fixação (ASHARY; TIWARI et al., 2018).

Com a eclosão da zona pelúcida e exposição do trofotoderma, uma camada celular que delimita externamente o blastocisto, há um primeiro contato com o endométrio. As microvilosidades do trofotoderma se interdigitam com os pinopodes das células deciduais endometriais. Os pinopodes secretam LIF (Fator Inibitório de Leucemia), uma citocina pertencente à Família IL-6 que ativa a via de sinalização JAK/STAT. A fosforilação de STAT3 como resposta a ativação da via favorece a implantação. A eclosão da zona pelúcida depende de um corte na região e estudos apontam para a ação de proteases como serina, cisteína e metaloproteases nesse processo (MASSIMIANI; LACCONI et al., 2019).

No polo de aposição, foram observados níveis de MUC-1 (Glicoproteína Transmembrânica Mucin 1) reduzidos, aumento de integrinas alfaV e beta3; e menor expressão de HOXA10 (Fator de transcrição endometrial). Essas alterações são reações locais e por isso estão sendo consideradas como uma possível sinalização do melhor local de implantação para o embrião. Os mecanismos para essa reação local ainda não foram completamente elucidados, uma vez que a secreção de hCG e IL-1beta pelo embrião promovem mudanças uniformes (ASHARY; TIWARI et al., 2018). Outra observação é a orientação da massa celular interna (ICM) do blastocisto sempre voltada para a parede uterina, orientação essa que se relaciona com o local de fixação do trofotoderma e com o desenvolvimento das membranas fetais e estruturas placentárias. Os estudos demonstram que essa orientação depende apenas de sinais do endométrio, uma vez que contatos, células, bolhas ou outros elementos com formato similar ao de um embrião fixam na mesma posição (MASSIMIANI; LACCONI et al., 2019).

Nesse processo de aposição o endométrio também realiza uma análise em relação a competência do embrião, avalia a capacidade de implantação. (MASSIMIANI; LACCONI et al., 2019). Um exemplo é a liberação de microRNAs do tipo miR-166 liberado pelo embrião e reconhecido pelo endométrio como um blastocisto de desenvolvimento incompetente por reduzir a adesão entre endométrio e tecido fetal (ASHARY; TIWARI et al., 2018).

Após a aposição do blastocisto, o trofocotoderma e o endométrio em resposta aos estímulos gerados pelo contato entre eles passam a expressar moléculas de adesão (MASSIMIANI; LACCONI et al., 2019). O trofocotoderma expressa integrina alfa-v-beta3, OPN, L-selectina, E-caderina que se ligam a OPN, integrina alfa-v-beta3, HECA-452, MECA-79, E-caderina e CD98 receptores expressos pelo endométrio como representado pela parte B da figura 7 (MASSIMIANI; LACCONI et al., 2019).

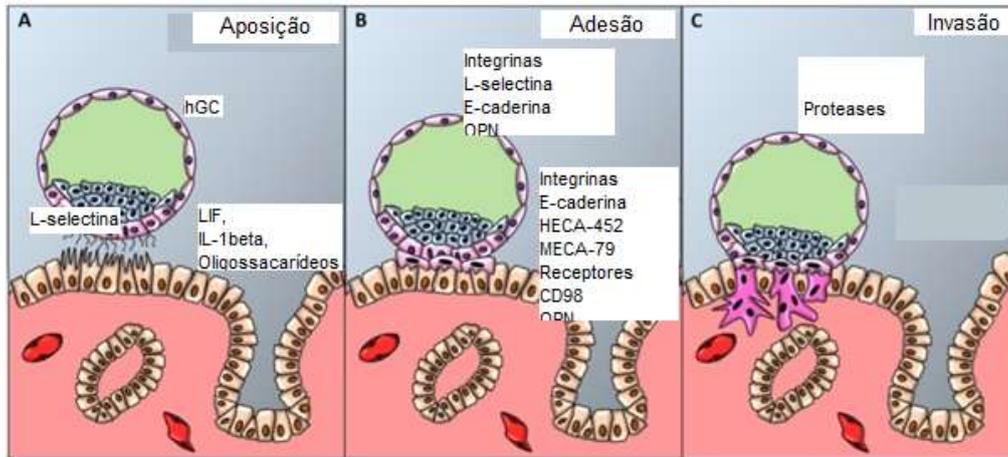
Além disso, o embrião secreta vesículas extracelulares contendo lipídios, proteínas, DNA, RNAm e microRNA. Essas vesículas se fundem com as células endometriais e transportam para o citoplasma as substâncias presentes. Os microRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes que se ligam ao RNA mensageiro alvo e regulam a expressão gênica, os genes alvo regulados são genes de adesão e migração, dessa forma tornam o endométrio mais propenso à implantação (ASHARY; TIWARI et al., 2018). Ao longo de todo esse processo de adesão, proteases começam a ser produzidas preparando o ambiente para a invasão (MASSIMIANI; LACCONI et al., 2019).

A invasão é o fenômeno da implantação mais longo, porém o menos compreendido. Sabemos que proteases trofoblásticas e outras moléculas colaboram com o enfraquecimento da adesão entre as células epiteliais, tais moléculas desfazem junções comunicantes laterais e apicais, reduzem a polaridade celular e reduzem a expressão de E-caderinas nas bordas apicolaterais nas regiões de implantação. Contudo, não sabemos se essas proteases são o suficiente para a invasão tecidual. Foi descrito que o embrião produz lisofosfolipídios como lisofosfatidilcolina (LPC) que na presença de autotaxina é convertido em ácido lisofosfatídico (LPA), um mediador lipídico que enfraquece a barreira epitelial. O endométrio expressa a autotaxina assim como o receptor de LPA (LPAR3). Experimentos realizados em camundongos Nocaute LPAR3 ou negativos para a expressão de autotaxina, não suportaram a implantação e apresentaram aumento na expressão de E-caderina. Esses achados reforçam a ideia de que LPA quando reconhecido pelo endométrio, enfraquece a barreira epitelial. Outra ideia que tem sido considerada no processo de invasão é a remoção física das células epiteliais por apoptose no local de implantação. Contudo,

estudos recentes estão apontando a ausência de marcadores de apoptose e/ou autofagia. Diante disso, propuseram a entose como sendo um fenômeno possível na invasão embrionária. A entose consiste no englobamento de células epiteliais por células trofoblásticas como uma espécie de canibalismo. As NKs também estão envolvidas no processo de invasão através da produção de citocinas e quimiocinas pró-invasivas. Camundongos com falha em decidualização, apresentam deficiência na presença de células NK deciduais e no processo de implantação (ASHARY; TIWARI et al., 2018).

O processo de invasão pode ser dividido em: invasão intersticial e invasão endovascular. A invasão intersticial consiste na infiltração de células trofoblásticas na membrana basal (Figura 7, parte C) e no estroma, enquanto na invasão endovascular, as células migram para o lúmen das artérias espiraladas maternas e permitem a substituição de vasos de pequeno calibre e alta resistência por vasos de grande calibre e baixa resistência, alteração importante para garantir o suprimento sanguíneo para a unidade feto placentária. Comprometimentos nesse processo podem prejudicar a função placentária (MASSIMIANI; LACCONI et al., 2019). À medida que o sinciciotrofoblasto invade a decídua, lacunas são formadas no tecido e posteriormente preenchidas por sangue materno e restos celulares glandulares e é por difusão que oxigênio e nutrientes chegam aos tecidos extraembrionários. A essa comunicação damos o nome de circulação uteroplacentária primordial (MEZOMMO, GOMES; et. al, p.44-47, 2022). Uma superinvasão torna-se um ponto crítico no processo e por isso, o corpo trabalha em busca de um equilíbrio na expressão de fatores de crescimento, citocinas e enzimas por parte do trofoblasto e do endométrio de forma que a invasão do blastocisto seja controlada, evitando a superinvasão. Um aumento na produção de inibidores teciduais por parte do endométrio como MMPs e TIMPs limitam a degradação da matriz extracelular (MEC) (MASSIMIANI; LACCONI et al., 2019).

Figura 7 – Fases da Implantação embrionária



Fonte: Adaptado de Massimiani, 2019

Em A vemos a fase de aposição em que o blastocisto rola pelo endométrio em busca do local de aposição, o trofoblasto expressa L-selectina e produz hGC enquanto a decídua secreta LIF, IL-1beta e expressa Oligossacarídeos. Em B, temos a ilustração da adesão e as moléculas de adesão envolvidas expressas pelo trofoblasto e pelo tecido materno. Em C, temos o início da invasão mediante a secreção de proteases.

4.4 O PAPEL DAS CÉLULAS UNKS E SUA RELAÇÃO COM O MICROAMBIENTE

As células Natural Killer (NK) compõem a imunidade inata, induzem apoptose em células sob estresse, como é o caso de tumores e células infectadas. A indução da morte celular ocorre mediante liberação de grânulos citoplasmáticos contendo citocinas indutoras de apoptose no ponto de contato entre NK e célula alvo (ABBAS et al., p.48, 2021). Por essa razão, durante muito tempo foram encaradas como um grande conjunto de células que compartilhavam as mesmas funções citotóxicas independentemente do tecido de atuação. Foi exatamente pela ação citotóxica frente a células danificadas e infectadas que receberam o nome de Natural Killer, matadoras naturais em sua tradução mais simples. Contudo, análises genóticas demonstraram diferenças entre as moléculas de superfície dessas células e mais de 10 mil subgrupos foram encontrados, indicando que essas células podem assumir perfil fenotípico distinto a depender do tecido de localização, do receptor que expressam e do tipo de ligação que esses receptores podem realizar (ALECSANDRU; GARCÍA-VELASCO, 2017). As células NK pertencem a família de Células Linfóides Inatas (ILCs) e por isso não dependem da enzima RAG para o rearranjo somático de

seus receptores o que contribui para que essas células apresentem respostas rápidas contra infecções e danos ao DNA, não precisam ser sensibilizadas como acontece com Linfócitos T e B, possuem um repertório de receptores pré-estabelecido (SOJKA, YANG; et.al, 2019).

As células NKs estão presentes em diferentes tecidos como sangue periférico, órgãos linfóides secundários, endométrio e decídua (FRÍAS et al., 2021). As diferenças genótípicas e fenótípicas entre essas células contribuem para atuações distintas, a depender do tecido que se encontram e do estímulo que recebem, as células NKs presentes no endométrio, por exemplo, induzem invasão trofoblástica, remodelação tecidual, desenvolvimento embrionário e placentação; inclusive, se ativadas prematuramente no final da gestação podem estimular um parto prematuro com a quebra da tolerância imunológica na interface materno-fetal. Diante do exposto, será necessário desmistificar a ideia de que células NKs são apenas matadoras profissionais (ZHANG; WEI, 2021). Os 10 mil subgrupos de células NKs encontrados podem ser classificados em dois tipos: as células NKs presentes no sangue periférico (pbNK ou pNK), essas também podem ser chamadas de cNK (NK convencionais); e as células em tecidos periféricos, células NK residentes em tecido (trNK) (ZHANG; WEI, 2021).

As pNKs são formadas por dois subtipos: um com maior potencial citotóxico de fenótipo CD3-/CD56dim/CD16+ e outro com menor potencial citotóxico cujo fenótipo é CD3-/CD56bright/CD16- (ZHANG; WEI, 2021). A densidade de expressão da molécula CD56 (Molécula de adesão de células neurais) e a ausência ou presença do receptor tipo III da região Fc de baixa afinidade da imunoglobulina G – CD16 (FcGamIII) norteiam essa classificação e influenciam no perfil citolítico das células (FRÍAS et al., 2021, p.5). CD16 é um receptor que participa da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) (GUERRERO, HASSOUNEH, et.al; 2020). Esse receptor é capaz de reconhecer imunoglobulinas G (IgG) e, portanto, identifica células cobertas por anticorpos, reconhece e ativa NK para indução de apoptose, esse processo configura ADCC e torna a célula que expressa tal receptor mais citotóxica (ABBAS et al., p.48, 2021). Enquanto células com CD56 em baixa expressão e presença de CD16 possuem perfil citolítico, as células com CD56 em alta expressão

e ausência de CD16 possuem potente atividade proliferativa e secreção de citocinas imunorreguladoras (GUERRERO, HASSOUNEH, et.al; 2020). As células NK de perfil citolítico representam de 90 a 95% das células pNKs (FRÍAS et al., 2021), os outros 5-10% são do segundo tipo e, por isso, as pbNKs são consideradas heterogêneas (ALECSANDRU; GARCÍA-VELASCO, 2017). As células CD3-/CD56bright/CD16-, também possuem atividade citolítica como o outro perfil, contudo, essa atividade é fraca (ZHANG; WEI, 2021).

Quanto as trNKs, pertencem basicamente ao subconjunto considerado menos citotóxico de fenótipo CD3-/CD56bright/CD16-, estão presentes no fígado, pulmão, útero e pele. Apresentam alta expressão de marcadores CD69, CD103 e CD49a. As NKs uterinas (uNKs) ou também chamadas NKs decíduais (dNK) fazem parte desse conjunto como células especializadas com características únicas. (ZHANG; WEI, 2021). Em resumo, as NKs presentes no sangue periférico, parecem apresentar perfil citolítico potente, enquanto, as NKs teciduais apresentam uma atenuação nessa característica com uma atividade citotóxica fraca quando comparada ao primeiro grupo celular, contudo, a maquinaria citolítica permanece presente nessas células (FRÍAS et al., 2021).

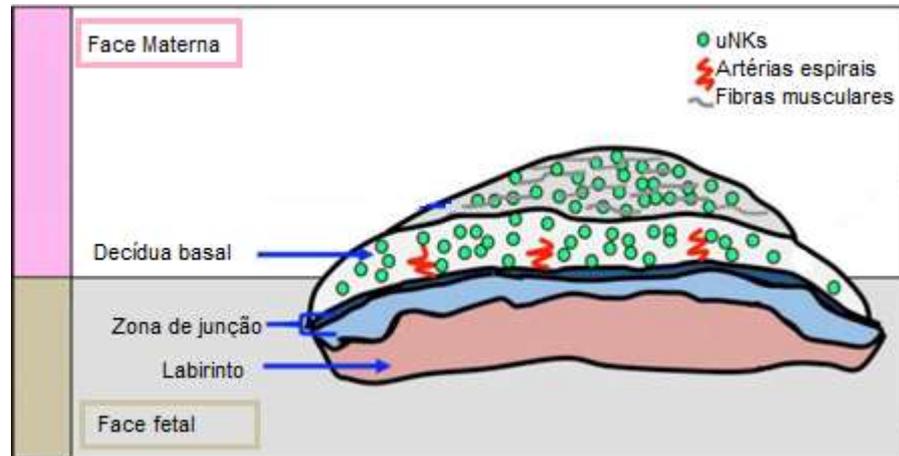
4.4.1 As uNKs e a decídua

As células uNKs estão presentes no útero e podem ser chamadas de dNKs, uma vez que se concentram na mucosa. Em geral, expressam em sua superfície CD45, CD56 em alta expressão e ausência de CD16, essas moléculas funcionam como marcadores para essas células. Cinco subconjuntos foram encontrados para células dNKs, sendo eles: dNK1, dNK2, dNK3, dNK em proliferação (dNKp) e Células Linfóides Inatas 3s (ILC3s). O subconjunto dNK1 é o maior e representa 55% da população celular de dNKs, esse subconjunto expressa receptores semelhantes a imunoglobulina de células Killer (KIR), esses receptores possuem como ligantes HLAs de Classe I tanto maternos quanto fetais, sendo os maternos, HLA-A; HLA-B; HLA-C; HLA-E e os fetais, HLA-C; HLA-E ou HLA-G. (WANG, QUALLS; et.al, 2021). As moléculas de HLA (Antígeno Leucocitário Humano) são complexos proteicos presentes em seres humanos e podem desempenhar diferentes funções, desde apresentação de antígenos até ligantes importantes para ativação ou

inibição de vias de sinalização, são um tipo de MHC (Major histocompatibility Complex) (FRÍAS et al., 2021). Ainda que as dNK1 representem o maior subconjunto, foi observado que dNK2 e dNK3 secretam mais citocinas e quimiocinas quando estimuladas em comparação a dNK1. As citocinas secretadas são principalmente: GM-CSF (Fator estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos) e XCL1 (Linfonotactina alfa) que interagem com o EVT (WANG, QUALLS; et.al, 2021).

A interface materno-fetal é a região em que há comunicação entre decídua basal e células trofoblásticas invasoras, ou seja, nesse território há um componente materno e um componente fetal, esse contato entre entidades alogênicas é considerado o maior paradoxo da imunologia (Figura 8) (SOJKA, YANG; et.al, 2019). A decídua basal possui diferentes células imunes no primeiro trimestre de gestação, como macrófagos; linfócitos T, principalmente T reguladores; e as dNKs. Essas representam 70% da população de células imunes (ZHANG; WEI, 2021). Contudo, essa proporção não é sempre assim, as dNKs conquistam essa porcentagem ao longo do ciclo menstrual e atingem seu número máximo na gravidez sob investidas de progesterona e secreção de Interleucina-15 por células estromais deciduais (FRÍAS et al., 2021). Quando a gestação alcança o momento do parto, um declínio na população de dNKs é observado (Figura 9) (SOJKA, YANG; et.al, 2019). Essas células podem chegar a 70% da população de células imunes na decídua a partir de dois fenômenos: migração de células presentes no sangue periférico e a proliferação de células residentes ao longo do ciclo menstrual (FRÍAS et al., 2021). A proliferação de uNKs residentes no endométrio é mais evidente no início da gestação e a migração de pNKs parece contribuir significativamente a partir do início da placentação (SOJKA, YANG; et.al, 2019).

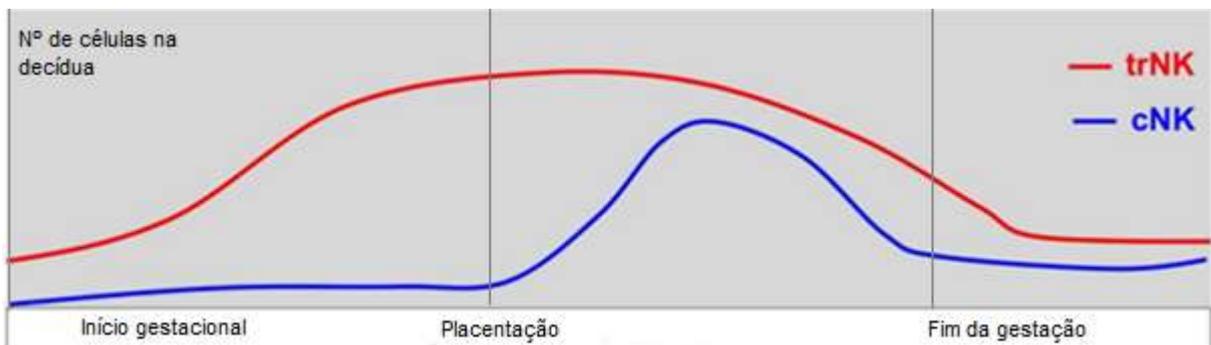
Figura 8 – Interface materno-fetal e a presença de uNKs



Fonte: Adaptado de Sojka, 2019

Vemos na imagem a face materna com células uNK na região de interface, próximas a artérias espirais. O esquema foi elaborado baseado em estudo de gestações em murinos, sendo assim, em rosa observamos o labirinto presente nessas gestações.

Figura 9 – A proliferação de NKs ao longo da gestação em murinos



Fonte: Adaptado de Sojka, 2019

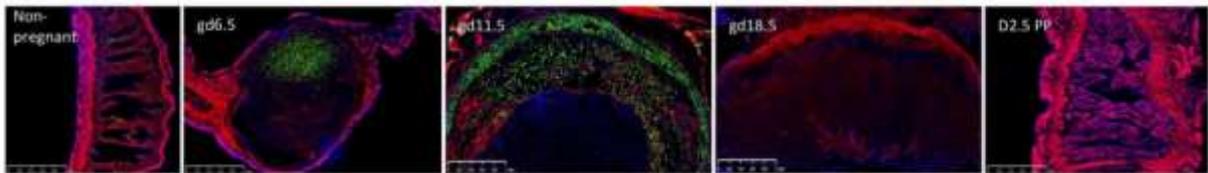
No esquema vemos o aumento no número de células NK residentes teciduais (em vermelho) no início da gestação em murinos, representando um envolvimento significativo desse tipo celular no processo de implantação. Posteriormente observamos o aumento de NKs circulantes (em azul), indicando uma participação mais significativa desse tipo celular após a implantação, com o início da placentação. É possível notar que ao final da gestação, ambas as células apresentam uma queda significativa, demonstrando a redução dessa população no momento do parto.

No primeiro fenômeno, as células uNKs chegam ao endométrio quando estimuladas quimiotaticamente por moléculas produzidas pelas células decíduais quando em contato com células trofoblásticas. Também pode haver migração de progenitores medulares de uNKs que finalizam a diferenciação celular quando submetidos a interleucina-15 (IL-15) produzida pelo estroma endometrial em acréscimos de progesterona no período de ovulação e no início da gravidez (FRÍAS et al., 2021). As dSCs promovem migração celular através da produção de quimiocinas do tipo CXCL10/IP-10, CXCL11 e CXCL12/SDF 1 que se ligam aos receptores CXCR3 e CXCR4, expressos por pNKs e dNK3, atraindo-as. As células SCs também expressam receptores LGALS9, CLEC2D e CXCL14 que se ligam a TIM3, KLRB1 e a outros receptores desconhecidos de NKs (WANG, QUALLS; et.al, 2021). Alguns estudos demonstraram que a população de pNKs circulantes aumenta ao longo da gravidez, acontecimento esse que fortalece a ideia de que pNKs podem migrar para o útero e sofrerem adaptação quando expostas a citocinas específicas. O endométrio decidualizado está intimamente relacionado com esse processo, as dSC demonstraram capacidade de produzir in vitro TGF-gama (Fator de transformação do Crescimento-gama), IL-15 e Interleucina-18, citocinas que induzem a expressão de CD9, CD49a, CD103, CXCR3, CXCR4 em pNKs tornando-as dNKs. As células dS1 secretam IGF-1 (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1), enquanto dS2, IL-15. A IL-15 é uma citocina envolvida no processo de diferenciação e amadurecimento de precursores hematopoiéticos. Além de induzirem alterações fenotípicas, as dSC produzem mudanças de função, através de TGF-gama de ação imunossupressora que regula negativamente a citotoxicidade e secreção de IFN-gama (Interferon-gama) em dNKs, IFN-gama está envolvida com mudanças vasculares no tecido endometrial (WANG, QUALLS; et.al, 2021).

No segundo fenômeno, a população de uNKs no endométrio varia conforme os acréscimos de progesterona no ciclo menstrual sendo que durante a fase secretora a proliferação dessas células é aumentada. Após o período ovulatório, caso não haja gravidez, as células uNK entram em apoptose com a redução da progesterona e são eliminadas junto com o endométrio nos dias de menstruação, reduzindo a população dessas células no estroma endometrial (FRÍAS et al., 2021). Esse fenômeno indica a existência de uma adaptação do repertório no período gestacional, sendo assim a quantidade de uNKs no tecido não é constante (Figura 10)

(ALECSANDRU; GARCÍA-VELASCO, 2017). Caso haja gravidez, a população de uNKs aumenta na decídua basal, essas se concentram em regiões próximas ao sítio de implantação e chegam a compor 70% da imunidade inata presente na decídua, 20% é constituída de macrófagos (FRÍAS et al., 2021). No útero também podemos encontrar células tronco residentes que adquirem características de células uNKs quando expostas a TGF-beta (WANG, QUALLS; et.al, 2021).

Figura 10: Proliferação de uNKs ao longo da gestação murina



Fonte: Sojka, 2019

No primeiro quadrante temos o útero não gravídico com uma quantidade de uNKs reduzidas, no segundo quadrante e no terceiro, é possível perceber um aumento no número dessas células (em verde) que começam a reduzir a partir da placentação (terceiro quadrante), chegando a quase zero no quarto quadrante que representa o parto. Por fim, o tecido após o parto com quantidade de uNKs similar ao do primeiro quadrante. As imagens são de gestações murinas e a sigla gd corresponde ao dia de gestação.

As uNKs, como mencionado anteriormente, possuem fenótipo e funcionamento único quando comparadas à pNKs e trNKs a começar por um potencial citotóxico reduzido pela incapacidade de polarizar grânulos para a sinapse imune (WANG, QUALLS; et.al, 2021). Ainda que sejam menos citotóxicas, carregam uma maquinaria citolítica assim como as pNKs, indicando que sua capacidade citotóxica pode ser ativada em situações de alteração do microambiente uterino, podendo ser uma alteração favorável ao contexto ou não (FRÍAS et al., 2021). Outras diferenças significativas são a expressão seletiva de receptores, grânulos três vezes maiores do que os grânulos de pNKs e a secreção de citocinas específicas (WANG, QUALLS; et.al, 2021).

As uNKs produzem citocinas e quimiocinas importantes para a implantação, são exemplos: Interferon-gama; Fator de Necrose Tumoral – alfa; Interleucina-12; Interleucina-15 e Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos, fator de crescimento endotelial vascular A e C; e fator de crescimento placentário, os dois últimos fatores regulam a angiogênese durante a placentação, IL-

8 contribui com a migração do citotrofoblasto enquanto FNT-alfa e IF-gama inibem essa migração, também são fonte de GM-CSF, CSF-1 e fatores inibitórios leucêmicos que regulam a implantação. Estão envolvidas no processo de diferenciação dos linfócitos T em Linfócitos T reguladores o que contribui com a tolerância imunológica entre o organismo materno e o embrião (FRÍAS et al., 2021). Além de contribuírem diretamente com o processo de implantação e com a remodelação vascular durante a placentação, estudos demonstram que as uNKs estimulam diretamente o crescimento fetal através da produção de Fatores promotores de crescimento como pleiotrofina, osteoglicina e osteopontina. Essas células regulam o processo de vascularização e o desenvolvimento placentário por meio da ação de receptores inibidores e ativadores que respondem ao HLA-I fetal. Não o bastante, células do tipo NK decíduais treinadas na gravidez (PTdNK) foram encontradas nas decíduas de gestações repetidas e parecem conferir uma resposta de memória com ação protetora em gestações subsequentes, auxiliando no processo de vascularização (SOJKA, YANG; et.al, 2019).

Diferentemente das pNKs, essas células possuem um único repertório de receptores KIR que interagem com o HLA expresso pelo trofoblasto extraviloso (FRÍAS et al., 2021). Compreender a interação das células uNKs com seus receptores é fundamental, uma vez que sua ativação ou inativação é definida por um balanço entre receptores ativadores e/ou inibidores ativados, prevalecendo o estímulo mais acentuado (ABBAS et al., p.48, 2021). O único repertório de KIR pode ser remodelado quando estimulado por agentes infecciosos como foi identificado em mulheres infectadas por Citomegalovírus (CMV). A infecção promove alteração fenotípica em uNKs tornando-as mais citotóxicas contra fibroblastos decíduais infectados, contudo, essa remodelação não foi observada contra o embrião saudável. Esse fator somado à atividade auxiliadora das uNKs na implantação e na remodelação das artérias espirais, processo importante na placentação, faz da alta concentração de uNKs na decídua um processo fisiológico necessário para uma gestação bem-sucedida e não um marcador de rejeição embrionária como tem sido encarado nos últimos anos (ALECSANDRU; GARCÍA-VELASCO, 2017).

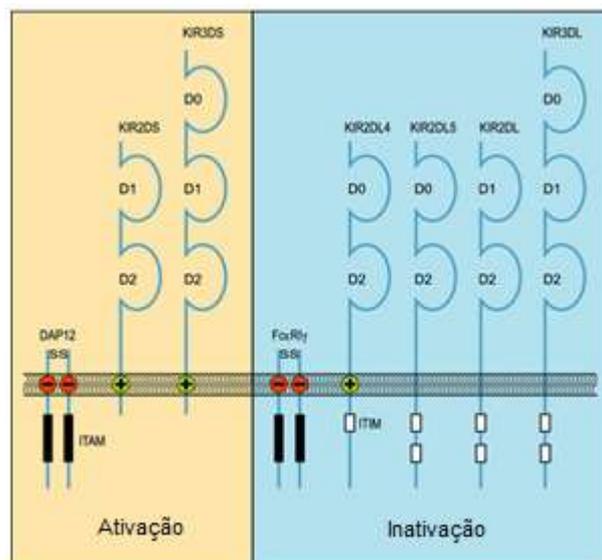
4.4.2 As uNKs e seus receptores KIRs

Como vimos, os receptores KIR estão intimamente relacionados com o funcionamento e modulação das células uNKs conforme promovem ativação ou inibição quando em contato com seus ligantes HLA-I. Os receptores do tipo Killer immunoglobulin-like receptor (KIR) podem ser encontrados principalmente em células NK, tanto as do tipo decíduais quanto as periféricas, e em alguns linfócitos T (FRÍAS et al., 2021). Formam uma família de glicoproteínas de membrana e estão envolvidos no processo de modulação de respostas de NKs (YA et al., 2020). Esse envolvimento acontece em duas circunstâncias, com as células NKs em estado de repouso e em estado imunológico, quando as células estão em estado de repouso são submetidas a um processo chamado Educação de Células NKs em que a ativação de KIRs inibitórios diante de ligantes específicos e próprios do tecido materno, conduz as células a um estado funcional; quando estão em estado imunológico a ativação ou inibição celular mediada por KIRs ativadores e inibidores modula a capacidade dessas células reagirem diante dos estímulos (YANG, YANG; et. al, 2020). É importante ressaltar que as células NK possuem um repertório de receptores estocado, isso significa que podem expressar receptores inibitórios e de ativação diferentes simultaneamente o que confere a elas a capacidade de responderem a estímulos variáveis, esses repertórios são formados a partir de haplótipos herdados (SOJKA, YANG; et.al, 2019).

As sequências gênicas para KIR estão localizadas no Complexo Receptor de Leucócitos (LRC) do Cromossomo 19 (19q13.4). O Locus KIR conta com 14 genes e dois pseudogenes (KIR2DP1 e KIR3DP1). Os receptores KIR possuem dois ou três domínios extracelulares, um domínio transmembranar e uma região citoplasmática. Didaticamente são classificados de acordo com a resposta que estimulam quando acoplados a seus ligantes, sendo receptores do tipo inibidor: KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3 e do tipo ativador: KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DS1. O nome que esses receptores recebem diz muito sobre a estrutura molecular que carregam. O primeiro número do nome (2 ou 3) seguido da letra D informa a quantidade de domínios extracelulares presentes em tal receptor. A segunda letra presente no nome aponta para a extensão da região citoplasmática dos receptores.

Receptores do tipo L (large), possuem hastes intracelulares compridas, enquanto os que carregam a letra S (Small) no nome, possuem cadeias curtas. De forma geral, podemos dizer que os receptores do tipo S possuem função ativadora, enquanto, os do tipo L, função inibitória, com exceção apenas de KIR2DL4 que ao ser expresso em endossomos pode interagir com HLA-G e proporcionar ativação celular, essa por sua vez não ativa o potencial citotóxico de NKs, mas eleva a síntese de citocinas que contribuem para o desenvolvimento placentário. A ativação de células NK por receptores KIR de hastes curtas é mediada por moléculas sinalizadoras do tipo DAP12 (ou FcγRly) e Tirosina do Imunorreceptor (ITAM), enquanto os de hastes longas produzem resposta inibitória baseada em tirosina do imunorreceptor citoplasmático (ITIMs) que recrutam tirosina fosfatase (Figura 11) (FRÍAS et al., 2021).

Figura 11 – Receptores KIR inibitórios, de ativação e seus domínios



Fonte: Adaptado de Ronald, 2015

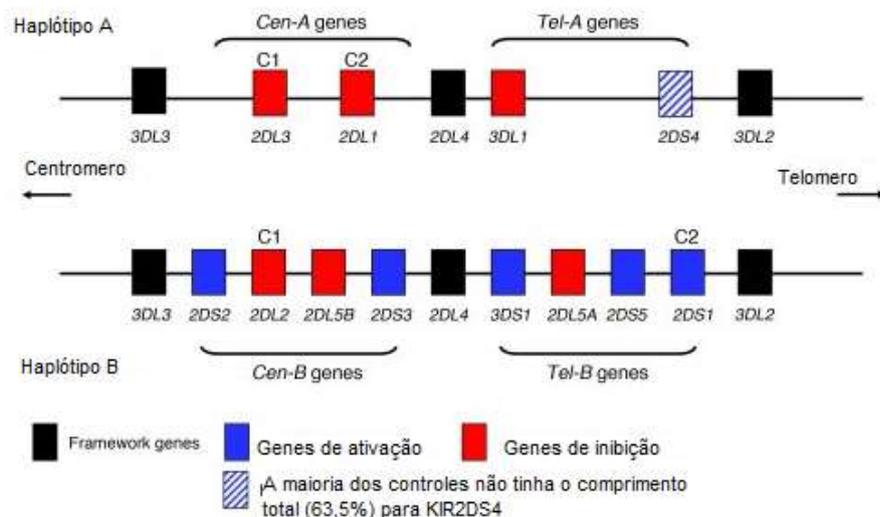
A esquerda temos a representação de dois receptores KIRs de ativação com seus respectivos domínios, a esquerda dos receptores as moléculas envolvidas com a via de sinalização. A direita, a representação de alguns receptores KIRs inibitórios e a via de sinalização baseada em tirosina.

Os genes KIR dispostos no Cromossomo 19 possuem conteúdo gênico variável, essa variabilidade é capaz de alterar a expressão, afinidade por HLA-I e mecanismos de sinalização mediados por esses receptores. Seus genes são

agrupados em haplótipos, portanto, herdados em conjunto. Além disso, são considerados genes framework por possuírem padrões gênicos diferentes, padrões esses conservados na maioria dos indivíduos (FRÍAS et al., 2021). Devido ao exposto, espera-se que os KIRs expressos pelas uNKs maternas sejam distintos a cada gestação assim como o HLA-C expresso pelo embrião, uma vez que o feto pode herdar qualquer conjunto de HLA-C do pai (YANG, YANG; et. al, 2020).

Para compreendermos a divisão dos genes KIR realizada pelo Comitê de Nomenclatura do Genoma Humano da Organização Mundial da Saúde em haplótipos A e B, precisamos compreender a organização desses haplótipos. Os Genes estruturais são compartilhados por quase todos os haplótipos e por isso delimitam as regiões, sendo assim temos 3DL3 na região centromérica e 3DL2 na região telomérica, entre esses, 3DP1 e 2DL4 na região central como representado na figura abaixo. Os genes 3DP1 e 2DL4 estão a uma distância de 5 a 14Kb entre si e constituem o ponto mais frequente de recombinação gênica, definindo duas zonas chamadas de motivos: Motivo Centromérico e Motivo Telomérico. A recombinação desses motivos gera os diferentes haplótipos (Figura 12) (FRÍAS et al., 2021).

Figura 12 – Estrutura dos haplótipos KIR



Fonte: IPGO, 2019

No esquema visualizamos os genes estruturais delimitando regiões nos haplótipos, com 2DL4 ao centro, enquanto 3DL3 e 3DL2 delimitam as extremidades. O haplótipo A possui genes de inibição em vermelho e o haplótipo B, de inibição e de ativação, esse em azul. Em preto, os genes framework que são altamente variáveis. As bandas com a letra C1 em cima indicam que o gene KIR codifica um receptor com afinidade por HLA-C1, assim como, as bandas com C2, receptores com afinidade por HLA-C2.

O haplótipo A é formado por uma região centromérica e uma telomérica (cenA/cA + tela/tA) e o haplótipo B por regiões cenB e telB. O haplótipo A possui conteúdo gênico mais definido (3DL3-2DL3-2DP1-2DL1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1-2DS4-3DL2) e pode ser considerado um haplótipo de característica inibitória. Em contrapartida, o haplótipo B tem conteúdo gênico variável, sendo constituído por genes KIR inibidores e ativadores, é caracterizado pela ausência de 2DL3, 3DL1 e 2DS4 e tem como resposta final mais frequente a ativação de KIRs. Cada indivíduo herda dois haplótipos, um de cada progenitor e, portanto, existem três genótipos possíveis: Genótipo A (AA), Genótipo B (BB) e Genótipo AB (AB) conforme representado no quadro 1. Dessa forma, indivíduos de genótipo AB podem carregar combinações gênicas muito variadas entre si (FRÍAS et al., 2021).

Quadro 1 – Relação entre Genótipo, Haplótipo e Motivos de KIR

Genótipos	Haplótipos	Motivos
A	AA	2 CenA + 2 TelA
B	BB	2 CenB + TelB
AB	AB	Combinações variadas

Fonte: própria

No quadro observamos que o genótipo A é formado por dois haplótipos A, dois motivos centroméricos A e dois motivos teloméricos A. O genótipo B, por dois haplótipos B, dois motivos centroméricos B e dois motivos teloméricos B. O Genótipo AB, possui um haplótipo A e um haplótipo B e a combinação de motivos é altamente variada.

A variabilidade presente entre os genes KIR é considerada a mais elevada no Complexo Receptor de Leucócitos e se justifica pelas diferentes combinações entre motivos e pelo polimorfismo alélico importante nos genes do haplótipo A. Uma prova disso está no registro de 977 alelos para 16 genes KIR só pelo banco de dados do Instituto Europeu de Bioinformática (FRÍAS et al., 2021).

Ao se tratar de reprodução humana, os genes framework são desconsiderados e apenas os KIRs que interagem com a molécula HLA-C são analisados, isso porque entre 8 e 10 semanas há uma predominância de células uNKs com receptores do tipo KIR com afinidade por HLA-C do que quando comparadas à pNKs do mesmo período. Em análises realizadas em endométrio isolado de mulheres não grávidas, essa predominância de KIRs com afinidade por HLA-C não é tão facilmente identificada o que indica uma adaptação do repertório KIR na gravidez (ALECSANDRU; GARCÍA-VELASCO, 2017).

Analisando o receptor KIR haplótipo A KIRK2DL1 em ligação com HLA-C2 temos um sinal fortemente inibitório, sinal esse que não é neutralizado quando ocorre ativação mediante ligação HLA-G-KIR2DS4 por trogocitose. Se houver na mesma célula ligação entre HLA-C1 e KIR2DL3 um sinal inibitório será gerado, contudo, essa inibição tem sido considerada irrelevante até o momento, isso demonstra a força de ligação entre o receptor e o epítipo C2 de HLA-C e o sinal inibitório gerado pelo haplótipo A (FRÍAS et al., 2021).

No haplótipo B, observamos um forte sinal ativador quando HLA-C2 liga-se a KIR2DS1, sinal esse capaz de neutralizar a inibição gerada por HLA-C2-KIR2DL1 no haplótipo A. A ligação de HLA-C1 a KIR2DL2 gera um sinal inibidor bastante fraco. Portanto, observamos uma diferença funcional entre os haplótipos. Essa diferença também é observada quando tratamos do polimorfismo alélico. Um exemplo disso acontece em KIR2DL1 secretado em CenA que possui resposta

inibitória mais alta e maior avidéz por HLA-C2 do que quando secretado em CenB. Outros exemplos são KIR2DL2 e KIR2DL3 que quando secretados em CenA possuem resposta inibitória menor e menor avidéz por HLA-C1 (FRÍAS et al., 2021). É possível compreendermos que a resposta gerada por dNKs frente a interação KIR-HLA recebe influência do tipo de receptor KIR quanto a sua classificação em haplótipo, quanto aos motivos em que são secretados, sofre influência do tipo de molécula HLA e do epítipo que constitui essa molécula.

4.4.3 As dNKs e o trofoblasto extraviloso

Assim como a decídua exerce forte influência sobre as dNKs, o EVT também é capaz de modular a migração, função, fenótipo e proliferação de dNKs através da liberação de citocinas específicas pelo próprio EVT a depender da relação ligante-receptor entre moléculas de HLA do EVT e os receptores de dNKs (WANG, QUALLS; et.al, 2021). Os genes de HLA são os mais polimórficos no genoma humano e se localizam no Cromossomo 6p (YA et al., 2020). As moléculas de HLA podem ser classificadas de acordo com o aspecto funcional em Classes I, II e III (FRÍAS et al., 2021). No primeiro trimestre gestacional, o EVT expressa um único repertório de HLA, os HLAs de classe I: HLA-C, HLA-E e HLA-G, mas não expressam HLA-A, HLA-B e moléculas de classe II (WANG, QUALLS; et.al, 2021).

Essa expressão seletiva é essencial para a gravidez, uma vez que a ligação HLA a receptores específicos das células uNKs pode gerar resposta inibitória ou de ativação, modulando a citotoxicidade dessas células, a promoção e a secreção de citocinas importantes no processo de remodelação das artérias uterinas e placentação. Os estudos apontam que a magnitude da expressão de moléculas HLA-I no EVT modifica a intensidade da resposta imune gerada pelas células uNK. A classe de HLA expressa pelo EVT pode interferir no sucesso gestacional como demonstrado por estudos em que o sinciotrofoblasto e o citotrofoblasto de gestações finalizadas em aborto espontâneo sem explicação expressaram HLA-DR (HLA-II), enquanto os mesmos tecidos em gestações saudáveis finalizadas por ação voluntária, não expressaram. Além disso, os HLA-I são proteínas de superfície expressas por células nucleadas e são reconhecidos por linfócitos T citotóxico, mas não por linfócitos T helper, essa característica associada ao fato de que as células do EVT não expressam

HLA-II (Reconhecidos por Linfócitos T helper), impede a geração de uma resposta aloimune paterna no início da gestação, indicando o envolvimento de uNK na tolerância imunológica materno-fetal (FRÍAS et al., 2021).

A molécula HLA-C demonstra ter expressão aumentada no início da gestação assim como, a expressão dos seus receptores por uNKs aumenta no primeiro trimestre, sendo eles: KIR2DL1, KIR2DS1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS4 e KIR2DS5. A ligação de HLA-C ao seu receptor KIR específico acontece na posição 80 do domínio alfa-1 (cadeia pesada) da molécula, essa posição é a responsável pela classificação de mais de 1000 alelos em moléculas de HLA-C1 e HLA-C2 a depender da constituição do epítipo na posição 80. Se constituído por uma aspargina, é classificado como HLA-C1, se composto por lisina, HLA-C2. Como apresentado no quadro 2, HLA-C1 tem afinidade por KIR2DL2 e KIR2DL3, receptores com sinal inibitório fraco que quando estimulados reduzem a degranulação e liberação de citocinas. Em contrapartida, HLA-C2 tem afinidade por KIR2DL1, receptor com sinal inibitório forte; e por KIR2DS1, KIR2DS4 e KIR2DS5, receptores com sinal de ativação que ao serem estimulados promovem aumento da degranulação com secreção de GM-CSF e FNT-alfa pelas uNKs (FRÍAS et al., 2021). A secreção dessas citocinas está envolvida com a regulação da profundidade da invasão realizada pelo trofoblasto e facilitam a transformação das artérias espiraladas (WANG, QUALLS; et.al, 2021). Diante do exposto, é possível concluir que o epítipo C2 realiza uma ligação mais forte com o seu receptor quando comparado ao epítipo C1. As células do trofoblasto extraviloso expressam simultaneamente HLA-C materno e HLA-C paterno, uma vez que o embrião recebeu uma herança genética materna e uma paterna. O HLA-C paterno é o que irá ativar ou inativar uNK pois o HLA-C materno é reconhecido como próprio pela uNK assim como na figura 13 (ALECSANDRU; GARCÍA-VELASCO, 2017).

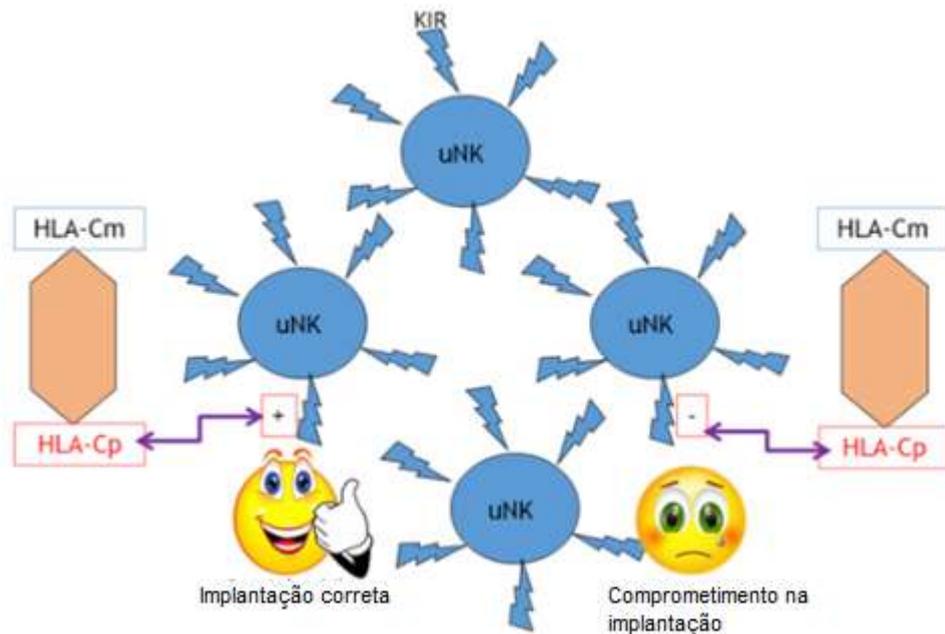
Quadro 2 – HLA-C, seus receptores e a resposta que geram quando acoplados

HLA-C	Receptor KIR	Sinal	Ação em uNKs
C1	KIR2DL2, KIR2DL3	Sinal inibitório fraco	Reduz a degranulação e liberação de citocinas
C2	KIR2DL1	Sinal inibitório forte	Reduz a degranulação e liberação de citocinas
	KIR2DS1, KIR2DS4, KIR2DS5	Sinal de ativação forte	Aumenta a degranulação, secreção de GM-CSF e FNT-alfa

Fonte: Própria

O quadro relaciona os tipos de HLA-C com os seus receptores específicos, o sinal emitido quando HLA-C e KIR se ligam e a ação resultante em uNKs após a liberação do sinal.

Figura 13 – O reconhecimento de HLA-C paterno por uNKs e o efeito na placentação



Fonte: Alecsandru, 2017

O hexágono representa o trofoblasto expressando o HLA-C de origem materna (HLA-Cm) e o HLA-C de origem paterna (HLA-Cp). Quando a ligação entre o HLA-C de origem paterna e o KIR gera um estímulo ativador em uNK (sinal de mais), favorece a implantação pois estimula a produção de citocinas específicas pelas uNKs, quando essa ligação gera um estímulo inibitório (sinal de menos), não favorece a implantação por não estimular a secreção de citocinas importantes para o processo.

Além da relação HLA-receptor específico, a afinidade por esses receptores também pode variar, HLA-C2 tem 3,5 vezes mais afinidade por KIR2DL1 (resposta inibitória) do que por KIR2DS1 (resposta de ativação). Sendo assim, em células NK que expressam ambos os receptores, o efeito de inibição predomina sobre o efeito de ativação (FRÍAS et al., 2021).

Os receptores KIR2DL4 e LILRB1 têm HLA-G como ligante, esse quando reconhece KIR2DL4 promove sinalização de ativação celular, promovendo a secreção de citocinas, fatores pró-angiogênicos e fatores de crescimento em células uNKs, como IL-6, IL-8 e TNF (Fator de Necrose Tumoral). Algumas células uNKs podem adquirir a molécula HLA-G expressa pelo EVT e passar a expor a molécula em sua superfície por meio de um processo chamado trogocitose, esse mecanismo prolonga a sinalização intracelular desencadeada na uNK quando estimulada pela ligação HLA-G-KIR2DL4. Enquanto ligante de KIR2DL4, HLA-G é considerado essencial para o processo reprodutivo. O receptor KIR2DL4 está presente em quase todos os indivíduos. Contudo, estudo envolvendo múltiparas que não expressavam KIR2DL4 sugeriu que as uNKs teriam mecanismos redundantes capazes de suprir a ausência de tal receptor (FRÍAS et al., 2021). No primeiro trimestre o embrião pode produzir HLA-G solúvel, o HLA-G está presente no soro de mulheres grávidas em maiores quantidades quando comparado ao soro de mulheres não grávidas. Essa molécula está relacionada com a tolerância imunológica materno-fetal por aumentar a produção de IL-10, uma interleucina envolvida com regulação imunológica (YANG, YANG; et. al, 2020). Por sua vez, o HLA-E não é expresso após a sétima semana e indica ter função restrita à fase de implantação embrionária, possui como receptores: CD94/NKG2A e CD94/NKG2C, sendo CD94/NKG2A, um receptor inibitório e CD94/NKG2C, ativador (WANG, QUALLS; et.al, 2021). O receptor inibitório de HLA-E apresenta sinal predominante como apresentado pelo quadro 3 abaixo (FRÍAS et

al., 2021). As diferentes moléculas de HLA-I, seus receptores e a ação que promovem quando se acoplam aos receptores foram reunidos no quadro 3 abaixo.

Quadro 3 – HLA-I, seus receptores, sinal e resposta

HLA-I	Receptores de afinidade	Sinal	Resposta
HLA-G	LILRB1 / KIR2DL4	Sinal de ativação	Secreção de IL-6, IL8, TNF
HLA-E	CD94/NKG2A CD94/NKG2C	Sinal inibitório predominante	-----

Fonte: própria

No quadro temos as moléculas HLA-G e HLA-E, seus receptivos receptores, o sinal que emitem nas células uNK quando a ligação entre HLA e receptor ocorre e a resposta celular gerada.

Como já mencionado, as células uNKs do subconjunto 1 são as que mais expressam receptores do tipo KIR, a saber: KIR2DS1, KIR2DS4, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, também expressam CD94/NKG2A e LILRB1, o que sugere que as dNK1 são as células que interagem com o EVT, regulando a invasão, a transformação da artéria espiralada e a placentação. O crosstalk entre HLAs, receptores de dNKs e citocinas secretadas nesse processo é essencial para o sucesso gestacional no primeiro trimestre (WANG, QUALLS; et.al, 2021).

4.5 O CÓDIGO IMUNOLÓGICO KIR-HLA-C E A SÍNDROME DO ABORTO DE REPETIÇÃO

Em um cenário mundial a interrupção gestacional acomete 15 a 20% das gestações e é considerada comum entre as mulheres brasileiras. Dos casais tentantes, 2 a 5% são acometidos pela síndrome do aborto de repetição (AER). A AER consiste na interrupção espontânea de três ou mais gestações pela mesma mulher, sendo provocada por comprometimentos relacionados a saúde materna ou fetal.

Alguns serviços já consideram AER casos com dois abortos espontâneos ou mais. Apenas 50% dos casos de AER possuem causa detectável o que dificulta a tomada de decisão na conduta clínica (BARROS et. al., 2020).

Os abortos espontâneos de repetição configuram uma condição que acomete parcela considerável de casais tentantes no Brasil o que gera danos psicológicos e de cunho emocional ao casal que sofreu a perda, além disso, o país também é impactado do ponto de vista econômico, considerando custos envolvendo procedimentos para controle gestacional, prevenção e tratamento de afecções geradas na mulher devido ao aborto espontâneo, internações, complicações do quadro, elevam os custos financeiros aplicados pelo Sistema Único de Saúde mediante abortos espontâneos (SOUZA et.al. 2020). De acordo com dados recentes do estudo de Le et al. (2014), os custos sob a perspectiva do Sistema Único de Saúde (SUS), geram um total anual de R\$ 32,9 milhões referentes aos gastos com abortos espontâneos.

Entre as causas da AER estão: anormalidades cromossômicas, responsável por 2 a 4% das perdas recorrentes; anormalidades uterinas adquiridas ou congênitas; (BARROS et.al., 2020). Outros fatores são os distúrbios endócrinos, infecções e aspectos relacionados a tolerância imunológica, esses fatores podem desencadear em invasão trofoblástica insuficiente e/ou remodelação vascular inadequada, essas complicações estão sendo apontadas como as principais envolvidas em distúrbios de aborto recorrente. (ALECSANDRU; GARCÍA-VELASCO, 2017). Ainda que fatores como os apontados sejam relacionados aos abortos espontâneos, o mecanismo envolvido com esse comprometimento ainda não é compreendido (HAN; et. al,2020). Por isso, uma concentração de esforços tem sido depositada sobre o assunto microambiente imunológico da decídua, considerando como uma possível associação com a patogênese de AER, uma vez que as células imunológicas possuem participação bastante ativa ao longo de toda a gestação (GUO, CAI; et. al, 2021). Um exemplo disso são as dNKs e a sua capacidade secretora de quimiocinas e citocinas importantes para o processo de invasão trofoblástica, assim como para a inibição de uma superinvasão; remodelamento vascular; placentação; crescimento fetal e formação de uma memória gestacional (FRÍAS et al., 2021).

Estudos têm mostrado a forte relação entre a interação inadequada de KIR-HLA-C e a ERA. A sinalização inadequada de uNKs reduz a secreção de citocinas, substâncias essas envolvidas com o processo de decidualização e implantação. O comprometimento da decidualização representa redução no número de células estromais deciduais secretando citocinas envolvidas com a invasão, como IL-15 que atrai quimiotaticamente uNKs e induz o amadurecimento dessas células. Com menos uNKs na região, menor será a produção de citocinas pró-invasivas e a implantação será dificultada. A implantação comprometida pode acarretar aborto espontâneo de repetição (HAN; et. al,2020).

Sendo assim, a adequada interação KIR-HLA-C é fundamental para que a invasão trofoblástica seja adequadamente regulada no início da gestação, uma vez que essa relação determina o nível de ativação ou inibição de dNKs e consequentemente a continuidade da gestação (ALECSANDRU; GARCÍA-VELASCO, 2017).

As moléculas HLA-I expressas pelo tecido fetal quando associadas a receptores de células uNKs específicos geram respostas diferentes, envolvendo uma série de fatores secretados após a estimulação que influenciam na invasão trofoblástica. Considerando que o EVT expressa HLA-C em altos níveis no primeiro trimestre gestacional e que os receptores KIR fortemente expressos por uNK1 possuem afinidade por HLA-C, olhemos para eles. Mães que carregam haplótipo A (AA) possuem genes KIR inibitórios, enquanto, as com haplótipo B (BB) possuem principalmente genes KIR ativadores. Em uma situação em que o embrião possui HLA-C1 paterno, a ligação com KIR será fraca assim como o sinal gerado, contudo, se o embrião expressar HLA-C2 paterno, ligação e sinal serão fortes. Diante do exposto, mães que expressam KIR-AA e carregam embrião com HLA-C2 paterno estão apresentando um risco aumentado de AER (Figura 14), uma vez que a interação KIR-HLA-C gera sinal inibitório forte sobre uNKs, comprometendo invasão trofoblástica e remodelação adequada de artérias, comprometimentos frequentemente associados à abortos espontâneos (ALECSANDRU; GARCÍA-VELASCO, 2017).

Figura 14 – Os riscos à gestação representados pela interação KIR-HLA-C

HLA-C (paterno)	KIR (Mãe)	Risco para a gravidez
C1C1	AA, AB ou BB	sem 
C2C2 ou C1C2	AB ou BB	Aumentado 
C2C2 ou C1C2	AA	Aumentado 

Fonte: IPGO, 2019

No quadro temos que HLA-C paterno com epítipo C2 quando associado a KIR de haplótipo AA, há risco aumentado para a gravidez. Em casos de HLA-C2 paterno com KIR de perfil não inibitório como AB ou BB, não há risco aumentado. Quando o HLA-C paterno carrega epítipo 1, o tipo de receptor KIR parece ter menos influência sobre o risco na gravidez, podendo se associar a KIR AA, AB ou BB.

Um estudo comparando o microambiente imunológico de decíduas de gestações saudáveis e de decíduas de gestações interrompidas espontaneamente, demonstrou uma redução na proporção de células dNK1 e de células dNK2 (do tipo Path T que podem se tornar dNK1 quando estimuladas), níveis aumentados de dNK3, subconjunto de característica pró-inflamatória. O estudo também demonstrou que dNK1 de decíduas em AER expressavam níveis reduzidos de LILRB1, um receptor que se liga a HLA-G, demonstrando uma interação reduzida dessas células com o EVT. Esses achados reforçam a relação da influência de uNKs e seus receptores em casos de AER (GUO, CAI; et. al, 2021).

4.6 MÉTODO DIAGNÓSTICO KIR-HLA-C

A partir do entendimento a respeito da interação KIR-HLA-C e seu impacto na implantação embrionária, a comunidade científica desenvolveu um método diagnóstico para identificar a presença de HLA-C2 paterno e KIR-AA materno em casais tentantes que buscavam alternativas como a Fertilização in Vitro. Esse diagnóstico fornece mais informações ao profissional para que esse busque pela melhor conduta clínica quando em situações de aborto espontâneo recorrente, pré-

eclâmpsia, atraso de crescimento intrauterino e outras complicações obstétricas (ALECSANDRU, DIANA; et. al, 2020).

O exame é realizado a partir de duas amostras, a amostra de sangue total paterna em que se analisa a genotipagem da molécula HLA-C a partir da metodologia de PCR-SSP (Reação em Cadeia da Polimerase Iniciador Sequência-Específico) e a amostra materna, em que se analisa KIR com a metodologia PCR-SSOP (Reação em Cadeia da Polimerase Sonda Oligonucleotídica Sequência Específica) (VOORTER, PALUSCI; et. al, 2014).

A PCR-SSOP é a amplificação específica do locus HLA por meio da reação da cadeia de polimerase, que se baseia na desnaturação química da dupla fita de DNA do produto que já foi amplificado com reagentes fluorescentes seguida por neutralização química de ambas as fitas do DNA já abertas, e posteriormente hibridização desse produto por meio de sondas oligonucleotídicas específicas de sequência. Já a especificidade dos alelos HLA amplificados por PCR-SSP é determinada pelos primers. A partir de múltiplas reações de PCR visando a presença e ausência de polimorfismos dentro do gene HLA alvo. Cada par de primers utilizado amplifica um ou mais alelos e o número total de primers usados deve amplificar todos os alelos conhecidos para o locus a ser determinado. Portanto, apenas o alelo de interesse será amplificado, e então o produto pode ser detectado por eletroforese em gel de agarose. Dependendo de sua seleção, SSP-PCR pode ser de baixa, média ou alta resolução (VOORTER, PALUSCI; et. al, 2014)

Como forma de um possível tratamento após o diagnóstico, uma alternativa seria o uso de G-CSF (Fator estimulante de colônia de granulócitos). É uma das principais citocinas hematopoiéticas envolvidas na defesa do sistema imune, tendo efeito na ativação da via Th2, ativação de linfócitos Treg, modulação da citotoxicidade NK e estímulo da angiogênese. No caso de abortos espontâneos de repetição com pacientes que tem falhas de implantação apresentou uma melhora significativa na taxa de gravidez somente quando as pacientes possuíam o haplótipo KIR AA. Em contrapartida, outros estudos baseados em pacientes com a taxa de nascidos vivos a partir de seu uso desde após a ovulação, apresentaram resultados

divergentes. Portanto, ainda são necessários mais estudos sobre o uso de G-CSF (ESTEVEES; PERUZZATO; FRANÇA, 2022).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível compreender que as células uNKs são um tipo diferente de NKs tanto fenotipicamente quanto funcionalmente e estão intimamente relacionadas com o processo de implantação embrionária quando devidamente estimuladas por seu ligantes específicos que se acoplam aos receptores promovendo a secreção de citocinas e quimiocinas pró-invasivas importantes para a implantação, essas células estão presentes em altas proporções na decídua basal e reduzem em quantidade durante a placentação, indicando ação específica na implantação. As células uNKs são moduladas pelo microambiente, sendo assim componentes como decídua, moléculas expressas pelo EVT e seus próprios receptores influenciam diretamente em seu comportamento. Os receptores do tipo KIR expressos por uNKs possuem perfil inibitório e ativador, um balanço entre esses estímulos ditará a atividade celular dessas células. Seus ligantes são moléculas de HLA-I, principalmente as moléculas HLA-C que são mais expressas no primeiro trimestre gestacional. As células dNK1 são as mais ativas durante a implantação e são estimuladas mediante a interação KIR-HLA-C.

Muitos são os fatores envolvidos para que essas células sejam devidamente estimuladas, é necessário ter um balanço adequado de receptores KIR de perfil inibitório e ativador; o HLA-I embrionário precisa ter afinidade pelo KIR materno e estabelecer uma ligação de ativação forte capaz de suprimir um estímulo inibitório gerado na mesma célula. O microambiente também tem um papel ativo na modulação das uNKs, as células estromais deciduais secretam citocinas e quimiocinas importantes para o amadurecimento de progenitores de uNKs e para a promoção de migração de pNKs que serão convertidas em uNKs. Para que as células da imunidade inata realizem a sua função adequadamente durante a implantação uma gama de fatores são acionados, de moléculas sinalizadoras a investidas hormonais, essa complexidade somada a variabilidade gênica dos receptores KIRs e moléculas HLA-I torna a aplicação desses conceitos à conduta clínica bastante limitada.

Desequilíbrios na relação KIR-HLA-C podem acontecer a depender do haplótipo KIR envolvido na interação assim como, do HLA de classe I. Os KIRs de haplótipo A possuem característica predominantemente inibitória e, portanto, quando acoplados ao ligante HLA-C2, promovem um sinal fortemente inibitório, impedindo que as células uNKs atuem secretando citocinas pró-invasivas e angiogênicas, comprometendo não apenas a implantação, mas também a remodelação vascular. Esse comprometimento vem sendo associado à patogênese dos Abortos Espontâneos de Repetição e, por isso, um método diagnóstico baseado na técnica de PCR, tem sido aplicado em clínicas de reprodução humana como uma forma do profissional coletar maiores informações a respeito das falhas de implantação envolvidas nas repetidas gestações não finalizadas. O exame KIR-HLA-C busca detectar qual o fenótipo KIR expresso pela mãe e qual o fenótipo de HLA-C expresso pelo pai que será herdado pelo feto, uma vez que o resultado do exame é KIR AA e HLA-C2, o profissional interpreta como fenótipos que indicam risco de aborto espontâneo e, portanto, uma nova conduta deve ser estabelecida. Outros resultados fenotípicos para essas moléculas estão sendo apontados como fenótipos protetores para aborto espontâneo de repetição, contudo, devido à alta variabilidade gênica, mais estudos são necessários para que novos padrões sejam determinados e o exame possa ter uma aplicação mais ampla e precoce.

Estudos envolvendo células uNKs e receptores KIR são recentes e por isso, ainda faltam informações para que uma abordagem clínica seja devidamente elaborada. Há contradições entre os artigos quanto à nomenclatura dessas células o que dificulta a compreensão. Alguns artigos consideram as células uNKs como sendo sinônimo de dNKs e pbNKs, sinônimo de cNK, outros artigos fazem distinção entre essas nomenclaturas. Essa revisão tratou as uNKs como sinônimo de dNKs e as pbNKs como sinônimo de cNKs, considerando que Massimiani et. al. seguiram com esse pressuposto.

Outra grande barreira para os estudos na área está na variabilidade gênica presente nos receptores KIR e nas moléculas HLA-I, as inúmeras possibilidades de interação entre esses componentes dificultam o entendimento a respeito dessas descobertas. Diante disso, há uma necessidade de mais ensaios

clínicos em seres humanos e com amostras populacionais maiores, uma vez que o conhecimento em imunologia da reprodução é de vital importância para o aumento da taxa de sucesso em reproduções assistidas e para redução do estresse psicológico e econômico vivenciado por casais tentantes que sofrem com a Síndrome do Aborto de Repetição.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico**. 6.ed. São Paulo: GEN Guanabara Koogan, 2021. 360 p.

ALECSANDRU, Diana; GARCÍA-VELASCO, Juan A. Why natural killer cells are not enough: a further understanding of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen. **Fertility and Sterility**, [s.l.], v. 114, n. 4, p. 809-817, Out. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028217303515> Acesso em: 13 jun. 2022.

Ana Clara Esteves, Fernanda Peruzzato, Patrícia França (Ed.). (Fevereiro de 2022). REVISTA DIGITAL PRONÚCLEO: **COMPÊNDIO DE IMUNOLOGIA DA REPRODUÇÃO** (Vol. 10, Issue Especial). Disponível em: <https://pronucleo.com.br/wp-content/uploads/2022/03/original-1.pdf> Acesso em: 6 de set. 2022.

ASHARY, N.; TIWARI, A.; MODI, D. Embryo implantation: War in times of love. **Endocrinology**, [s.l.], v. 159, n. 2, p. 1188–1198, Feb. 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article/159/2/1188/4792933> Acesso em: 14 jun. 2022.

BARROS, Breno Pena et al. Abortamento de repetição: etiologia e cuidados. **Research, Society and Development**, [s.l.], v. 9, n. 11, p. 1-16, Nov. 2020. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/download/10277/9081> Acesso: 24 nov. 2021.

CAMBIAGHI, Arnaldo; LEÃO, Rogério. KIR – HLA- C NOS TRATAMENTOS DE FERTILIZAÇÃO ASSISTIDA. In: CAMBIAGHI, Arnaldo; LEÃO, Rogério. **IPGO MEDICINA DA REPRODUÇÃO**. São Paulo, 2019. Disponível em: <https://ipgo.com.br/kir-hla-c-nos-tratamentos-de-fertilizacao-assistida/> Acesso em: 6 set. 2022.

CHOU, Y.-C. et al. Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) and human leukocyte antigen-C (HLA-C) allorecognition patterns in women with endometriosis. **Scientific reports**, [s./], v. 10, n. 1, p. 4897, Mar. 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-61702-y> Acesso em: 10 jun. 2022.

DE GROOT, Natasja G. et al. Co-evolution of the MHC class I and KIR gene families in rhesus macaques: ancestry and plasticity. **Immunological reviews**, [s./], v. 267, n. 1, p. 228-245, Aug. 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imr.12313> Acesso em: 20 jun. 2022.

GUERRERO, B. et al. Natural killer cells in recurrent miscarriage: An overview. **Journal of reproductive immunology**, [s./], v. 142, p. 1-9, Nov. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165037820301303> Acesso em: 13 jun. 2022.

GUO, C. et al. Single-cell profiling of the human decidual immune microenvironment in patients with recurrent pregnancy loss. **Cell discovery**, [s./], v. 7, n. 1, p. 1, Jan. 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41421-020-00236-z> Acesso em: 12 jun. 2022.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos U.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica: texto e atlas**. 13.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2017. 568 p.

KONG, C.-S. et al. Embryo biosensing by uterine natural killer cells determines endometrial fate decisions at implantation. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, [s./], v. 35, n. 4, Nov. 2021. Disponível em: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1096/fj.202002217R> Acesso em: 20 jun. 2022.

LU, Han et al. Rapamycin prevents spontaneous abortion by triggering decidual stromal cell autophagy-mediated NK cell residence. **Autophagy**, [s./], v. 17, n. 9, p.

2511-2527, Set. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33030400/>
Acesso em: 16 nov. 2022.

MASSIMIANI, M. et al. Molecular signaling regulating endometrium-blastocyst crosstalk. **International journal of molecular sciences**, [s.l.], v. 21, n. 1, p. 23, Dec. 2019. Disponível em: https://mdpi-res.com/d_attachment/ijms/ijms-21-00023/article_deploy/ijms-21-00023-v2.pdf?version=1576811041 Acesso em: 13 jun. 2022.

MEZZOMO, Lisiane C.; GOMES, Flavia G.; BECKER, Roberta O.; ZANELATTO, Carla; SANTIAGO, Sônia. **Embriologia clínica**. 1.ed. São Paulo: Grupo A Educação S.A., 2019. 227 p.

MOORE, Keith L.; PERSAUD, T.V.N; TORCHIA, Mark G. **Embriologia Básica**. 10.ed. São Paulo: GEN Guanabara Koogan, 2022. 368 p.

NG, Shu-Wing et al. Endometrial decidualization: the primary driver of pregnancy health. **International journal of molecular sciences**, [s.l.], v. 21, n. 11, p. 4092, Jun. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7312091/>
Acessado em: 16 dez. 2022.

PEPE, Camila et al. Custo-efetividade do uso do sistema intrauterino liberador de 52 mg de levonorgestrel (SIU-LNG) versus contraceptivos hormonais de curta duração na prevenção de gravidez não desejada em adolescentes entre 15 e 19 anos sob a perspectiva do Sistema Único de Saúde do Brasil (SUS). **JBES: Brazilian Journal of Health Economics/Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, [s.l.], v. 9, n. 1, Abr. 2017. Disponível em: https://web.archive.org/web/20220227104508id_/http://www.jbes.com.br/images/v9n1/100.pdf Acesso em: 02 set. 2022.

RODRÍGUEZ DE FRÍAS, E. et al. Antígeno leucocitario humano C y receptores tipo inmunoglobulina en medicina reproductiva. **Medwave**, [s.l.], v. 21, n. 10, p. 84, Nov.

2021. Disponível em: <https://www.medwave.cl/revisiones/analisis/8484.html> Acesso em: 12 jun. 2022.

SOARES, Beatriz; NETO, Magui. O Ciclo Menstrual da Mulher. In: SOARES, Beatriz; NETO, Magui. **Metis**. São Paulo, 2016. Disponível em: http://metis.med.up.pt/index.php/O_Ciclo_Sexual_da_Mulher Acesso em: 10 out. 2022.

SOJKA, D. K.; YANG, L.; YOKOYAMA, W. M. Uterine natural killer cells. **Frontiers in immunology**, [s.l.], v. 10, p. 960, May. 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00960/full> Acesso em: 21 jun. 2022.

SOUZA JÚNIOR, Edison Vitório de et al. **Internações e custos hospitalares por aborto espontâneo na Bahia, Brasil**. Rev. Pesqui.(Univ. Fed. Estado Rio J., Online), p. 767-773, Dez. 2020. Disponível em: <https://search.bvsalud.org/gim/resource/en/biblio-1102744> Acesso em: 02 set. 2022.

VOORTER, Christina EM; PALUSCI, Fausto; TILANUS, Marcel GJ. Sequence-based typing of HLA: an improved group-specific full-length gene sequencing approach. In: **Bone Marrow and Stem Cell Transplantation**. Humana Press, New York, NY, 2014. p. 86-99.

YANG, X. et al. The roles of uterine natural killer (NK) cells and KIR/HLA-C combination in the development of preeclampsia: A systematic review. **BioMed research international**, Mar. 2020. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2020/4808072/> Acesso em: 21 jun. 2022.

ZHANG, Xiuhong; WEI, Haiming. Role of decidual natural killer cells in human pregnancy and related pregnancy complications. **Frontiers in Immunology**, p. 3421, Aug. 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.728291/full> Acesso em: 13 jun. 2022.