

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Análisis de biomarcadores asociados a la modulación de
células NK : implicaciones en la predicción de viabilidad
gestacional en pacientes con fallo reproductivo recurrente**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Raquel Gil Laborda

DIRIGIDA POR

Miguel Fernández Arquero
Silvia María Sánchez Ramón

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

*Análisis de biomarcadores asociados a la modulación de células NK:
Implicaciones en la predicción de viabilidad gestacional en pacientes
con fallo reproductivo recurrente*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Raquel Gil Laborda

DIRECTORES

Miguel Fernández Arquero
Silvia María Sánchez Ramón

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA



TESIS DOCTORAL

Análisis de biomarcadores asociados a la modulación de células
NK: Implicaciones en la predicción de viabilidad gestacional en
pacientes con fallo reproductivo recurrente

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Raquel Gil Laborda

Directoras

Miguel Fernández Arquero

Silvia María Sánchez Ramón

Madrid 2025

El proyecto recibió una beca de investigación del Instituto Carlos III de Salud, Ministerio de Economía y Competitividad (España), otorgada en la convocatoria de 2019 en el marco de la Estrategia de Salud Acción 2019–2023, dentro del Programa Nacional de Investigación orientado a los Retos Sociales, en el Plan Nacional de Investigación Técnica, Científica e Innovación 2019–2022, con referencia PI19/01450; y dentro del Plan 2023-2026, con referencia PI23/00709.

The project received a research grant from the Carlos III Institute of Health, Ministry of Economy and Competitiveness (Spain), awarded on the 2019 call under the Health Strategy Action 2019–2023, within the National Research Program oriented to Societal Challenges, within the Technical, Scientific and Innovation Research National Plan 2019–2022, with reference PI19/01450; and within the Plan 2023-2026, with reference PI23/00709.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar un momento para agradecer a todas las personas que han sido parte fundamental en este viaje hacia el final de mi tesis doctoral.

En primer lugar, quiero agradecer de corazón a mis directores, Miguel y Silvia. Su apoyo, y confianza en mí han sido esenciales, han hecho que crezca. Gracias por su paciencia y por guiarme a lo largo de este proceso. Gracias por darme a conocer un tema tan fascinante como es la inmunología reproductiva, y por darme la oportunidad de ser parte de ella.

Después me gustaría dar gracias a los que me han acompañado todos los días y han compartido conmigo todos los momentos buenos y malos de este proyecto, que se han convertido en amigos y que me llevo en el corazón. En primer lugar, a Teresa y Ángela, la clara descripción de antítesis pero que cada una a su manera ha animado mi día a día y ha ido poniendo alicientes para que el proceso no sea tan duro. Kauzar y Laura, que compartieron conmigo el comienzo de este proyecto y que con su sonrisa y ánimo de hacer planes fue mucho más fácil entrar al grupo que después ha acabado casi formando una gran familia, y Elsa, que también estuvo casi desde el inicio y también ha compartido muchos años tanto dentro como fuera. A Alejandro, que siempre está, siempre apoyándome y apoyándole yo a él, ha sido la pata de la mesa que he necesitado cuando me tambaleaba. A Juli, por su gran paciencia y escucharme siempre que lo he necesitado, por darme los consejos que me han ayudado a hacer todos los problemas un poco más fáciles y por animarme y hacerme sentir que hago las cosas bien. Al *equipo T*, a Dani por su ánimo incondicional, a Alex por las rumbitas y los choques de mano a primera hora de la mañana, y sobre todo a Nabil por ser mi compañero de embarazadas que tantos dolores de cabeza nos ha llevado. A Whiti, que, aunque sea reciente, ha sido un apoyo y compañera de risas y de dramas sin resolver. A las Merys, por escucharme de vez en cuando y estar siempre que he necesitado. A Marc, por las horas de análisis e informes KIR y buscando las parejas imposibles. A Bárbara, por estar ahí mano a mano en el Luminex desde mi comienzo con el TFM. A Blanquita, doctora que llegó hace dos meses, pero ha estado ahí para soportándome con la tortura del depósito de tesis.

También tengo dar gracias a Imanol, mi mentor y para mí una de las personas que más me llevo en este recorrido, aunque ha estado conmigo unos pocos meses he sentido su apoyo incondicional, me ha enseñado lo difícil y lo fascinante que es la ciencia y sobre todo me ha enseñado a crecer como adulta. A su vez, a Marta y Ana, que para mí fueron las personas que más me han enseñado a crecer en ciencia, y me han hechos más amenas las horas de laboratorio de conteo de GSC, eso no quita que las volvería a repetir 100 veces más. Y por supuesto Paula, que me enseñó lo importante que es ser riguroso en el laboratorio y me apoyó siempre que lo necesitaba.

Después, quiero agradecer a mis amigas, que me han hecho más amenos los tiempos libres y a olvidarme de lo difícil que es el proceso de la tesis, y especialmente a mi amiga Andreoli por su apoyo incondicional tanto en lo personal como en lo profesional, es una lucecita que ilumina mis malos momentos y el tiempo ha demostrado que seguiremos juntas hasta el final. También agradecer a mi anticuadri, una nueva incorporación a mi vida que me hace feliz. A Inés, por ser mi apoyo incondicional desde la lejanía de Colonia, el sentir que estás orgullosa de mi ha hecho que yo lo esté también y a Sofia, por ser mi apoyo incondicional desde cerquita, y compartir conmigo todos los momentos, somos el trio calavera que nunca se separará. A Tarta por estar siempre y darme ese empujón cuando lo he necesitado. A Fabio, por ser mi calva favorita, por apoyarme y sacarme siempre una sonrisa. A polo, que tanto ha tenido que aguantar, y darme consejos cuando he estado en el peor momento. A Alex, por estar y seguir estando, y por ser una personita que se alegra por mí siempre. Y a todos los que hemos formado parte de ese máster que fue un antes y un después y nos llevaremos en el corazón para siempre.

Uno de los agradecimientos más especiales, es a mis padres, las personas que sin duda sé que son mi apoyo y lo serán siempre, vosotros me habéis enseñado lo que es la perseverancia y hacer las cosas bien. Las personas que me dan los consejos que necesito para seguir adelante, aunque las cosas no vayan como uno quiere. Gracias por enseñarme las cosas importantes de la vida, y por enseñarme a *“confiar” y soltar muchas veces los problemas porque no están en nuestra mano*, y sobre todo gracias por darme esta familia que tanto quiero. También gracias a mi hermana, que siempre está ahí y aunque no le pida demasiados consejos es una de las personas que más quiero.

Por último, quiero dar gracias a Javier, la persona que más ha oído la palabra *tesis* en los últimos meses, gracias por estar y sacarme una sonrisa día a día, por darme el empujón cuando lo necesito, por enseñarme lo fáciles que son las cosas cuando las miras desde otra perspectiva. Gracias por aguantarme, a veces soy demasiado intensa. Gracias por hacer mis dramas menos dramáticos. Gracias por ponerme pequeños alicientes que han hecho más fácil llegar hasta el final. Gracias por ilusionarte conmigo, y por ayudarme a poner esa primera piedrita de algo que llamamos futuro.

Y como dijo Marie Curie *“La vida no es fácil para ningún de nosotros. Debemos tener perseverancia y, sobre todo, confianza en nosotros mismos. Debemos creer que estamos dotados para algo y que eso debe ser alcanzado.”*

*“A veces sentimos que lo que hacemos
es tan solo una gota en el mar,
pero el mar sería menos si le faltara esa gota”*

María Teresa de Calcuta

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
ABREVIATURAS	XV
RESUMEN / SUMMARY	XIX
Resumen	XXI
Summary	XXV
 INTRODUCCIÓN	 1
1. Desarrollo embrio-fetal	3
1.1. Placentación	3
1.2. Células del trofoblasto	5
2. Patología en la fase de implantación	8
2.1. Fallo reproductivo recurrente	8
2.1.1. Aborto de repetición	8
2.1.2. Fallo de implantación recurrente	9
2.2. Factores de riesgo y etiología del fallo reproductivo recurrente	10
2.2.1. Factores de riesgo	10
2.2.2. Etiología	12
3. Inmunología del embarazo. La placenta	17
3.1. Mecanismos de hiporrespuesta frente a aloantígenos fetales	17
3.2. Células inmunorreguladoras maternas	18
3.2.1. Células dendríticas	18
3.2.2. Células T	19
3.2.3. Macrófagos	20
3.2.4. Células NK	21
4. Receptores KIR: estructura, organización genética y estructural	25
4.1. Haplotipos de los genes KIR	28
4.2. Distribución de los motivos centroméricos y teloméricos	31
4.3. Expresión de los genes KIR	32
4.4. Ligandos de los receptores KIR	34
5. CD94/NKG2.....	37
6. Educación y función de las células NK.....	40

7. Combinación HLA/KIR y NKG2A/HLA-E	41
7.1. Fallo reproductivo recurrente	43
7.2. Otras Enfermedades	44
7.2.1. Preeclampsia	44
7.2.2. Infecciones transplacentarias	44
7.2.3. Infecciones virales	45
7.2.4. Enfermedades autoinmunes	46
7.2.5. Cáncer.....	46
 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	 49
Justificación del estudio	51
Hipótesis	52
Objetivos	53
 MATERIAL Y MÉTODOS.....	 55
1. Sujetos/Diseño de estudio	57
2. Extracción y procesamiento de las muestras	60
3. Aislamiento del ADN	60
4. Cuantificación de DNA	60
5. Determinación de genotipos	61
5.1. Genes KIR	61
5.2. Genes HLA-C.....	63
5.3. Genes HLA-B.....	63
6. Evaluación de panel por citometría de flujo multiparamétrica.....	65
7. Estudio estadístico	68
7.1. Estadística descriptiva	68
7.2. Estudio de asociación entre variables	68
7.3. Análisis de curvas ROC	68
7.4. Diseño del algoritmo	69

RESULTADOS	71
BLOQUE I (DATOS PUBLICADOS) ESTUDIO DE LOS GENES KIR Y HLA-C EN PACIENTES CON FALLO REPRODUCTIVO RECURRENTE	73
1. Características epidemiológicas y obstétricas de los diferentes grupos de estudio	73
2. Distribución de genotipos KIR clásicos en pacientes con FRR y un GCS.....	75
3. Distribución de motivos Centroméricos y teloméricos en paciones con FRR y un GCS	78
4. Distribución de HLA-C en parejas con FRR y un GCS.....	81
5. Distribución de genotipo KIR centromérico y telomérico y HLA-C en parejas con FRR y un GCS.....	85
BLOQUE II (A). ESTUDIO DE LOS GENES KIR, HLA-C Y DIMORFISMO HLA-B EN POSICIÓN -21 ..	88
1. Características epidemiológicas y obstétricas de los diferentes grupos de estudio	88
2. Frecuencia de los genes KIR en las pacientes con FRR y un GCS	89
3. Combinación de HLA-C y KIR en pacientes con FRR y un GCS	93
4. Hipótesis del ligando ausente de KIR inhibitorios en pacientes con FRR y un GCS	96
5. Análisis del dimorfismo HLA-B -21 en pacientes con FRR y un GCS	99
6. Matriz que combina el dimorfismo -21 HLA-B con haplotipos KIR en pacientes con FRR y un GCS	101
7. Combinación de la hipótesis de falta de ligando para receptores KIR inhibitorios y el dimorfismo de HLA-B en la posición -21 en pacientes con FRR y GCS	104
BLOQUE II (B). ESTUDIO DE LOS RECEPTORES KIR Y NKG POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	108
1. Evaluación de los receptores KIR y NKG2 mediante citometría de flujo en las pacientes con RFF y un GCS	108
2. Análisis de la expresión de los receptores de células NK en combinación con la genética HLA-C, HLA-B y KIR en las pacientes con RFF y un GCS	114
DATOS SIGNIFICATIVOS ENGLOBADOS Y ALGORITMO DIAGNÓSTICO FINAL	119
1. Resumen de parámetros significativos entre los grupos AR, FIR y GCS.....	119
2. Evaluación de la capacidad de discriminación pacientes con FRR y un GCS mediante curvas ROC.....	121
3. Diseño del algoritmo diagnóstico en pacientes con AR y FIR y un GCS	123

DISCUSIÓN	127
1. BLOQUE I (datos publicados)	131
2. BLOQUE II	133
2.1. Estudio genético de genes KIR, HLA-C y dimorfismo HLA-B en posición -21	133
2.2. Estudio de la expresión de los receptores KIR y NKG en las células NK	134
3. Estudio de diseño algorítmico	137
Limitaciones del estudio	140
Perspectivas futuras	141
CONCLUSIONES.....	143
BIBLIOGRAFÍA.....	147
DATOS SUPLEMENTARIOS	177
Bloque I	179
Bloque II	184

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de la tempranas del desarrollo placentario.	4
Figura 2. Desarrollo de la capa trofoblástica y extravasación de las células a la interfase materno-fetal.	6
Figura 3. Resumen de las causas conocidas hasta el momento de AR y de FIR.	12
Figura 4. Cambios en los componentes del sistema inmune materno durante los diferentes trimestres del embarazo.	22
Figura 5. Interacción en la decidua del sistema inmune materno con las células fetales.	23
Figura 6. Estructura de los receptores KIR.	25
Figura 7. Polimorfismos de los receptores KIR.	26
Figura 8. Genes KIR según su localización en el cromosoma 19q13.4.	29
Figura 9. Distribución de los motivos centroméricos y teloméricos de los receptores KIR según sus haplotipos.	32
Figura 10. Interacción de los receptores KIR con su HLA-C específico.	36
Figura 11. Estructura de los receptores NKG.	37
Figura 12. Diferentes interacciones de las células NK con células fetales y maternas.	42
Figura 13. Resumen gráfico de la hipótesis abarcada en el presente estudio.	52
Figura 14. Reglas para la generación de haplotipos KIR.	63
Figura 15. Resumen de los alelos que pertenecen al grupo Bw4 y Bw6, y los que con tienen treonina o metionina en la posición -21.	64
Figura 16. Estrategia mediante citometría flujo para la identificación de poblaciones de células NK, en GCS, AR, FIR.	66
Figura 17. Esquema de protocolo de procesamiento de muestras para el análisis de genético de los genes HLA-C, HLA-B y KIR por la tecnología Luminex y análisis por citometría de flujo en cada grupo de estudio.	67
Figura 18. Frecuencias de los haplotipos KIR clásicos en los diferentes grupos de estudio.	76
Figura 19. Frecuencias de los haplotipos KIR centroméricos y teloméricos en los diferentes grupos de estudio.	80
Figura 20. Frecuencias de los haplotipos HLA-C en los diferentes grupos de estudio.	84
Figura 21. Frecuencias de la combinación de los haplotipos HLA-C y KIR Cen AA en la población de estudio.	87

Figura 22. Frecuencias de haplotipos KIR clásicos y haplotipos estratificados en región centromérica y región telomérica en cada uno de los diferentes grupos de estudio.....	92
Figura 23. Frecuencias de la combinación de los haplotipos HLA-C y KIR centromerico en la población de estudio.	95
Figura 24. Frecuencia de la ausencia de los haplotipos de HLA-C2, HLA-C1 y HLA-Bw4 específicos para los genes <i>KIR2DL1</i> , <i>KIR2DL2/3</i> y <i>KIR3DL1</i> en los diferentes grupos de estudio.	98
Figura 25. Frecuencia del dimorfismo B en la posición -21 en los diferentes grupos de estudio	100
Figura 26. Frecuencias del dimorfismo HLA-B en la posición -21 y los haplotipos KIR Cen AA y Tel AA en los diferentes grupos de estudio.	103
Figura 27. Frecuencias del dimorfismo HLA-B en la posición -21 y la ausencia de ligando para los receptores KIR en los diferentes grupos de estudio.	106
Figura 28. Representación de los Odds Ratio y los intervalos de confianza 95%, de los grupos FRR, AR y FIR en comparación con la el grupo control sano (GCS).	107
Figura 29. Expresión del receptor NKG2A en porcentaje total de NK, NK CD56 ^{Bright} , y NK CD56 ^{DIM} CD16+ en FRR, AR y FIR en comparación con el grupo control sano.	109
Figura 30. Expresión del receptor KIR2DL1 en porcentaje total de NK, NK CD56 ^{Bright} , y NK CD56 ^{DIM} CD16+ en FRR, AR y FIR en comparación con el grupo control sano.	110
Figura 31. Expresión del receptor KIR3DL1 en porcentaje total de NK, NK CD56 ^{Bright} , y NK CD56 ^{DIM} CD16+ en FRR, AR y FIR en comparación con el grupo control sano.	111
Figura 32. Expresión del receptor NKG2C en porcentaje total de NK, NK CD56 ^{Bright} , y NK CD56 ^{DIM} CD16+ en FRR, AR y FIR en comparación con el grupo control sano.	112
Figura 33. Expresión del receptor NKG2A en NK CD56 ^{BRIGHT} , y NK CD56 ^{DIM} CD16+ AR y FIR en combinación con dimorfismo HLA-B en posición -21.	115
Figura 34. Expresión del receptor KIR2DL1 en NK CD56 ^{BRIGHT} , y NK CD56 ^{DIM} CD16+ AR y FIR en combinación con haplotipo HLA-C.	116
Figura 35. Expresión del receptor KIR3DL1 en NK CD56 ^{BRIGHT} , y NK CD56 ^{DIM} CD16+ AR y FIR en combinación con el haplotipo HLA-B	117
Figura 36. Expresión del receptor NKG2C en NK CD56 ^{BRIGHT} , y NK CD56 ^{DIM} CD16+ AR y FIR en combinación con dimorfismo HLA-B en posición -21.	118
Figura 37. Representación tipo Heatmap de los p valores obtenidos tras la comparativa entre grupos, GC vs AR; GC vs FIR y AR vs FIR.	119
Figura 38. Gráfico resumen de marcadores significativos en cada grupo de estudio.	120
Figura 39. Representación del análisis de regresión logística multivariante mediante curvas ROC	121

Figura 40. Representación de aquellas curvas ROC obtenidas en el análisis entre el grupo fallo de implantación recurrente (FIR) y el grupo de abortos de repetición (AR) con las áreas bajo la curva (AUC) más altas.	122
Figura 41. Representación gráfica del algoritmo de decisión mediante un árbol de decisión para los grupos GCS y el Grupo AR.	124
Figura 42. Representación gráfica del algoritmo de decisión mediante un árbol de decisión para los grupos GCS y el Grupo FIR.	124
Figura 43. Representación gráfica del algoritmo de decisión mediante un árbol de decisión para los grupos AR y el Grupo FIR.	125
Figura 44. Protocolo de obtención de resultados para el diagnóstico diferencial de pacientes. Creado en BioRender. Gil, R. (2024) https://BioRender.com/h07l469	138

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de los diferentes grupos de estudio.	73
Tabla 2. Características clínicas y demográficas subdivididas en los haplotipos KIR de los diferentes grupos de estudio.....	74
Tabla 3. Frecuencias de haplotipos KIR clásicos en en los diferentes grupos de estudio.	75
Tabla 4. Frecuencias de los haplotipos KIR centroméricos y teloméricos en los diferentes grupos de estudio.....	79
Tabla 5. Frecuencia de los haplotipos de HLA-C de las pacientes y sus parejas en los diferentes grupos de estudio.....	82
Tabla 6. Matriz de la frecuencia del haplotipo KIR centromérico con los haplotipos HLA-C de las pacientes y sus parejas en los diferentes grupos de estudio.	86
Tabla 7. Características clínicas y demográficas de los grupos de estudio. Los valores se expresan como porcentaje.	88
Tabla 8. Frecuencias de haplotipos KIR clásicos y haplotipos estratificados en región centromérica y región telomérica en los diferentes grupos de estudio.	90
Tabla 9. Frecuencia de los haplotipos de HLA-C en combinación con KIR centromérico de las pacientes en los diferentes grupos de estudio.	93
Tabla 10. Frecuencia de la ausencia de los haplotipos de HLA-C2, HLA-C1 y HLA-Bw4 específicos para los genes <i>KIR2DL1</i> , <i>KIR2DL2/3</i> y <i>KIR3DL1</i> respectivamente de las pacientes en los diferentes grupos de estudio.	97
Tabla 11. Frecuencia del dimorfismo B en la posición -21, se representa la homocigosis para T (TT), la homocigosis para M (MM) y la heterocigosis (MT) de los diferentes grupos de estudio.	99
Tabla 12. Matriz de la frecuencia de los haplotipos KIR centroméricos y teloméricos combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 de los diferentes grupos de estudio.	102
Tabla 13. Matriz de la frecuencia de la hipótesis de ausencia de ligando para los KIR inhibitorios de interés combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 en los diferentes grupos de estudio.	104
Tabla 14. Resumen del análisis de regresión logística multivariante entre el grupo control sano (GCS) y el grupo abortos de repetición (AR) de menor p valor a mayor.	121
Tabla 15. Resumen del análisis de regresión logística multivariante entre el grupo abortos de repetición (AR) y grupo fallo reproductivo recurrente (FIR) de menor p valor a mayor.	122

Tabla suplementaria 1. Haplotipo Cen/tel en grupos de esterilidad y muerte fetal.	179
Tabla suplementaria 2. Combinación de HLA-C1 y HLA-C2 en los diferentes grupos de estudio de mujeres con sus parejas.	180
Tabla suplementaria 3. Matriz de combinaciones entre haplotipos KIR y HLA-C1 y C2 en los distintos grupos de estudio.	182
Tabla suplementaria 4. Frecuencias de haplotipos KIR clásicos en los diferentes grupos de estudio.	184
Tabla suplementaria 5. Frecuencias de haplotipos KIR centroméricos y teloméricos en los distintos grupos de estudio.	184
Tabla suplementaria 6. Frecuencia de los haplotipos de HLA-C en combinación con KIR centromérico de las pacientes en los diferentes grupos de estudio.	185
Tabla suplementaria 7 Frecuencia de los haplotipos de HLA-C2, C1 y Bw4 específicos para los receptores KIR2DL1, KIR2DL2/3 y KIR3DL1 respectivamente en los distintos grupos de estudio. .	185
Tabla suplementaria 8. Frecuencia del dimorfismo B en la posición -21, se representa la homocigosis para T (TT), la homocigosis para M (MM) y la heterocigosis (MT) en los distintos grupos de estudio.	186
Tabla suplementaria 9. Matriz de la frecuencia de los haplotipos KIR centroméricos combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 en los distintos grupos de estudio.	186
Tabla suplementaria 10. Matriz de la frecuencia de los haplotipos KIR teloméricos combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 en los distintos grupos de estudio.....	187
Tabla suplementaria 11 Matriz de la frecuencia de la hipótesis de ausencia de ligando para los KIR inhibitorios de interés combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 en los distintos grupos de estudio.	187

ABREVIATURAS

A

- ADCC** citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
ADN ácido desoxirribonucleico
Ang-1 angiotensina 1
Ang-2 angiotensina 2
AR abortos de repetición
Arg arginina
Asn asparagina

C

- Cen** Centromérico
CMV citomegalovirus
CT citotrofoblasto
CTLA-4 antígeno asociado a linfocito T citotóxico

D

- DAP12** proteína activadora DNAX de 12 kDa
DGGG Sociedad alemana de ginecología y obstetricia
dNK células NK deciduales

E

- eEVT** EVT endovascular
EDTA Ácido etilendiaminotetraacético
ES esterilidad
ESHRE Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología
EVT trofoblasto extravelloso

F

- FcRn** receptor FC neonatal
FIR fallo implantación recurrente
FIV fertilización in vitro
FOXp3 proteína P3 de la Forkhead box
FRR fallo reproductivo recurrente

G

- GCS** grupo control sano

H

- hCG** hormona de la gonadotropina coriónica humana
HLA antígeno leucocitario humano

I

ICM masa celular interna

iEVT EVT intersticial

IgG inmunoglobulina G

iKIR KIR inhibitorio

IMC índice de masa corporal

INF-gamma interferon gamma

IL interleucina

ITAM immunoreceptor tyrosine-based activating motif

ITIM immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif

K

KIR Killer immunoglobulin like receptor

L

LT linfocitos T

LTh LT helper

LILRB1 subfamilia B del receptor similar a la inmunoglobulina leucocitaria

LTreg LT reguladores

Lys lisina

M

M metionina

M1 macrófagos tipo 1

M2 macrófagos tipo 2

MF muestra fetal

MHC complejo mayor de histocompatibilidad

MTHFR enzima metilentetrahidrofolato reductasa

N

NK natural killer

P

PCR-SSP reacción en cadena de la polimerasa-primer de secuencia específica

PD-1 proteína de muerte programada 1

PDL-1 ligando de muerte programada 1

P.ref población de referencia

R

RCOG Royal College of Obstetricians and Gynaecologists

RRF recurrent reproductive failure

S

- SAFO** síndrome antifosfolípido obstétrico
SCT sicitiotrofoblasto
SEGO Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia
Ser serina

T

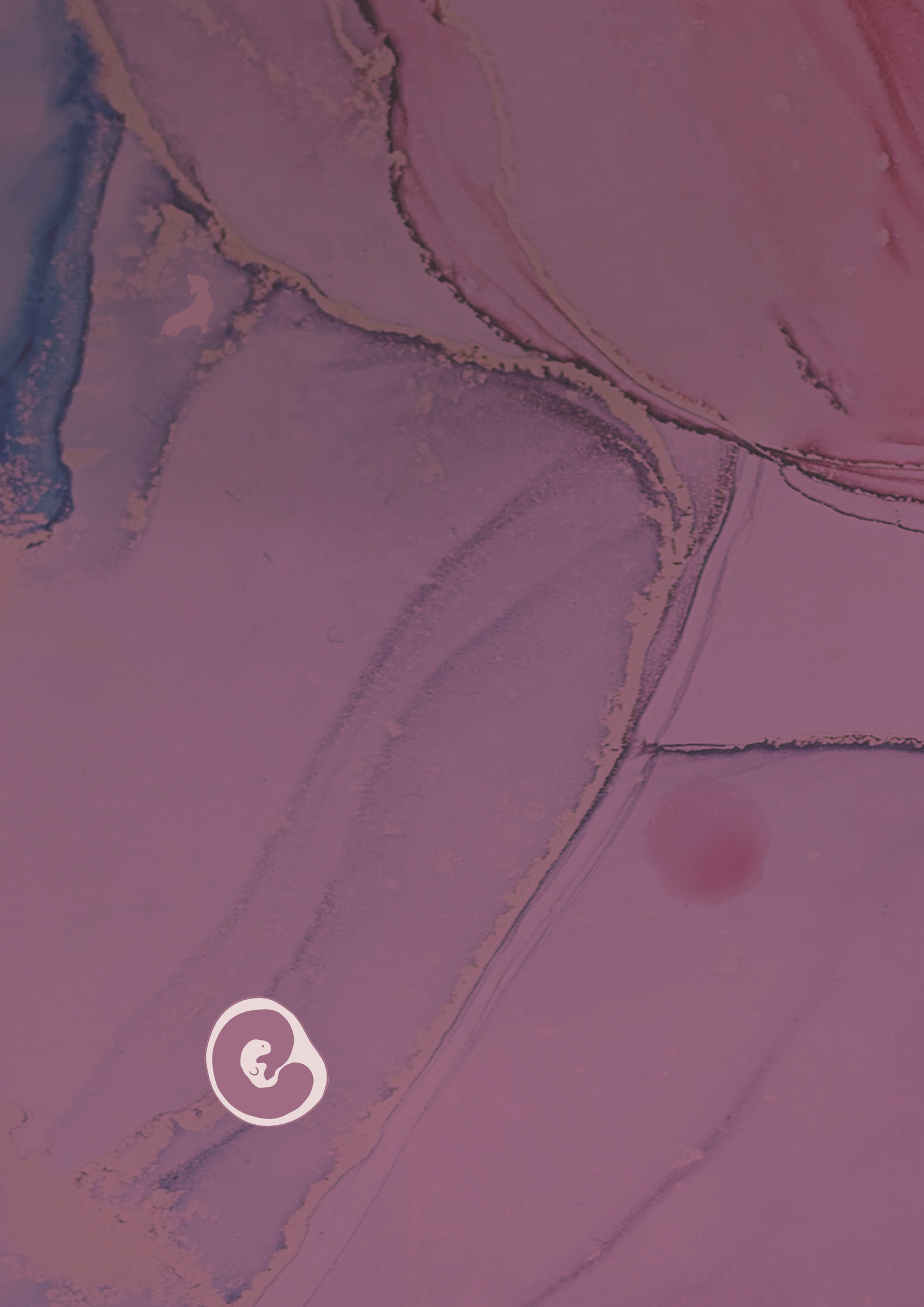
- T** treonina
T4 tiroxina
TE trofoectodermo
Tel Telomérico
TGF-beta factor de crecimiento transformante beta
TNF-alfa factor de necrosis tumoral alfa
TPH progenitores hematopoyéticos
TRA tratamiento de reproducción asistida
TSH hormona estimulante de la tiroides

V

- VCT** citotrofoblasco vellosos
VIH-I virus de la inmunodeficiencia humana de tipo I

X

- XCL1** ligando 1 de quimiocina con motivo X-C





RESUMEN SUMMARY

RESUMEN

Introducción

Este proyecto de tesis se centra en la compleja interacción entre el sistema inmunitario materno y el trofoblasto fetal, destacando la importancia de la educación de las células NK en el éxito reproductivo. Este proceso de educación, mediado por receptores inhibitorios como CD94/NKG2A y los receptores KIR, es crucial no solo para el desarrollo fetal, sino también para otros mecanismos vitales del organismo.

Esta tesis doctoral propone un innovador algoritmo diagnóstico fundamentado en la evaluación de biomarcadores inmunológicos en sangre periférica, con un enfoque particular en las células Natural Killer (NK) citotóxicas y moduladoras, así como en biomarcadores genéticos específicos como los genes KIR, HLA-C y HLA-B. El objetivo principal es desarrollar una herramienta clínica eficaz para el diagnóstico diferencial entre Aborto Recurrente (AR) y Fallo de Implantación Recurrente (FIR) de origen inmunológico.

Las células NK son la principal población celular del sistema inmunitario involucrada en el correcto desarrollo del feto durante los primeros meses de embarazo. Sin embargo, el papel de las interacciones activadoras e inhibitorias que conducen a la educación y la actividad funcional de estas células ha sido poco explorado en este contexto.

Los receptores inhibitorios en el sistema inmunitario actúan como puntos de control vitales para garantizar la correcta función de las células que lo componen. Además de suprimir la activación, estos receptores tienen funciones adicionales; al unirse a sus ligandos, preparan y calibran las funciones de las células NK, un fenómeno conocido como educación.

Objetivos

El objetivo principal de esta memoria de tesis consiste en identificar nuevos biomarcadores diagnósticos en sangre periférica que ayuden a identificar pacientes con AR y FIR que pudieran ser responsables de una irregular educación de las NK, tanto previamente al embarazo, por la propia interacción de las NK con los ligandos maternos propios, como durante el embarazo cuando se produce la interacción con el EVT fetal.

Objetivos adicionales bloque I (datos publicados):

- Analizar el impacto de los haplotipos KIR de pacientes con AR y FIR.
- Analizar el impacto de los haplotipos HLA-C de la paciente y su pareja con AR y FIR.
- Analizar la combinación de haplotipos KIR y HLA-C en pacientes con AR y FIR.

Objetivos adicionales bloque II:

- Analizar el impacto de los haplotipos KIR en pacientes con AR y FIR en una cohorte independiente para la validación los datos anteriormente publicados.
- Analizar el impacto del dimorfismo HLA-B en posición -21 en pacientes con AR y FIR, debido a su impacto en la preeclampsia descrito por otros autores.
- Analizar el impacto de la combinación de los genes inhibitorios de mayor interés (*KIR2DL1*, *KIR2DL2/3*, *KIR3DL1*) con la falta de su ligando HLA en pacientes con AR y FIR.
- Analizar el impacto de la expresión de los receptores NKG2A, NKG2C y KIR inhibitorios para comparar con los resultados obtenidos en la genética en pacientes con AR y FIR.
- Analizar la expresión de los receptores NKG2A, NKG2C y KIR con la presencia genética de los ligandos específicos en pacientes con AR y FIR.

Resultados Clave

En este trabajo de investigación se ha demostrado que existen marcadores genéticos significativos en pacientes con Fallo Reproductivo Recurrente (FRR) globalmente:

Uno de los resultados mas relevantes fue la frecuencia estadísticamente significativa del haplotipo KIR centromérico AA en pacientes con FRR 49,12% (195/397) en comparación con el grupo control sano (GCS) 40,34% (162/402), con un p-valor <0,01. Además, la frecuencia del haplotipo HLA-C2 paterno también se observó significativamente en pacientes con fallo implantación recurrente (FIR) 27,08% frente a 6,98% en GCS, con un p-valor= 0,022.

Además, el haplotipo Cen BB fue más frecuente en las pacientes del grupo GCS 10,61% (42/402), en comparación con el grupo FIR 3,01% (6/133), con un p-valor= 0,001.

Además, se enfatiza en la necesidad de definir haplotipos KIR centroméricos y teloméricos por separado para una evaluación más precisa de los riesgos asociados, que rescatan un 14% de pacientes con fallo reproductivo de causa aloinmune no detectados con la clasificación tradicional. La importancia de evaluar la incongruencia HLA-C-KIR en los grupos de pacientes para mejorar la precisión diagnóstica. Y, por último, se ha desarrollado una “matriz de código inmunológico de gestación” que considera las combinaciones entre KIR materno y HLA-C de la pareja.

Por otro lado, y de forma muy novedosa, se realizó por primera vez el análisis del dimorfismo HLA-B en la posición -21 en este grupo de FRR, y se observó que la frecuencia de la homocigosis de T en la posición -21,

se observó de forma más frecuente en las pacientes con FRR (61%) en comparación con el GCS (30%), con un p-valor= 0,0031, por lo que podría ser un buen y novedoso biomarcador de riesgo. Además, la homocigosis para T en combinación con el haplotipo Cen AA se presentó significativamente con más frecuencia aún que estas dos variables estudiadas por separado en pacientes con FRR (42,67%) en comparación con el GCS (4,76%), con un p-valor=0,0005.

Estos novedosos hallazgos abren la puerta a un nuevo diagnóstico en pacientes con FRR; pero además se observó que si se realiza el estudio de biomarcadores por citometría de flujo se podía ser capaz de diagnosticar de forma diferencial a las pacientes con abortos de repetición (AR) y de las FIR. Se observó un aumento estadísticamente significativo de NKG2A en las células NK CD56BRIGHT de las pacientes con AR (76,85%) en comparación con la FIR (59,65%), con un p-valor= 0,0006, además la expresión de NKG2A era estadísticamente mayor en las pacientes con AR que tenían homocigosis para T en comparación con el grupo FIR con un p-valor= 0,0001 y también un aumento estadísticamente significativo de la expresión de KIR3DL1 de las pacientes con AR (35%) en comparación con FIR (23%) con un p-valor= 0,044.

Conclusiones

Esta investigación subraya la complejidad de las interacciones inmunológicas durante el embarazo y proporciona nuevas perspectivas para el diagnóstico y manejo del AR y FIR. Los hallazgos sugieren que:

1. El haplotipo KIR CenAA es un biomarcador de riesgo significativo para el diagnóstico de AR y FIR.
2. La presencia del alelo HLA-C2 paterno aumenta el riesgo de FIR y, en menor medida, de AR.
3. La ausencia de ligandos HLA-C1 para *KIR2DL2/3* y HLA-Bw4 para *KIR3DL1* se identifica como un marcador de riesgo para AR y FIR.
4. El haplotipo CenBB se presenta como un posible factor protector contra el FRR.
5. La homocigosis para la variante T en la posición -21 de HLA-B se observa en un 55-65% de pacientes con AR y FIR, comparado con un 30% en controles.
6. La combinación de la falta de ligandos para genes *KIR2DL2/3* y la homocigosis T en HLA-B se propone como un marcador de riesgo prometedor para AR y FIR.
7. Los resultados genéticos, aunque diferencian entre controles y pacientes, no logran distinguir efectivamente entre AR y FIR, sugiriendo que la genética por sí sola es insuficiente para caracterizar estas entidades como diferentes.
8. El estudio por citometría de flujo de NKG2A y KIR3DL1 en células NK moduladoras en sangre periférica podía ser un buen biomarcador para el diagnóstico diferencial de AR y FIR.

SUMMARY

Introduction

The research focuses on the complex interaction between the maternal immune system and the fetal trophoblast, highlighting the importance of the education of Natural Killer (NK) cells in reproductive success. This education process, mediated by inhibitory receptors such as CD94/NKG2A and KIR receptors, is crucial not only for fetal development but also for other vital mechanisms within the organism.

This doctoral thesis proposes an innovative diagnostic algorithm based on the evaluation of immunological biomarkers in peripheral blood, with a particular emphasis on cytotoxic and modulatory NK cells, as well as specific genetic biomarkers such as KIR, HLA-C, and HLA-B genes. The main objective is to develop an effective clinical tool for the differential diagnosis between Recurrent Pregnancy Loss (RPL) and Recurrent Implantation Failure (RIF) of immunological origin.

NK cells are the primary cellular population of the immune system involved in the proper development of the fetus during the early months of pregnancy. However, the role of activating and inhibitory interactions that lead to the education and functional activity of these cells has been little explored in this context.

Inhibitory receptors in the immune system act as vital checkpoints to ensure the proper function of its constituent cells. In addition to suppressing activation, these receptors have additional functions; by binding to their ligands, they prepare and calibrate the functions of NK cells, a phenomenon known as education.

Objectives

The main objective of this thesis is to identify new diagnostic biomarkers in peripheral blood that can help identify patients with RPL and RIF who may be responsible for irregular NK cell education. This includes both pre-pregnancy interactions between maternal NK cells and their own ligands, as well as interactions during pregnancy with fetal EVT.

Additional Objectives - Block I (Published Data):

- Analyze the impact of KIR haplotypes in patients with RPL and RIF.
- Analyze the impact of HLA-C haplotypes from patients and their partners with RPL and RIF.
- Analyze the combination of KIR and HLA-C haplotypes in patients with RPL and RIF.

Additional Objectives - Block II:

- Validate previously published data by analyzing KIR haplotypes in an independent cohort of patients with RPL and RIF.
- Analyze the impact of HLA-B dimorphism at position -21 in patients with RPL and RIF due to its association with preeclampsia described by other authors.
- Analyze the combination of major inhibitory genes (*KIR2DL1*, *KIR2DL2/3*, *KIR3DL1*) with the absence of their HLA ligands in patients with RPL and RIF.
- Investigate the expression of NKG2A, NKG2C, and inhibitory KIR receptors to compare genetic findings in patients with RPL and RIF.
- Examine the expression of NKG2A, NKG2C, and KIR receptors alongside genetic presence of specific ligands in patients with RPL and RIF.

Key Findings

One of the most relevant findings was the statistically significant frequency of the centromeric KIR haplotype AA in patients with RRF 49.12% (195/397) compared to the healthy control group (HCG) 40.34% (162/402), with a p-value <0.01. Additionally, the frequency of the paternal HLA-C2 haplotype was also significantly observed in patients with recurrent implantation failure (RIF) 27.08% compared to HCG 6.98%, with a p-value = 0.022.

Moreover, the Cen BB haplotype was more frequent in patients from the HCG 10.61% (42/402), compared to the RIF group 3.01% (6/133), with a p-value = 0.001.

Furthermore, there is an emphasis on the need to define centromeric and telomeric KIR haplotypes separately for a more accurate assessment of the associated risks, which identifies 14% of patients with reproductive failure of undetected alloimmune causes using traditional classification. The importance of evaluating HLA-C-KIR incongruence in patient groups to improve diagnostic accuracy is highlighted. Finally, an “immunological gestation code matrix” has been developed that considers the combinations between maternal KIR and the partner’s HLA-C.

On the other hand, and in a very novel way, the analysis of HLA-B dimorphism at position -21 was performed for the first time in this RRF group, and it was observed that the frequency of homozygosity for T at position -21 was more frequent in patients with RRF (61%) compared to the HCG (30%), with a p-value = 0.0031, suggesting it could be a good and novel risk biomarker. Additionally, homozygosity for T in combination with the Cen AA haplotype was significantly more frequent than these two variables studied separately in patients with RRF (42.67%) compared to the HCG (4.76%), with a p-value <0.001.

These novel findings open the door to a new diagnosis in patients with RRF; additionally, it was observed that if biomarker studies are conducted through flow cytometry, it may be possible to differentially diagnose patients with recurrent miscarriages (RM) (76,85%) and those with RRF (59,65%). A statistically significant increase in NKG2A was observed in the CD56BRIGHT NK cells of patients with RM compared to RRF, with a p-value = 0.0006. Furthermore, the expression of NKG2A was statistically higher in RM patients who were homozygous for T compared to the RRF group, with a p-value = 0.0001, and there was also a statistically significant increase in the expression of KIR3DL1 in patients with RM (35%) compared to RIF (23%), with a p-value = 0.044.

Conclusions

This research underscores the complexity of immunological interactions during pregnancy while offering new perspectives for diagnosing and managing RM and RIF. Key conclusions include:

1. The KIR CenAA haplotype is a significant risk biomarker for diagnosing RPL and RIF.
2. Paternal HLA-C2 allele presence increases RIF risk and, to a lesser extent, RPL risk.
3. Absence of HLA-C1 ligands for *KIR2DL2/3* or HLA-Bw4 ligands for *KIR3DL1* is identified as a risk marker for RPL and RIF.
4. CenBB haplotype presents itself as a potential protective factor against RRF.
5. Homozygosity for T variant at position -21 of HLA-B is observed in 55–65% of RM/RIF patients compared to 30% in controls.
6. Combining absence of ligands for *KIR2DL2/3* genes with T homozygosity at HLA-B is proposed as a promising risk marker for RPL and RIF.
7. Genetic results differentiate between controls and patients but fail to effectively distinguish between RPL and RIF, suggesting genetics alone is insufficient to characterize these entities.
8. Flow cytometry analysis of NKG2A/KIR3DL1 expression on modulatory NK cells could serve as a reliable biomarker for differential diagnosis between RPL and RIF.





INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Desarrollo embrio-fetal

La existencia humana debe entenderse como un proceso continuo, donde la fecundación representa un momento clave. En condiciones normales, la fecundación da lugar a un nuevo individuo genéticamente diferenciado, a pesar de que el genoma embrionario no se active realmente hasta la formación de las 4-8 células.

1.1. Placentación

La placenta es el órgano más grande y el primero en desarrollarse durante el embarazo, desempeñando un papel central en la salud tanto de la madre como del feto. El correcto desarrollo de la misma es importante; cuando se no se produce en condiciones normales puede dar lugar a diferentes enfermedades gestacionales, tales como la preeclampsia, la restricción del crecimiento fetal, abortos de repetición y fallos en la implantación [1]. Aunque se reconoce la importancia de la placenta para el éxito reproductivo, todavía existen muchas limitaciones acerca de su desarrollo en humanos. Esta falta de información se debe, en gran medida, a los obstáculos éticos y logísticos asociados con la investigación del embarazo temprano en humanos, así como a la escasez de modelos in vitro que simulen adecuadamente este proceso [2].

La placenta humana se origina a partir del trofoectodermo (TE), que se forma aproximadamente cinco días después de la fertilización. En esta primera etapa, conocida como **etapa de diferenciación**, el embrión se divide en dos linajes: la masa celular interna (ICM) y el TE. Este último es esencial para conseguir la adherencia a la mucosa del endometrio, iniciando así el proceso de implantación (Fig. 1.1).

El TE además de contribuir en la formación de la placenta, es fundamental para establecer la conexión entre el embrión y el tejido materno, asegurando el intercambio de nutrientes y gases necesarios para el desarrollo fetal. Además, el correcto desarrollo del TE es vital para la regulación de la respuesta inmune materna, lo que permite la tolerancia del sistema inmunológico hacia el feto, es por ello que en muchas ocasiones se compara con el trasplante semialogénico.

A medida que avanza el embarazo, la placenta continúa desarrollándose y madurando, y adquiere múltiples funciones, incluyendo la producción de hormonas y factores de crecimiento que son esenciales para el mantenimiento del embarazo.

La segunda etapa del desarrollo placentario se conoce como la **etapa prelacunar**. Durante esta fase, el TE se fusiona con el endometrio materno, formando el sincitiotrofoblasto (SCT) primario, que invade rápidamente la decidua materna (Fig. 1.2) [3]. En este momento, el blastocisto se encuentra completamente incrustado en la decidua y está recubierto por un epitelio superficial, lo que facilita la conexión entre el embrión y el tejido materno [4].

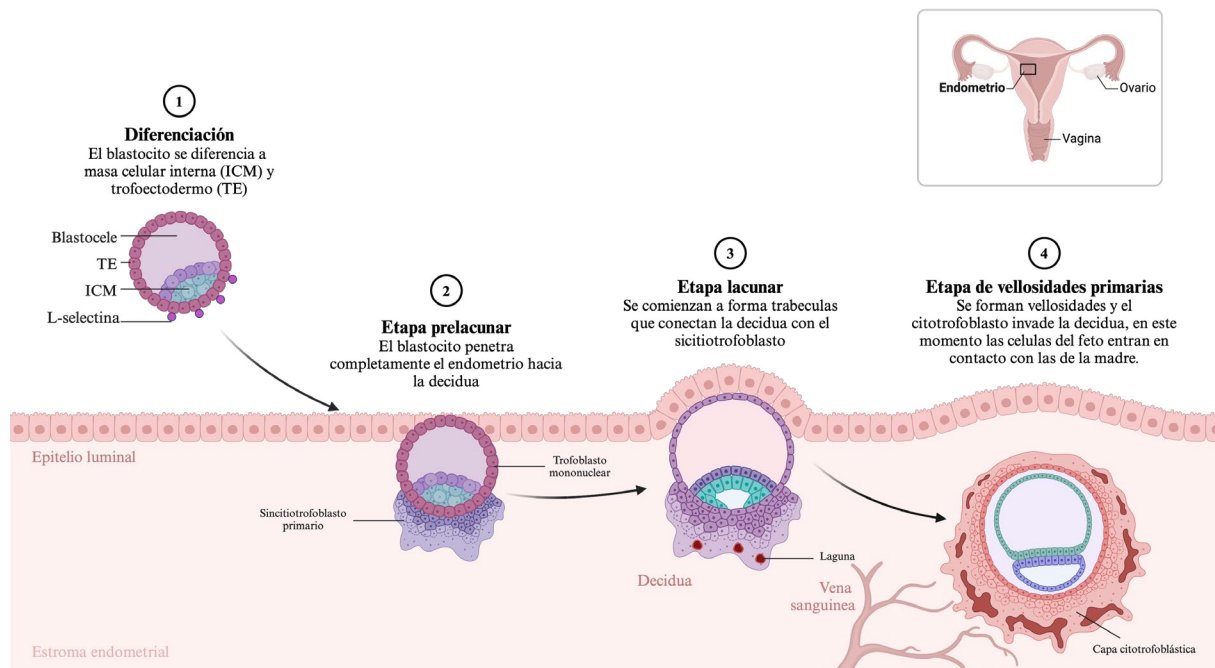


Figura 1. Etapas de la tempranas del desarrollo placentario.

Etapas tempranas de la formación de la placenta, así como la implantación del blastocisto. (1) Diferenciación células, (2) Etapa prelacunar, (3) Etapa lacunar (4) Etapa de vellosidades primarias. Creado en BioRender. Gil, R. (2024) <https://BioRender.com/m80v326>

A continuación, se avanza a la **etapa lacunar**, en la cual aparecen espacios en la masa sincitial que se llenan de líquido. Estos espacios, conocidos como lagunas, se agrandan y se fusionan, formando un sistema de trabéculas que proporciona una mayor superficie para el intercambio de nutrientes y gases (Fig. 1.3) [4]. Durante esta etapa, el SCT también se erosiona hacia la decidua, permitiendo que las secreciones sanguíneas de la decidua bañen las lagunas esenciales para el establecimiento de la circulación materno-fetal.

En cuarto y último lugar se produce la **etapa de desarrollo de las vellosidades**. En esta fase, las células trofoblásticas, específicamente los citotrofoblastos (CT), comienzan a proliferar rápidamente, formando proyecciones que atraviesan el SCT primario y dan lugar a las vellosidades primarias. Estas estructuras proliferan y se ramifican rápidamente, formando lo que se denomina “árboles vellosos”. A medida que los CT penetran en el SCT primario, continúan su desarrollo en la decidua, estableciendo una conexión más profunda con el tejido materno.

Al final de este proceso, el blastocisto está cubierto por tres capas: la **placa coriónica interna**, las vellosidades que se separan por el **espacio intervelloso**, y la **cubierta de citotrofoblasto** que está en contacto con la decidua. Esta organización estructural es fundamental para el correcto funcionamiento de la placenta, permitiendo no solo el intercambio de nutrientes y gases, sino también la secreción de hormonas y factores que son cruciales para el mantenimiento del embarazo.

Poco después, las células extraembrionarias, penetran a las vellosidades secundarias, que se forman a partir de prolongaciones de las vellosidades primarias. En este contexto se forma la interfaz materno-fetal.

1.2. Células del trofoblasto

Las funciones más importantes de la placenta son llevadas a cabo por las células del trofoblasto. El término “trofoblasto” fue introducido por primera vez por el embriólogo Ambrosius Arnold Willem Hubrecht en 1889 para describir las células que forman la barrera protectora entre la madre y el feto, y que son responsables del transporte de nutrientes esenciales [5]. Hubrecht también observó que estas células tienen una alta capacidad invasiva y dependen de la decidua para su supervivencia [5].

Dentro de lo que se conoce como trofoblasto humano, se han identificado principalmente cuatro subtipos celulares, que incluyen las células del SCT, las células del citotrofoblasto vellosos (VCT) y dos subtipos de células del trofoblasto extraveloso (EVT); EVT intersticial (iEVT) y EVT endovascular (eEVT).

El SCT es la capa que establece el contacto directo con la sangre materna y las secreciones de las glándulas maternas, formando un revestimiento repleto de vellosidades. Esta capa es el principal sitio de intercambio materno-fetal de gases y nutrientes, y permite el crecimiento y desarrollo embrionario [6].

Además de su función en el transporte, el SCT actúa como una barrera protectora frente al sistema inmune materno. Esto se debe a que evita la expresión de moléculas del antígeno leucocitario humano (HLA), haciendo que las células del feto, que son alogénicas, no sean reconocidas como “no propias” [6] por el sistema inmunológico de la madre. Esta característica es fundamental para la tolerancia inmunológica, permitiendo que el embarazo progrese sin ser atacado por las respuestas inmunitarias maternas.

En lo que respecta a estas células del SCT también expresan el receptor Fc neonatal (FcRn), que facilita el transporte de inmunoglobulina G (IgG) materna a través de la circulación fetal [7]. Estos anticuerpos maternos, en particular las IgG digalactosiladas, se unen al FcRn en el SCT y son eficaces en la activación de las células NK fetales, proporcionando una protección crucial al recién nacido antes de su nacimiento [8]. Esta transferencia de anticuerpos es un aspecto vital de la inmunidad pasiva, permitiendo que el feto reciba protección contra infecciones en un entorno aún vulnerable.

En segundo lugar, las células del VCT se encuentra justo debajo del SCT y ha sido históricamente considerado la capa responsable del desarrollo del trofoblasto, dado que presenta alta actividad mitótica y expresa una variedad de marcadores proliferativos [9]. Al inicio del embarazo, las células del VCT son cúbicas y, a medida que avanza el desarrollo, esta capa se vuelve discontinua, cubriendo aproximadamente un 25% de la superficie vellosa de la placenta [10].

A medida que la placenta aumenta de tamaño, la capa externa del citotrofoblasto se vuelve cada vez más discontinua provocando la liberación de las células del VCT y formando puntas distales que entran en contacto con la decidua materna. Estas estructuras, conocidas como vellosidades de anclaje, son fundamentales para la implantación y anclaje de la placenta en el tejido materno.

Por último, las células del EVT que se originan a partir de las vellosidades de anclaje, y como se ha mencionado anteriormente, se diferencian en dos subtipos celulares distintos: iEVT, que migra a través del estroma decidual hacia las arterias espirales maternas, y eEVT, que desciende por el interior de las arterias espirales [11-13]. Esta migración permite posteriormente la remodelación del lecho vascular materno, facilitando un adecuado flujo sanguíneo materno-fetal.

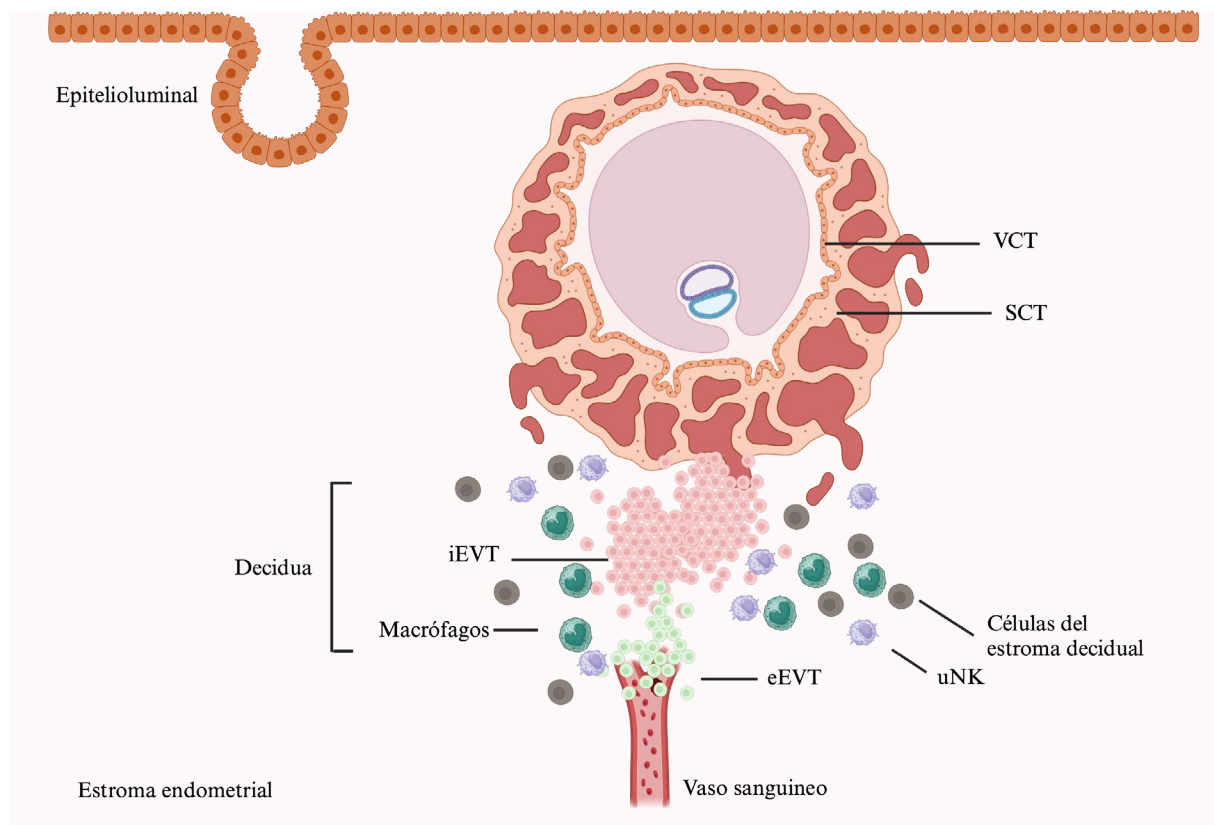


Figura 2. Desarrollo de la capa trofoblástica y extravasación de las células a la interfase materno-fetal.

Creado en BioRender. Gil, R. (2024) <https://BioRender.com/h52c794>

Las células del iEVT se dirigen hacia las arterias espirales, donde forman un manguito de células circundantes. Este cambio en la morfología celular implica la pérdida de actina, y transforma a estas células en un tipo más fibrinógeno. Esta transformación arterial mediada por el trofoblasto genera una disminución de la actividad vascular y una conversión de la arteria en un tubo que permite una alta conductancia a baja presión, una adaptación esencial para el desarrollo de un embarazo normal [14].

Uno de los resultados de la invasión de las iEVT en el estroma uterino es su interacción con células estromales deciduales, macrófagos y células natural killer (NK) uterinas. Estas interacciones son fundamentales para la regulación inmunológica del aloinjerto placentario, además de desempeñar un papel en el control de la función del trofoblasto extraveloso (Fig. 2) [15,16]. La capacidad de las iEVT para interactuar con el sistema inmunológico materno es importante que ya permite establecer y mantener un entorno tolerante que permita el crecimiento fetal si las interacciones son las correctas.

Tras la transformación arterial, las células del eEVT se mueven de manera retrógrada a lo largo de la arteria, formando un tapón que impide la entrada de sangre al espacio intervelloso. Este tapón se mantiene hasta el final del primer trimestre, momento en el cual se establece la circulación hemocorial completa [17-19]. La circulación hemocorial permite un intercambio eficiente de nutrientes y gases entre la madre y el feto.

2. Patología en la fase de implantación

Como se ha mencionado anteriormente, es necesario que los mecanismos anteriores actúen de manera conjunta para que se produzca la gestación con normalidad. Sin embargo, la tasa de pérdida gestacional es preocupante y cada vez afecta a más personas [20].

Entre un 20-50% de los casos de pérdida se deben a malformaciones uterinas, síndrome antifosfolípido, anomalías genéticas e infecciones, pero existe gran parte de los casos en los que la causa se desconoce [20].

A su vez, existen patologías que se han relacionado fisiológicamente con algunas alteraciones inmunológicas, esta tesis doctoral está centrada en el aborto de repetición y el fallo de implantación recurrente; estas dos patologías se pueden englobar en el fallo reproductivo recurrente.

2.1. Fallo reproductivo recurrente

El fallo reproductivo recurrente (FRR) es un estado clínicamente complejo que afecta aproximadamente entre el 1% y el 5% de las parejas en periodo reproductivo [20]. Este estado se define como la incapacidad de la mujer para lograr un embarazo viable tras varios intentos.

El FRR es un trastorno en el cual se engloban dos entidades clínicas bien definidas: el aborto de repetición (AR), conocido en inglés como recurrent pregnancy loss (RPL), y el fallo de implantación recurrente (FIR), o recurrent implantation failure (RIF). Estas dos condiciones comparten muchas similitudes en sus causas, pero presentan ciertas características distintas.

2.1.1. Aborto de repetición

Según las guías publicadas por la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE), el aborto de repetición (AR) se define como la pérdida de dos o más gestaciones antes de las 24 semanas de edad gestacional [21]. Esta definición incluye no solo los embarazos clínicos, sino también los embarazos bioquímicos, en los que no se ha detectado un saco gestacional en la ecografía, pero se ha confirmado la presencia de la hormona gonadotropina coriónica humana (beta-hCG). Sin embargo, están excluidos los embarazos molares y el FIR posterior a tratamientos de reproducción asistida (TRA) [22].

La Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) también coincide con la definición europea, aunque su Grupo de Trabajo de Fallo Reproductivo [23] acepta como criterio la pérdida de dos o más gestaciones clínicas, excluyendo los embarazos bioquímicos. Además, se diferencia en considerar la pérdida gestacional hasta la semana 22, en lugar de la semana 24.

El AR puede subdividirse en dos categorías: el **AR temprano**, que ocurre antes de la décima semana de gestación, y el **AR tardío**, que sucede después de la décima semana. En la actualidad persiste una controversia

no resuelta sobre si esta condición debe considerarse únicamente cuando los abortos son consecutivos o también cuando son intercalados [24], por lo que existen aún puntos que necesitan ser concretados para definir este trastorno con exactitud.

Se estima que aproximadamente el 15% de los embarazos culminan en abortos espontáneos. De este porcentaje, entre el 1% y el 3% [25,26] se convierten en abortos de repetición, lo que la clasifica como una enfermedad rara. Aún más preocupante es que en el 50% de los casos no se ha establecido una etiología clara. Tras descartar causas genéticas, anatómicas, endocrinas o inmunológicas, se clasifica como AR de causa desconocida.

Recientemente, se han identificado diversas causas de infertilidad desconocida que pueden estar asociadas con pérdidas recurrentes de embarazo, muchas de las cuales están intrínsecamente relacionadas con el sistema inmunitario. Este área representa un campo de investigación en desarrollo que podría proporcionar información valiosa para comprender mejor los mecanismos subyacentes al AR y para el desarrollo de nuevas estrategias de intervención [27].

2.1.2. Fallo de implantación recurrente

El fallo de implantación recurrente (FIR) se define como el fracaso en lograr un embarazo a término tras realizar al menos tres transferencias de dos embriones de buena calidad [28], o al menos dos transferencias de dos ovodonantes distintas, también de buena calidad. Según la SEGO esta definición refleja las prácticas anteriores, cuando se transfieren más embriones y criopreservar no es tan eficaz [29]. Sin embargo, carece de un consenso universal, lo que lleva a que diferentes sociedades propongan sus propias definiciones.

En 2014, dos grupos españoles adaptaron la definición de FIR, estableciendo que se considera FIR cuando no se logra el embarazo en mujeres menores de 40 años tras la transferencia de al menos cuatro embriones de buena calidad, distribuidos en un mínimo de tres transferencias, incluyendo tanto las realizadas en fresco como las de embriones criopreservados.

Por otro lado, la guía canadiense de fertilidad publicó en 2020 una revisión sobre el FIR, reconociendo que su definición está en constante evolución y acepta la heterogeneidad de las múltiples definiciones que dependen del tipo de fallo [30].

La tasa de implantación en tratamientos de fertilización in vitro (FIV) es aproximadamente del 30%. Algunos estudios estiman una incidencia de FIR del 10% [30]. Sin embargo, continúan realizándose estudios poblacionales al respecto. En 2020, el grupo de Bustelli et. Al, revisó esta cifra, redefiniendo el FIR como la ocurrencia de tres intentos fallidos en parejas con buen pronóstico, basado en un análisis de 1.221 pacientes. Su estudio elevó la estimación de FIR al 15% [31]. Además, en alrededor del 30% de los casos de FIR, no se identifica ninguna causa subyacente, lo que resalta la necesidad de más investigación en esta área [32].

2.2. Factores de riesgo y etiología del fallo reproductivo recurrente

2.2.1. Factores de riesgo

A) Edad materna

Tanto en AR como en FIR, la edad materna se considera uno de los factores de riesgo más comunes. El riesgo de pérdida gestacional aumenta de manera directamente proporcional a la edad. A partir de los 32 años, se observa un deterioro progresivo de la reserva y calidad ovárica, que se acelera a partir de los 37 años [33-35].

Un estudio retrospectivo realizado en mujeres en edad fértil (entre 12 y 45 años) mostró un aumento exponencial en la incidencia de pérdida gestacional, reflejado en los siguientes porcentajes [36, 37]:

- 12 a 19 años: 13%
- 20 a 24 años: 11%
- 25 a 29 años: 12%
- 30 a 34 años: 15%
- 35 a 39 años: 25%
- 40 a 44 años: 51%
- 45 años: 93%

Estos datos subrayan la correlación entre la edad materna y el riesgo de aborto espontáneo, destacando la importancia de la edad en la planificación familiar y en la toma de decisiones sobre tratamientos de fertilidad.

Además de la edad materna, la edad paterna avanzada también ha sido identificada como un factor de riesgo. El deterioro de la calidad y cantidad de los espermatozoides en hombres mayores puede contribuir a problemas reproductivos, incluyendo el fracaso en la implantación y el aumento del riesgo de abortos espontáneos. Estudios han demostrado que el envejecimiento paterno puede afectar la salud del embrión y la viabilidad del embarazo, lo que añade una dimensión adicional a las consideraciones sobre la edad en la reproducción.

B) Índice de masa corporal

El índice de masa corporal (IMC) es un factor que se ha asociado significativamente con el riesgo de abortos espontáneos. Los índices de masa corporal superiores a 25 kg/m² se han relacionado con un aumento en la incidencia de AR y FIR, especialmente en mujeres que se han sometido a tratamientos de reproducción asistida [38, 39]. Por eso cuando se tiene un IMC muy elevado se debe tener en consideración el estado nutricional en la evaluación de la salud reproductiva.

Un estudio retrospectivo realizado en la Universidad de Sheffield [40] examinó la correlación entre el IMC y el aborto recurrente. En este estudio, se compararon 1.644 mujeres con un IMC de 30 kg/m² con 3.288 mujeres del grupo control, que tenían un IMC entre 19 y 24,9 kg/m² y siendo de la misma edad. Los hallazgos revelaron que las mujeres con un IMC elevado eran cuatro veces más propensas a tener un historial de al menos tres abortos espontáneos en comparación con el grupo sano.

Estos resultados sugieren que el exceso de peso puede influir negativamente en la salud reproductiva, aumentando el riesgo de complicaciones en el embarazo. Las alteraciones hormonales y metabólicas asociadas con un IMC elevado pueden afectar la calidad ovárica, la función endometrial y, en última instancia, el éxito de la implantación.

C) Número de abortos previos

El número de abortos previos es un factor de riesgo significativo a considerar en la evaluación de la salud reproductiva. Estudios recientes sugieren que los eventos adversos en un embarazo anterior incrementan el riesgo de sufrir un nuevo aborto en intentos posteriores [41]. De hecho, el riesgo de nuevos abortos aumenta de manera acumulativa, alcanzando hasta un 40% de probabilidad tras tres pérdidas gestacionales sucesivas.

De acuerdo con las guías de la Sociedad Alemana de Ginecología y Obstetricia (DGGG), el riesgo de recurrencia de abortos espontáneos se incrementa con la edad materna y el número de abortos previos. Específicamente, el riesgo se presenta de la siguiente manera [42]:

- Tras sufrir dos abortos espontáneos, el riesgo de recurrencia aumenta un 24% para mujeres entre 25 y 29 años, y un 44% para aquellas entre 40 y 44 años.
- Después de sufrir tres o más abortos espontáneos, el riesgo se eleva a un 42% en el grupo de 25 a 29 años y a un 65% en el grupo de 40 a 44 años.

Estos datos subrayan la importancia de considerar el historial de abortos previos en la evaluación de las parejas que buscan concebir. La acumulación de abortos puede estar relacionada con factores subyacentes que afectan la salud reproductiva, tales como alteraciones anatómicas, hormonales o inmunológicas, que requieren atención médica adecuada.

D) Factores ambientales

La contaminación del aire y la exposición a sustancias químicas se han identificado como factores de riesgo significativos en el AR y el FIR [43, 44]. Estas exposiciones ambientales pueden afectar negativamente la salud reproductiva, contribuyendo a complicaciones en el embarazo y alterando los procesos de implantación.

Además, el consumo de tabaco y alcohol también ha sido relacionado con un mayor riesgo de abortos espontáneos [45]. En particular, el tabaquismo se ha asociado con un aumento en la incidencia de abortos, así como con un mayor riesgo de embarazos ectópicos. Las evidencias indican que las mujeres que fuman presentan peores resultados cuando se someten a tratamientos de reproducción asistida, lo que sugiere que el tabaquismo puede interferir con la eficacia de estas intervenciones.

En los hombres, el tabaquismo también tiene implicaciones negativas. Se ha asociado con un deterioro en los parámetros funcionales y morfológicos del espermatozoides [46], lo que puede afectar la fertilidad masculina y, en consecuencia, los resultados de los tratamientos de fertilidad. La calidad del espermatozoides es crucial para el éxito de la concepción y el desarrollo del embarazo, y su deterioro puede contribuir a complicaciones reproductivas.

2.2.2. Etiología

Aunque en el FRR se puede diferenciar en dos entidades distintas clínicamente, la etiología en los dos casos es compartida. Se han realizado estudios exhaustivos al respecto y, aun así, la causa sigue siendo una incógnita en numerosas situaciones [47].

A lo largo de los años se han descrito una serie de causas que de forma individual o en combinación están asociadas tanto en AR como el FIR (Fig 3)

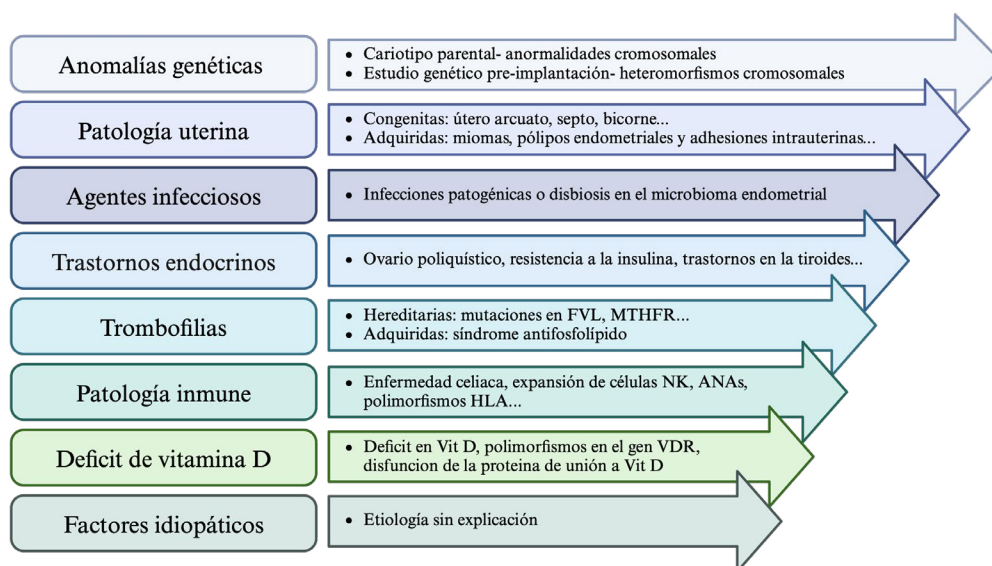


Figura 3. Resumen de las causas conocidas hasta el momento de AR y de FIR.

Creado en BioRender. Gil, R. (2024) <https://BioRender.com/e75e470>

A) Anomalías genéticas

Se ha investigado ampliamente el papel de las anomalías genéticas como la causa más relevante de aborto espontáneo en el primer trimestre de embarazo, representando entre el 50% y el 60% de los casos [48]. Los estudios familiares indican que las hermanas de mujeres con AR tienen una mayor predisposición a experimentar también abortos de repetición, con una incidencia que se estima entre el 2% y el 4%. Además, los portadores de variantes genéticas específicas presentan un riesgo incrementado de abortos recurrentes [49].

Los factores genéticos más comunes relacionados con el AR y el FIR incluyen alteraciones en la metilación del ADN, heteromorfismos cromosómicos y variaciones genéticas en un solo nucleótido [50, 51]. Se ha observado que al menos el 50% de los casos de FRR están asociados con anomalías citogenéticas [37, 52]. En particular, del 2 al 8% de los casos afecta a anomalías en el cariotipo [53] y se estima que entre el 2% y el 5% de las pacientes con AR presentan translocaciones Robertsonianas [54], que pueden interferir con el desarrollo embrionario normal.

La inactivación del cromosoma X, que ocurre durante la embriogénesis, ha sido propuesta como una posible causa de AR. Un estudio comparativo reveló que, en mujeres con AR, la tasa de inactivación del cromosoma X fue del 17,7%, en contraste con solo el 1.6% en mujeres sanas [55], lo que sugiere una disfunción en este proceso en las mujeres afectadas.

El principal factor de riesgo para la aneuploidía embrionaria es la edad materna. La proporción de embriones aneuploides se estima en un 25% a 35% en mujeres menores de 35 años, aumentando significativamente a entre el 55% y el 85% en mujeres de entre 40 y 45 años. Este aumento en la tasa de aneuploidías conforme avanza la edad materna subraya la necesidad de una evaluación genética en parejas que han experimentado abortos recurrentes, especialmente en grupos de edad avanzada [55].

B) Factores uterinos

Dentro de las anomalías estructurales uterinas, varios estudios encontrados que estaba presente en el 7-28% de las mujeres con fallo recurrente de implantación en comparación con mujeres de la población general que suponía un 4-7% [52, 56, 57].

Las anomalías congénitas más comunes corresponden los úteros bicornes, arcuatos o septos (52). Entre las pacientes con defectos congénitos, el útero septo son los que tienen mayor incidencia dentro del fallo reproductivo recurrente (44,3%), las pacientes con útero bicorneo (36%) y por último las pacientes con útero arcuato (25,7%) [52].

En cuanto a los defectos estructurales adquiridos, los leiomiomas uterinos submucosos, los pólipos y las sinequias endometriales son las principales causas de interferencia en el proceso de implantación y desarrollo embrionario. Estas condiciones se asocian entre el 6-15% de las mujeres con fallo reproductivo recurrente [36, 52, 58].

C) Agentes infecciosos

En distintos estudios se ha demostrado que la vaginosis bacteriana podría ser una de las causas durante el primer trimestre de embarazo en FRR [37]. Sin embargo, el papel de infección en esta enfermedad no está del todo claro.

Hay estudios que han demostrado una asociación directa entre el fallo reproductivo recurrente y la clamidia, micoplasma y toxoplasma [36].

El microbioma de la cavidad endometrial actualmente se considera un factor de éxito reproductivo, por el contrario, la disbiosis en el endometrio se asocia a fallo reproductivo recurrente como un factor de riesgo [59]. Especialmente la especie de Lactobacillaceae es una de las más investigadas recientemente [60].

D) Trastornos endocrinos

Síndrome de ovario poliquístico

Es un trastorno heterogéneo que se caracteriza por padecer hiperandrogenismo, resistencia a la insulina y disfunción ovárica [61] es un síndrome que afecta a diferentes aspectos, tanto en la salud de la mujer como a nivel endocrino, metabólico y reproductivo [62].

Se ha demostrado que las mujeres con ovario poliquístico tienen mayor riesgo de padecer FRR [63], el aumento de este riesgo se ha atribuido recientemente a la resistencia a la insulina y al hiperandrogenismo ya que afectan el desarrollo folicular [31, 62].

Trastornos tiroideos

En el embarazo se pueden producir cambios que afecten de manera negativa a la función tiroidea. De manera que, se ha observado que el hipotiroidismo subclínico no aumenta el riesgo de FRR, pero el hipotiroidismo clínicamente diagnosticado sí que es un factor de riesgo para esta enfermedad por su elevación moderada y significativa de la TSH la cual es influyente en el deterioro fetal, y el desarrollo del feto [64].

Diabetes mellitus

La diabetes mellitus bien controlada no está considerada como un factor de riesgo en el FRR, de hecho, en el Real Colegio de Obstetras y Ginecólogos (RCOG) afirman que “la diabetes mellitus bien controlada no es un factor de riesgo en el aborto recurrente” [36, 53], el problema es cuando esta enfermedad no está bien controlada y se produce un aumento de los niveles de HbA1c.

E) Trombofilias

La predisposición a una coagulación inapropiada puede influir en el flujo coriónico y contribuir la aparición de abortos de repetición en las mujeres [65-67]. Un metaanálisis reciente, que incluyó a 30.254 participantes de 89 estudios diferentes, sugiere que la trombofilia hereditaria está asociada con el FRR [68]. Existen dos tipos de trombofilia que pueden relacionarse con este fenómeno: la **trombofilia hereditaria** y la **trombofilia adquirida**.

Entre los tipos de trombofilia hereditaria más prevalentes relacionados con FRR se encuentran los polimorfismos genéticos en la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), las mutaciones de la protrombina y la deficiencia de proteína C, entre otros. Por otro lado, el síndrome antifosfolípido obstétrico (SAFO) es el principal tipo de trombofilia adquirida asociada con el FRR [67].

El SAFO es una afección autoinmune caracterizada por la producción de anticuerpos antifosfolípidos, que favorecen eventos protrombóticos y están estrechamente relacionados con complicaciones en el embarazo. Numerosos estudios han investigado sobre ello [69-71], llegando a resultados en los que la prevalencia de anticuerpos antifosfolípidos en mujeres que experimentan abortos de repetición es entre el 15% y el 20%, en comparación con solo el 2% en mujeres de bajo riesgo, lo que confirma la alta asociación entre el SAFO y el aborto recurrente. Esta asociación también se relaciona con tasas bajas de nacidos vivos, que pueden ser tan solo del 10% en ausencia de tratamiento farmacológico [37].

Según las guías de la Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG), para que el SAFO se considere relacionado con la pérdida de embarazo, deben cumplirse las siguientes condiciones [37]:

- Tres o más abortos espontáneos consecutivos antes de la décima semana de gestación.
- Antecedentes de una o más pérdidas de embarazo después de la décima semana de gestación, si el feto es morfológicamente normal.
- Antecedentes de uno o más partos prematuros antes de la semana 34 de gestación.

Dada la alta asociación entre el SAFO y el aborto recurrente, es fundamental prestar especial atención a las mujeres que cumplen con estas condiciones.

F) Patología inmune

La respuesta inmunológica controlada es fundamental para el éxito del embarazo. Numerosos estudios han sugerido que ciertas variantes genéticas están asociadas con el FRR [72, 73]. En particular, se ha observado que la supresión de reguladores inmunitarios, la inducción de procesos inflamatorios y el rechazo inmunitario pueden estar relacionados con variantes genéticas del sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA), lo que induce un déficit en la tolerancia inmunitaria [74-77].

La literatura indica que muchos casos de fallo reproductivo recurrente idiopático pueden atribuirse a una etiología inmunogenética, incluyendo variaciones en los genes HLA y su asociación con los receptores correspondientes [78, 79]. Sin embargo, la conexión precisa entre el HLA y enfermedades específicas aún no se comprende completamente, ya que múltiples factores genéticos y ambientales pueden contribuir a estos procesos patológicos [80].

Se postula que el sistema HLA es uno de los factores inmunológicos más críticos en el mantenimiento del embarazo, desempeñando un papel crucial en el aumento del FRR. La presencia de alelos HLA maternos y la falta de coincidencia HLA entre la madre y el feto se han asociado con un mayor riesgo de complicaciones en el embarazo [81].

Además, diversas enfermedades autoinmunitarias, como el lupus eritematoso, la artritis reumatoide, la enfermedad celíaca y la sensibilidad al gluten no celíaca, así como la presencia de anticuerpos antitiroideos y antinucleares, se han relacionado con abortos de repetición. En particular, en el contexto de la enfermedad celíaca, se han propuesto asociaciones entre los alelos HLA DRB1*03 y DQB1*03 y el fallo reproductivo recurrente [82, 83].

La prevalencia de la positividad para HLA DQ2/DQ8 se estima en alrededor del 53% en pacientes con FRR, lo que es aproximadamente el doble que en la población general [84, 85]. Investigaciones recientes también han demostrado que las mujeres con HLA-DQ2/DQ8 positivo presentan una microbiota endometrial y vaginal diferente en comparación con un grupo control sano [84]. Esto sugiere que ciertos polimorfismos en el HLA de clase II podrían ser factores determinantes en el fallo reproductivo recurrente, aunque aún se desconoce la vía de acción específica.

Adicionalmente, varios estudios han indicado que un elevado número de células NK periféricas o endometriales está relacionado con el fallo reproductivo recurrente [86-88]. Se ha demostrado que el porcentaje de células NK citotóxicas es más alto en sangre y en el endometrio, mientras que los niveles de células NK moduladoras se encuentran por debajo de lo normal [89]. Esto ha llevado a proponer la determinación de células NK periféricas como un biomarcador subrogado de inflamación y un posible causante del fallo reproductivo recurrente [90].

G) Déficit de vitamina D

Aunque hay investigadores que confirman que, sí que podría haber relación entre el déficit de Vitamina D y el FRR [91], todavía no existen recomendaciones claras hacia la necesidad de medir el nivel de vitamina D en mujeres como parte de un posterior asesoramiento o un plan de evaluación.

3. Inmunología del embarazo. La placenta

La inmunología es uno de los grandes pilares para comprender la fisiología del embarazo y distintos procesos patogénicos. Una de las principales causas de la importancia del sistema inmune en el embarazo es debido a la dotación genética paterna al feto, el cual lo convierte en un semialoinjerto para la madre.

Lo primero que cabría esperar es un rechazo por parte del sistema inmunitario materno ya que la mitad de los antígenos del feto deberían ser reconocidos como extraños, pero habitualmente el rechazo no se produce rompiendo así con las leyes que rigen el trasplante inmunológico.

Por tanto, la gestación supone un estado en el que el sistema inmunitario materno debe tolerar los antígenos HLA paternos y a la vez, mantener una respuesta efectora de protección frente a patógenos que pueden ser perjudiciales para un correcto desarrollo fetal.

3.1. Mecanismos de hiporrespuesta frente a aloantígenos fetales

Los aloantígenos fetales inducen tolerancia materna a través de diversos mecanismos. Se ha establecido que las células del SCT escapan del reconocimiento inmunológico al reducir la expresión de HLA en su superficie. Esta disminución en la presentación de HLA permite que el sistema inmunológico materno permanezca inerte frente a los antígenos fetales, lo que es crucial para el éxito del embarazo.

Por otro lado, el EVT expresa varios tipos de HLA de clase I, siendo el HLA-G uno de los más destacados. Según la función fisiológica del HLA-G las células trofoblásticas deberían ser más susceptibles al ataque del sistema inmunológico, sin embargo, se ha demostrado que el HLA-G se une a receptores inhibidores en las células NK, disminuyendo su actividad citotóxica [92]. Esta interacción es fundamental para mantener un ambiente inmunológico adecuado en el útero.

Además, el HLA-C, que también se expresa en el EVT, actúa como una diana específica para los receptores inhibidores KIR en las células NK. La unión entre HLA-C y los receptores KIR puede inducir una inhibición excesiva de la función de las células NK, lo que podría favorecer el desarrollo de complicaciones como la preeclampsia [93]. Esta relación entre la interacción HLA-KIR y la salud del embarazo será explorada más detalladamente en secciones posteriores.

Otros estudios han sugerido que la expresión de HLA-E en el EVT también juega un papel importante al inhibir la función citotóxica de las células NK. Esta inhibición parece estar relacionada con la capacidad de las células NK para ser “educadas” hacia un fenotipo más modulador, lo que les permite participar en la regulación de la respuesta inmunitaria en lugar de actuar de manera agresiva contra el feto [94].

3.2. Células inmunorreguladoras maternas

Además de las células estromales, la decidua está enriquecida con diversas células inmunitarias, incluyendo células NK macrófagos y linfocitos T. Estas células desempeñan un papel crucial en la remodelación de la homeostasis decidual, lo que es esencial para el desarrollo de un embarazo exitoso. La interacción y el equilibrio entre estas células inmunitarias son fundamentales para establecer un ambiente adecuado que favorezca la implantación y el desarrollo placentario Fig 4. [95]

La disfunción de las células inmunitarias deciduales se asocia estrechamente con problemas en el embarazo, incluyendo el FIR y AR. Las células NK deciduales, por ejemplo, no solo están involucradas en la defensa contra patógenos, sino que también participan en la remodelación del endometrio y en la regulación del crecimiento fetal. Un desequilibrio en su actividad, ya sea por un exceso de actividad citotóxica o por una falta de respuesta adecuada, puede resultar en complicaciones.

Asimismo, los macrófagos deciduales tienen un papel dual; pueden promover la tolerancia inmunitaria y la remodelación tisular, pero también pueden contribuir a procesos inflamatorios si su función se altera. Los linfocitos T, particularmente las células T reguladoras, son esenciales para mediar la tolerancia hacia los aloantígenos fetales [95].

Por lo tanto, la homeostasis del sistema inmunológico materno es un componente clave para un correcto desarrollo placentario. La regulación adecuada de las células inmunitarias en la decidua no solo favorece la implantación, sino que también previene complicaciones asociadas al embarazo, como la preeclampsia y los abortos espontáneos.

3.2.1. Células dendríticas

Las células dendríticas desempeñan un papel crucial en el contexto del embarazo al facilitar la diferenciación de linfocitos T reguladores (LTreg). Estas células no solo promueven la generación de LTreg [96], que son fundamentales para la tolerancia inmunológica materna [97], sino que también inhiben la proliferación y diferenciación de linfocitos T efectoras. Este equilibrio es esencial para evitar una respuesta inmunitaria agresiva contra el feto, que contiene antígenos paternos.

Durante la implantación, las células dendríticas son reclutadas hacia la interfase materno-fetal, donde inician y coordinan la respuesta del resto de las células inmunitarias presentes en este nicho. Actúan como células presentadoras de antígenos, facilitando la comunicación entre el sistema inmunológico y el trofoblasto, lo que a su vez ayuda a establecer un entorno favorable para la implantación y el desarrollo embrionario [97].

Además, las células dendríticas en el endometrio pueden influir en la producción de citoquinas y quimioquinas que modulan la actividad de otras células inmunitarias, creando un microambiente que favorece la tolerancia y la inmunidad adaptativa [97]. Este proceso es vital para la prevención de complicaciones, como el rechazo fetal y los abortos espontáneos.

3.2.2. Células T

Los linfocitos T (LT) en la decidua constituyen una proporción inferior en comparación con las células NK y los macrófagos, representando entre el 10% y el 20% de la población celular [98]. Sin embargo, se ha observado su importancia en la implantación y la placentación durante el primer trimestre de embarazo. Los mediadores clave en este proceso son los linfocitos T helper (Th) y los linfocitos T reguladores (Treg) [99, 100].

Aproximadamente entre el 10% y el 30% de los LT CD4+ en la decidua son Treg, que juegan un papel crucial en la inmunomodulación [100]. Estas células son responsables de mantener la tolerancia inmunitaria, inhibiendo respuestas que podrían ser perjudiciales para el feto.

Se estableció que un perfil inflamatorio Th2 era necesario para un embarazo exitoso, sugiriendo que un aumento en la actividad de los linfocitos Th1 podría inducir complicaciones [101]. Sin embargo, estudios más recientes han propuesto un modelo más matizado que sugiere que, el embarazo comienza y termina con un perfil proinflamatorio, caracterizado por la predominancia de citoquinas de tipo Th1, como IFN-gamma y TNF-alfa. Este perfil proinflamatorio puede ser beneficioso en las fases iniciales, facilitando la implantación y la formación de la placenta [102].

A medida que avanza el embarazo y se desarrolla el crecimiento fetal, se observa un cambio hacia un perfil antiinflamatorio, dominado por citoquinas de tipo Th2. Este cambio es crucial para la protección del feto y la promoción de un entorno inmunológico adecuado que favorezca su desarrollo [103].

Células T reguladoras

Los LTreg son reclutados a la decidua materna y son las células principalmente encargadas de establecer y mantener la tolerancia inmunológica durante la gestación. Desde el inicio de un embarazo normal, la población de LTreg aumenta, alcanzando su pico en el segundo trimestre, y disminuye en el período postparto. Se ha observado que el porcentaje de LTreg es mayor en el microambiente endometrial en comparación con la sangre periférica [104, 105].

Además, el ganglio linfático fetal tiene la capacidad de producir grandes cantidades de TGF-beta, lo que induce la expresión de FOXP3. Estas LTreg son capaces de reconocer los antígenos y bloquear la proliferación de las células T efectoras, lo que es esencial para evitar respuestas inmunitarias perjudiciales contra el feto [105].

Las células del EVT también juegan un papel crucial en la inducción de tolerancia a través de la producción de mediadores inmunitarios, que incluyen quimiocinas, hormonas y ligandos de puntos de control inmunológico (inmun checkpoints). Estas células pueden promover la diferenciación de las células T hacia un perfil LTh2, al tiempo que inhiben las células LTh17 mediante la producción de Interleuquina 10 (IL-10) y factores linfopoyéticos del timo.

El cambio en el modelo de dominancia LTh1/LTh2/LTh17/LTreg hacia una predominancia de LTreg es fundamental para establecer la tolerancia en el microambiente decidual. Varios estudios han confirmado que las células EVT son capaces de inducir la producción de IL-10, TGF-beta, hCG y ligandos inductores de apoptosis como TNF, que aumentan la expresión de FoxP3 en los LT CD4+ [106, 107].

Además, la hCG no solo promueve la diferenciación hacia LTreg, sino que también aumenta la expresión de puntos de control inmunológico, incluyendo PD-1 y CTLA-4 [106], y puede inducir la diferenciación de LTh17 hacia subtipos Th con un perfil antiinflamatorio. La participación de PD-1 y PDL1 presentes en la placenta conduce a una disminución de las citoquinas proinflamatorias producidas por los LT CD4+, favoreciendo un entorno inmunológico que apoya el desarrollo feta [108].

3.2.3 Macrófagos

El papel de los monocitos en el embarazo ha sido descrito en algunos estudios, pero se ha observado un aumento de esta población en la decidua durante la gestación [109, 110]. Los macrófagos, son un tipo de célula de la inmunidad innata, son responsables de la detección, ingestión y procesamiento de antígenos no propios y restos celulares [111]. En sangre y tejidos, se han identificado dos subtipos principales de macrófagos [112, 113]:

- **M1:** Macrófagos activados por la vía clásica, que tienen funciones microbicidas y son proinflamatorios.
- **M2:** Macrófagos activados por la vía alternativa, cuya función es principalmente inmunomoduladora, induciendo la tolerancia y promoviendo la resolución de la inflamación.

En el nicho embrionario, los macrófagos están presentes y constituyen aproximadamente entre el 20% y el 30% del total de linfocitos deciduales al inicio del embarazo [114]. Varios estudios han documentado que el subtipo M2 es predominante en la decidua, ya que producen numerosos factores asociados con la inmunomodulación, como IL-4, IL-10 y TNF-alfa, así como factores relacionados con la angiogénesis, como el VEGF y diversas proteasas [110, 115]. Además, los macrófagos que rodean las arterias espirales desempeñan un papel crucial al fagocitar células en apoptosis, lo que ayuda a prevenir la liberación de sustancias proinflamatorias en la decidua [116, 117].

Los macrófagos deciduales también son capaces de regular la respuesta adaptativa de los linfocitos T y la respuesta innata de las células NK deciduales (dNK) durante el primer trimestre del embarazo [118]. Un estudio funcional ha demostrado que las interacciones entre B7-H1, expresado por los macrófagos, y su ligando PD-1 en los linfocitos T deciduales suprimen la producción de IFN-gamma por parte de estos linfocitos T [119]. Además, la proximidad de las células NK y los macrófagos deciduales sugiere que son los principales mediadores en la regulación de la respuesta inmunitaria en la decidua [120].

3.2.4. Células NK

Las células natural killer (NK) son linfocitos granulares que desempeñan un papel esencial en el sistema inmunológico innato [121]. Su principal función es la citotoxicidad frente a infecciones y células tumorales. Esta capacidad de respuesta inmunitaria depende del equilibrio entre las señales activadoras e inhibitorias que reciben a través de los diversos receptores presentes en su superficie, lo que les permite discernir entre células sanas y patológicas [122].

Durante el primer trimestre del embarazo, las células NK constituyen aproximadamente el 70% de la población celular del endometrio. Sin embargo, no todas las NK presentes en el útero durante estos primeros meses son residentes; un porcentaje significativo son células NK que migran desde la circulación periférica. Las células presentes en la decidua se denominan células dNK. Estas células se caracterizan por expresar CD56 en ausencia de CD16, a diferencia de las NK periféricas que circulan en la sangre [101].

Las células dNK son fácilmente diferenciables de las NK periféricas debido a su exclusivo programa de expresión génica, que está orientado hacia la producción de citoquinas y otros mediadores inmunológicos. Para evitar el rechazo inmunológico debido a los antígenos paternos, las células dNK carecen prácticamente de actividad citotóxica. Análisis de RNAseq realizados por diversos grupos de investigación han identificado tres subtipos de células dNK: dNK1, dNK2 y dNK3 [123].

- **dNK1:** Este subtipo expresa receptores tipo inmunoglobulina llamados KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptors) y contiene enzimas implicadas en la glucólisis, así como gránulos citoplasmáticos que incluyen perforina. Estas características les permiten proporcionar una defensa frente a infecciones, aunque su actividad citotóxica es limitada en el contexto del embarazo.
- **dNK2:** Al igual que las dNK1, las dNK2 expresan receptores tipo lectina NKG2C, NKG2E y NKG2A en su membrana. Sin embargo, se diferencian por expresar en su superficie el ligando 1 de quimiocina con motivo X-C (XCL1), que facilita el reclutamiento de otras células inmunitarias y células del trofoblasto hacia la decidua. Esto sugiere que las dNK2 tienen un papel activo en la modulación del microambiente decidual [124, 125].

- **dNK3:** Este subtipo muestra una alta expresión del ligando de quimiocina 5 (CCL5), lo que sugiere que su función está relacionada con la modulación de la invasión del trofoblasto en la decidua. La presencia de CCL5 puede ayudar a atraer otras células inmunitarias y facilitar la interacción entre el trofoblasto y el tejido materno.

Por lo tanto, el papel de las células dNK es la regulación de la respuesta inmunitaria, que es fundamental para establecer un entorno tolerante para el desarrollo fetal [126].

Las células dNK son mediadores clave en la comunicación entre el sistema inmunológico y el trofoblasto, ayudando a promover la angiogénesis y la remodelación vascular necesarias para el crecimiento de la placenta [122]. Además, su producción de citoquinas, como IL-10 y TGF-beta, contribuye a crear un ambiente antiinflamatorio que favorece el embarazo.

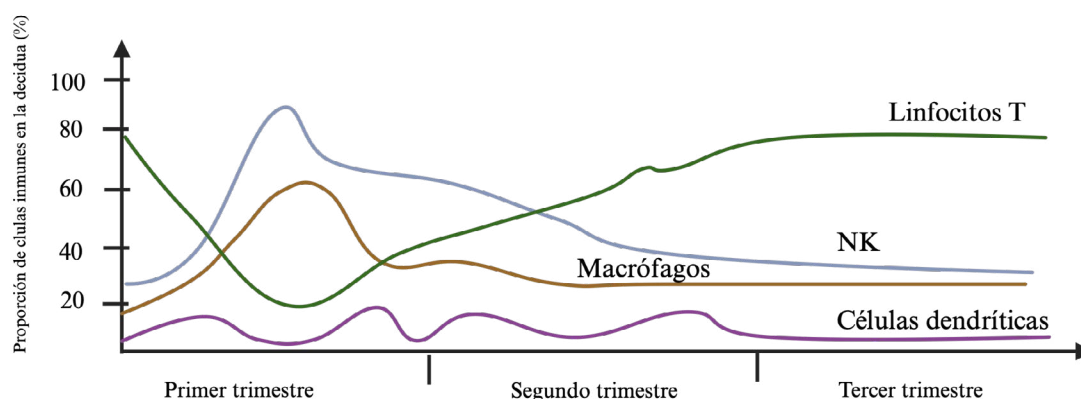


Figura 4. Cambios en los componentes del sistema inmune materno durante los diferentes trimestres del embarazo.

Adaptado de Yang. Et. Al, 2019 [127].

Se ha prestado mucha atención a su papel de implantación del feto, ya que sugieren ser reguladores esenciales que favorecen la implantación y el éxito en el embarazo [121, 128]. Además, se ha determinado el papel esencial en eventos fisiológicos tanto en la remodelación de la placenta como en regulación de las células trofoblásticas y la tolerancia inmunológica.

Durante las primeras etapas del embarazo, las células dNK se acercan a las arterias espirales, lo que podría indicar su papel de control de cambios vasculares [129], además se ha demostrado que las dNK secretan

Ang-1, Ang-2, INF-gamma y metaloproteinasas que da como resultado alteraciones del sistema vascular, estas alteraciones permiten a las células del EVT penetrar en los vasos y colonizar las paredes mediante la secreción de factores vasoactivos por parte de las dNK Fig 5. [130]

De forma que, las dNK podrían ser las responsables de la potenciación o inhibición de la invasión del trofoblasto en humanos [131]. Se ha descrito en modelo murino que cuando son deficientes en células dNK la invasión del trofoblasto se acelera; por lo tanto, es evidente que la función deficiente de estas células está asociada con alteración de la invasión trofoblásticas [131].

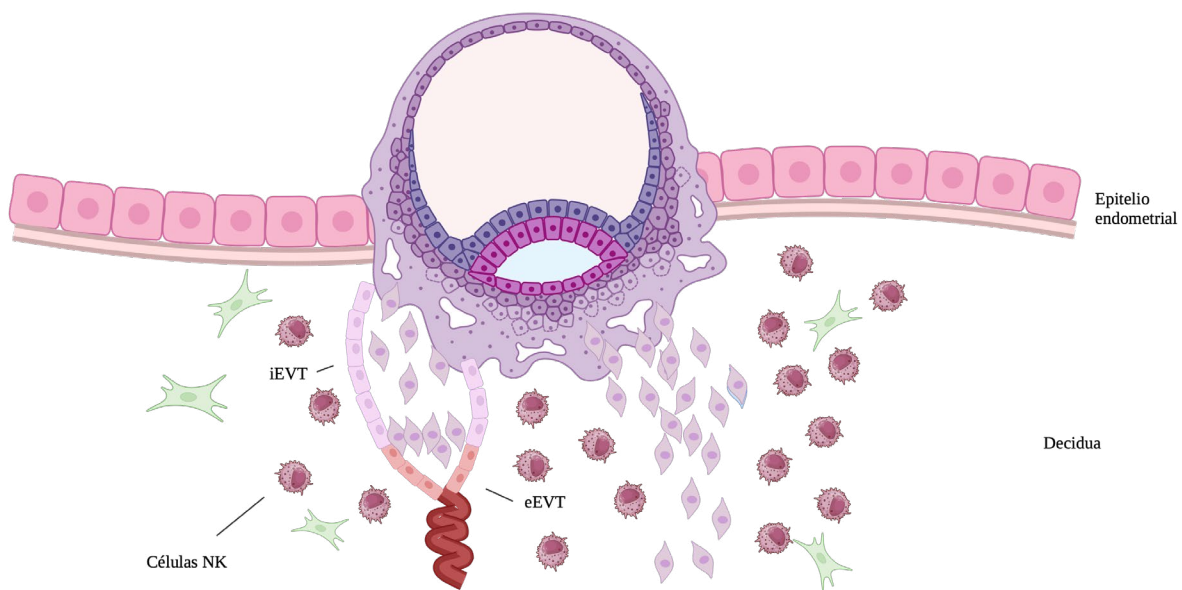


Figura 5. Interacción en la decidua del sistema inmune materno con las células fetales.

Se representa la interacción de las células NK con el trofoblasto extraviloso fetal, y la interacción de este para que se produzca la formación de las arterias espirales correctamente. Creado en BioRender. Gil, R. (2024) <https://BioRender.com/c16n565>

El mecanismo de acción de las células dNK se basa en generar un aumento de la tensión de oxígeno en la interfaz materno-fetal. Este aumento es esencial para la adaptación de las células a condiciones de hipoxia, que son comunes durante las primeras etapas del embarazo. La adaptación a estos niveles de oxígeno es crucial para el proceso de placentación [132], que implica la invasión del trofoblasto en el tejido materno y el establecimiento de conexiones vasculares adecuadas.

Curiosamente, se ha establecido que la disminución de los factores angiogénicos está asociada con fallos recurrentes de implantación y abortos de repetición, tanto en humanos como en modelos animales [133]. Cuando la angiogénesis es insuficiente, la placenta puede no desarrollarse adecuadamente, lo que resulta en un suministro inadecuado de sangre y nutrientes al feto. Esto puede llevar a complicaciones graves, incluyendo el crecimiento fetal restringido y la pérdida del embarazo [134].

Por otro lado, el aumento descontrolado de la angiogénesis también presenta riesgos. Un exceso de vascularización puede resultar en una circulación sanguínea materna anormal, lo que aumenta el estrés oxidativo en el entorno decidual. Este estrés oxidativo puede causar daño celular y afectar negativamente el desarrollo placentario, conduciendo a un mayor riesgo de fracaso del embarazo. De esta manera, las dNK deben mantener un delicado equilibrio en la regulación de la angiogénesis para asegurar un entorno óptimo para el desarrollo fetal [134].

Resumiendo, las células dNK son capaces de controlar la invasión del trofoblasto mediante la regulación de la tensión de oxígeno en la decidua, atribuyendo a estas células la capacidad de modular la angiogénesis en las etapas iniciales del embarazo. Una función adecuada de las dNK es esencial para asegurar que el trofoblasto pueda invadir adecuadamente el tejido materno y establecer una conexión vascular eficiente. Por el contrario, un deterioro en la función de estas células, así como un número anormal de ellas, puede afectar negativamente la angiogénesis y, por lo tanto, la invasión del trofoblasto [133, 134].

Los factores angiogénicos que son secretados por las células dNK en humanos se producen tras su activación y modulación. Esta activación se lleva a cabo a través de la interacción entre los receptores tipo inmunoglobulina de células NK (KIR, por sus siglas en inglés) y sus ligandos específicos de HLA. Además, otros receptores como NKp44, NKp46, NKG2D y NKp30 también contribuyen a esta activación [134].

Los ligandos expresados por las células del EVT son proteínas derivadas de los genes HLA, en particular HLA-C y HLA-G, que son específicas para los KIR, así como HLA-E, que es específica para el receptor NKG2A [135]. La función de estas uniones es crucial, ya que protegen al citotrofoblasto de la actividad citotóxica de las células dNK. Esta relación es vital para la implantación exitosa y el desarrollo placentario, permitiendo que las dNK desempeñen un papel más inmunorregulador.

Se ha postulado que la unión del ligando HLA-E a su receptor NKG2A/CD94 [136] desempeña un papel clave en la placentación [137]. Esta interacción no solo modula la actividad de las dNK, sino que también influye en la comunicación entre el trofoblasto y el tejido materno. De hecho, se ha observado que la vía no funcional HLA-B → HLA-E → NKG2A puede exponer a las mujeres a un mayor riesgo de desarrollar preeclampsia [138], una complicación grave del embarazo caracterizada por hipertensión y daño a órganos.

Además de las interacciones entre las células dNK y el trofoblasto, se ha observado que ligandos para receptores como NKp30 y NKG2D son expresados también por el estroma decidual. Esto indica que tanto el trofoblasto como el tejido materno tienen una capacidad moduladora sobre las células dNK. Esta dualidad en las interacciones sugiere que el microambiente decidual es dinámico y que las células dNK pueden recibir señales tanto del trofoblasto como del tejido decidual, lo que les permite ajustar su respuesta inmunológica de acuerdo con las necesidades del embarazo.

4. Receptores KIR: estructura, organización genética y estructural

Los KIR son un tipo de receptor de tipo inmunoglobulina, presentes en células NK: deciduales, endometriales y en sangre periférica, y ciertas subpoblaciones de linfocitos T [139, 140], se les está dando mucha relevancia ya que podrían ser una de las causas de FRR cuando se unen a las células EVT en la decidua.

Son receptores que están compuestos por: dos o tres dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático activador basados en tirosina (ITAM) o dominio citoplasmático inhibidor basados en tirosina (ITIM). Su función se basa en la modulación de las células NK a través de señales activadoras o inhibitoras [141].

La nomenclatura de los receptores KIR se determina por la estructura proteica mencionada anteriormente. Las dos primeras siglas hacen referencia al dominio extracelular; es decir, presentan dos dominios se denomina 2D y si por el contrario tiene tres dominios se denomina 3D. La sigla posterior da nombre al dominio citoplasmático, siendo dominio corto (S- short) generalmente con dominios ITAM, y largo (L- long) generalmente con dominios ITIM. El último número hace mención al gen en el que se codifica la proteína con la estructura que se nombra [142].

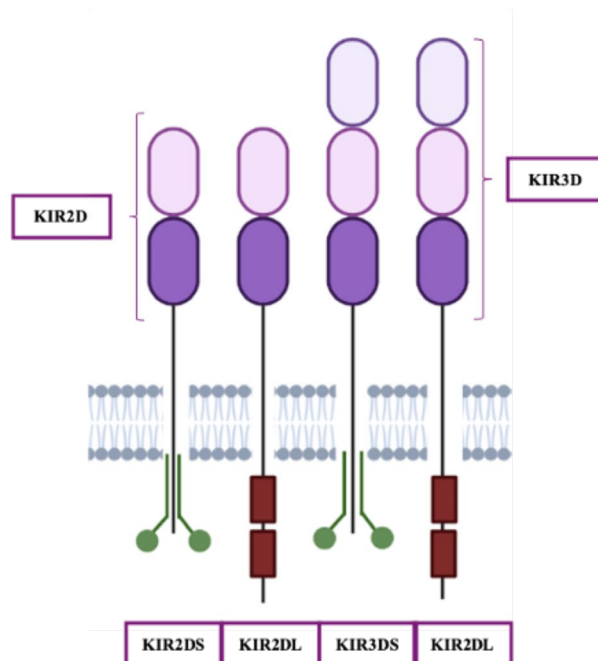


Figura 6. Estructura de los receptores KIR.

Los receptores KIR se componen de 2 o 3 dominios extracelulares, un tallo y una cola citoplasmática que si es corta (S) tiene regiones ITAM y si es larga (L) tiene regiones ITIM tipo inmunoglobulina. Los receptores inhibidores tienen mayor afinidad por su ligando HLA, por lo que habitualmente el resultado es una señal neta negativa y no hay activación del programa citotóxico de las células NK. Creado en BioRender. Gil, R. (2024) <https://BioRender.com/x40n016>

Se puede deducir por lo tanto la nomenclatura de los distintos receptores, por ejemplo: KIR2DS1, es un receptor que tiene dos dominios extracelulares, con una cola citoplasmática corta (con dominio ITAM) y que se codifica en el gen 1. KIR3DL2 es un receptor que tienen 3 dominios citoplasmáticos, con una cola citoplasmática larga (con dominio ITIM) y está codificado en el gen 2.

De tal forma que se dispone de receptores activadores (KIR 2DS1-5 y KIR3DS1) y receptores inhibidores (KIR2DL1-3, KIR2DL5 y KIR3DL1-3), también existen dos pseudogenes, es decir que no se traduce el gen a proteína y todavía no se conoce su función, y estos son 3DP1 y 2DP1 [143].

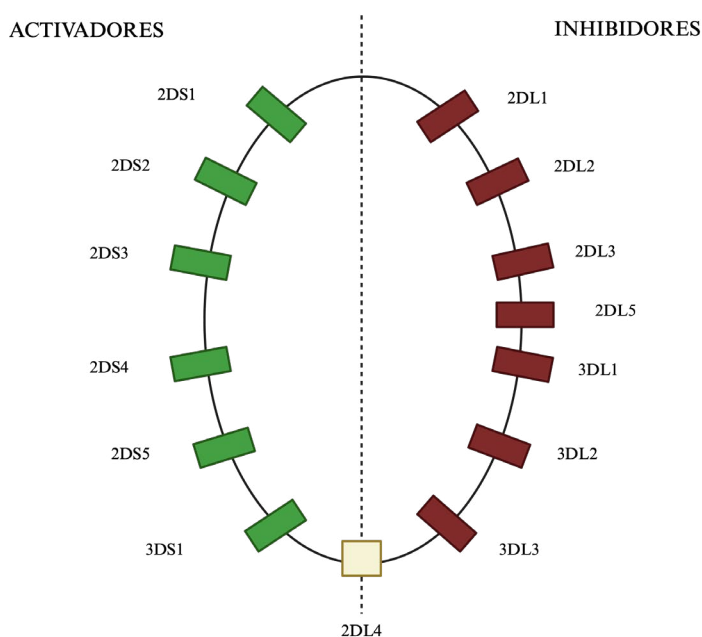


Figura 7. Polimorfismos de los receptores KIR.

Polimorfismos de los receptores KIR activadores (verde) inhibidores (rojo) y activador/inhibidor (amarillo). Creado en BioRender. Gil, R. (2024) <https://BioRender.com/m53c596>

Los receptores están codificados por el brazo corto del cromosoma 19 (19q13.4), consiste en una región muy polimórfica, y por ello presenta un grado muy alto de variación entre individuos tanto en contenido genético como en número de copias. Esta región consta de 16 genes y cada gen consta de 9 exones: los exones 1 y 2 ocupan la secuencia que traduce el péptido señal, la región 3-4-5 codifican para los dominios extracelulares tipo inmunoglobulina (D0, D1 y D2), la región 6 y 7 codifican el tallo transmembrana y los exones 8 y 9 codifican para la cola citoplasmática.

En *KIR2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS4* y *2DS5*, expresan D1 y D2 sus dominios extracelulares son codificados por los exones 4 y 5. Los receptores *KIR2DL4* y *2DL5* expresan D0, y las regiones extracelulares se codifican a través de los exones 3 y 5 [139, 144]. Las variaciones que existen entre los diferentes exones, modifican la afinidad por sus ligandos específicos y los mecanismos de señalización celular [144].

En función de los dominios inmunoglobulina de los KIR, estos receptores se pueden clasificar en tres grupos:

Los genes KIR tipo-I:

Presentan dos dominios extracelulares, denominados D1 y D2. En este grupo se incluyen los genes *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4* y *KIR2DS5*, junto con el pseudogén *KIR2DP1* [145, 146].

Estos genes se caracterizan por poseer un total de ocho exones y un pseudoexón, el cual se encuentra inactivo en los genes de tipo KIR2D. Es relevante destacar que *KIR2DL1* y *KIR2DL2* presentan una delección común que afecta al exón 7, resultando en una secuencia más corta en comparación con otros miembros de la familia KIR.

Dentro de este grupo, se observa diferentes genes entre los que están los genes de cola larga (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*) y los de cola corta (*KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4* y *KIR2DS5*), los cuales están determinados por el exón 9. Esta variabilidad en la estructura de los receptores es fundamental para comprender sus funciones biológicas y su implicación en la respuesta inmunitaria [145, 146].

Finalmente, la estructura del pseudogén *KIR2DP1* se diferencia de los genes *KIR2DL1*, *KIR2DL2* y *KIR2DL3* en el exón 4, que es más corto debido a la delección de un solo par de bases [145]. Esta singularidad en la estructura genética sugiere un posible impacto en la función y la evolución de los receptores KIR, lo que podría ser una de las dianas para futuras investigaciones y conseguir esclarecer su papel en la inmunología [145, 146].

Los genes KIR tipo-II:

Presentan dos dominios extracelulares, denominados D0 y D2, e incluyen los genes *KIR2DL4* y *KIR2DL5*. A diferencia de sus homólogos de tipo-I, los KIR2D de tipo-II contienen una región delecionada en el exón 4.

Además, los KIR de tipo-II se distinguen de los de tipo-I por la presencia de un exón 3 que se transcribe, mientras que en los de tipo-I existe un pseudoexón 3 que no se traduce [145, 147]. Esta diferencia en la transcripción puede influir en la expresión y funcionalidad de los receptores, lo que a su vez podría tener implicaciones en la respuesta inmune [145].

Entre los receptores KIR de tipo-II, *KIR2DL4* se diferencia claramente de *KIR2DL5* y del resto de los KIRs, especialmente por la longitud de la secuencia del exón 1, que contiene seis nucleótidos adicionales. Este exón también presenta un codón de inicio distinto al de los otros receptores KIR, lo que sugiere un mecanismo de regulación y expresión único [145].

Los genes KIR tipo-III:

Se caracterizan por poseer tres dominios extracelulares: D0, D1 y D2 (141). Este grupo incluye los genes *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* y *KIR3DS1*, y se distingue por tener un total de nueve exones. Notablemente, la secuencia de nucleótidos de *KIR3DL2* es la más extensa entre todos los genes KIR, lo que sugiere una posible complejidad funcional que merece ser investigada.

Los cuatro genes *KIR3D* presentan diferencias significativas en la longitud del exón 9, que codifica la región del tallo citoplasmático [148]. Además, *KIR3DS1* se distingue de *KIR3DL1* y *KIR3DL2* por tener una secuencia más corta en el exón 8, lo que podría influir en su actividad biológica.

Particularmente, *KIR3DL3* se diferencia del resto de los KIR por la ausencia del exón 6, lo que resalta su singularidad dentro del grupo. Asimismo, se incluye en este grupo el pseudogén *KIR3DL1*, que presenta la variación más extrema observada en el conjunto de genes KIR [149]. Este pseudogén carece de los exones 6, 7, 8 y 9, y en ocasiones se ha documentado la delección completa del exón 2. A pesar de estas pérdidas, los exones que permanecen (1, 2, 3, 4 y 5) muestran un alto grado de similitud con otras secuencias de genes KIR3D, especialmente con *KIR3DL3*.

El estudio de estas variaciones en la estructura genética y la función de los receptores KIR3D no solo proporciona información valiosa sobre la evolución de estos genes, sino que también puede tener implicaciones importantes para entender su papel en enfermedades inmunológicas y en la regulación de la respuesta inmune [149].

4.1. Haplotipos de los genes KIR

La segregación de los genes KIR se realiza en haplotipos debido a su proximidad en el genoma, lo que genera un alto desequilibrio de ligamiento. Este fenómeno sugiere la existencia de bloques o asociaciones semiconservadas que pueden afectar sobre la regulación y la función de los receptores KIR. Se han clasificado tradicionalmente dos grupos de haplotipos: el grupo A, predominantemente compuesto por genes KIR inhibidores, y el grupo B, que presenta una mayor proporción de genes KIR activadores. Esta diferenciación tiene implicaciones significativas en la respuesta inmunológica, dado que los genes inhibidores y activadores desarrollan funciones complementarias en la regulación de la actividad de células NK (Natural Killer) [150].

El bloque de genes KIR exhibe un alto grado de polimorfismo y diversidad tanto genética como alélica, lo que resulta en variaciones significativas en las combinaciones de genes entre individuos. Hasta la fecha, se han identificado más de 100 haplotipos KIR diferentes, clasificados según su contenido genético, con frecuencias diferentes según las diferentes poblaciones estudiadas. Esta variabilidad sugiere un proceso

evolutivo dinámico, influido por la selección natural y la presión de patógenos, que ha dado lugar a una adaptación del sistema inmunológico en diversas líneas de población [150].

Entre los genes KIR, los denominados “framework genes” o genes marco, como *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* y *KIR3DP1*, están presentes en todos los haplotipos. Estos genes son considerados ancestrales y poseen un nivel elevado de diversidad alélica, lo que sugiere que desempeñan un papel fundamental en la funcionalidad y la estabilidad del sistema inmunológico en diversas poblaciones [150]. La presencia constante de estos genes conservados en la mayoría de los haplotipos KIR resalta su importancia en la mediación de interacciones inmunitarias y su potencial impacto en la susceptibilidad a enfermedades infecciosas y autoinmunitarias.

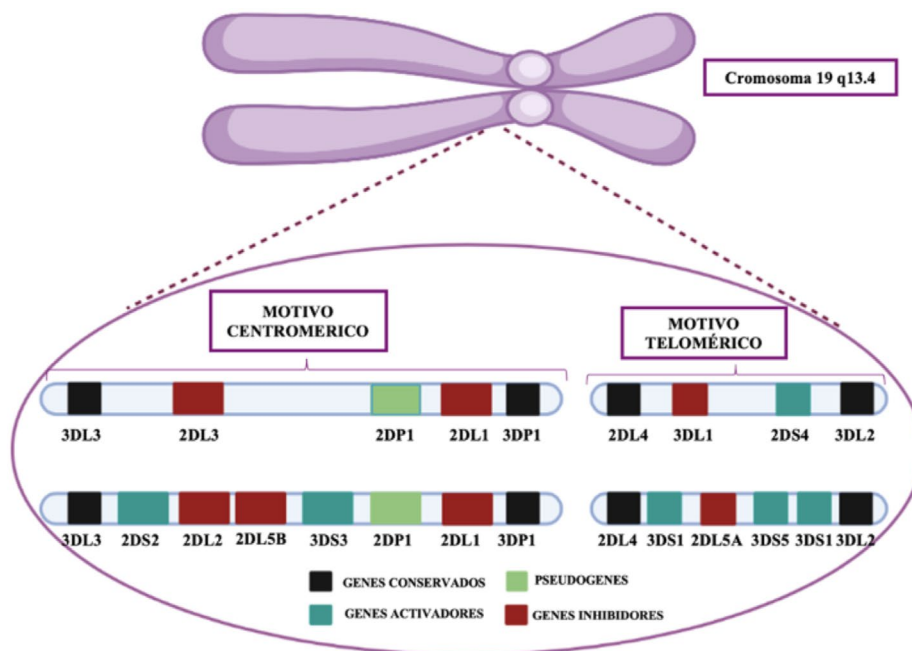


Figura 8. Genes KIR según su localización en el cromosoma 19q13.4.

Se observan los límites de la zona centromérica y telomérica. Creado en BioRender. Gil, R. (2024) <https://BioRender.com/o36y433>

Como se ha mencionado anteriormente, los genes KIR son altamente polimórficos, de hecho, la base de datos del Instituto Europeo de Bioinformática, tienen recogidos 977 alelos de los genes KIR. De ellos, el más polimórfico es *3DL3*, en el cual presenta actualmente 164 alelos diferentes. *2DS1* y *2DS3* son los genes menos polimórficos con 16 alelos cada uno diferentes.

A su vez, los genes KIR se organizan en dos haplotipos distintos A y B:

El haplotipo A se caracteriza por su organización génica relativamente poco variable, que consta de siete genes, de los cuales seis son inhibidores y dos son pseudogenes [151]. Entre los genes inhibidores se encuentran *KIR2DL1* y *KIR2DL3*, localizados en la región centromérica, así como *KIR2DL4* y *KIR3DL1*, situados en la región telomérica [152].

KIR2DS4 es el único gen activador asociado al haplotipo A; sin embargo, es importante destacar que aproximadamente el 75% de los haplotipos A presentan una variante no funcional, conocida como KIR1D, que se caracteriza por una delección de 22 pares de bases en la secuencia que codifica el segundo dominio inmunoglobulina (D2) [151, 153]. En la actualidad, se considera que *KIR1D* y *KIR2DS4* son alelos del mismo gen, siendo *KIR1D* mucho más frecuente en la población caucasoide.

La identificación de *KIR1D* ha llevado a una subdivisión del haplotipo A, permitiendo su subdivisión en dos haplotipos: haplotipo A-1D y haplotipo A-2DS4. El haplotipo A-1D se asigna a una frecuencia del 38.8% en la población caucasoide, mientras que el haplotipo A-2DS4 tiene una frecuencia estimada del 11.8%. Además, se ha observado que un 14% de la población estudiada es homocigota para el haplotipo A-1D [153].

Resulta particularmente inquietante la alta frecuencia del haplotipo A-1D en la población caucásica, dado que este haplotipo carece de formas activadoras de KIR2DS, siendo *KIR2DL4* el único gen activador presente. *KIR2DL4* ha sido previamente definido por su capacidad para mediar en la producción de citoquinas, lo que sugiere que, a pesar de la escasez de genes activadores en este haplotipo, existe una potencial modulación de la respuesta inmune a través de mecanismos alternativos [147, 154].

El haplotipo B es notablemente más variable y se caracteriza por la presencia de uno o más genes codificantes para formas activadoras de receptores KIR, tales como *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* y *KIR3DS1*. Además, estos haplotipos incluyen formas inhibitorias adicionales, como *KIR2DL2*, que se localiza en la región centromérica, y *KIR2DL5A/B*, presentes en ambas regiones, centromérica y telomérica [155].

Es relevante señalar que algunos genes comúnmente asociados a haplotipos A, como *KIR3DL1*, *KIR2DS4*, *KIR2DL1* y *KIR2DL3*, también pueden encontrarse en haplotipos B, lo que indica una mayor complejidad en la estructura y funcionalidad de estos haplotipos [152]. En términos generales, los haplotipos B constituyen un grupo diverso que alberga una variedad de receptores activadores más allá de *KIR2DS4* y *KIR1D*.

Los estudios familiares frecuentemente multigeneracionales y con amplias descendencias, han permitido identificar al menos 20 haplotipos B diferentes [149, 150, 153]. Esta variabilidad en los haplotipos B se debe principalmente a la presencia o ausencia de ciertos genes, mientras que las variaciones alélicas son menos frecuentes. En contraste, la variabilidad en el contenido génico de los haplotipos A es excepcionalmente limitada, siendo más común la variabilidad alélica [152].

Un aspecto interesante de los haplotipos KIR es el desequilibrio de ligamiento que presentan algunos pares de genes y pseudogenes, lo cual indica que pueden ser alelos de un mismo gen. Ejemplos de esto incluyen *KIR2DL2* y *KIR2DL3*, *KIR3DS1* y *KIR3DL1*, así como *KIR2DS3* y *KIR2DS5*, y *KIR2DS4* y *KIR1D* (153). Por otro lado, otros pares de genes presentan un desequilibrio de ligamiento positivo, lo que sugiere una co-segregación. Un caso notable es el de *KIR2DS2* y *KIR2DL2*.

Adicionalmente, el desequilibrio de ligamiento observado entre los subtipos expresados y no expresados de *KIR2DL5* resulta igualmente interesante. Aunque se esperaría que ambos fueran alelos, la forma expresada de *KIR2DL5* se asocia positivamente con *KIR2DS5*, *KIR2DS3* y *KIR3DS1*, mientras que la variante no expresada se relaciona con *KIR2DS3* y *KIR2DL2*, pero no con *KIR2DS5* [153].

4.2. Distribución de los motivos centroméricos y teloméricos

Las mitades centromérica y telomérica de cada haplotipo KIR no solo varían en los genes marco que las delimitan, sino también en los genes presentes entre cada pareja de genes marco [156]. Generalmente, la mitad centromérica es más rica en formas inhibidoras, mientras que la mitad telomérica se caracteriza por una mayor presencia de formas activadoras [153].

En la mitad centromérica de los haplotipos, la presencia de *KIR2DL3* o *KIR2DL2* es habitual; sin embargo, nunca se encuentran ambos simultáneamente, ya que se comportan como alelos de un mismo gen [153]. *KIR2DL2* se asocia frecuentemente con *KIR2DS2*, reforzando la relación entre las formas inhibidoras y activadoras [153]. Además, los pseudogenes *KIR2DP1* y *KIR3DP1* tienden a segregarse en bloque junto a *KIR2DL1*, y pueden asociarse tanto con *KIR2DL3* como con *KIR2DL2*, siendo más común que se vinculen al primero. Por otro lado, la variante *KIR3DP1* se asocia negativamente con *KIR2DP1* y *KIR2DL1*, pero presenta una asociación positiva y exclusiva con *KIR2DL2* [153]. La variante no expresada de *KIR2DL5*, en la mitad centromérica, se encuentra ligada a *KIR2DL2* y *KIR2DS3*, o menos frecuentemente, con *KIR2DL2* y *KIR2DS5*.

En cuanto a la mitad telomérica de los haplotipos KIR, se caracteriza por la presencia, downstream de *KIR2DL4*, *KIR3DL1* o *KIR3DS1*, pero no de ambos, dado que son alelos de un mismo gen. En raras ocasiones, puede no aparecer ninguno de estos genes. La presencia de *KIR3DL1* indica una mitad telomérica corta, que puede contener *KIR2DS4* o *KIR1D*, precediendo al gen marco *KIR3DL2*. En contraste, la presencia de *KIR3DS1* define una mitad telomérica más larga, que incluye un subtipo de *KIR2DL5* emparejado con *KIR2DS3* o *KIR2DS5*, seguido de *KIR2DS1*. Este locus concluye con *KIR3DL2*, que enmarca el final del segmento [153].

La determinación de genotipo se denomina AA, AB o BB de acuerdo con las siguientes reglas [157]:

- 1. La combinación del haplotipo AA:** se determina con la ausencia de *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS5* y *3DS1*.
- 2. La combinación del haplotipo AB:** se determina con la presencia de alguno de los genes que se han mencionado en el punto anterior, junto con los siguientes genes; *2DL1*, *2DL3*, *2DS4* y *3DL1*.
- 3. La combinación del haplotipo BB:** se determina cuando está presente al menos uno de los siguientes genes; *2DL2*, *2DL5A*, *2DL5B*, *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS5* y *3DS1* y no están presentes los siguientes genes; *2DL1*, *2DL3*, *2DS4* y *3DL1* [158].

Además, dentro de cada haplotipo se puede identificar genes que se conservan en prácticamente todos los individuos y sirven de referencia (son los denominados “*framework genes*”). Estos genes están localizados en los extremos tanto centromérico como telomérico, y en la zona central de cada haplotipo. *KIR3DL3* es el límite del extremo centromérico, *KIR3DL2* es el límite del extremo telomérico y *KIR3DP1* y *KIR2DL4* son los genes que están en la región central [156].

La mayoría de los haplotipos que se identifican en la población pueden explicarse por la recombinación de los motivos centroméricos y teloméricos, de forma que puede identificarse un motivo centromérico A (Cen A) con la presencia de *2DL3-2DP1-2DL1* y un motivo telomérico A (Tel A) con la presencia de *3DL1-2DS4*. El haplotipo B sin embargo es mucho más variable que el A, el haplotipo B se caracteriza por la presencia de *2DS2-2DL2* y además pueden estar acompañados de *2DL1* y *2DP1*.

Estos receptores son altamente polimórficos, con una amplia gama de combinaciones; un estudio dirigido por C. Vilches logró explicar los 38 perfiles de estos genes, este estudio reproduce la herencia de los haplotipos más frecuentes en la población caucásica [159].

Haplotype	Cen motif	Tel motif	Centromeric part					Telomeric genes					Cen and tel genes			Framework genes			
			2DS2	2DL2	2DL3	2DP1	2DL1	3DL1	2DS4	2DS4N	3DS1	2DS1	2DL5	2DS3	2DS5	3DL3	3DP1	2DL4	3DL2
A	Cen A	Tel A																	
	Cen A	Tel B																	
B	Cen B1	Tel A																	
	Cen B1	Tel A																	
	Cen B2	Tel B																	

Figura 9. Distribución de los motivos centroméricos y teloméricos de los receptores KIR según sus haplotipos.

Figura obtenida del artículo de Raquel G. Laborda et. Al [160].

4.3. Expresión de los genes KIR

La variabilidad en la expresión de receptores KIR en células NK es notable, manifestándose tanto en el porcentaje como en la cantidad de receptores entre diferentes individuos. Esta variabilidad se atribuye en gran medida al azar inherente en la expresión de estos receptores, influenciada por varios factores que incluye: el número de copias de cada uno de los genes KIR, el polimorfismo alélico, la regulación epigenética a nivel del promotor, así como la interacción con ligandos HLA y la exposición a agentes infecciosos como el citomegalovirus (CMV) [161].

Investigaciones realizadas por Béziat et al. [162] sugieren que las diferencias en la adquisición del repertorio KIR pueden estar relacionadas con el estado de infección por CMV de las cohortes estudiadas. Sin embargo, aún no se ha esclarecido si el repertorio de receptores en una célula NK resulta de interacciones durante su desarrollo con distintos patógenos o si se trata de un mecanismo de selección que ocurre de

manera intrínseca durante su ontogenia. Existen evidencias que indican que los pacientes seropositivos para CMV muestran una expresión aumentada de KIR2DL1 y KIR2DL3 en presencia de ligandos específicos [163]. Estos hallazgos subrayan la influencia de los patógenos en el repertorio KIR, especialmente en el contexto de infecciones por CMV, dado que los individuos sin exposición previa a este virus presentan un repertorio de receptores KIR similar al observado en sangre de cordón umbilical [162]. Este patrón parece desafiar la hipótesis de que la selección del repertorio KIR se produce a través de procesos deterministas durante el desarrollo de las células NK.

Es importante destacar que el único receptor KIR que se transcribe en todas las células NK es KIR2DL4. A través de este receptor, se accede al complejo de transcripción del resto de los genes KIR, que se transcriben de manera aleatoria. Esto permite que cada célula NK exprese diferentes combinaciones de genes KIR, contribuyendo así a la diversidad funcional de estas células en la respuesta inmune. Esta variabilidad en las combinaciones de receptores KIR es crucial para su capacidad de reconocer y responder a una amplia gama de patógenos, lo que resalta la importancia de la plasticidad del sistema inmunológico en la defensa contra infecciones [162, 163].

El conjunto de clones de células NK que expresan diversas combinaciones de receptores KIR y CD94/NKG2A en un individuo se denomina “Repertorio de células NK”. Dado que estos receptores se segregan independientemente de sus ligandos (HLA clase I), debido a que se encuentran en cromosomas diferentes [141], muchos individuos presentan células NK con receptores KIR para los cuales no poseen el ligando correspondiente [164]. Sin embargo, otros estudios han evidenciado una clara relación entre la expresión de un receptor KIR y la presencia de su ligando HLA [161].

Cada célula NK funcional expresa al menos un receptor para HLA propio, lo que se conoce como auto-reconocimiento; sin embargo, la coexpresión de dos o más receptores es menos frecuente. Esta característica permite que el conjunto de células NK de un individuo pueda detectar la pérdida de al menos un alelo HLA clase I en las células propias, lo que es particularmente relevante en contextos de transformación tumoral o infección viral [161].

Un estudio realizado por Yawata et al. [165] demostró que la presencia de un ligando HLA-I específico para un KIR determinado aumenta la frecuencia de dicho receptor KIR en las células NK [165]. En individuos homocigotos para *KIR2DL1*, la presencia de su ligando (HLA-C de tipo C2) incrementa la frecuencia de células NK KIR2DL1+ casi al doble. Además, se ha observado que la frecuencia de células NK KIR2DL2/2DL3+ disminuye en ausencia de su ligando HLA-C de tipo C1. Por otro lado, las células NK que expresan KIR3DL1 también se ven favorecidas por la presencia de su ligando HLA-Bw4, siendo este efecto más evidente en individuos heterocigotos que en homocigotos [165].

En consecuencia, durante el desarrollo, el genotipo HLA clase I conforma y educa el repertorio de las células NK [150], además de proteger contra la auto-reactividad de estas células. Es importante destacar que la mayoría de las células NK que no expresan KIR inhibidores, sin embargo, expresan CD94/NKG2A, lo que sugiere un mecanismo alternativo de regulación y reconocimiento de células propias [166]. Esta interacción entre los receptores KIR, CD94/NKG2A y los ligandos HLA es fundamental para la funcionalidad de las células NK, permitiendo una respuesta adaptativa y eficiente frente a patógenos y células tumorales.

La expresión de NKG2A en células NK se ha demostrado ser inversamente proporcional al número de receptores KIR expresados en su membrana [167]. Es relevante mencionar que la expresión de NKG2A ocurre en etapas más tempranas que la de los receptores KIR. Como resultado, las células que son NKG2A+ y presentan únicamente este inhibidor son tolerantes a lo propio gracias a la ubicuidad de su ligando, HLA-E. Esto les permite funcionar sin necesidad de adquirir receptores KIR adicionales [167].

Contrario a lo que se podría esperar, estas células NKG2A+/KIR- son bastante frecuentes en la circulación [168]. Un estudio realizado por Fischer et al. en 2007 sobre la diferenciación de células NK, mostró que la expresión de KIR2DL2 y KIR2DL3 se produce antes que la de KIR2DL1 [169]. Este hallazgo también se ha observado durante la reconstitución de células NK en modelos post-trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) [170].

Esta dinámica de expresión sugiere que la adquisición de receptores KIR puede estar relacionada con la necesidad de adaptar la respuesta inmunitaria a diferentes contextos, como la exposición a patógenos o la modificación del microambiente celular durante la reconstitución. La coexistencia de células NKG2A+ y KIR- resalta la plasticidad del repertorio de células NK y su capacidad para mantener la tolerancia a lo propio mientras se preparan para reconocer y responder a células potencialmente dañinas.

4.4. Ligandos de los receptores KIR

Los receptores KIR tienen como ligandos de mayor afinidad las moléculas de HLA de clase I, específicamente en la región $\alpha 1/\alpha 2$ [171]. Los ligandos humanos más relevantes para los receptores KIR, en orden de importancia, son HLA-C, HLA-B y HLA-A. La interacción entre los receptores KIR y sus ligandos HLA se establece a través de puentes de hidrógeno y de interacciones hidrofóbicas, lo que contribuye a la especificidad de esta unión [171].

El sistema de antígeno leucocitario humano (HLA), supone un bloque fundamental del sistema inmunológico adaptativo se encuentra ubicado en el cromosoma 6, en concreto en la banda 6p21.3, el complejo HLA, sobre todo se caracteriza por su alto grado de polimorfismo genético

Los antígenos HLA pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, y son glicoproteínas, presentan los péptidos extraños al exterior para que sean visibles a las células efectoras del sistema inmunitario, por tanto, es el sistema principal para combatir infecciones. Su función principal es la de permitir el reconocimiento de las moléculas extrañas al inicio de la respuesta inmunitaria [172].

Las moléculas HLA tienen función de presentación antigénica, diferenciándose en familia HLA clase I: clásicas (HLA-A, HLA-B y HLA-C) y no clásicas (HLA-E, HLA-F, HLA-G), y familia HLA de clase II (HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP) [173].

Las moléculas de clase I, se expresan en prácticamente todas las células nucleadas y desempeñan un papel fundamental en la presentación de antigénica a los LT CD8+, esta presentación es fundamental para la capacidad del sistema inmunológico para poder distinguir lo propio de lo ajeno, y facilitando la detección y eliminación de patógenos intracelulares y células infectadas.

Las moléculas de clase II: se expresan en la superficie de células presentadoras de antígeno como: células dendríticas, linfocitos B, monocitos, macrófagos, LT CD4+ activados, endotelio vascular.

Las células de EVT carecen de la expresión de HLA-A y HLA-B, mientras que sí que expresan HLA-C y HLA-E la regulación transcripcional de estos dos ligandos y su expresión en la membrana de las células de EVT afectan a la respuesta de los linfocitos T cuando se encuentran con el HLA paterno [173-175].

La especificidad KIR-HLA está influenciada por la presencia de ciertos aminoácidos en posiciones críticas de los ligandos, lo que resulta clave para la interacción. Por ejemplo, algunos receptores KIR inhibidores reconocen preferentemente residuos de lisina (Lys) o arginina (Arg) en la posición 80 de los ligandos HLA-C, lo que ha promovido su conservación evolutiva en linajes tanto humanos como en chimpancés [176].

Uno de los aspectos más intrigantes del HLA-C es su papel en la inmunología reproductiva. Durante el embarazo, el HLA-C expresado en las células del trofoblasto fetal interactúa con las células NK del útero materno a través de receptores KIR. Esta interacción es vital para la placentación y el crecimiento fetal adecuados. Las combinaciones específicas de los genotipos KIR materno y HLA-C fetal pueden influir en los resultados del embarazo, afectando potencialmente los riesgos de trastornos como la preeclampsia y los abortos espontáneos recurrentes [176].

Las moléculas de HLA-C se han clasificado en dos grupos principales, diferenciados por dimorfismos en el dominio $\alpha 1$ de la cadena pesada. El grupo C1 incluye aquellas moléculas que presentan serina (Ser) en la posición 77 y asparagina (Asn) en la posición 80. Este grupo comprende las moléculas HLA-C*01, *03, *07, *08, *12, *14 y 16. Con estas moléculas interactúan los receptores *KIR2DL2*, *KIR2DS2* y *KIR2DL3*. Por otro

lado, el grupo C2 está compuesto por moléculas que presentan asparagina (Asn) en la posición 77 y lisina (Lys) en la posición 80, incluyendo *HLA-C02*, *04, *05, *06, *15, *17 y *18. Estos ligandos son reconocidos por KIR2DL1 y KIR2DS1 [175, 177].

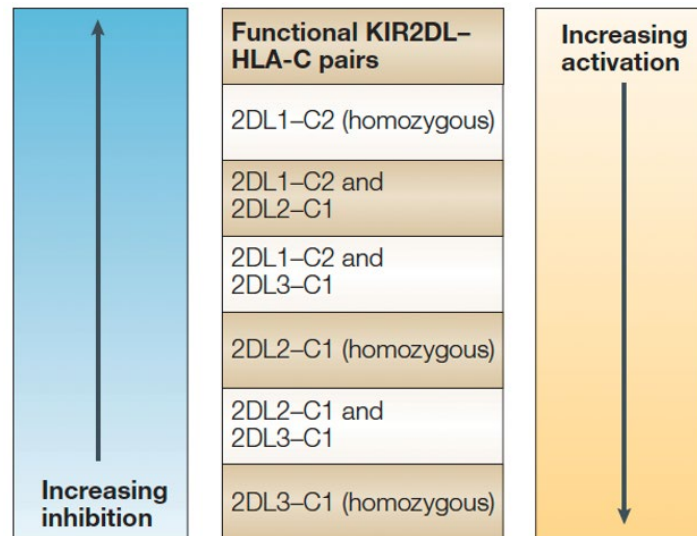


Figura 10. Interacción de los receptores KIR con su HLA-C específico.

Se muestran las especificidades de los receptores KIR con sus ligandos HLA-C específicos y también la intensidad de inhibición o activación según su unión en la célula NK [177].

5. CD94/NKG2

Los receptores CD94/NKG2 se expresan en la mayoría de las células NK. Según su estructura pertenecen a la superfamilia de receptores tipo lectina de tipo C. Se ha demostrado que existen 6 receptores diferentes de NKG2 (NKG2A, B, C, D, E, H) y forman heterodímeros porque se unen a la cadena CD94, por uniones disulfuro. Cada subunidad está formada por un dominio similar a tipo lectina C en la zona extracelular, después se compone de un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. Estas glicoproteínas presentan un dominio extracelular rico en carbohidratos y están codificadas por genes ubicados en la región NKC (NK Cell Complex) del cromosoma 12, específicamente en la región 12p12.3-p13.2 [178].

NKG2A tiene un receptor que manda señales inhibitorias y por lo tanto en la cola citoplasmática tiene dos dominios ITIM junto con CD94 se forma el receptor inhibitorio [179]. NKG2C es un receptor que carece de dominios ITIM, pero tienen residuos cargados positivamente dentro de las regiones transmembrana que les permite asociarse a DAP12. [180, 181].

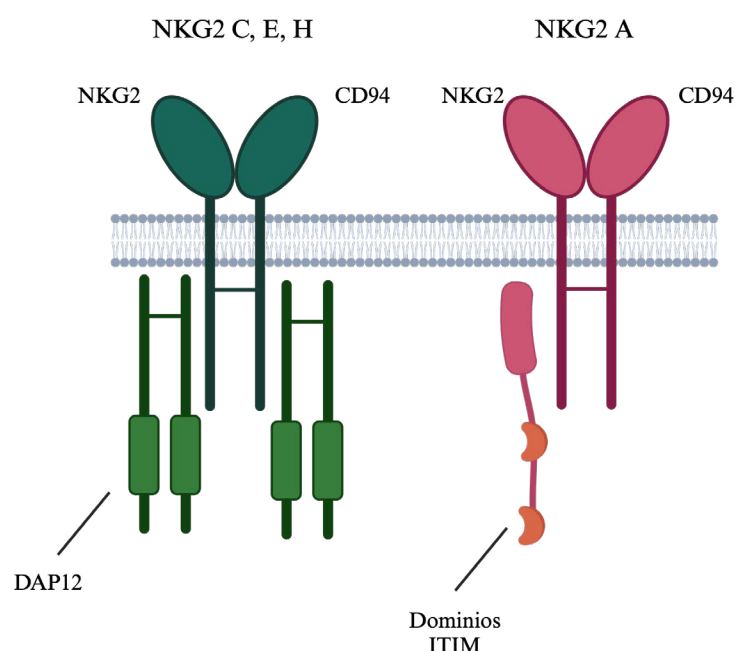


Figura 11. Estructura de los receptores NKG.

Se observa la estructura del receptor NKG2A (inhibidor) con los dos dominios ITIM, y el receptor NKG2C (activador) con el dominio DAP12 que produce a la célula NK señales activadoras. Creado en BioRender. Gil, R. (2024) <https://BioRender.com/i04r555>

A pesar de que aún existen numerosas dudas sobre la naturaleza exacta de la interacción entre los receptores CD94/NKG2 y sus ligandos, se ha establecido que la unión requiere un péptido nonamérico derivado de la secuencia líder de las moléculas HLA-A, HLA-B y HLA-C [182]. Este péptido es esencial para la presentación del ligando, ya que actúa como un mediador en la interacción con los receptores.

La especificidad de los receptores CD94/NKG2 se basa en su capacidad para reconocer y unirse a estas moléculas de HLA en el contexto de la presentación de antígenos, lo que les permite jugar un papel muy importante en la regulación de la respuesta inmunológica. La activación de las células NK a través de estos receptores es fundamental para la detección y eliminación de células infectadas o transformadas, lo que subraya la importancia de estas interacciones en la inmunidad innata [182].

Además, la diversidad genética de los ligandos HLA y de los receptores CD94/NKG2 contribuye a la variabilidad en la respuesta inmunológica entre individuos, lo que tiene implicaciones significativas en la susceptibilidad a enfermedades y en la efectividad de tratamientos como la inmunoterapia y el trasplante de órganos.

HLA-E, el ligando específico del receptor NKG2A, adquiere una conformación adecuada y se transporta a la superficie celular al unirse a péptidos nonaméricos. Estos péptidos poseen un aminoácido de anclaje crítico en la posición 2, que corresponde al residuo 21 de la secuencia líder de las moléculas HLA de clase I. Este residuo es fundamental para el plegamiento correcto y la expresión de HLA-E en la membrana celular [136].

El aminoácido en cuestión es la metionina (-21M), que se encuentra presente en todos los alotipos de HLA-A y HLA-C, así como en una minoría de los alotipos HLA-B. La presencia de este aminoácido de anclaje no solo facilita la correcta conformación de HLA-E, sino que también es esencial para su capacidad de presentar péptidos a los receptores de células NK, como NKG2A [183].

Esta interacción facilita la regulación de la respuesta inmune, ya que HLA-E actúa como un marcador de células sanas y permite que las células NK reconozcan y eviten atacar células propias, contribuyendo así a la tolerancia inmunológica. La habilidad de HLA-E para presentar péptidos derivados de otras moléculas HLA de clase I refuerza su papel en la supervisión inmunológica y en la detección de células alteradas o estresadas.

HLA-B presenta un dimorfismo en la posición -21 de su secuencia líder como se ha mencionado anteriormente, donde en algunos casos, codifica el aminoácido treonina en lugar de metionina. Esta variación afecta la capacidad de HLA-B para unirse eficientemente a HLA-E. El dimorfismo en HLA-B genera una divergencia significativa en la educación de las células NK. El haplotipo HLA-B -21M incrementa la expresión de HLA-E en la superficie celular, lo que potencia la mediación por parte de las células NK y mejora su función efectora a través de la interacción con NKG2A/CD94. Por el contrario, los haplotipos HLA-B -21T se asocian con una menor expresión de HLA-E, pero con una mayor frecuencia de ligandos Bw4, C1 y C2 en la superficie celular. Por lo tanto, en estos haplotipos, la educación funcional de las células NK depende principalmente de las señales inhibitorias proporcionadas por las moléculas KIR, mientras que NKG2A juega un papel predominante en individuos con alelos HLA-B -21M [183].

El dimorfismo en HLA-B permite definir tres grupos de individuos en función de la posición -21 del péptido líder: homocigotos MM (6%), homocigotos TT (62%) y heterocigotos M/T (32%). Cada uno de estos grupos exhibe diferencias funcionales notables. Sin embargo, debido al efecto dominante del haplotipo -21M, existen similitudes significativas entre los individuos MM y M/T. Los donantes MM carecen de epítomos Bw4, presentan un conjunto más restringido de tipos de HLA y expresan niveles elevados de HLA-E, lo que implica que la vía principal de educación de las células NK se realiza a través de NKG2A/CD94 [183].

Las células NK en individuos homocigotos MM son particularmente efectivas en la mediación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), en la secreción de citoquinas y en la eliminación de células que presentan deficiencia de HLA-I. Estas células NK suelen expresar uno o dos de los diversos receptores inhibidores, incluyendo NKG2A, KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR3DL1, KIR3DL2 y LILRB1 [183].

Los individuos homocigotos TT expresan epítomos para Bw4, C1 y C2, lo que se traduce en niveles más altos de HLA-C y en bajos niveles de HLA-E en sus células. Las células NK en estos individuos suelen presentar un fenotipo generalmente inmaduro, lo que se asocia con una baja capacidad de respuesta en la mediación de ADCC. A diferencia de los individuos MM, las células NK de los homocigotos TT tienden a expresar solo uno o dos ligandos inhibidores de HLA-I [183].

Está descrito que las células NK educadas a través del receptor NKG2A tienen respuestas mejoradas y además son metabólicamente más resistentes que las células NK educadas con KIR [138]. Sin embargo, aunque no está claro cómo afecta a la fisiología de la NK la educación con este receptor, se sabe que la población de dNK tiene una expresión de NKG2A próxima al 95% [138]. NKG2A podría estar teniendo interacción con el HLA-E expresado en el EVT fetal. Por el momento no hay evidencia de que sea el HLA fetal el que está educando a las células dNK humanas, además, en modelos murinos el MHC materno es el que educa a las células dNK, no el fetal [138].

Particularmente, las células NK CD56dim NKG2A+ que son características de los individuos TT también desempeñan un papel importante en el control de la viremia del VIH, brindando así una notable protección contra el SIDA. Este efecto protector fue inicialmente correlacionado con la homocigosis para Bw4 [184]. Sin embargo, estudios más recientes sugieren que la protección asociada con Bw4 en homocigosis podría estar mediada por células KIR3DL1+ o bien por células NKG2A+, o incluso por la combinación de ambas [183].

La relación entre la expresión de epítomos HLA y la funcionalidad de las células NK en individuos TT ilustra cómo la variabilidad genética puede influir en la respuesta inmune ante infecciones virales. Esta comprensión es esencial para el desarrollo de estrategias terapéuticas que puedan potenciar la eficacia de las células NK en el combate contra el VIH y en la prevención de enfermedades autoinmunes y neoplásicas.

6. Educación y función de las células NK

Las formas maduras de las células NK constituyen una población heterogénea de clones que varían en su localización, potencial proliferativo, capacidad funcional y respuesta a diversas citoquinas (185, 186). Esta complejidad se debe en gran medida a su diverso repertorio de receptores inhibidores y activadores, que les permite reconocer eficazmente células diana.

El estatus funcional de las células NK está determinado por el equilibrio entre las señales activadoras e inhibitoras que transmiten los receptores presentes en su superficie [162]. Este equilibrio es crucial para la regulación de la actividad citotóxica de las células NK, y su capacidad para distinguir entre células sanas y células mutadas, como las infectadas o tumorales.

La heterogeneidad en la expresión de receptores y en la respuesta a señales externas también puede influir en la eficacia de las células NK en diferentes contextos clínicos, como en infecciones virales, cáncer o en el trasplante de órganos.

La interacción de los receptores de las células NK con sus ligandos, particularmente con las moléculas de HLA clase I, es fundamental para el auto-reconocimiento y la tolerancia de estas células hacia lo propio. La pérdida de estas interacciones, ya sea por la ausencia de ligandos propios o por la disminución de su expresión, induce a las células NK a actuar según el modelo de “Missing Self” [187]. En este modelo, la pérdida de la presión negativa de las señales inhibitoras conduce a una activación de las células NK, lo que resulta en su capacidad para eliminar células que no expresan HLA clase I [188].

Evidencias acumuladas en modelos murinos [189,190] y en estudios humanos [191] han puesto de manifiesto la importancia de la pérdida de identidad, es decir, la falta de expresión de HLA clase I, en la adquisición de funciones efectivas de las células NK, tales como citotoxicidad y producción de citoquinas.

Durante su desarrollo, las células NK son “educadas” a través de receptores inhibidores que interactúan con sus ligandos, principalmente las moléculas de HLA clase I, permitiéndoles adquirir competencias funcionales a través de un mecanismo conocido como “Licensing” [192]. Este proceso de licenciamiento es esencial para que las células NK aprendan a reconocer la identidad propia del individuo, resultando en la aparición de dos grupos funcionales: células NK licenciadas y no licenciadas, o educadas y no educadas para el reconocimiento de lo propio [192].

Las células NK licenciadas tienen una mayor capacidad para responder a señales activadoras, mientras que las no licenciadas pueden ser menos efectivas en la eliminación de células diana. Este mecanismo es crucial para mantener el equilibrio en la respuesta inmune, evitando tanto la auto-reactividad como la falta de respuesta ante células alteradas.

7. Combinación HLA/KIR y NKG2A/HLA-E

Las principales interacciones entre receptores KIR inhibidores (iKIR) y ligandos que determinan la educación de las células NK incluyen KIR2DL1 con HLA-C2, KIR2DL2 con HLA-C1 (y en menor proporción KIR2DL3 con HLA-C1), así como KIR3DL1 con Bw4. Aunque algunas células NK no presentan KIR específicos para HLA-I propio en sus membranas, sí expresan el receptor CD94/NKG2A, que interactúa con moléculas HLA-E [182].

La interacción inhibidora KIR2DL1/HLA-C2 es la que presenta mayor afinidad, seguida de KIR2DL2/HLA-C1 y KIR2DL3/HLA-C1 [93, 193-196]. Este patrón de afinidad tiene implicaciones importantes para la funcionalidad de las células NK. En general, las interacciones más débiles entre los receptores inhibidores y sus ligandos pueden permitir una mejor activación de las células NK, lo que a su vez podría traducirse en una mayor protección contra infecciones virales, pero también en una mayor susceptibilidad a procesos autoinmunes [93].

Además, al considerar los desequilibrios de ligamiento genético más comunes entre los genes KIR, se obtiene una amplia diversidad de combinaciones genéticas que pueden presentar una gradación decreciente de actividad inhibidora o activadora. Este fenómeno depende de si los ligandos HLA-C están presentes en homocigosis o heterocigosis. Esta variabilidad en las combinaciones de KIR y su interacción con los ligandos HLA puede influir en la capacidad de las células NK para regular la respuesta inmunitaria, resaltando la importancia de la genética en la susceptibilidad a enfermedades y en la eficacia de las terapias inmunológicas [93, 193-196].

Además de la relevancia de las moléculas HLA clásicas, es fundamental destacar la importancia de las moléculas HLA no clásicas en el balance funcional de las células NK. Varios estudios han investigado el papel crucial que desempeña NKG2A en el proceso de educación de las células NK. Se ha demostrado que las células NK que expresan NKG2A son funcionales incluso en ausencia de KIR, gracias a que su ligando, HLA-E, se expresa de forma constitutiva. Esta característica permite que las células NKG2A+ estén educadas en todos los individuos, lo que subraya su importancia en la regulación de la respuesta inmune [138].

La relevancia de las células NKG2A se hace aún más evidente en contextos clínicos, como en individuos tras un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), donde estas células emergen de manera dominante. Su presencia sugiere un papel esencial en la vigilancia inmunológica y en la respuesta a infecciones en un entorno inmunocomprometido [197].

Además, durante la etapa fetal, las células NK NKG2A+ son funcionales, a diferencia de las células que expresan KIR [197]. Sin embargo, aún se desconoce si el proceso de educación de estas células se lleva a cabo durante este periodo fetal o si ocurre posteriormente, lo que plantea interrogantes sobre el desarrollo inmunológico inicial y la adaptación del sistema inmunitario a lo largo de la vida [161].

Existe una clara correlación entre la educación de las células NK y su capacidad de respuesta rápida y eficiente frente a células tumorales [198]. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a esta

educación siguen siendo en gran medida desconocidos. A pesar de los numerosos estudios realizados desde 1998 [188], fue solo en los últimos años que se han presentado evidencias claras sobre cambios metabólicos y fenotípicos relacionados con la educación de las células NK [199].

Recientemente, también se han descrito cambios metabólicos que dirigen a las células educadas preferentemente hacia la glucólisis y la glutaminólisis [199]. Esto contrasta con las células NK no educadas, que dependen exclusivamente de la respiración mitocondrial para llevar a cabo sus funciones citolíticas. Este cambio metabólico sugiere que la glucólisis respalda la mejora en la capacidad proliferativa y citotóxica de las células NK [199].

Además, las interacciones entre KIR y sus ligandos provocan remodelaciones en los lisosomas, lo que resulta en la acumulación de granzimas en lisosomas secretores [200]. Estas remodelaciones son cruciales para la capacidad citotóxica de las células NK, facilitando la liberación de granzimas durante la interacción con células diana.

La combinación de HLA/KIR tienen un impacto directo que se ha determinado tanto en el fallo reproductivo, como en el éxito del mismo [93]. Mediante la unión de las células del EVT y las NK maternas se modula su activación y se favorece el desarrollo placentario y del embarazo. Por el contrario, la inhibición completa de las células NK se asociado con el riesgo a poder desarrollar complicaciones durante el embarazo [201].

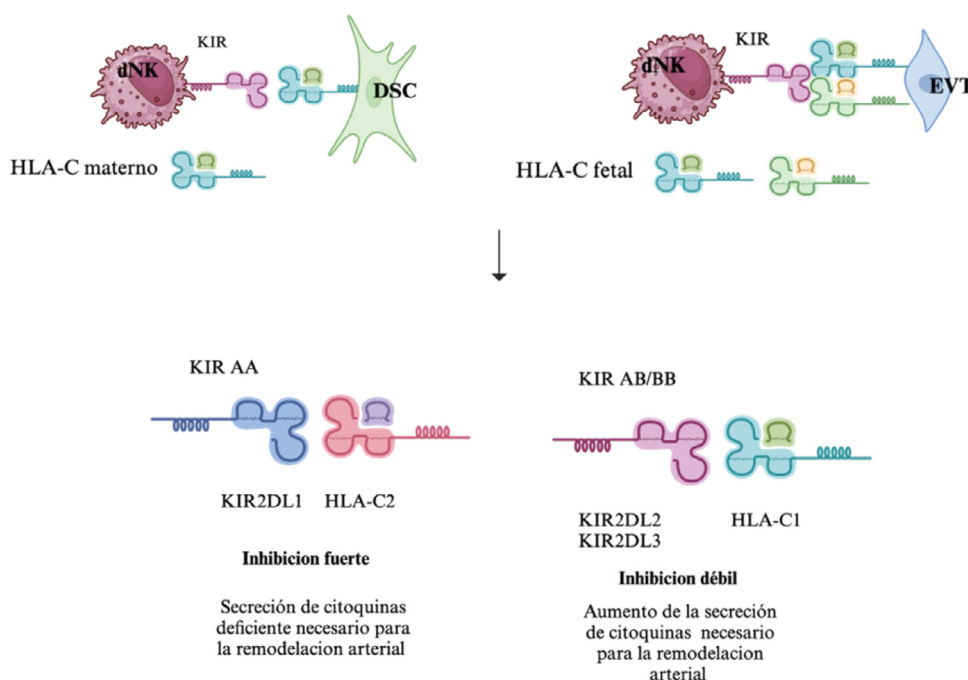


Figura 12. Diferentes interacciones de las células NK con células fetales y maternas.

Esta interacción se produce en la decidua mediante diferentes receptores; los receptores inhibidores de las células NK que podrían estar perjudicando o beneficiando el proceso de implantación y el correcto desarrollo del embarazo. Creado en BioRender. Gil, R. (2024) <https://BioRender.com/x82s209>

7.1. Fallo reproductivo recurrente

Las combinaciones entre los alelos HLA/KIR se han asociado a complicaciones en el embarazo como en FIR y AR restricción en el crecimiento fetal y preeclampsia [202-205]. Los defectos que se aprecian es la incapacidad de las EVT para la invasión debido a la desregulación del sistema de reconocimiento anteriormente mencionado.

Centrándose en las interacciones de KIR con su ligando HLA-C, puede producir señales inhibitorias o activadoras según al receptor que se una en las células NK regulando así la invasión del trofoblasto [93, 206-208].

Debe considerarse las variantes maternas KIR y HLA-C así como el haplotipo HLA-C paterno para la investigación de trastornos en el embarazo. Se ha demostrado que existe un mayor riesgo de trastornos cuando existe un haplotipo inhibidor materno KIR A, mientras que las células EVT del feto expresan altos niveles de C2 tanto materno como paterno [204, 209]. Otras investigaciones, observan que la activación de KIR2DS1 (KIRB) y la estimulación combinada de KIR2DS1/KIR2DS4 conceden protección permitiendo la invasión del trofoblasto [210]. Además, Kulkarni et al. [205], sugiere que debe haber un equilibrio entre el nivel de activación e inhibición de las células dNK para el éxito reproductivo ya que una activación o una inhibición excesiva podría ser perjudicial en el mantenimiento del embarazo.

Existen muchos estudios respecto a las combinaciones de KIR/HLA. El grupo de Moffet [208], sugiere que la inhibición excesiva de las dNK, y el genotipo KIR AA podría ser perjudicial en el éxito reproductivo. Concluyen que el genotipo KIR AA materno y la presencia de alotipos C2+ de HLA era mayor en pacientes con abortos de repetición, además 2DS1 estaba infrarrepresentado [209, 211].

Por el contrario, Dambaeva et. Al [212], no lograron en sus investigaciones confirmar la disminución de 2DS1 en pacientes con abortos de repetición, pero sí que observaron niveles de C2+ aumentados. Recientemente, se han obtenido datos donde se observado frecuencias bajas de KIR2DS2 y KIR2DL5A en pacientes con abortos de repetición en comparación con las mujeres control. Sugiriendo el efecto protector que puede aportar la combinación de KIR2DS2/HLA-C1+.

Esta cuestión, también ha sido discutido por Hiby et Al. [211], donde los autores sugieren que la placenta-ción exitosa depende del equilibrio entre la activación y la inhibición de las células dNK, en respuesta a las células EVT.

7.2. Otras Enfermedades

7.2.1. Preeclampsia

La preeclampsia es una de las enfermedades más asociadas a las combinaciones KIR/HLA que favorecen la inhibición de la dNK [213]. Rajagopalan [214] informaron que KIR2DL1, conduce a una inhibición muy potente y KIR2DL2/3 previene la activación excesiva de las dNK y por lo tanto la placentación efectiva. Además, otra investigación demostró que el HLA-C materno tiene efecto sobre el repertorio KIR de las dNK, y, además, el reconocimiento del HLA de las células de EVT por los iKIR da como resultado una inhibición excesiva y por lo tanto mayor riesgo de preeclampsia [215].

Informes del grupo de Moffet [93], confirmaron que embarazos que habían sufrido preeclampsia era aún más desfavorable la invasión trofoblástica aquellos que presentaban KIR AA/HLAC2+. Además, el genotipo KIR AA de las dNK es un factor menos importante cuando el feto presenta homocigosidad para C1, ya que la interacción KIR2DL2/3 con C1 produce una inhibición más débil que la interacción de KIR2DL1 con C2. Se postula que, si la madre expresa un KIR AB con HLA C1C1 propio, la posibilidad de un embarazo que llegue a término es mayor que en una mujer que dispone un KIR AB con un haplotipo HLA C1C2 propio, sin tener en cuenta el haplotipo HLA fetal [93].

Además, el genotipo KIR AA con HLA C1C1 propio, es compatible con un feto C1C1 incluso C1C2, y el aumento de la expresión de C2 en algunas combinaciones, provoca el riesgo de preeclampsia.

Se sugiere que la preeclampsia es inevitable en las combinaciones KIRAA/HLAC1C2, KIR AB/HLA-C2C2 y KIR AA/C2C2, además los KIR B son haplotipo que se intuye que protegen contra la preeclampsia, aunque el entorno fetal sea C2 [93].

Los autores, sugieren que esto sería útil para la selección adecuada de una donante cuando se realiza un proceso de ovodonación, suponen que el donante C1C1 sea más seguro que un donante que presente C2C2 a la hora de obtener un embarazo exitoso [93].

Debido a la alta controversia entre los estudios, existe una clara necesidad de estandarización de las cohortes para poder encontrar marcadores sin ambigüedades los cuales sean causa de la falta de invasión del trofoblasto.

7.2.2. Infecciones transplacentarias

Las combinaciones HLA/KIR se asocian con una respuesta y resultados que son variables según las infecciones en personas no embarazadas. Existen numerosos estudios que demuestran que el aumento de inhibi-

ción de las células NK puede alterar la protección a infecciones virales por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-1), hepatitis C (VHC), influenza de tipo A y en partículas, CMV y también la malaria y tuberculosis [216].

Por el contrario, la activación de las células NK o una inhibición débil de estas a través de la combinación HLA/KIR puede conducir a aumentar la capacidad de estas células para producir una respuesta efectiva en el control de la infección y mejorar los resultados [206, 215-217]. Además, las células NK sobreactivadas podrían también alterar la respuesta inmune produciendo un estado inflamatorio crónico e impulsar la progresión de la enfermedad [218].

Khakoo et Al. [195] encontraron una correlación entre la expresión de KIR2DL3/HLA-C1+ y la resolución de la infección VHC en personas no embarazadas. En cuanto a la combinación KIR/HLA en respuesta a VIH, diferentes autores afirman que se activa a nivel placentario preferentemente con los receptores KIR con un repertorio más activador: KIR3DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DL5 y KIR2DS5, mientras que el repertorio KIR más inhibidor, sin embargo, el repertorio más inhibidor de KIR confiere protección contra VIH: KIR3DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL5 y KIR2DS5 [219, 220].

7.2.3. Infecciones virales

Una de las infecciones en las que más se han estudiado la combinación HLA/KIR es en la infección por VIH, en este caso la combinación de KIR3DL1/KIR3DS1 con su ligando específico está relacionado con diferentes respuestas inmunitarias. La combinación de KIR3DS1 con su ligando HLA-Bw4-80I se ha vinculado a una progresión más lenta hacia el SIDA, carga viral más baja y protección contra infecciones oportunistas [221-223]. Estudios han demostrado que las células NK que expresan KIR3DS1 inhiben la replicación del VIH en células que expresan HLA-Bw4-80I, resaltando su papel crucial en la respuesta inmune contra el virus [217, 224]. Además, la presencia de KIR3DS1 se asocia con una mayor función efectora de las células NK, medida por la producción de IFN- γ [221].

Estudios relacionados con HCV, sugieren que KIR2DL1/HLA-C2 confiere respuestas inhibitorias más fuertes en comparación con KIR2DL3/HLA-C1 [175, 225]. Sin embargo, en individuos infectados con bajas dosis virales, la combinación KIR2DL3/HLA-C1, que genera señales inhibitorias más débiles, se asocia con la eliminación espontánea del virus. Además, un estudio in vitro con el virus de la gripe A demostró que las células NK de individuos con KIR2DL3/HLA-C1 secretan más IFN- γ y muestran mayor degranulación que las de aquellos con KIR2DL1/HLA-C2, lo que resalta la importancia de estas interacciones en la respuesta inmune a infecciones virales [205].

7.2.4. Enfermedades autoinmunes

Las asociaciones entre los receptores KIR y la susceptibilidad a condiciones autoinmunitarias e inflamatorias se centran en los KIR activadores de cadena corta, que son evolutivamente más jóvenes y probablemente derivados de homólogos inhibitorios. Aunque la variación en las frecuencias de KIR activadores es extensa entre diversas poblaciones étnicas, su diversidad alélica es relativamente limitada. Se ha observado que las frecuencias fenotípicas de KIR activadores y sus ligandos muestran correlaciones negativas, lo que sugiere presiones selectivas para mantener una baja frecuencia de estos receptores, posiblemente debido a la influencia de enfermedades autoinmunitarias [226]. En particular, se ha asociado el KIR2DS2 con condiciones que implican daño vascular e inflamación, como la artritis reumatoide, donde se ha encontrado que las células T CD4+CD28null expresan KIR2DS2 en ausencia de KIR2DL2 [227].

Además, los haplotipos B activadores de KIR y KIR2DS1 se han relacionado con la psoriasis y se ha propuesto un modelo en el que un gradiente de genotipos de KIR2D y HLA-C influye en la susceptibilidad a la artritis psoriásica [228]. Genotipos que confieren mayor activación se asocian con una mayor susceptibilidad, mientras que aquellos que confieren una fuerte inhibición son protectores. También se han observado perfiles de KIR activadores en otras condiciones inflamatorias, como la endometriosis y la diabetes tipo I [229, 230].

7.2.5. Cáncer

La pérdida de moléculas de MHC clase I en los tumores resalta el papel de las células NK en la eliminación de células transformadas. En melanoma, un aumento en la inhibición mediada por KIR puede facilitar la evasión tumoral, además el genotipo *KIR2DL2/2DL3/HLA-C1* [231] fue más frecuente en pacientes. Además, los KIR inhibitorios estaban presentes en mayores frecuencias en pacientes con leucemia, sugiriendo que pueden contribuir a la falta de respuestas antitumorales. Por otro lado, los receptores activadores KIR3DS1 y KIR2DS1 se asociaron con protección en casos de linfoma de Hodgkin [232, 233].

Los genotipos KIR activadores pueden tener efectos opuestos en diferentes malignidades, dependiendo del papel de la inflamación en la patogénesis tumoral. Por ejemplo, los genotipos KIR-HLA inhibitorios se asociaron con una mayor protección contra la neoplasia cervical, mientras que un mayor número de KIR activadores se vinculó con el carcinoma nasofaríngeo. La expresión anormal de KIR también se ha observado en condiciones malignas como el síndrome de Sézary [234] y leucemia de linfocitos grandes granulares, donde la ausencia de ligandos HLA para KIR expresados se relacionó con una mayor gravedad de la enfermedad [235].

Debido a la importancia que se le está dando la inmunidad innata alrededor del desarrollo fetal y sus complicaciones, este trabajo de tesis pretende estudiar variables en la inmunidad innata de la reproducción y sobre todo biomarcadores con objeto de conseguir avances clínicos en enfermedades no tan estudiadas como el FRR





JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Justificación del estudio

Actualmente, el fallo reproductivo continúa impactando negativamente en la sociedad, siendo un tema tabú tanto para la pareja como para la población cuando se aborda el tema. A pesar del aumento de estudios, y la disposición de herramientas cada vez más eficaces para la evaluación y manejo de la patología, todavía existen muchas incógnitas en cuanto a los trastornos obstétricos de causa inmunológica.

La dificultad intrínseca tanto para la obtención de las muestras de endometrio, por razones éticas, así como, la falta de muestras fetales, dificultan su estudio. Por ello es necesario encontrar otras herramientas y biomarcadores que sea útiles y más accesibles a la hora de diagnosticar causas de base inmunológica de dichos trastornos.

Cuando nos encontramos ante un AR o un FIR de causa desconocida, en muchas ocasiones es difícil establecer un protocolo clínico. En muchas ocasiones los tratamientos utilizados no llegan a cumplir sus objetivos exitosamente debido a que cada uno de los trastornos no son clasificados de la manera correcta por la escasez de información.

Ante todas estas necesidades, nuestro grupo decidió buscar herramientas biomarcadores genéticos e inmunológicos útiles, que fueran de fácil acceso y ayudaran al diagnóstico diferencial y personalizado de cada paciente que llega a consulta.

Hipótesis

Gracias a toda la información que se dispone actualmente sobre la gestación y el desarrollo de la misma, cada vez tiene más importancia el estudio del sistema inmunitario como uno de los factores más relevantes para que el embarazo llegue a término. Son muchos los trabajos que han planteado los estudio genéticos y funcionales basados las células inmunes maternas y el EVT fetal [236]. Esto es debido a la importancia de la tolerancia materno-fetal, en la que ciertas proteínas fetales que no pertenecen a la genética materna y que tienen que ser reconocidos como algo “no extraño” para no ser rechazado.

Las células NK son las células más abundantes del sistema inmunitario materno en el endometrio (70%), actuando como las encargadas del desarrollo fetal en los primeros meses de embarazo regulando la invasión del trofoblasto. Estas células entran en contacto con células del EVT fetal, siendo esta interacción determinará la dirección que estas células van a llevar en cuanto a beneficiar o perjudicar la gestación.

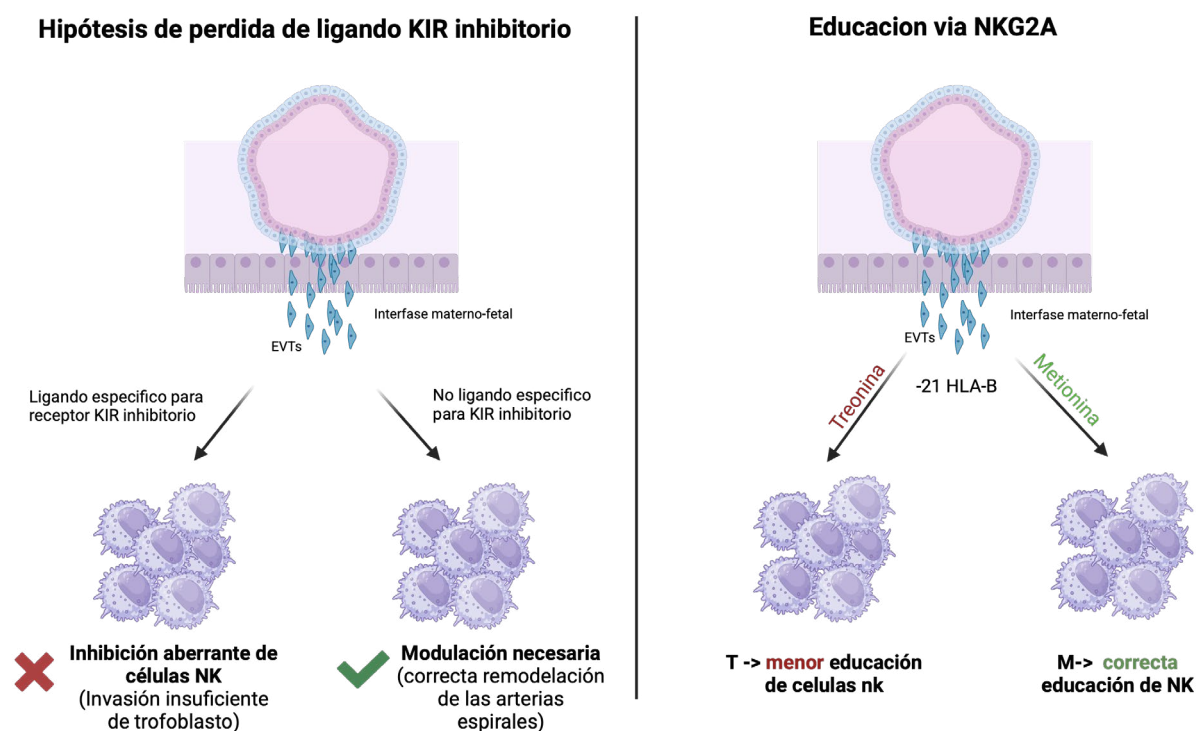


Figura 13. Resumen gráfico de la hipótesis abarcada en el presente estudio.

Creado en BioRender. Gil, R. (2024) <https://BioRender.com/v24z707>

Aunque la mayoría de estudios están dirigidos hacia esta interacción materno-fetal, estudios recientes comienzan a relacionar una correcta educación de las células NK con el propio sistema inmunitario materno asociado a una respuesta adecuada en el momento de la gestación.

Se sabe que las células NK son “educadas” a través de dos tipos de receptores; los receptores KIR y el receptor NKG2A, por tanto, la hipótesis que se aborda en este trabajo sugiere que la falta de interacción de las células NK con sus ligandos específicos puede conllevar a una educación aberrante, desembocando en problemas obstétricos en el embarazo.

Objetivos

El objetivo principal de este estudio consiste en identificar nuevos biomarcadores diagnósticos en sangre periférica que ayuden a identificar pacientes con AR y FIR que pudieran ser responsables de una irregular “educación” de las células NK, tanto previamente al embarazo, por la propia interacción de las células NK con los ligandos maternos propios, como durante el embarazo cuando se produce la interacción con el EVT fetal.

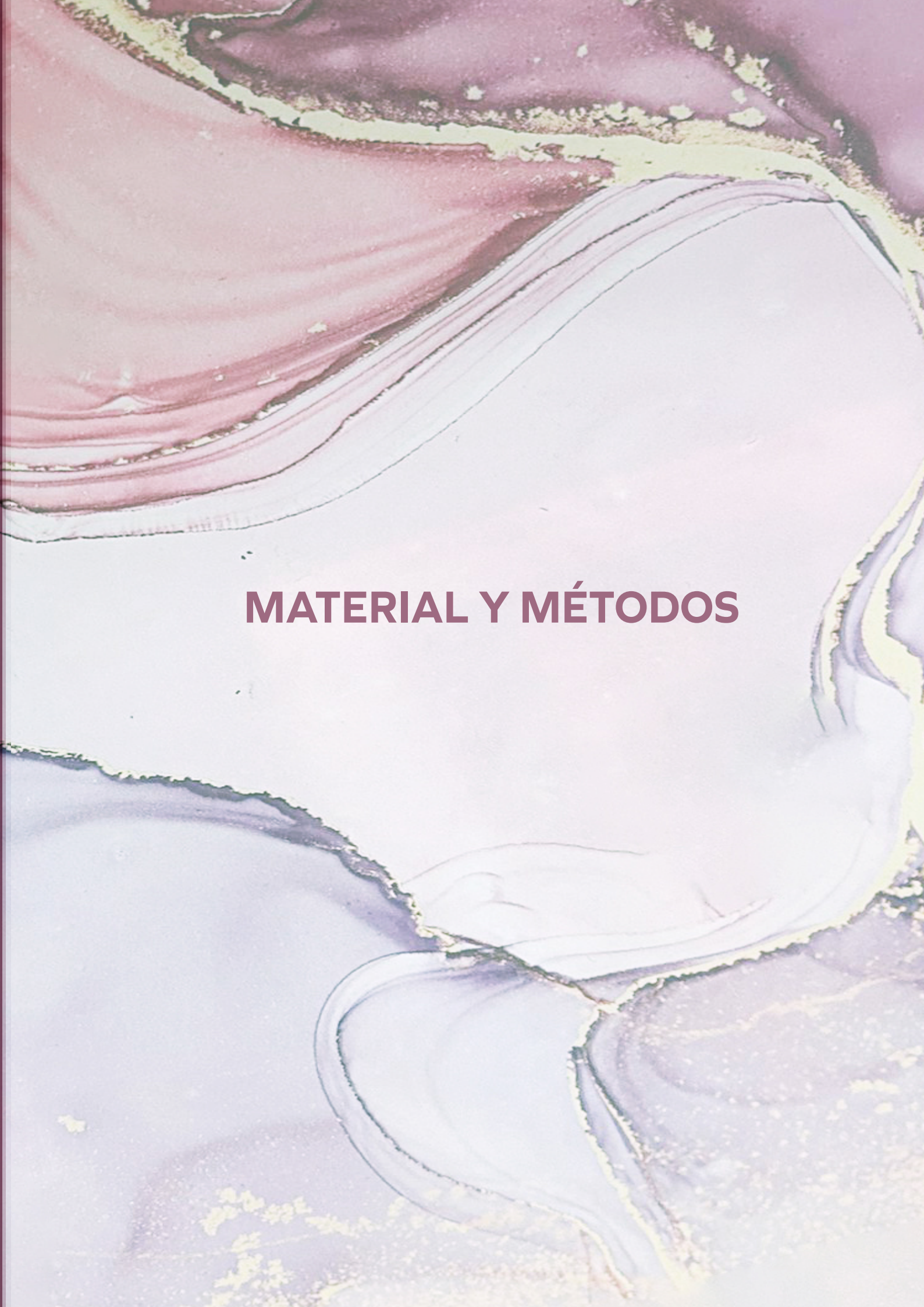
Objetivos adicionales bloque I (datos publicados):

- Analizar el impacto de los haplotipos KIR de pacientes con AR y FIR.
- Analizar el impacto de los haplotipos HLA-C de la paciente y su pareja con AR y FIR.
- Analizar la combinación de haplotipos KIR y HLA-C en pacientes con AR y FIR.

Objetivos adicionales bloque II:

- Analizar el impacto de los haplotipos KIR en pacientes con AR y FIR en una cohorte independiente para la validación los datos anteriormente publicados.
- Analizar el impacto del dimorfismo HLA-B en posición -21 en pacientes con AR y FIR, debido a su importancia en la preeclampsia descrito por otros autores.
- Analizar el impacto de la combinación de los genes inhibitorios de mayor interés (*KIR2DL1*, *KIR2DL2/3*, *KIR3DL1*) con la falta de su ligando HLA en pacientes con AR y FIR.
- Analizar el impacto de la expresión de los receptores NKG2A, NKG2C y KIR inhibitorios para comparar con los resultados obtenidos en la genética en pacientes con AR y FIR.
- Analizar la expresión de los receptores NKG2A, NKG2C y KIR con la presencia genética de los ligandos específicos en pacientes con AR y FIR.





MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Sujetos/Diseño de estudio

Bloque I

El primero de los análisis, fue realizado como un estudio observacional retrospectivo de cohortes que incluyó a 397 mujeres con AR y FIR, Esterilidad (ES) y Muerte Fetal (MF) de etiología desconocida y sus parejas. Estos pacientes fueron remitidos consecutivamente para evaluación inmunológica en la Unidad de Inmunología Clínica del Hospital Ruber Internacional entre 2015 y 2019. Los datos inmunológicos se examinaron utilizando evaluaciones clínicas de rutina, y los hallazgos se documentaron para posteriores análisis grupales. Es importante señalar que este estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki. El Comité Ético Institucional de Investigación Clínica del Centro (CEIC del Hospital RUBER Internacional) aprobó el protocolo del estudio (Proyecto nº Sa-16290 / 19 - CE: 401, código: MARIN-MFGR_01_2020). El comité ético del centro (CEIC del Hospital RUBER Internacional) renunció al consentimiento informado debido a la naturaleza anonimizada de la base de datos y a la inviabilidad de contactar con cada paciente para obtener un consentimiento específico para la investigación retrospectiva.

En este contexto, definimos los siguientes grupos como criterios de inclusión para realizar el análisis de estudio:

- A. Esterilidad (ES):** Definida como la incapacidad de lograr un embarazo clínico tras 12 meses de relaciones sexuales regulares y sin protección, siguiendo el Glosario Internacional sobre Infertilidad y Cuidados de la Fertilidad [237].
- B. Abortos de repetición (AR):** Definida como la pérdida de dos o más embarazos, incluidas las pérdidas de embarazo no visualizadas, según las Normas de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE).
- C. Fallo de implantación recurrente (FIR):** Definido como la no consecución de un embarazo clínico tras más de 3 transferencias de embriones de alta calidad o tras la transferencia de ≥ 10 embriones en transferencias múltiples en mujeres menores de 40 años.
- D. Muerte fetal (MF):** Definida como un resultado compuesto que incluía a mujeres con antecedentes de pérdida fetal tardía (entre las semanas 22 y 28 de embarazo) y mortinato (después de las 28 semanas de edad gestacional) [238].
- E. Población de referencia (P. Ref):** El grupo poblacional de referencia para el genotipo KIR se derivó de un estudio de Vilches et al [159].

- F. Grupo control sano (GCS):** Formado por 29 mujeres y sus parejas con antecedentes de al menos dos embarazos naturales sin complicaciones que dieron lugar al nacimiento de al menos dos recién nacidos sanos. Este grupo se utilizó para otros análisis y comparaciones.

Se realizó el estudio de genes KIR y HLA-C de compatibilidad, en la que se analizaron frecuencias alélicas con la intención de ver si existe algún gen con mayor frecuencia en la población con FRR y también si existen diferencias entre los grupos de estudio.

Además, se compararon las frecuencias génicas con las notificadas en donantes voluntarios de Barcelona y Madrid. Para descartar posibles efectos del síndrome obstétrico antifosfolípido (SAFO) sobre AR y FIR, se excluyó a las pacientes con SAFO (n = 78) para validar las asociaciones encontradas.

Bloque II

El segundo análisis de pacientes multicéntrico caso-control en una cohorte de pacientes fue realizado en una cohorte de 152 pacientes, de los cuales 77 de ellos con FRR divididos en AR y en FIR, y 75 de los cuales pertenecen al GCS. Estos pacientes fueron remitidos para evaluación inmunológica en el Servicio de Inmunología Clínica del Hospital Clínico San Carlos entre el 2022 y 2024. En cuanto al GSC las muestras se obtuvieron del hospital. Los datos que se analizaron fueron evaluaciones clínicas de rutina como en el bloque anterior, y posterior estudio de biomarcadores para ello se realizaron los siguientes análisis:

- Análisis de genes KIR y HLA-C para el estudio de compatibilidad, y confirmación de los resultados obtenidos anteriormente con otra cohorte de pacientes
- Con el análisis HLA-C/KIR se realizó también un estudio de receptor/ligando específico para ver si alguna de las combinaciones podía usarse como biomarcador
- Se analizaron los genes HLA-B para el análisis del dimorfismo en la posición –21,
- Por último, se realizó un estudio por citometría de flujo para el análisis de receptores de membrana en las células NK.

Tal y como se ha descrito en el bloque I, los grupos de estudio AR y FIR se agruparon con las mismas condiciones y criterios de inclusión que se utilizaron y se mencionaron anteriormente. Se utilizaron también los mismos criterios de inclusión mencionados para el GCS.

Las muestras biológicas y los datos clínicos asociados a las pacientes incluidas en el estudio fueron recogidas y procesadas siguiendo procedimientos normalizados de trabajo y con la aprobación del Comité de Ética y del Comité Científico del Hospital Clínico San Carlos (16/221-E).

Variables epidemiológicas y clínicas estudiadas (bloque I y bloque II)

- Variables epidemiológicas

De estas pacientes se incluyeron las variables demográficas: edad, tabaco, IMC, número de abortos, número de ciclos de fecundación in vitro, número de embriones transferidos.

- Variables clínicas

Las variables clínicas que se tuvieron en cuenta fueron mujeres que buscan tratamiento por infertilidad suelen llegar con muchas de las causas conocidas ya descartadas. Generalmente, traen consigo pruebas que incluyen el cariotipo de ambos padres y análisis para detectar trastornos trombofílicos hereditarios, como el factor V Leiden, mutaciones en la protrombina, niveles de homocisteína, y deficiencias en anticoagulantes como la proteína C, proteína S y antitrombina III. También se evalúan hormonas, incluyendo la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la tiroxina (T4), así como el índice de resistencia a la insulina.

Se realiza un examen inmunológico completo a todas las mujeres, que incluye:

- Historia clínica detallada y un examen físico.
- Determinación de anticuerpos que pueden actuar sobre la fertilidad: los anticuerpos antinucleares, anti-gliadina, anti-transglutaminasa, anti-tiroperoxidasa y anti-tiroglobulina. También se miden los anticuerpos anticardiolipina y anti-beta2-glicoproteína (IgG o IgM), así como el anticoagulante lúpico.
- Análisis del inmunofenotipo de las células NK que son cruciales en la respuesta inmune y pueden influir en la implantación del embarazo.

2. Extracción y procesamiento de las muestras

Se tomaron muestras de sangre periférica de pacientes y de un grupo control sano mediante punción venosa, utilizando tubos de EDTA y tubos secos para suero BD Vacutainer. En el caso de las pacientes, la extracción se realizó durante la primera consulta en la Unidad de Inmunología Reproductiva.

De los tubos de EDTA, uno se utilizó para el marcaje con anticuerpos en análisis por citometría de flujo, mientras que el segundo se destinó a la extracción de ADN para la determinación de genes KIR, HLA-C y B.

El tubo de suero se utilizó para evaluar marcadores inmunológicos en el laboratorio, como parte del protocolo clínico estándar para pacientes con abortos recurrentes AR y FIR. Después de permitir que la muestra coagule, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se almacenó en refrigeración a 4 °C para su análisis en los días siguientes a la extracción.

3. Aislamiento del ADN

El aislamiento del ADN se realizó con el aparato MagNA Pure, un sistema automatizado que permite el aislamiento del ADN a partir de sangre periférica. El procedimiento se basa en la lisis de las células sanguíneas, la digestión con proteinasa K para eliminar las proteínas y la captura del ADN mediante su unión a partículas magnéticas con vidrio. Tras separar los complejos de ADN y las partículas magnéticas, se realizaron varios lavados para eliminar las proteínas y los restos celulares. Se eluyeron estos complejos formados y se obtiene una solución de 200µl de ADN de gran pureza. Para el aislamiento se utilizó el siguiente kit, Isolation Kit I -Large Volume (REF: 03730972001 Roche Diagnostics GmbH).

4. Cuantificación de DNA

La cuantificación del ADN se llevó a cabo con el aparato NanoDrop, un espectrofotómetro que cubre un rango de 220 a 750 nm; en este caso, el ADN se midió a 260 nm. La concentración de la muestra se obtiene en ng / µl.

5. Determinación de genotipos

5.1. Genes KIR

Antes del genotipado se realiza una PCR-SSP a partir del Kits Lifecodes KIR Typing Kit (Ref: 545110R, Immucor Medizinische diagnostik GmbH, Germany). La tipificación KIR se realizó utilizando el equipo Luminex; las pruebas para los pacientes se llevaron a cabo en el Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid para el bloque I, mientras que las pruebas para las pacientes pertenecientes al GCS y las pacientes que se analizaron del bloque II se realizaron en el Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid. Las muestras de ADN se analizaron para detectar la presencia de los 14 genes KIR (*2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DL4*, *2DL5*, *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS4*, *2DS5*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3*, *3DS1*) y 2 pseudogenes (*2DP1* y *3DP1*).

Se llevó a cabo un análisis individual de los genes KIR, y las combinaciones de genes se compararon con haplotipos previamente identificados en la población del sur de Europa. Como parte del proceso de control de calidad, se excluyeron del análisis los resultados de genotipos KIR en los que faltaban genes KIR marco.

La clasificación de los genes KIR fue la siguiente:

Genes KIR Inhibidores		Genes KIR Activadores	
<i>KIR2DL1</i>	<i>KIR3DL1</i>	<i>KIR2DS1</i>	<i>KIR2DS4</i>
<i>KIR2DL2</i>	<i>KIR3DL2</i>	<i>KIR2DS2</i>	<i>KIR2DS5</i>
<i>KIR2DL3</i>	<i>KIR3DL3</i>	<i>KIR2DS3</i>	<i>KIR3DS1</i>
<i>KIR2DL5</i>			

KIR2DL4 es único, ya que puede ejercer funciones tanto inhibitoras como activadoras, lo que lo convierte en un receptor versátil en la regulación del sistema inmune.

Clasificación de Genotipos KIR

Los genotipos KIR se clasifican en dos grupos principales:

- **Haplotipo A (AA):** los genotipos AA contienen exclusivamente genes del haplotipo A canónico, que incluye:
 - *KIR3DL3*
 - *KIR2DL3*
 - *KIR2DL1*
 - *KIR2DL4*

- *KIR3DL1*
- *KIR2DS4*

KIR2DS4 es el único receptor activador presente en el haplotipo A telomérico.

- **Haplotipo B (Bx):** los genotipos Bx incluyen al menos un haplotipo B y pueden clasificarse más a fondo:
 - Genes B-centroméricos: Incluyen *KIR2DL2* y *KIR2DS2*.
 - Genes B-teloméricos: Incluyen *KIR2DS1* y *KIR3DS1*.

Clasificación Específica

Genotipos se agrupan como:

- Bx-centroméricos (cenBx): Contienen genes KIR centroméricos (*KIR2DL2/KIR2DS2*).
- Bx-teloméricos (telBx): Contienen genes KIR teloméricos (*KIR2DS1/KIR3DS1*).
- AA-centroméricos (cenAA): Genotipos AA que incluyen genes centroméricos.
- AA-teloméricos (telAA): Genotipos AA que incluyen genes teloméricos.

Alotipos de *KIR2DS4*

Se identifican dos tipos de alotipos para *KIR2DS4*:

- ***KIR2DS4full*:** Expresa el receptor en la membrana debido a la presencia del exón-5 completo.
- ***KIR2DS4dell (2DS4N)*:** Carece del exón-5, lo que resulta en la no expresión en la membrana.

En los casos en los que *KIR2DP1-2DL1* podía estar presente en motivos cenA y cenB (o incluso ausente en estos últimos), se asignaron motivos cenA o cenB basándose en la identificación de *KIR2DL3* o *KIR2DS2-2DL2*, respectivamente. Del mismo modo, en la región telomérica, los motivos telA o telB se asignaron en función de la identificación de *KIR3DL1-2DS4* o *KIR3DS1-2DS1*, respectivamente. Los genes como *KIR2DS3*, *KIR2DS5* y *KIR2DL5* se consideraron parte de los motivos cenB y telB, independientemente de su ubicación específica entre los genes KIR adyacentes (Figura 10).

Los pacientes con dos motivos cenA y dos motivos telA se clasificaron como de genotipo AA, mientras que aquellos con dos motivos telB y dos motivos telB se clasificaron como de genotipo KIR BB. El genotipo AB (BX) se asignó cuando estaba presente cualquier otra combinación de motivos A y B (Figura 14).

Además, la dosis génica de KIR 2DL1A se estimó en función del número de motivos cenA identificados en cada paciente, siguiendo un método descrito previamente por Moffet [208].

Centromeric (2DS2, 2DL2, 2DL3)	
Cen AA	only 2DL3
Cen AB	2DL3 with 2DL2 and/or 2DL2
Cen BB	2 DS2 and/or 2DL2, no 2DL3
Telomeric (3DL1, 3DS1, 2DS1, 2DS4)	
Tel AA	3DL1 and 2DS4
Tel AB	3DL1 and 2DS4 with 3DS1 and 2DS1
Tel BB	2DS1 and 3DS1, no 3DL1

Figura 14. Reglas para la generación de haplotipos KIR.

5.2. Genes HLA-C

Se realiza una PCR-SSO a partir del siguiente Kit específico, Lifecodes HLA-C eRES SSO Typing Kit (Ref: 628921, Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Germany). La tipificación posterior también fue analizada posteriormente con el aparato Luminex, y con el programa de análisis de datos Xponent. Los alelos de HLA-C se clasificaron en 2 grupos (C1 o C2) según la presencia del aminoácido Asparagina o Lisina en la posición 80 del dominio alfa-1, respectivamente [92]. Los siguientes alelos de HLA *HLA-C*01/*03/*07/*08/*12/*13/*14/*15:07/*16:01/*16:04* se incluyeron dentro de grupo C1. Los siguientes alelos de *HLA-C*02/*04/*05/*06/*07:07/*12:04/*15/*16:02/*17* se incluyeron dentro del grupo C2.

5.3. Genes HLA-B

Se realiza una PCR-SSO a partir del siguiente Kit específico, Lifecodes HLA-B eRES SSO Typing Kit (Ref: 628917, Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Germany). El análisis de HLA-B permitió la identificación de alelos portadores del motivo Bw4 en las posiciones 77 – 83 de la secuencia de aminoácidos en el dominio alfa-1 de la cadena pesada HLA-clase-I [183] o por el contrario de los alelos portadores de Bw6, así como el dimorfismo metionina/treonina (M/T) en la posición 21 de la secuencia líder de alotipos HLA-B.

Por ello, se analizó a partir de la figura 15:

Bx4 HLA-B	Posición -21	Bw6 HLA-B	Posición -21
<i>B*13</i>	T	<i>B*07</i>	M
<i>B*27</i>	T	<i>B*08</i>	M
<i>B*37</i>	T	<i>B*14</i>	M
<i>B*38</i>	M	<i>B*15</i>	T
<i>B*44</i>	T	<i>B*18</i>	T
<i>B*47</i>	T	<i>B*35</i>	T
<i>B*49</i>	T	<i>B*39</i>	M
<i>B*51</i>	T	<i>B*40</i>	T
<i>B*52</i>	T	<i>B*41</i>	T
<i>B*57</i>	T	<i>B*42</i>	M
<i>B*59</i>	T	<i>B*46</i>	T
<i>B*78</i>	T	<i>B*48</i>	M
		<i>B*50</i>	T
		<i>B*54</i>	T
		<i>B*55</i>	T
		<i>B*56</i>	T
		<i>B*67</i>	M
		<i>B*73</i>	M
		<i>B*81</i>	M
		<i>B*82</i>	T
		<i>B*83</i>	T

Figura 15. Resumen de los alelos que pertenecen al grupo Bw4 y Bw6, y los que con tienen treonina o metionina en la posición -21.

Figura adaptada de [183].

6. Evaluación de panel por citometría de flujo multiparamétrica

El análisis por citometría de flujo se realizó en las pacientes del bloque II, de los cuales se obtuvieron 46 pacientes con FRR de los cuales 28 pertenecían al grupo AR y 18 al grupo FIR, además se compararon con 9 pacientes control. Se realizó el protocolo con 100uL de sangre periférica y se marcaron durante 20 minutos con los anticuerpos descritos posteriormente en oscuridad y a temperatura ambiente. Después se lisó las células con 2 ml de buffer de lisis (Lysis Solution, BD Biosciencias) durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. En tercer lugar, se centrifugaron las muestras a 1600rpm durante 5 minutos, se decantó y se realizó un segundo centrifugado con buffer para lavar (FACSFlow, BD Biosciencias), otra vez a 1600rpm durante 5 minutos y después se decantó y se resuspendió en 200 microlitros de buffer. Se pasaron las muestras en citómetro FACSCanto II de Becton Dickinson. Posteriormente los datos se analizaron con el software de análisis de datos FlowJo (Becton, Dickinson and Company, USA)

Se analizó la expresión de los receptores NKG2A, NKG2C, y KIR (KIR3DL1, KIR2DL1) en las subpoblaciones de las células NK CD56^{bright} (CD3-CD16-/CD56+) y CD56^{dim} (CD3-CD16+CD56+). Se estimó tanto el porcentaje de las células presentes.

Los voltajes (PMT) del equipo se ajustaron diariamente utilizando partículas de calibración FACSDiva™ CS&T IVD Beads (BD). La compensación de fluorescencia se ajustó finalmente usando los controles negativos por cada fluorocromo. El protocolo incluye 7 colores: CD3 PerCP-Cy5.5 (SK7, BD), CD16 FITC (BD), CD56 BV5510 (NCAM16.2, BD), CD158e PE-Vio®770 (reconoce KIR3DL1, Miltenyi Biotec), CD158a BV521 (HP-3E4, reconoce KIR2DL1, BD), CD159c PE (S19005E, reconoce NKG2C, BioLegend), CD159a APC (S19004C, reconoce NKG2A, BioLegend).

Se usaron gráficos de puntos (dot-plot) FSC/SSC para identificar linfocitos; dot-plot para identificar células NK CD56^{bright} y CD56^{dim}; dot-plots de CD3/NKG2A para identificar células NKG2A+; dot-plot de CD3/KIR2DL1 para distinguir KIR2DL1+. El panel se combinó jerárquicamente y electrónicamente para definir las siguientes subpoblaciones de células NK:

- **CD56bright:** porcentaje de células moduladoras en sangre.
- **CD56dim CD16:** porcentaje de células citotóxicas en sangre.
- **CD56bright:** estudio del porcentaje de receptores cada uno por separado.
- **CD56dim CD16:** estudio del porcentaje de receptores cada uno por separado.

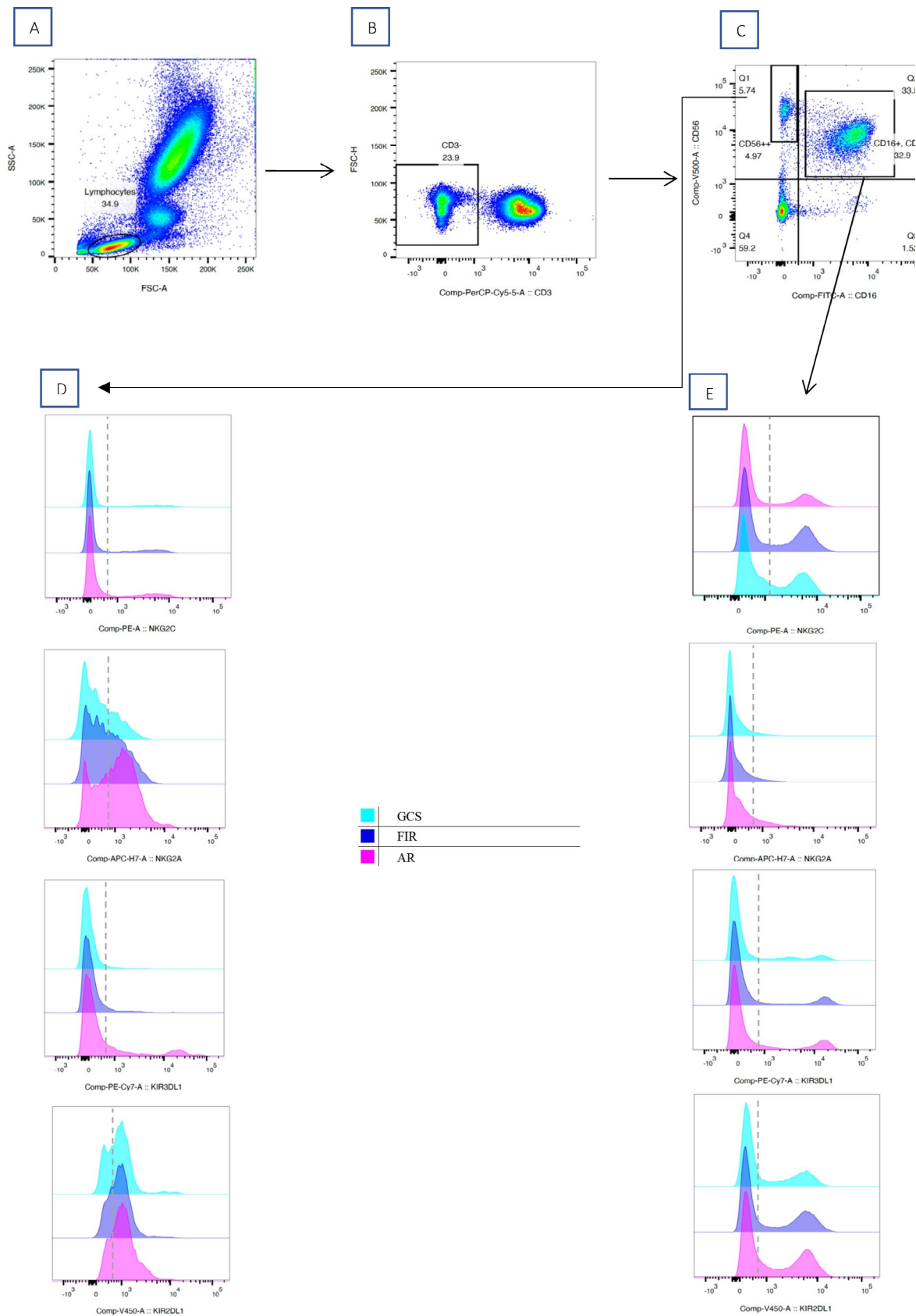


Figura 16. Estrategia mediante citometría flujo para la identificación de poblaciones de células NK, en GCS, AR, FIR.

(A) Selección de linfocitos FSC/SSC; (B) Selección de células CD3- PerCP-Cy5.5/FSC-H; (C) Selección de células CD56Bright y CD56DimCD16+, FITC/V500; (D) Porcentaje de expresión de marcadores en células NK CD56Bright: NKG2C-PE; NKG2A-APC-H7; KIR3DL1-PE-Cy7; KIR2DL1-V450; (E) Porcentaje de expresión de marcadores en células NK CD56DimCD16+: NKG2C-PE; NKG2A-APC-H7; KIR3DL1-PE-Cy7; KIR2DL1-V450.

La estrategia de estudio se muestra en la figura 17. En el bloque I se realiza un análisis genético de los genes KIR y HLA-C; realizando un algoritmo de estudio genético en pacientes con sus parejas. En el bloque II se realizó el análisis genético de genes KIR y HLA-C para confirmar los resultados anteriores, y posteriormente un estudio genético del dimorfismo HLA-B con su posterior análisis de un panel de receptores de interés de las células NK por citometría de flujo.

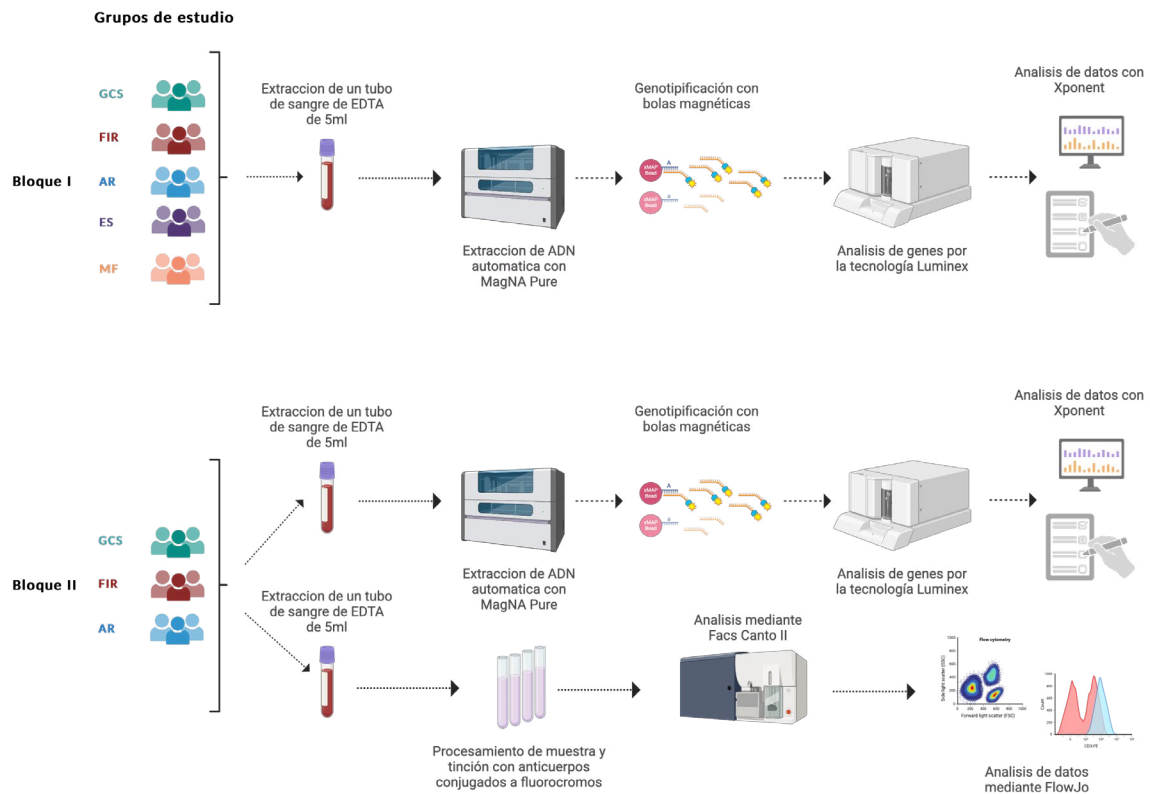


Figura 17. Esquema de protocolo de procesamiento de muestras para el análisis de genético de los genes HLA-C, HLA-B y KIR por la tecnología Luminex y análisis por citometría de flujo en cada grupo de estudio.

Creado en BioRender. Gil, R. (2024) <https://BioRender.com/i92b087>

7. Estudio estadístico

Los análisis estadísticos y los gráficos utilizados en el estudio fueron realizados con SPSS (Versión 27.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), GraphPad Prism versión 9.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) y RStudio (R versión 4.0.3, The R Foundation for Statistical Computing Platform, Vienna, Austria).

7.1. Estadística descriptiva

En un primer momento se procedió al análisis exploratorio de los datos para evaluar sus características principales y su distribución. Para ello, en las variables cuantitativas se realizó una prueba de Shapiro-Wilk (cuando $n < 30$) o de Kolmogorov-Smirnov para ($n \geq 30$) para evaluar la normalidad de la distribución. Se utilizaron test no paramétricos, U de Mann Whitney para comparar dos grupos o Kruskal-Wallis para comparar tres o más grupos, seguido éste último de la prueba posthoc test de Dunn. Los datos no paramétricos se expresaron como mediana y rango intercuartílico. Las comparaciones de variables cualitativas se realizaron con la prueba de chi-cuadrado o el test exacto de Fisher cuando el número de datos es igual o menor de 5. En el caso de datos pareados, se utilizó prueba t para muestras pareadas en el caso de las variables normalmente distribuidas y test de Wilcoxon para las que no siguen una distribución normal. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

7.2. Estudio de asociación entre variables

Se utilizó el test de correlación de Pearson para evaluar el grado de asociación entre las variables obtenidas por citometría de flujo y las citoquinas en el bloque I. Los datos obtenidos se representan en forma de matriz (heatmap), incluyendo la significación, si la hubiera, en forma de asterisco (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$) y la tendencia de la asociación (negativa o positiva) con un gradiente de color (negativa azul y positiva rojo).

7.3. Análisis de curvas ROC

Se realizó un análisis de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) para seleccionar el valor de punto de corte óptimo mediante el índice de Youden en aquellas variables significativas entre los grupos de estudio. Este índice determina el punto en el que la sensibilidad y especificidad es más alta conjuntamente y se calcula según la fórmula [sensibilidad + (1-especificidad)].

7.4. Diseño del algoritmo

El primer paso en el diseño de un algoritmo diagnóstico es seleccionar las variables más relevantes que permitan discriminar entre los grupos patológicos y el grupo control, facilitando así la construcción de un modelo predictivo. Entre los métodos tradicionales para la selección de variables, el análisis de componentes principales (PCA) es uno de los más utilizados, ya que emplea la varianza de los datos para identificar las variables principales. Sin embargo, una limitación del PCA y métodos similares es que realizan una selección no supervisada, sin considerar la relación entre las variables de entrada y el resultado final. Por ello, utiliza árboles aleatorios de clasificación (Random Forest Classifier) para identificar las variables más importantes teniendo en cuenta la salida final.

Se lleva a cabo un análisis de regresión logística univariante para evaluar el poder de clasificación de cada variable de forma individual. Las variables significativas se incluyen en un análisis de regresión logística multivariante (método Enter) para determinar el porcentaje de clasificación global del modelo. Además, se utiliza una curva ROC para calcular el área bajo la curva, así como la sensibilidad y especificidad global del modelo, permitiendo así evaluar su capacidad predictiva de manera integral.





RESULTADOS

RESULTADOS

Bloque I (datos publicados) Estudio de los genes KIR y HLA-C en pacientes con fallo reproductivo recurrente

1. Características epidemiológicas y obstétricas de los diferentes grupos de estudio

Se analizó un total de 397 mujeres con FRR, datos clínicos e inmunológicos completos. Sus antecedentes obstétricos en el momento de la evaluación inmunológica revelaron diferentes diagnósticos: El 15,11% fueron diagnosticadas del grupo ES; el 33,50%, del grupo FIR; el 44,33%, AR; y el 7,05%, MF. Se muestra en la Tabla 1 que todos los grupos compartían características similares, lo que permitió la comparabilidad en análisis posteriores.

Si nos centramos en las 321 mujeres sin donación de ovocitos, espermatozoides o embriones (SAFO), la distribución entre los grupos de diagnóstico se mantuvo constante: 14,95% con diagnóstico de esterilidad, 34,58% FIR, 43,61% AR y 6,85% MF. Surgieron más detalles: las pacientes con esterilidad que estaban buscando el embarazo cumplían una media de 37,7 años, los que tenían FIR tenían una media de 2,2 transferencias embrionarias previas, y los individuos con AR experimentaron una media de 3 abortos espontáneos previos (Tabla 1).

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de los diferentes grupos de estudio.

	Esterilidad (n = 60)	FIR (n = 133)	AR (n = 176)	MF (n = 28)	p
Edad (años) media±SD	38 ± 4,35	37,4 ± 3,79	38,11 ± 3.91	36,71 ± 3,63	NS
IMC media±SD	22,95 ± 2,95	22,6 ± 3,25	23,18 ± 3.68	23,3 ± 4,04	0,02
Tabaco N (%)	24 (40%)	45 (33,83%)	61 (35,26%)	7 (25%)	NS
Nº de abortos media±SD	0,35 ± 0,48	0,33 ± 0,47	3,45 ± 1,78	2,57 ± 1,64	<0,01
Nº de ciclos FIV media±SD	2,08 ± 1,63	4 ± 1,73	2,68 ± 1,90	2,12 ± 0,93	0,01
Nº de transferencias media±SD	2,74 ± 2,19	5.5 ± 3,32	5,16 ± 4,22	4,13 ± 2,94	<0,01
SAFO N(%)	12 (20%)	22 (19,8%)	36 (20,45%)	6 (21,42%)	NS

Los valores se expresan como media±SD o frecuencia (%). MF: muerte fetal. NS: no significativo. AR: aborto de repetición; FIR: fallo de implantación recurrente; SAFO: síndrome antifosfolipídico obstétrico; FIV: fecundación in vitro.

Tabla 2. Características clínicas y demográficas subdivididas en los haplotipos KIR de los diferentes grupos de estudio.

	KIR AA		KIR AB		KIR BB		p (AA - BB)
Edad (años) media±SD	38	(SD 3,7)	37,5	(SD 4)	40,2	(SD 2,7)	NS
IMC media±SD	22,8	(SD 3,6)	22,8	(SD 3,5)	22	(SD 1,8)	NS
Tabaco N (%)	38	27,5	67	26,7	1	14,3	NS
Exp. NK (CD16+ CD56+) N (%)	30	25,2	48	21,6	1	33,3	NS
Exp. NKT (CD3+CD56+) N (%)	16	13,7	28	12,9	2	50	NS
Exp. NK o NKT N (%)	43	30,9	73	29,1	3	42,9	NS
ANAs N (%)	16	11,6	30	12	1	14,3	NS
TSH media±SD	1,6	(SD0,9)	1,8	(SD1)	1,8	(SD0,6)	NS
Anti TG N (%)	10	7,2	24	9,6	0	0	NS
Anti TPO N (%)	6	4,3	14	5,6	0	0	NS
Anti TGT N (%)	2	1,6	2	0,8	0	0	NS
SAFO N (%)	60	43,2	97	38,6	3	42,9	NS

Los valores se expresan como media±SD o frecuencia (%). ANAs: anticuerpos antinucleares, TSH: hormona estimulante de la tiroides, Anti-TG: anticuerpos anti-tiroglobulina, Anti-TPO: anticuerpos anti-tiroideos, Anti-TGT: anticuerpos anti-transglutaminasa tisular, SAFO: síndrome antifosfolipídico obstétrico; IMC: índice de masa corporal; NK: células natural killer; KIR: receptor similar a la inmunoglobulina de las células NK

2. Distribución de genotipos KIR clásicos en pacientes con FRR y un GCS

En primer lugar, se realizó el análisis los genotipos KIR, se calcularon las frecuencias de los diferentes receptores generando haplotipos y se compararon con las frecuencias observadas en la población española de referencia (Tabla 3, figura 18). Entre todas las pacientes con FRR, el genotipo KIR AB fue el más prevalente, fue observado en el 63,22% (251/397) similar a la población de referencia, seguido del KIR AA un 35,01% (139/397) y del KIR BB en el 1,76% (7/397) de las mujeres (tabla 3, figura 18 A).

Se observó como en el grupo FRR el haplotipo KIR AA es significativamente más frecuente que en el grupo de referencia, 35,01% frente a un 24,15% respectivamente con un p-valor <0, .0001. En cuanto al haplotipo KIR BB, se observó que está significativamente disminuido en el grupo FRR, 1,76% frente 14,73%, y se obtuvo un p-valor <0,0001 (tabla 3, figura 18).

Al excluir a los pacientes con SAFO, se observaron prevalencias similares del genotipo KIR en la cohorte restante: KIR AB en el 65,73% (211/321), KIR AA un 33,02% (106/321) y KIR BB en el 1,25% (4/321). En análisis posteriores este factor no se consideró relevante (tabla 3).

Se decidió realizar el análisis de haplotipos KIR distinguiendo el haplotipo centromérico y telomérico por separado debido a la pérdida de información por el haplotipo KIR AB clásico..

Tabla 3. Frecuencias de haplotipos KIR clásicos en en los diferentes grupos de estudio.

KIR		GLOBAL			Sin SAFO		
		AA	AB	BB	AA	AB	BB
P. Ref (n=402)	N (%)	97 (24,15)	246 (61,12)	59 (14,73)	97 (24,15)	246 (61,12)	59 (14,73)
FRR (n=397)	N (%)	139 (35,01)	251 (63,22)	7 (1,76)	106 (33,02)	211 (65,73)	2 (1,25)
	P	<0,001	NS	<0,001	0,040	NS	<0,001
	Odds Ratio	1,464	1,035	0,120	1,367	1,076	0,084
	IC 95%	1,093-1,961	0,828-1,292	0,055-0,264	1,003-1,863	0,851-1,359	0,030-0,235
FIR (n=133)	N (%)	45 (33,83)	87 (65,41)	1 (0,80)	39 (35,14)	72 (64,86)	0 (0,00)
	P	0,008	NS	<0,001	0,008	NS	<0,001
	Odds Ratio	1,606	1,070	0,051	1,701	1,061	-
	IC 95%	1,051-2,152	0,783-1,462	0,007-0,371	1,086-2,666	0,759-1,484	-
AR (n=176)	N (%)	63 (35,80)	111 (63,07)	2 (1,14)	46 (32,86)	96 (68,57)	1 (0,71)
	P	<0,001	NS	<0,001	0,040	NS	<0,001
	Odds Ratio	1,497	1,032	0,077	1,360	1,087	0,048
	IC 95%	1,042-2,149	0,776-1,371	0,018-0,310	0,913-2,026	0,801-1475	0,007-0,353

KIR: receptor similar a la inmunoglobulina de las células asesinas; AR: abortos de repetición FIR: fallo recurrente de implantación; FRR: fallo reproductivo recurrente; sin SAFO: sin cumplir los criterios de clasificación del síndrome antifosfolípido obstétrico.

FRECUECIAS DE LOS HAPLOTIPOS KIR CLÁSICOS EN COMPARACIÓN CON LA POBLACIÓN DE REFERENCIA

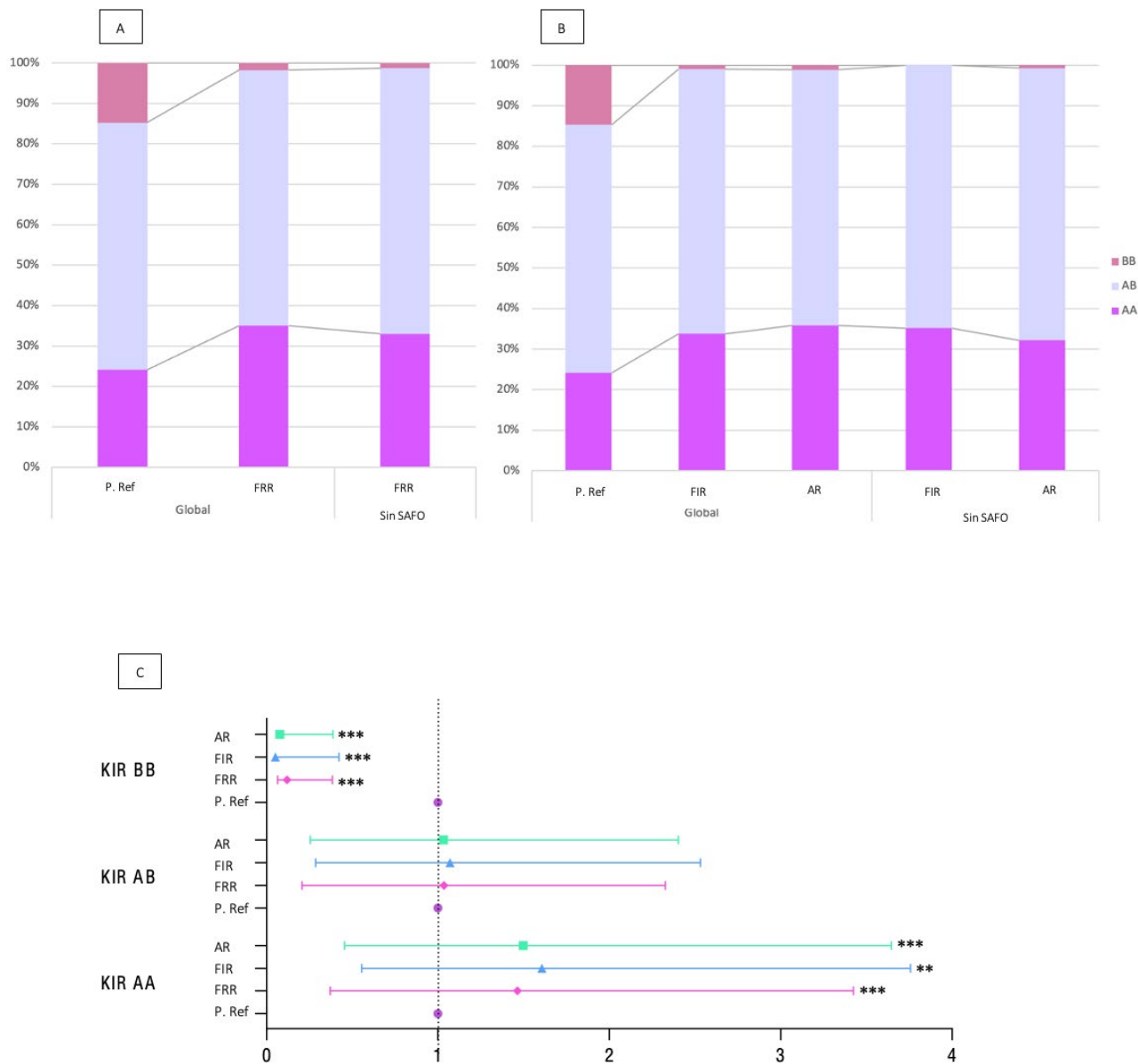


Figura 18. Frecuencias de los haplotipos KIR clásicos en los diferentes grupos de estudio.

(A) Frecuencia de los haplotipos clásicos de los genes KIR de las pacientes con fallo reproductivo recurrente (FRR) y la población de referencia (P. Ref). (B) Frecuencia de los haplotipos clásicos de los genes KIR de las pacientes con fallo recurrente de implantación (FIR) y abortos de repetición (AR) en comparación con la población de referencia (P. Ref) (C) Representación de los Odds Ratio y los intervalos de confianza 95%, de los grupos FRR, AR y FIR en comparación con la población de referencia. Los valores de p se derivan de pruebas U de Mann Whitney para comparar dos grupos y Kruskal-Wallis para comparar tres o más grupos. Datos con p-valor significativo mostrados * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

También se analizaron las frecuencias alélicas tras la estratificación de grupos. La frecuencia de KIR AB también fue la más prevalente tanto en el grupo FIR como el grupo AR, pero la frecuencia se mantuvo igual que en la población española de referencia, por lo que no se observaron diferencias significativas en este grupo.

Los datos obtenidos tanto en el grupo FIR como en AR, la frecuencia alélica fue significativamente más alta 33,83% y el 35,80% con p-valores = 0,008 y <,0001, respectivamente (Tabla 3, figura 18B). Se analizó el haplotipo KIR BB, la frecuencia se observó invertida, es decir disminuyó en ambos grupos, tanto FIR como AR, suponiendo un 1,76% y 1,14%, respectivamente frente a un 14,73% en el grupo de población de referencia (tabla 3, figura 18B).

Los resultados en la población sin SAFO para los grupos FIR y AR fueron similares a los resultados del grupo global., Los análisis a partir de este punto se realizaron sin tener en cuenta este factor.

3. Distribución de motivos Centroméricos y teloméricos en paciones con FRR y un GCS

La distribución de motivos centroméricos y teloméricos en mujeres con FRR se muestran en la Tabla 4. En la cohorte representada, CenAA aumentó significativamente en el grupo FRR en comparación con P. Ref, mientras que en la población de referencia CenAB fue el único motivo centromérico KIR asociado con la probabilidad de FRR. En particular, en esta cohorte, se observó un aumento significativo de CenAA con un p-valor $<0,001$, mientras que, en la población de referencia, CenAB era el más común.

Entre las mujeres con FRR, la distribución de los motivos centroméricos fue la siguiente: CenAA estuvo presente en 195 de 397 (49,12%), CenAB en 171 de 397 (43,07%) y CenBB en 31 de 397 (7,81%). En cuanto a los motivos teloméricos, TelAA se identificó en 227 de 397 (57,18%), TelAB en 156 de 397 (39,55%) y TelBB en 14 de 397 (3,53%) de los sujetos (tabla 4, figura 19A).

En la Tabla 4 se muestra un análisis más detallado de los motivos KIR centroméricos y teloméricos en las mujeres con FRR. Cabe destacar que la frecuencia de CenAA en las pacientes con FRR fue significativamente superior a la registrada en la población española de referencia (49,12% frente a 40,34%; $p<0,01$) (tabla 4, figura 19A).

La presencia de un motivo CenAA se asoció con un aumento significativo del riesgo de pertenecer al grupo FRR (Odds Ratio: 1,18; IC: 0,949-1,560; $p<0,001$) (Figura 19C). No se observaron diferencias significativas en las frecuencias de otros motivos centroméricos y teloméricos entre los pacientes del grupo FRR y la población de referencia.

Además, el motivo CenAA se identificó en 29 de 60 (48,33%) en el grupo ES, 65 de 133 (48,87%) en el grupo FIR, 89 de 176 (50,57%) en el grupo AR y 12 de 28 (42,86%) en el grupo MF (tabla 4, datos suplementarios 1). En comparación con la población de referencia, la frecuencia del motivo CenAA fue significativamente mayor en el grupo FIR (48,87% frente a 40,34%, $p=0,028$) y en el grupo AR (50,57% frente a 40,34%, $p=0,001$) (tabla 4, figura 19A). La presencia de un motivo CenAA aumentó significativamente la probabilidad de pertenecer a los grupos FIR (Odds Ratio: 1,212; 0,856-1,710) y AR (Odds Ratio: 1,513; IC 1,060-2,158) (tabla 4, figura 19C).

Por el contrario, el motivo CenBB se identificó en 9 de 60 (15,00%) en el grupo ES, 4 de 133 (3,01%) en el grupo FIR, 16 de 176 (9,09%) en el grupo AR y 2 de 28 (7,14%) en el grupo MF. Se observó que la frecuencia del motivo Cen BB era significativamente menor en el grupo FIR (3,01% frente a 10,61%; $p=0,001$) en comparación con la población de referencia (tabla 4, tabla suplementaria 1, figura 19B), y esto se asoció en consecuencia con una probabilidad significativamente menor de pertenecer al grupo FIR (Odds Ratio:

0,283; IC: 0,099-0,802) (figura 19C). Las frecuencias de los demás motivos Cen/Tel entre las mujeres de los grupos ES y MF fueron similares a las descritas para la población de referencia (tabla suplementaria 1).

Tabla 4. Frecuencias de los haplotipos KIR centroméricos y teloméricos en los diferentes grupos de estudio.

		CenAA	CenAB	CenBB	TelAA	TelAB	TelBB
P.Ref. (n=402)	N (%)	162 (40,34)	178 (44,18)	42 (10,61)	211 (55,07)	146 (36,23)	15 (3,83)
FRR (n=397)	N (%)	195 (49,12)	171 (43,07)	31 (7,81)	227 (57,18)	157 (39,55)	14 (3,53)
	P	<0,01	NS	NS	NS	NS	NS
	Odds Ratio	1,218	0,974	0,735	1,038	1,084	0,912
	IC 95%	0,949-1,560	0,759-1,250	0,454-1,187	0,825-1,306	0,833-1,411	0,439-1,894
FIR(n=133)	N (%)	65 (48,87)	64 (48,12)	5 (3,01)	76 (57,14)	54 (40,60)	3 (2,26)
	P	0,028	NS	0,001	NS	NS	NS
	Odds Ratio	1,212	1,089	0,283	1,037	1,121	0,584
	IC 95%	0,856-1,710	0,770-1,537	0,099-0,802	0,750-1,436	0,776-1,618	0,167-2,034
AR (n=176)	N (%)	89 (50,57)	71 (40,34)	16 (9,09)	102 (57,95)	54 (30,68)	6 (3,41)
	P	0,001	NS	NS	NS	NS	NS
	Odds Ratio	1,513	0,913	0,855	1,052	0,847	0,882
	IC 95%	1,060-2,158	0,658-1,264	0,460-1,556	0,785-1,410	0,592-1,211	0,339-2,291

(P. Ref) se refiere a datos de población control; IC: intervalo de confianza. AR: abortos de repetición; FIR: fallo de implantación recurrente; FRR: fallo reproductivo recurrente; KIR: receptor similar a la inmunoglobulina de las células NK; Cen AA: haplotipo KIR centromérico A; Cen AB: haplotipo KIR centromérico AB; Cen BB: haplotipo KIR centromérico B; Tel AA: haplotipo KIR telomérico A; Tel AB: haplotipo KIR telomérico AB; Ten BB: haplotipo KIR telomérico B.

Dado que los grupos de ES y MF no mostraron diferencias significativas con el grupo de referencia, lo que podía deberse al tamaño muestral limitado, en los análisis posteriores se descartaron ambos grupos y se siguió el estudio de investigación con el grupo FRR.

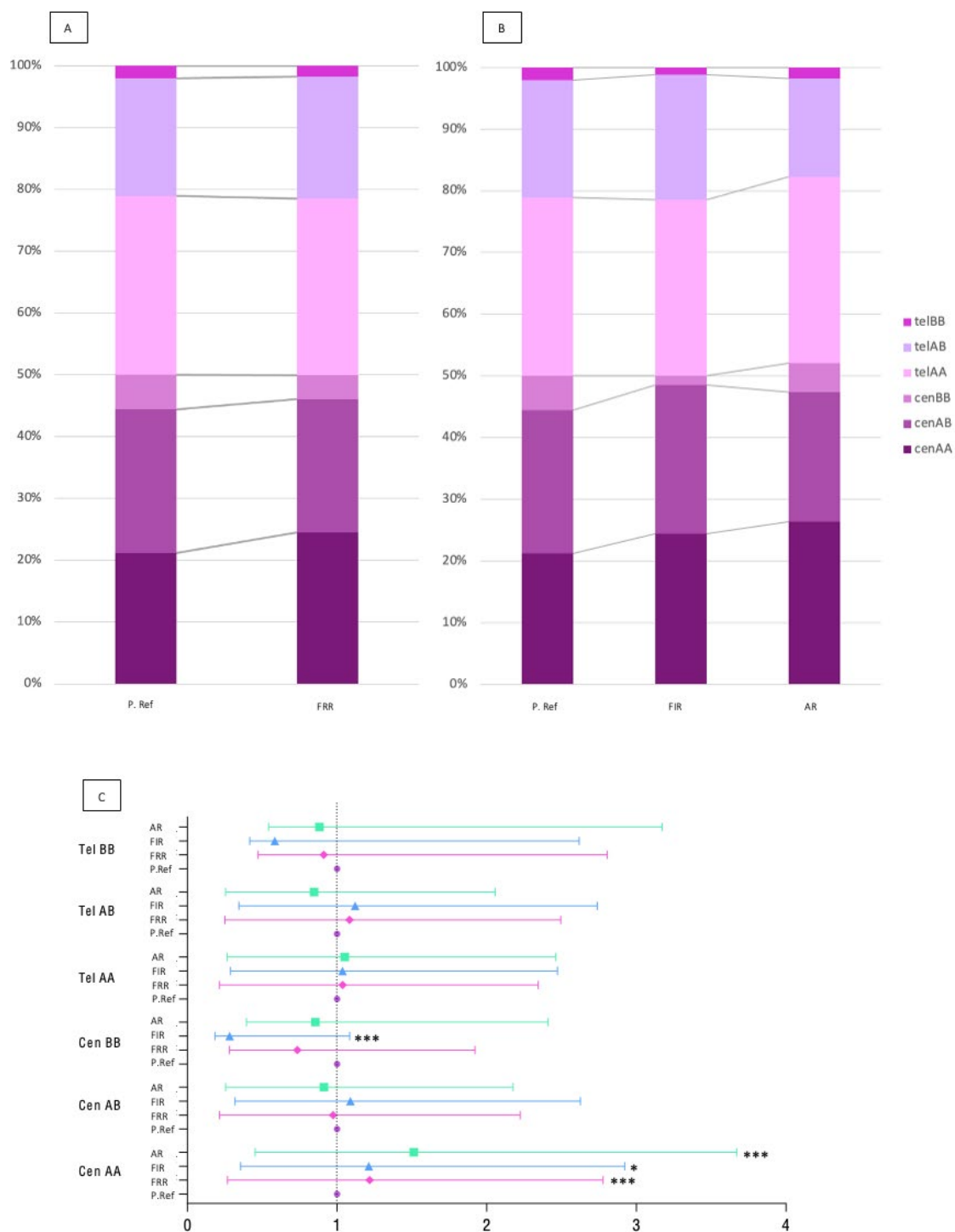


Figura 19. Frecuencias de los haplotipos KIR centroméricos y teloméricos en los diferentes grupos de estudio.

(A) Frecuencia de los haplotipos centroméricos y teloméricos de los genes KIR de las pacientes con fallo reproductivo recurrente (FRR) y la población de referencia (P.Ref). (B) Frecuencia de los haplotipos centroméricos y teloméricos de los genes KIR de las pacientes con fallo de implantación recurrente (FIR) y abortos de repetición (AR) en comparación con la población de referencia (P. Ref). (C) Representación de los Odds Ratio y los intervalos de confianza 95%, de los grupos FRR, AR y FIR en comparación con la población de referencia. Abreviaturas: Cen AA: haplotipo KIR centromérico A; Cen AB: haplotipo KIR centromérico AB; Cen BB: haplotipo KIR centromérico B; Tel AA: haplotipo KIR telomérico A; Tel AB: haplotipo KIR telomérico AB; Ten BB: haplotipo KIR telomérico B. Los valores de p se derivan de pruebas U de Mann Whitney para comparar dos grupos y Kruskal-Wallis para comparar tres o más grupos. Datos con p-valor significativos mostrados * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4. Distribución de HLA-C en parejas con FRR y un GCS

Se realizó un examen detallado de los haplotipos HLA-C tanto en las mujeres como en sus parejas en todos los grupos estudiados, tal y como se presenta en la tabla 5. Surgieron los siguientes hallazgos:

- A.** Una reducción del haplotipo HLA-C1 fue notable en las mujeres del grupo FRR (26,44% frente a 48,27%, $p=0,01$) y del grupo AR (26,70% frente a 48,27%, $p=0,018$). Se observó de forma similar en sus parejas dentro del grupo FRR (22,92% frente a 62,06%, $p<0,001$), así como en los subgrupos AR (22,72% frente a 62,06%, $p<0,001$) y FIR (31,25% frente a 62,06%, $p=0,002$) en comparación con el grupo de control.
- B.** Se analizaron los individuos con el haplotipo HLA-C2, se observó un aumento significativo en las parejas de los grupos FRR y AR. En particular, se produjo un aumento estadísticamente significativo en el grupo FIR (27,08% frente a 6,89%, $p=0,022$) en comparación con el grupo de control.

Además, cabe destacar que el riesgo de AR y FIR fue significativamente menor en las parejas que poseían el haplotipo HLA-C1 (Odds Ratio: 0,179, IC: 0,078-0,411; OR: 0,277, IC: 0,116-0,660, respectivamente) (tabla 5, figura 20C).

Posteriormente, se analizó la distribución de las combinaciones HLA-C entre las mujeres y sus parejas, como se presenta en la tabla suplementaria 2. Se obtuvieron los siguientes resultados:

- A.** Se observó una reducción de las combinaciones HLA-C1/C1 en el grupo FRR (9,03% frente a 27,59%, $p=0,004$), el grupo AR (7,09% frente a 27,59%, $p<0,001$) y el grupo FIR (10,42% frente a 27,59%, $p=0,002$) en comparación con el grupo de control (tabla suplementaria 2).
- B.** En particular, la frecuencia de parejas HLA-C2/C2 fue significativamente mayor en el grupo FIR, con un riesgo cinco veces superior al del grupo de control (tabla suplementaria 2).

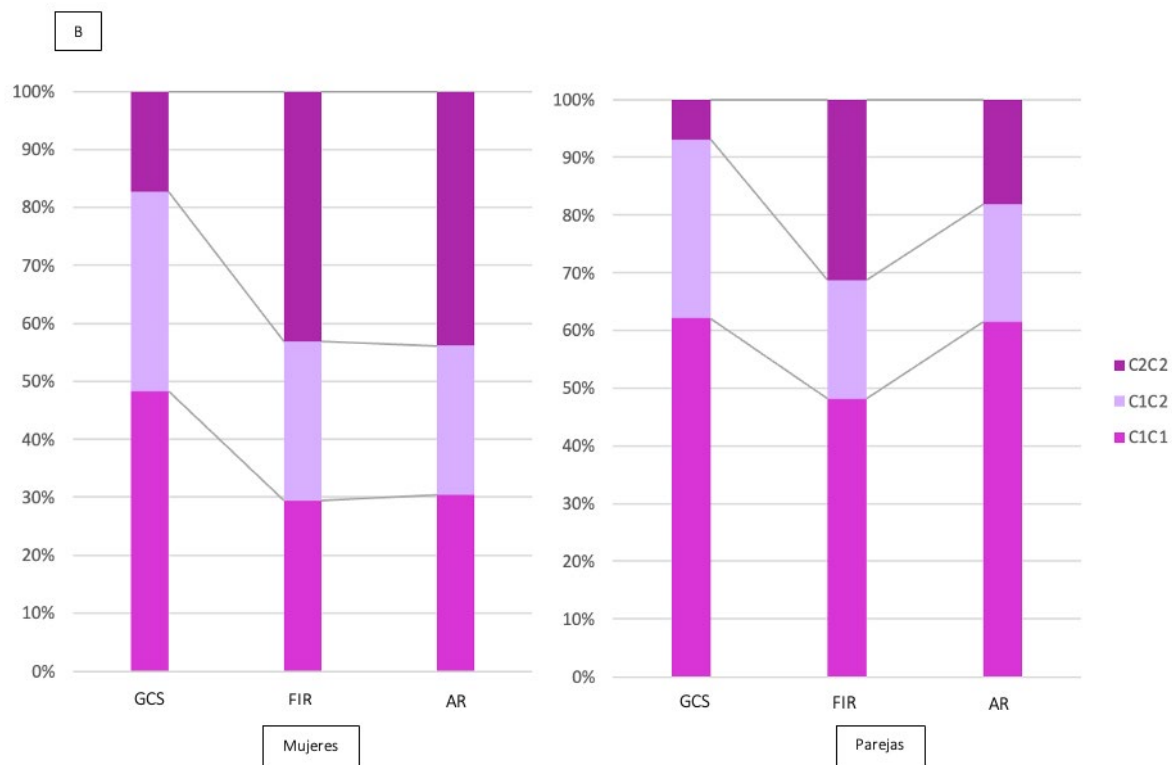
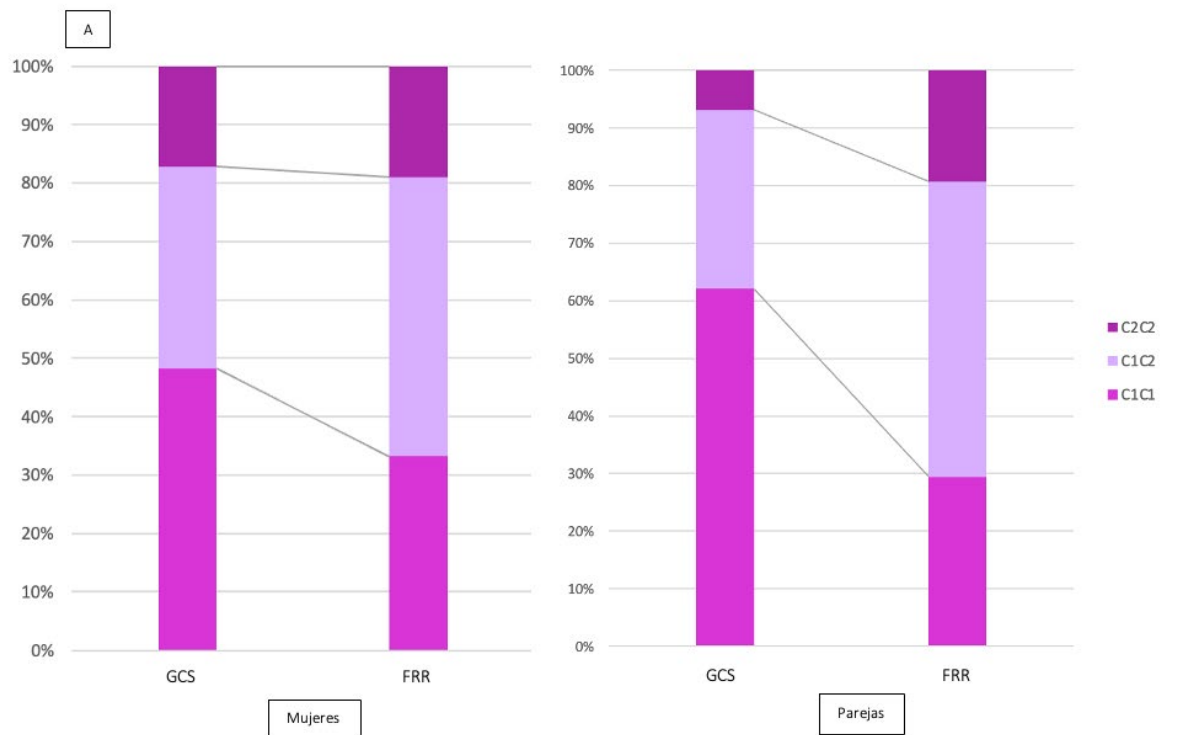
Se estudiaron las combinaciones HLA-C y considerar únicamente el porcentaje de la suma de HLA-C2 paternos, se observó una mayor frecuencia de al menos un HLA-C2 paterno en los grupos FRR (70,60% frente a 37,93%, $p<0,001$), AR (68,75% frente a 37,93%, $p=0,003$) y FIR (71,63% frente a 37,93%, $p<0,001$). Notablemente, esta tendencia no se encontró al considerar únicamente el HLA-C2 materno (tabla 5, figura 20A).

Tabla 5. Frecuencia de los haplotipos de HLA-C de las pacientes y sus parejas en los diferentes grupos de estudio.

		Mujer C1C1	Pareja C1C1	Mujer C1C2	Pareja C1C2	Mujer C2C2	Pareja C2C2
GCS	N (%)	14 (48,27)	18 (62,06)	10 (34,48)	9 (31,03)	5 (17,24)	2 (6,89)
FRR	N (%)	105 (26,44)	91 (22,92)	152 (38,04)	159 (40,05)	54 (13,60)	60 (15,11)
	P	0,01	<0,001	NS	NS	NS	NS
	Odds Ratio	0,385	0,181	1,178	1,484	0,755	3,240
	IC 95%	0,179-0,825	0,082-0,398	0,533-2,602	0,659-3,343	0,276-2,065	0,749 -14,003
AR	N (%)	47 (26,70)	40 (22,72)	68 (38,64)	78 (44,32)	26 (14,77)	23 (13,06)
	P	0,018	<0,001	NS	NS	NS	NS
	Odds Ratio	0,390	0,179	1,196	1,768	0,832	1,990
	IC 95%	0,175-0,869	0,078-0,411	0,525-2,726	0,762-4,101	0,291-2,376	0,443-8,934
FIR	N (%)	32 (33,33)	30 (31,25)	47 (48,95)	40 (41,67)	17 (17,71)	26 (27,08)
	P	NS	0,002	NS	NS	NS	0,022
	Odds Ratio	0,535	0,277	1,822	1,587	1,032	5,014
	IC 95%	0,230-1,244	0,116-0,660	0,768-4,324	0,655-3,846	0,344-3,093	1,113-22,590

IC: intervalo de confianza. AR: aborto de repetición; FIR: fallo de implantación recurrente; FRR: fallo reproductivo recurrente; FRR: fallo reproductivo recurrente; NS: no significativo; C1C1: haplotipo HLA-C homocigoto C1; C1C2: haplotipo HLA-C heterocigoto; C2C2: haplotipo HLA-C homocigoto C2.

FRECUENCIAS DE LOS HAPLOTIPOS HLA-C EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO



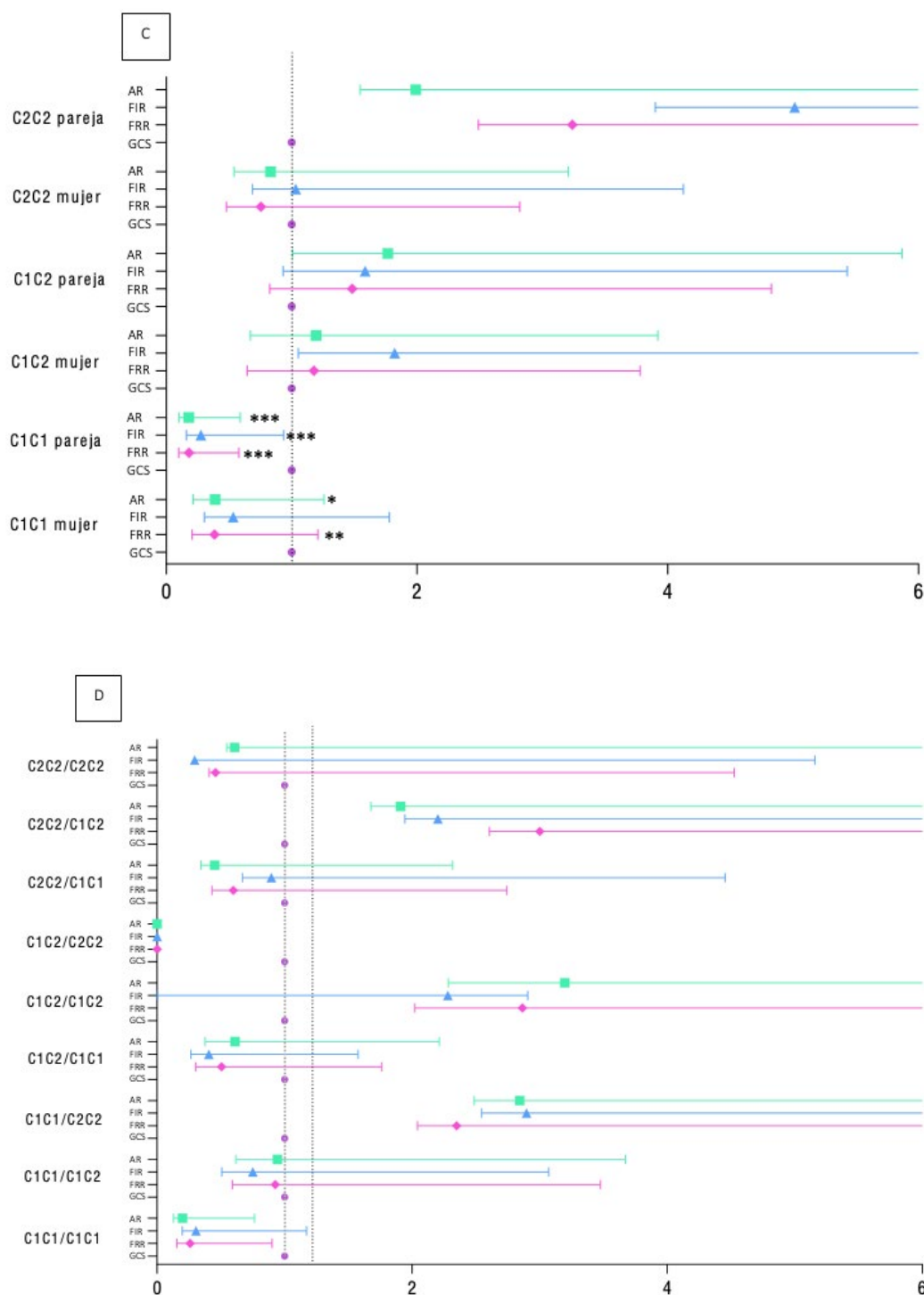


Figura 20. Frecuencias de los haplotipos HLA-C en los diferentes grupos de estudio.

(A) Frecuencia de los haplotipos de HLA-C de las pacientes y sus parejas con fallo reproductivo recurrente (FRR) y grupo control sano (GCS) (B) Frecuencia de los haplotipos HLA-C de las pacientes y sus parejas con fallo de implantación recurrente (FIR) y abortos de repetición (AR) en comparación con el grupo control sano (GCS). (C) Representación de los Odds Ratio y los intervalos de confianza 95%, de los haplotipos HLA-C por separado de los grupos FRR, AR y FIR en comparación con el grupo control sano (GCS). (D) Representación de los Odds Ratio y los intervalos de confianza 95%, de los haplotipos HLA-C conminando la mujer con la pareja de los grupos FRR, AR y FIR en comparación con el grupo control sano (GCS). Abreviaturas: C1C1: haplotipo HLA-C homocigoto C1; C1C2: haplotipo HLA-C heterocigoto; C2C2: haplotipo HLA-C homocigoto C2. Los valores de p se derivan de pruebas U de Mann Whitney para comparar dos grupos y Kruskal-Wallis para comparar tres o más grupos. Datos con p-valor significativos mostrados * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

5. Distribución de genotipo KIR centromérico y telomérico y HLA-C en parejas con FRR y un GCS.

Se estudió la distribución de KIR y HLA-C entre las parejas con fertilidad conocida y el grupo FRR, no se encontraron diferencias estadísticas en las frecuencias de genotipos KIR o motivos Cen/Tel, excepto para el motivo CenBB (tabla 6, figura 21A). El motivo CenBB fue significativamente más frecuente en las parejas con fertilidad conocida en comparación con los pacientes del grupo AR (7,81% frente a 18,01%; $p=0,040$) y del grupo FIR (3,01% frente a 18,01%; $p=0,004$) (tabla suplementaria 3, figura 21B).

Debido a que el genotipo KIR AA y el motivo Cen AA se asociaron con un mayor riesgo del grupo FIR y del grupo AR. Se estudió el impacto del HLA-C parental comparando las frecuencias de las diferentes combinaciones de HLA-C de las mujeres y sus parejas en estos tres subgrupos (tabla suplementaria 3, figura 21B).

La frecuencia de la combinación Cen AA/HLA-C1C1 y de parejas HLA-C1C1 fue significativamente mayor en el grupo C en comparación con el FRR (Tabla 6, figura 21A).

La frecuencia de la combinación Cen AA/HLA-C1C1 y de parejas HLA-C1C1 fue significativamente mayor en el grupo GCS en comparación con el grupo FIR y el grupo AR (9,01% frente a 33,3%; $p=0,048$ y 6,85% frente a 33,3%; $p=0,009$, respectivamente) (tabla suplementaria 3, figura 21B).

Las mujeres con la combinación Cen AA/HLA-C1C1 y parejas HLA-C1C1 tenían una asociación casi 5 veces mayor con un resultado reproductivo satisfactorio (OR: 0,220, IC: 0,050 a 0,961) y (OR: 0,202, (IC: 0,046 a 0,871), respectivamente) (tabla 6, tabla suplementaria 3).

De nuevo, resultó clínicamente relevante discriminar la clasificación en región centromérica para la clasificación más precisa de las pacientes, a pesar de la estratificación de la cohorte que puede afectar a la significación estadística.

Tabla 6. Matriz de la frecuencia del haplotipo KIR centromérico con los haplotipos HLA-C de las pacientes y sus parejas en los diferentes grupos de estudio.

Haplotipo KIR	Combinación HLA / Grupos	GCS	FRR			
		N (%)	N (%)	P	Odds Ratio	IC 95%
Cen AA	C1C1/C1C1	5 (17,24)	11 (3,55)	<0,001	0,176	0,056-0,549
	C1C1/C1C2	4 (13,79)	25 (8,06)	NS	0,548	0,176-1,700
	C1C1/C2C2	1 (3,45)	8 (2,58)	NS	0,741	0,089-6,146
	C1C2/C1C1	2 (6,90)	28 (9,03)	NS	1,340	0,302-5,935
	C1C2/C1C2	1 (3,45)	40 (12,90)	NS	4,148	0,549-31,337
	C1C2/C2C2	0 (0,00)	16 (5,16)	NS	-	-
	C2C2/C1C1	2 (6,89)	9 (2,90)	NS	0,837	0,102-6,850
	C2C2/C1C2	1 (3,45)	12 (3,87)	NS	0,543	0,115-2,556
	C2C2/C2C2	0 (0,00)	1 (0,32)	NS	-	-
		N (%)	N (%)	P	Odds Ratio	IC 95%
Cen AB	C1C1/C1C1	2 (6,89)	15 (4,84)	NS	0,686	0,149-3,161
	C1C1/C1C2	0 (0,00)	20 (6,45)	NS	-	-
	C1C1/C2C2	0 (0,00)	15 (4,84)	NS	-	-
	C1C2/C1C1	4 (13,79)	10 (3,23)	0,004	0,208	0,061-0,712
	C1C2/C1C2	1 (3,45)	31 (10,00)	NS	3,111	0,409-23,662
	C1C2/C2C2	0 (0,00)	14 (4,52)	NS	-	-
	C2C2/C1C1	1 (3,45)	9 (2,90)	NS	0,837	0,102-6,851
	C2C2/C1C2	0 (0,00)	14 (4,52)	NS	-	-
	C2C2/C2C2	0 (0,00)	4 (1,29)	NS	-	-
		N (%)	N (%)	P	Odds Ratio	IC 95%
Cen BB	C1C1/C1C1	1 (3,45)	2 (0,65)	NS	0,181	0,016-2,068
	C1C1/C1C2	1 (3,45)	8 (2,58)	NS	0,741	0,089-6,146
	C1C1/C2C2	0 (0,00)	1 (0,32)	NS	-	-
	C1C2/C1C1	1 (3,45)	5 (1,61)	NS	0,459	0,051-4,067
	C1C2/C1C2	1 (3,45)	6 (1,94)	NS	0,552	0,064-4,754
	C1C2/C2C2	0 (0,00)	1 (0,32)	NS	-	-
	C2C2/C1C1	0 (0,00)	2 (0,65)	NS	-	-
	C2C2/C1C2	0 (0,00)	3 (0,97)	NS	-	-
	C2C2/C2C2	1 (3,45)	0 (0,00)	NS	-	-

FRR: fallo reproductivo recurrente; GCS: grupo control sano; IC: intervalo de confianza; Cen AA: haplotipo centromérico A; Cen AB: haplotipo centromérico AB; Cen BB: haplotipo centromérico B; C1C1: haplotipo HLA-C homocigoto C1; C1C2: haplotipo HLA-C heterocigoto; C2C2: haplotipo HLA-C homocigoto C2.

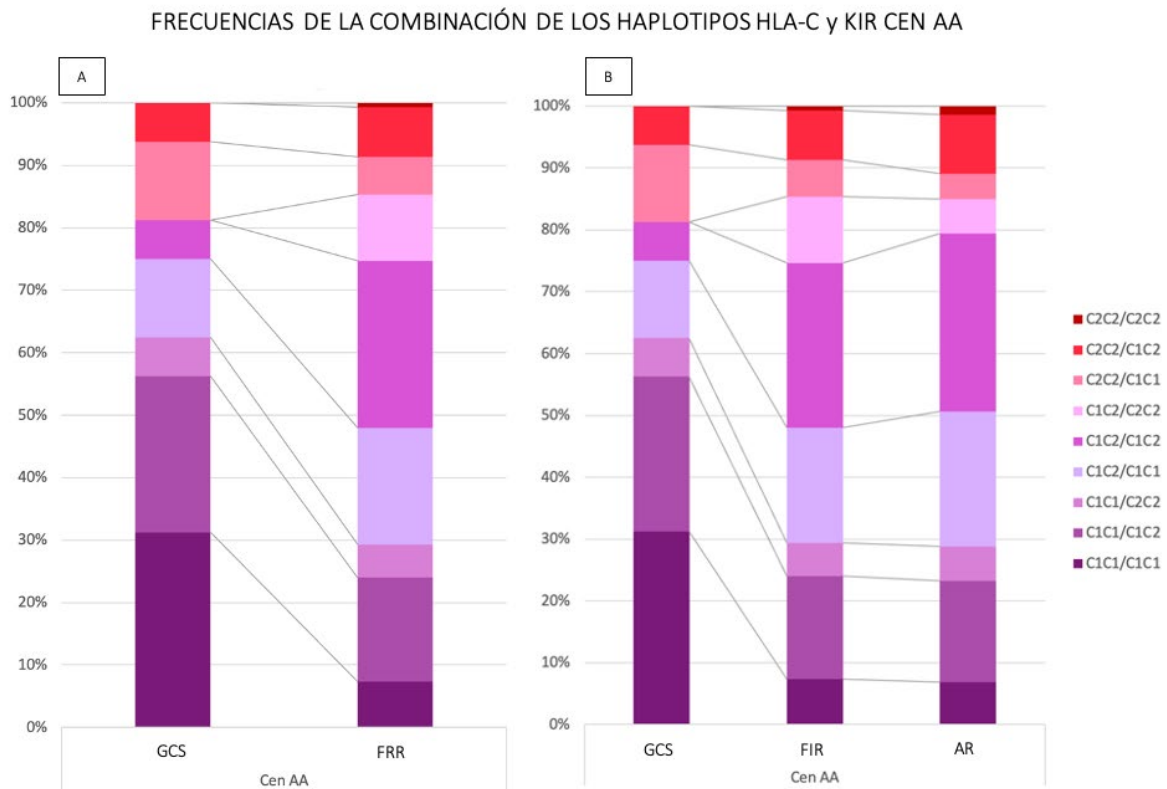


Figura 21. Frecuencias de la combinación de los haplotipos HLA-C y KIR Cen AA en la población de estudio.

(A) Frecuencia de los haplotipos de HLA-C de las pacientes y sus parejas con fallo reproductivo recurrente (FRR) y el grupo control sano (GCS), en combinación con el haplotipo KIR Cen AA (B) Frecuencia de los haplotipos HLA-C de las pacientes y sus parejas con fallo de implantación recurrente (FIR) y abortos de repetición (AR) en comparación con el grupo control sano (GCS) todos los haplotipos que se estudian son los que la mujer tiene haplotipo KIR Cen AA. Abreviaturas: Cen AA: haplotipo centromérico A; C1C1: haplotipo HLA-C homocigoto C1; C1C2: haplotipo HLA-C heterocigoto; C2C2: haplotipo HLA-C homocigoto C2.

Bloque II (A). Estudio de los genes KIR, HLA-C y dimorfismo HLA-B en posición -21

1. Características epidemiológicas y obstétricas de los diferentes grupos de estudio

Se analizaron de manera sistemática a 77 pacientes con FRR que fueron referidos a la Unidad de Inmunología Reproductiva en el Hospital Clínico San Carlos entre 2021 y 2024, junto con 75 pacientes incluidos en el grupo de control sano. Sus características obstétricas no revelaron diferencias entre el grupo de pacientes con positividad en anticuerpos antifosfolípidos y las que tenían negatividad en ellos, por lo que no se consideró este factor en el análisis de los resultados obtenidos.

En cuanto al grupo control sano existen diferencias en cuanto a las condiciones obstétricas suficientes como para poder realizar un estudio comparativo con nuestro grupo de interés.

Tabla 7. Características clínicas y demográficas de los grupos de estudio. Los valores se expresan como porcentaje.

Variable	TOTAL	SAFO positivos	SAFO negativo	P-Valor
Pacientes FRR	n=77	n = 14 (17.3%)	n = 63 (82.66%)	
Edad (años), media (SD)	40,7 (3,4)	40,3 (3,0)	40,8 (3,5)	NS
IMC (kg/m2), media (SD)	23,3 (3,8)	24,5 (3,9)	23,1 (3,8)	NS
Tabaco n (%)	7 (9,09%)	0 (0,0%)	7 (11,11%)	NS
FIV previos, n (%)	45 (58,44%)	6 (42,85%)	39 (61,9%)	NS
Abortos previos n (%)	30 (38,96%)	6 (42,85%)	24 (38,09%)	NS
Nº. de abortos previos, media	3,0 (1,7;4,3)	3,3 (2,0;4,6)	2,0 (0,7;3,3)	NS
Hijos previos, n (%)	10 (13,3%)	0 (0,0%)	12 (19,35%)	NS
NKs > 13, n (%)	32 (41,0%)	8 (53,3%)	24 (38,1%)	NS

FRR: fallo reproductivo recurrente; FIV: fecundación in vitro. NS: no significativo; SAFO: síndrome antifosfolípido obstétrico; IMC: índice de masa corporal; NK: células natural killer; NS: no significativo.

2. Frecuencia de los genes KIR en las pacientes con FRR y un GCS

El primer objetivo de este estudio fue comparar y validar las diferencias entre los haplotipos clásicos realizados clásica de KIR y la estratificación de haplotipos KIR en región centromérica y región telomérica, a modo de validación de los datos anteriormente publicados. Como se observó previamente [160], existe una pérdida de información al considerar los haplotipos clásicos, que afecta entre el 10-15% de los pacientes con haplotipos KIR Cen AA, tanto en pacientes como en el GCS (tabla 8, tabla suplementaria 4).

El análisis de los resultados también reveló una sobreestimación en la prevalencia de pacientes con KIR AB; la división de los haplotipos según su región muestra casi una reducción a la mitad en el número de pacientes con haplotipos Cen AB. Por lo tanto, se confirmaron los hallazgos de nuestro trabajo previo y enfatizamos la importancia de la estratificación independiente de las regiones centroméricas y teloméricas para mejorar la precisión diagnóstica.

Asimismo, buscamos corroborar los resultados de nuestro artículo previamente publicado [160] con una cohorte independiente de 75 pacientes con AR y FIR, estudiados en el grupo FRR y seguidos en el Hospital Universitario Clínico San Carlos.

Al igual que en el artículo anterior, se observó un incremento significativo del haplotipo KIR Cen AA en pacientes con FRR, un 56,41% frente al 34,67% en GCS, con un valor $p=0,01$ (tabla 8, figura 22C). Se analizó el haplotipo Cen BB, que incluye tanto Cen AB como CenBB, se observó una disminución significativa en el grupo FRR en relación con el GCS, con un 45,6% frente a 65,4%, con un valor $p=0,01$ (tabla 8, figura 22C). Los datos también se corroboraron en el grupo AR y FIR obteniendo resultados similares (tabla suplementaria 5).

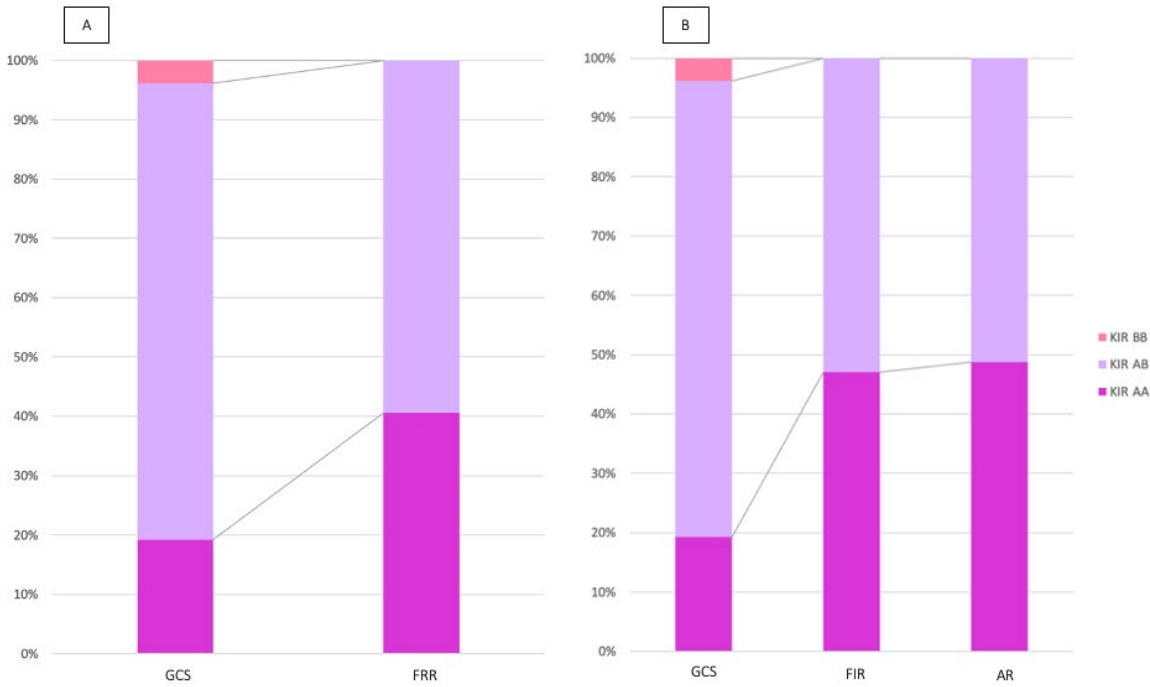
Finalmente, se confirmó nuevamente la pérdida de pacientes con incompatibilidad HLA-C-KIR materno-fetal al utilizar la clasificación clásica de KIR, en comparación con la disociación de las regiones centromérica y telomérica. Nuestros datos indicaron una pérdida del 16% en el diagnóstico en el grupo FRR con el haplotipo centromérico AA, pero clasificados como haplotipo clásico AB, lo que resalta la necesidad de un análisis independiente.

Tabla 8. Frecuencias de haplotipos KIR clásicos y haplotipos estratificados en región centromérica y región telomérica en los diferentes grupos de estudio.

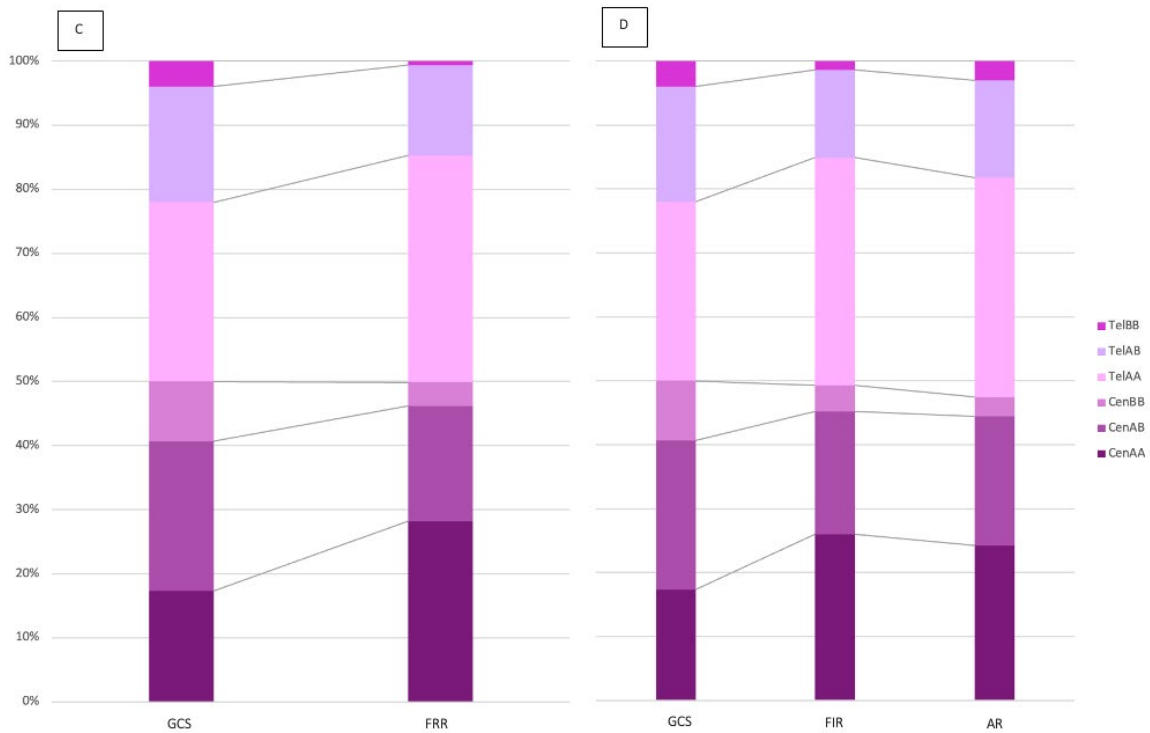
	GCS (N=75)		FRR (N=77)				
	N	%	N	%	Odds Ratio	IC 95%	P-valor
Clasificación clásica							
KIR AA	15	20,00	32	41,02	2,782	1,3495 - 5,7377	0,0056
KIR AB	60	80,00	45	59,98	0,3409	0,1655 – 0,7021	0,0035
KIR BB	3	4,00	0	0,00	0,1319	0,0067 – 2,5986	NS
Clasificación motivo centromérico y motivo telomérico							
CenAA	26	34,67	44	56,41	2,438	1,2694 – 4,6860	0,0075
CenAB	35	46,67	28	35,89	0.64	0,3348 – 1,2234	NS
CenBB	14	18,67	6	7,60	0,3512	0,1271 – 0,9705	0,0436
TelAA	42	56	55	70,51	18,789	0,9644 – 3,6604	NS
TelAB	27	36	22	28,21	0,6984	0,3530 – 1,3818	NS
TelBB	6	8	1	1,28	01494	0,0175 – 1,2717	0,0819

KIR: receptor similar a la inmunoglobulina de las células NK; FRR: fallo reproductivo recurrente; GCS: grupos control sano; IC: intervalo de confianza; NS: no significativo; Cen AA: haplotipo KIR centromérico A; Cen AB: haplotipo KIR centromérico AB; Cen BB: haplotipo KIR centromérico B; Tel AA: haplotipo KIR telomérico A; Tel AB: haplotipo KIR telomérico AB; Ten BB: haplotipo KIR telomérico B.

FRECUENCIAS DE LOS HAPLOTIPOS KIR CLÁSICOS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO



FRECUENCIAS DE LOS HAPLOTIPOS KIR CENTROMÉRICOS Y TELOMÉRICOS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO



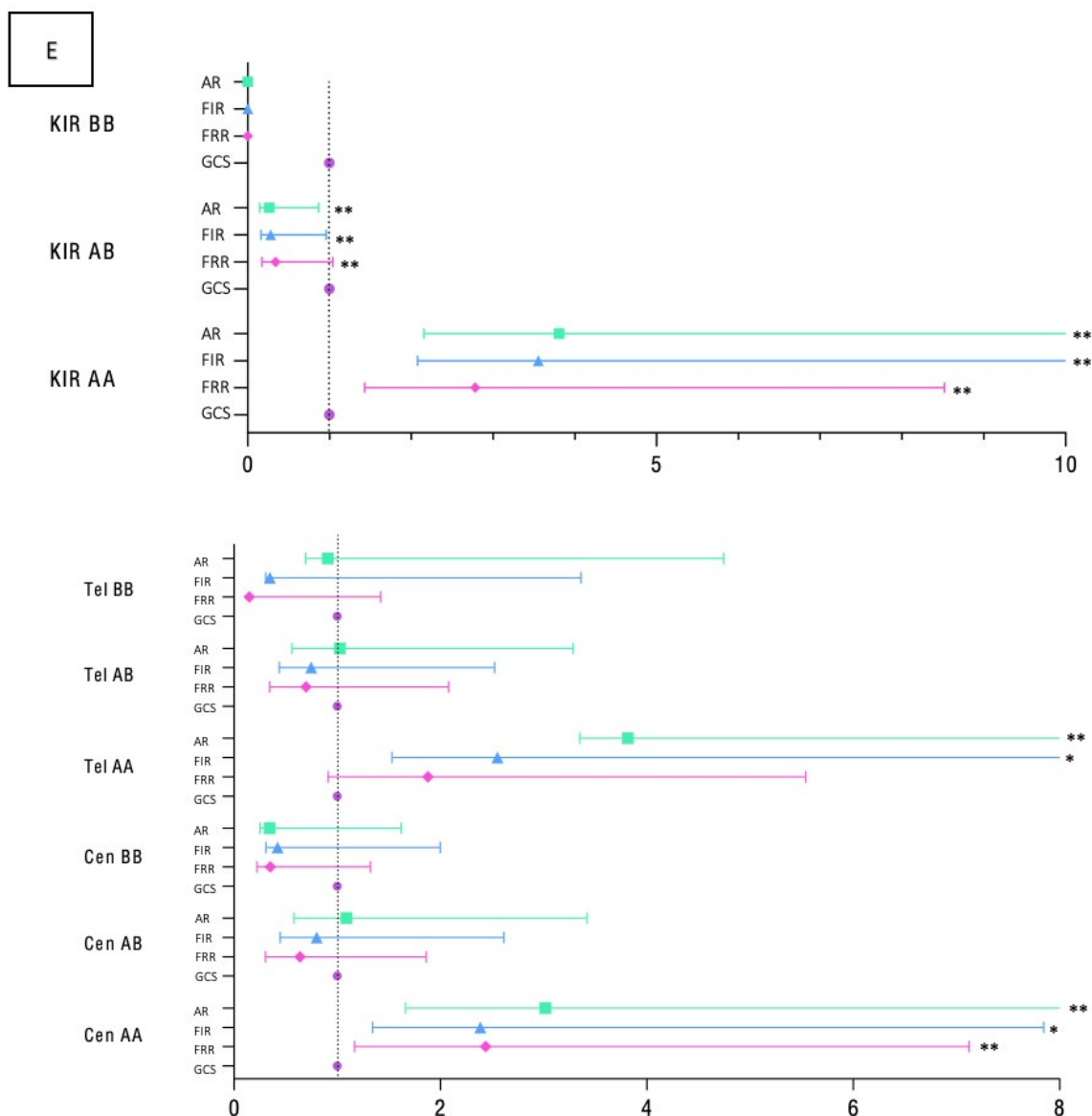


Figura 22. Frecuencias de haplotipos KIR clásicos y haplotipos estratificados en región centromérica y región telomérica en cada uno de los diferentes grupos de estudio.

(A) Frecuencia de los haplotipos clásicos de los genes KIR de las pacientes con fallo reproductivo recurrente (FRR) y el grupo de mujeres control sano (GCS). (B) Frecuencia de los haplotipos clásicos de los genes KIR de las pacientes con fallo de implantación recurrente (FIR) y abortos de repetición (AR) en comparación con el grupo control sano (GCS) (C) Frecuencia de los haplotipos de los motivos centroméricos y teloméricos de los genes KIR de las pacientes con fallo reproductivo recurrente (FRR) y el grupo control sano (GCS). (D) Frecuencia de los haplotipos clásicos de los genes KIR de las pacientes con fallo de implantación recurrente (FIR) y abortos de repetición (AR) en comparación con el grupo control sano (GCS). (E) Representación de los Odds Ratio y los intervalos de confianza 95%, de los grupos FRR, AR y FIR en comparación con la población de referencia. Abreviaturas: Cen AA: haplotipo KIR centromérico A: Cen AB: haplotipo KIR centromérico AB; Cen BB: haplotipo KIR centromérico B; Tel AA: haplotipo KIR telomérico A: Tel AB: haplotipo KIR telomérico AB; Ten BB: haplotipo KIR telomérico B. Los valores de p se derivan de pruebas U de Mann Whitney para comparar dos grupos y Kruskal-Wallis para comparar tres o más grupos. Datos con p-valor significativos mostrados * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

3. Combinación de HLA-C y KIR en pacientes con FRR y un GCS

Considerando los resultados anteriores que confirman la pérdida de información al estudiar únicamente KIR clásicos, se realizó un estudio algorítmico asociando el haplotipo centromérico de KIR con el haplotipo HLA-C obtenido de la mujer, para confirmar su relevancia real en esta patología obstétrica.

Las mujeres con haplotipo KIR Cen AA mostraron un incremento significativo en la homocigosis para la presencia de HLA-C1 en el GCS, con un valor $p=0,0058$ (Tabla 9, figura 23A), en comparación con el grupo FRR. Este hallazgo corroboró las observaciones previas en un artículo anterior.

Se estudió la heterocigosis del haplotipo HLA-C combinado con KIR Cen AA, se observó una prevalencia significativa en las pacientes en comparación con los controles, 47,50% frente a 23,07%, respectivamente, con un valor p de 0,049. Esto sugiere que la prevalencia de HLA-C2 podría implicar un riesgo de pérdida del embarazo (tabla 9, figura 23A).

La presencia de homocigosis para HLA-C2 en combinación con el haplotipo KIR Cen AA no mostró significación estadística en ninguno de los grupos, aunque se observó un incremento en el grupo FRR en comparación con el GCS, 22,50% frente a 11,50%, respectivamente. Sin embargo, el tamaño de la muestra no fue suficiente para confirmar la significación estadística en este caso (tabla 9, figura 23 A).

Tabla 9. Frecuencia de los haplotipos de HLA-C en combinación con KIR centromérico de las pacientes en los diferentes grupos de estudio.

		GCS		FRR				
		N	%	N	%	Odds Ratio	IC 95%	P-Valor
Cen AA	C1C1	17	65,38	12	30	0,2269	0,0791 – 0,6507	0,0058
	C1C2	6	23,07	19	47,5	3,0159	1,0005 – 9,0909	0,0499
	C2C2	3	11,5	3	22,5	2,2258	0,5415 – 9,1499	NS
Cen BB	C1C1	4	30,76	1	16,66	0,4500	0,0389 – 5,2091	NS
	C1C2	6	46,15	4	66,66	2,3333	0,3103 – 17,5453	NS
	C2C2	3	23,07	1	16,66	0,6667	0,0545 – 8,1617	NS

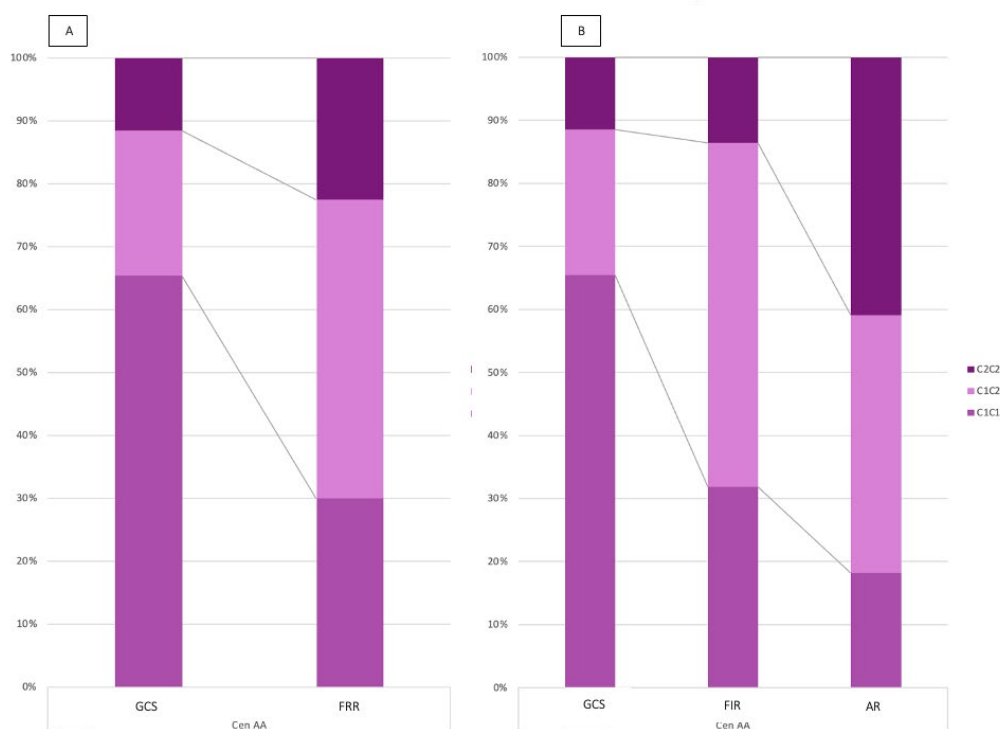
GCS: grupo control sano; FRR: fallo reproductivo recurrente. IC: intervalo de confianza; NS: no significativo; Cen AA: haplotipo KIR centromérico A; Cen BB: haplotipo KIR centromérico B; C1C1: haplotipo HLA-C homocigoto C1; C1C2: haplotipo HLA-C heterocigoto; C2C2: haplotipo HLA-C homocigoto C2.

Se analizó el motivo centromérico BB, no se observaron asociaciones significativas con ninguno de los tres haplotipos C. Sin embargo, se evidenció una tendencia similar a la observada en el motivo centromérico, aunque de manera no concluyente debido al tamaño limitado de la muestra. La prevalencia de HLA-C1C1 en el GCS en combinación con CenBB podría indicar un posible mecanismo protector contra la pérdida recurrente del embarazo, aunque se requiere una investigación adicional con un tamaño de muestra mayor para obtener resultados concluyentes.

Los resultados del grupo FRR (Figura 23A), se muestran las frecuencias de los haplotipos HLA-C en combinación con KIR Cen AA del grupo cuando se estratifica FIR y AR (figura 23B). Se observó como el patrón de frecuencia es similar a la gráfica anterior, la combinación de KIR Cen AA con la homocigosis en HLA-C1 está disminuida en ambos grupos cuando se compara con el grupo control sano de forma significativa ($p=0,0008$ y $p=0,0011$, respectivamente) (tabla suplementaria 6, figura 23B).

La homocigosis en HLA-C2, mostró significación estadística en el grupo AR 37,5% frente a un 11,5% en el grupo control sano con $p=0,0404$ tabla suplementaria 6.

Si observamos las dos gráficas inferiores, se muestran los datos de HLA-C en combinación con KIR cen BB en el grupo FRR (tabla 9, figura 23C), y los resultados de la estratificación en FIR y AR como en el caso anterior (tabla suplementaria 6, figura 23D), no se pueden observar datos significativos debido a la falta de tamaño muestral.



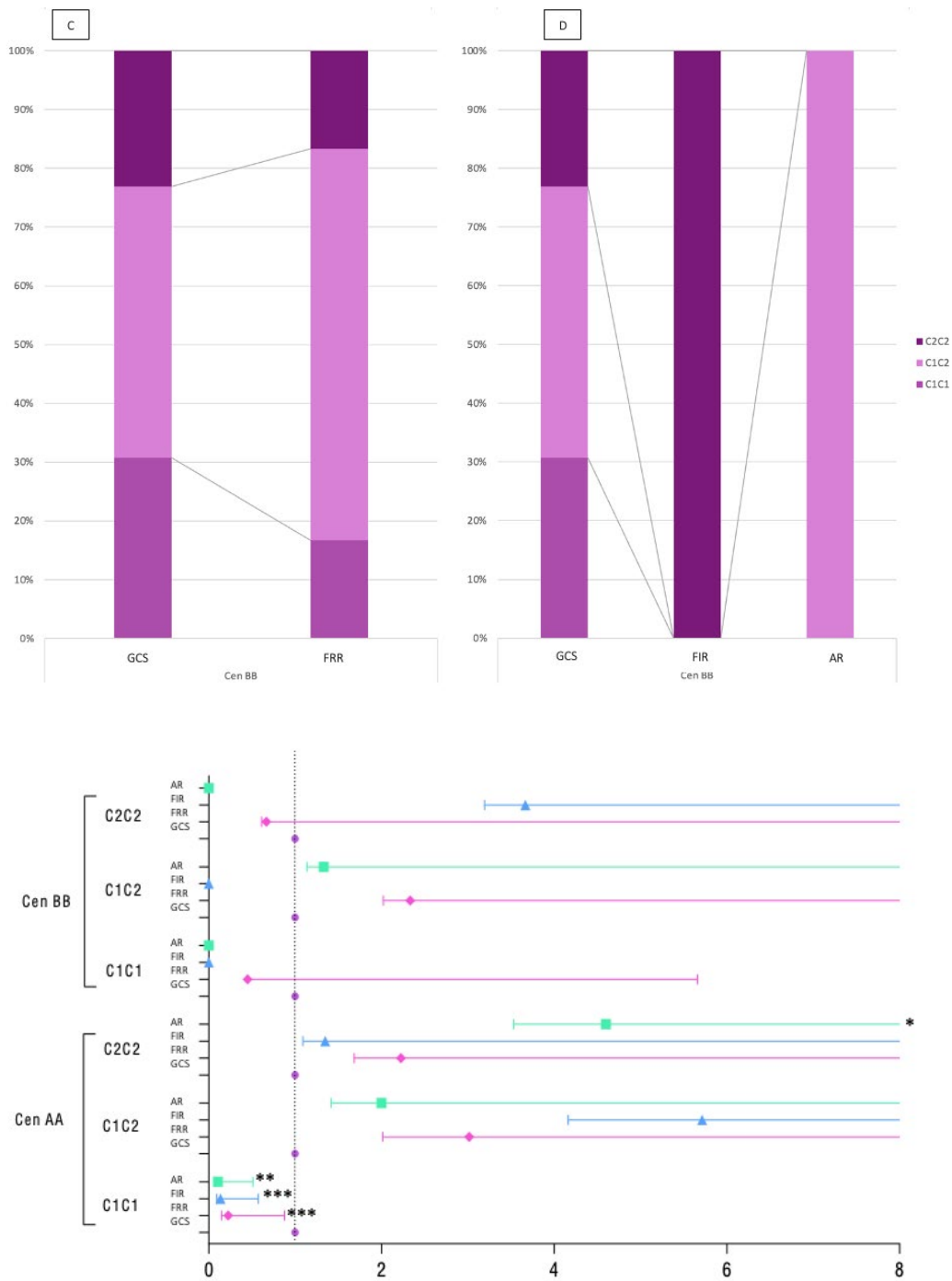


Figura 23. Frecuencias de la combinación de los haplotipos HLA-C y KIR centromerico en la población de estudio.

(A) Frecuencia de los distintos haplotipos de HLA-C de las pacientes con fallo reproductivo recurrente (FRR) en combinación con KIR Cen AA, y el grupo control sano (B) Frecuencia de los distintos haplotipos de HLA-C de las pacientes con fallo de implantación recurrente (FIR) y abortos de repetición (AR) en combinación con KIR Cen AA y el grupo control sano. (C) Frecuencia de los distintos haplotipos de HLA-C de las pacientes con fallo reproductivo recurrente (FRR) en combinación con KIR cen BB, y el grupo control sano (D) Frecuencia de los distintos haplotipos de HLA-C de las pacientes con fallo de implantación recurrente (FIR) y abortos de repetición (AR) en combinación con KIR cen BB y el grupo control sano (GCS). (E) Representación de los Odds Ratio y los intervalos de confianza 95%, de los grupos FRR, AR y FIR en comparación con la población de referencia. Abreviaturas: Cen AA: haplotipo KIR centromérico A; Cen BB: haplotipo KIR centromérico B; C1C1: haplotipo HLA-C homocigoto C1; C1C2: haplotipo HLA-C heterocigoto; C2C2: haplotipo HLA-C homocigoto C2. Los valores de p se derivan de pruebas U de Mann Whitney para comparar dos grupos y Kruskal-Wallis para comparar tres o más grupos. Datos con p-valor significativos mostrados * P<0,05 **P<0,01; ***P<0,001.

4. Hipótesis del ligando ausente de KIR inhibitorios en pacientes con FRR y un GCS

Como se mencionó anteriormente, en otros escenarios como el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT), la ausencia de ligandos específicos para ciertos receptores KIR de las células NK desempeña un papel clave en el rechazo del trasplante.

La hipótesis del ligando ausente de KIR inhibitorios en el contexto del embarazo sugiere que la falta de ligandos específicos para los KIR inhibitorios puede tener un efecto positivo en la educación y funcionalidad de las células NK durante la gestación. Esta teoría se basa en la idea de que, en ausencia de ligandos inhibitorios, las células NK pueden volverse más activas y efectivas en su función para favorecer la implantación del embrión, la placentación y el desarrollo del embarazo.

Las células NK requieren una “educación” adecuada a través de la interacción con sus ligandos para desarrollar una funcionalidad óptima. La presencia de ligandos inhibitorios puede suprimir la actividad de las NK, lo que podría ser contraproducente durante el embarazo. La hipótesis plantea que una mayor proporción de mujeres con haplotipos KIR que carecen de ligandos específicos puede estar asociada con un mayor éxito en la gestación, al permitir que las células NK actúen de manera más activa en la remodelación de los tejidos y en la defensa contra infecciones.

Por lo tanto, como un aspecto novedoso de este estudio, se propuso determinar si la ausencia de ligandos específicos para los KIR inhibitorios podría ser relevante para el resultado del embarazo. Para ello, se centró el estudio en el gen *KIR2DL1*, por ser el receptor inhibitorio más potente y parece estar implicado en el grupo FRR.

Nuestros resultados mostraron que la ausencia completa de HLA-C2, combinada con la presencia de *KIR2DL1*, fue significativamente más prevalente en la población de control en comparación con el grupo FRR, alcanzando un 45,95% frente a un 26,9%, respectivamente, con un valor p de 0,0187. Estos hallazgos son relevantes, y la presencia del ligando específico es más común en el grupo FRR, lo que sugiere que podría ser perjudicial para el desarrollo adecuado del embarazo (Tabla 10, figura 24A, figura 28).

Cuando el grupo se estratifica en FIR y AR, se observa que en el grupo FIR no existen diferencias significativas entre la ausencia de HLA-C2 en presencia *KIR2DL1* en comparación con el grupo control sano. Sin embargo, en el grupo AR la significación es mayor en FRR con un p-valor=0,0146 (tabla suplementaria 7, figura 24B, figura 28).

Adicionalmente, se investigaron los genes *KIR2DL2* y *KIR2DL3*, que tienen un ligando específico, HLA-C1, lo que conduce a una inhibición parcial, con una función aún no definida. En estos resultados se observó

una ausencia significativamente mayor de estos ligandos específicos en el grupo FRR en comparación con el GCS, con un 28,2% frente a un 12%, respectivamente, y un valor p de 0,015 (tabla 10, figura 24A, figura 28). La presencia del ligando específico en este caso podría ejercer un efecto protector, a diferencia del escenario anterior.

Cuando se analizan los resultados de FIR, no se observan diferencias significativas, aunque sí una mayor frecuencia de ausencia de ligando HLA-C1 para *KIR2DL2/3* 23,53% frente a 12% del GCS, esta tendencia concuerda con los datos de FRR, si analizamos el grupo AR se observan resultados significativos en comparación con el grupo control sano con p-valor=0,0058, con una significación mayor en el grupo en conjunto (tabla suplementaria 7, figura 24B, figura 28).

Tabla 10. Frecuencia de la ausencia de los haplotipos de HLA-C2, HLA-C1 y HLA-Bw4 específicos para los genes *KIR2DL1*, *KIR2DL2/3* y *KIR3DL1* respectivamente de las pacientes en los diferentes grupos de estudio.

		<i>KIR2DL1</i> (ausencia de HLA-C2)	<i>KIR2DL2/KIR2DL3</i> (ausencia de HLA-C1)	<i>KIR3DL1</i> (ausencia de HLA-Bw4)
GCS	N	34	9	10
	%	45,94	12	23,8
FRR	N	21	22	28
	%	26,9	28,2	35,9
	Odds Ratio	0,4443	2,881	1,792
	IC 95%	0,2260 – 0,8735	1,2272 – 6,7633	0,7679 – 4,1821
	P-Valor	0,0187	0,0151	NS

IC: intervalo de confianza; FRR: fallo reproductivo recurrente GCS: grupo control sano; NS: no significativo

Finalmente, se analizó el gen *KIR3DL1*, un receptor inhibitorio ubicado en el motivo telomérico, cuya función es aún desconocida, pero que se sabe que se une a HLA-Bw4. Nuestros resultados mostraron ausencia de este ligando en el GCS en comparación con el grupo FRR en frecuencias similares, sin hallazgos significativos a destacar, aunque se observó un incremento de su ausencia entre las pacientes (tabla 10, figura 24 A, figura 28).

Si se observan los datos de los grupos estratificados, en FIR existe mayor frecuencia de la ausencia de ligando de forma significativa con un p-valor=0,0104, sugiriendo que la ausencia de este ligando específico para *KIR3DL1* podría estar desfavoreciendo la correcta educación de las células NK. Se analizó el grupo AR, la significación es aún mayor en el grupo anterior con un p-valor=0,0023 reforzando aún más la hipótesis anterior (tabla suplementaria 7, figura 24B, figura 28).

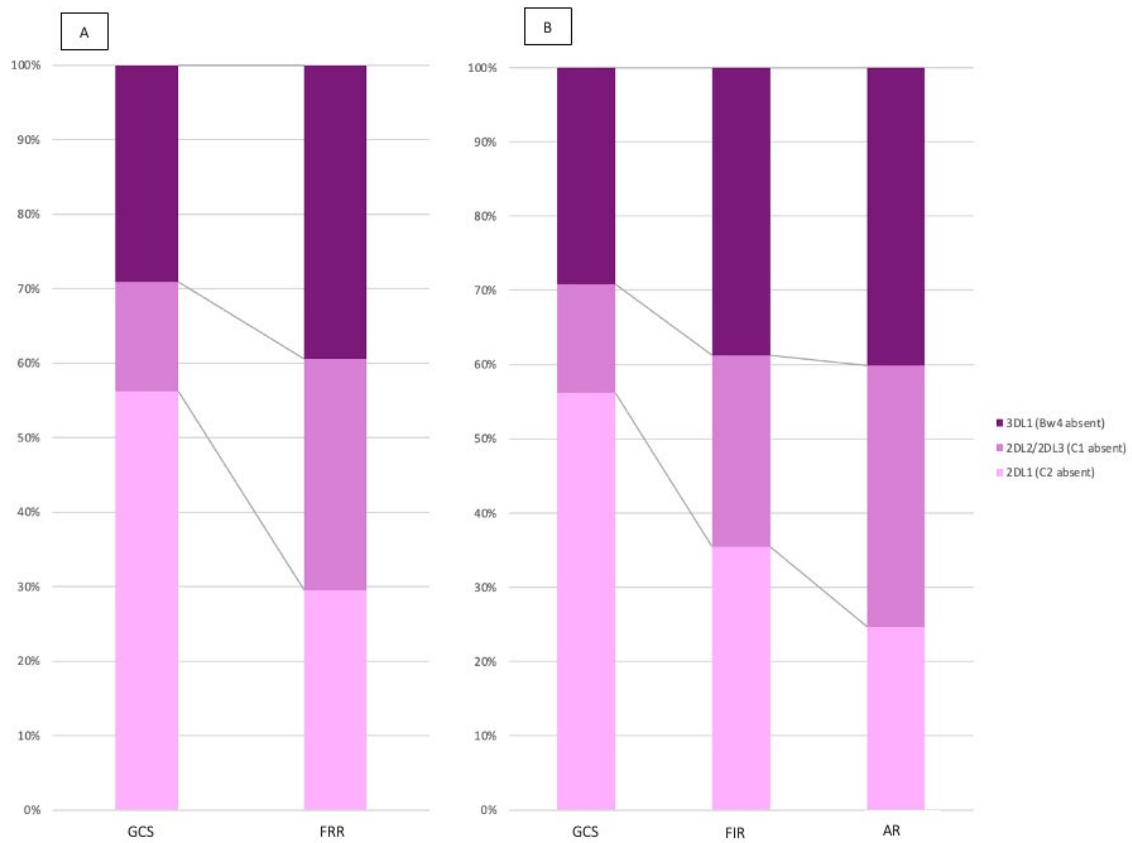


Figura 24. Frecuencia de la ausencia de los haplotipos de HLA-C2, HLA-C1 y HLA-Bw4 específicos para los genes *KIR2DL1*, *KIR2DL2/3* y *KIR3DL1* en los diferentes grupos de estudio.

(A) Frecuencia de la ausencia de los haplotipos de HLA-C2, C1 y Bw4 específicos para la presencia los genes *KIR2DL1*, *KIR2DL2/3* y *KIR3DL1* respectivamente de las pacientes con fallo reproductivo recurrente (FRR), y el grupo control sano (B) Frecuencia de la ausencia de los haplotipos de HLA-C2, C1 y Bw4 específicos para los genes *KIR2DL1*, *KIR2DL2/3* y *KIR3DL1* respectivamente de las pacientes con fallo recurrente de implantación (FIR) y abortos de repetición (AR) y el grupo control sano (GCS).

5. Análisis del dimorfismo HLA-B -21 en pacientes con FRR y un GCS

El análisis del dimorfismo HLA-B -21 es crucial para entender la variabilidad genética y su impacto en la respuesta inmunológica, especialmente en contextos clínicos como el fallo reproductivo.

Tras llevar a cabo un análisis confirmatorio de los genes KIR y HLA-C, se procedió a evaluar el NKG2A en las células NK. Para ello, se tomó como referencia el trabajo del grupo de Colucci y otros autores [138] que investigaron el dimorfismo HLA-B en el contexto de otras patologías. Asimismo, se analizó el dimorfismo en la posición -21 de HLA-B el cual se ha propuesto como un biomarcador candidato en el FRR. Se postuló que el receptor NKG2A podría tener un papel genético en el adecuado funcionamiento de las células NK durante el embarazo. Se observó que la homocigosis para el alelo TT estaba significativamente incrementada en el grupo FRR en comparación con el grupo de controles sanos, suponiendo un 61% frente a un 30%, respectivamente, y un p -valor=0,0031. Adicionalmente, se identificó una tendencia al aumento de la homocigosis MM en los controles en comparación con los pacientes, aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística, con un 11,9% frente a un 5,2%, respectivamente. También se constató que un porcentaje significativamente mayor del grupo de controles sanos presentaba al menos un alelo M, evidenciando heterocigosis, en comparación con los pacientes, con un 54,76% frente a un 32,8%, y un valor p =0,0252 (tabla 11, figura 25A, figura 28).

Tabla 11. Frecuencia del dimorfismo B en la posición -21, se representa la homocigosis para T (TT), la homocigosis para M (MM) y la heterocigosis (MT) de los diferentes grupos de estudio.

		TT	MT	MM
GCS	N	13	23	5
	%	30	54,76	11,9
FRR	N	45	25	4
	%	61	32,8	5,2
	Odds Ratio	3,3462	0,4130	0,4169
	IC 95%	1,5022 – 7,4535	0,1904 – 0,8960	0,1056 – 1,6465
	P-Value	0,0031	0,0252	NS

FRR: fallo reproductivo recurrente; GCS: grupos control sano; IC: intervalo de confianza; NS: no significativo; TT: homocigosis de treonina en la posición -21 de HLA-B; MT: heterocigosis de metionina y treonina en la posición -21 de HLA-B; MM: homocigosis de metionina en la posición -21 de HLA-B.

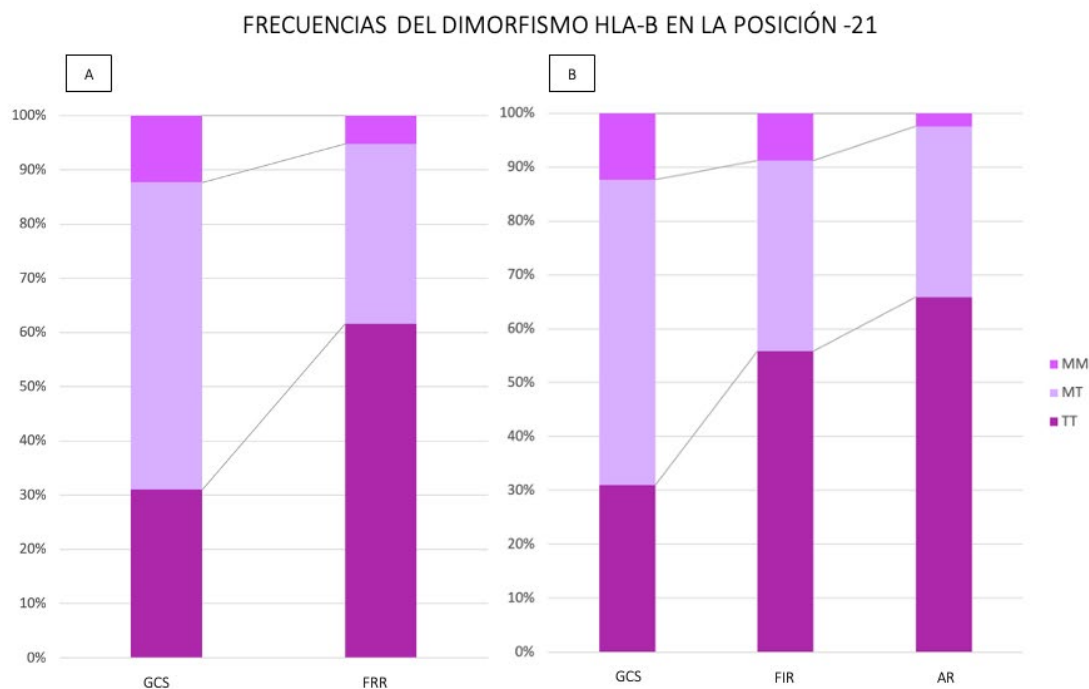


Figura 25. Frecuencia del dimorfismo B en la posición -21 en los diferentes grupos de estudio

(A) Frecuencias del dimorfismo B en la posición -21, se representa la homocigosis para T (TT), la homocigosis para M (MM) y la heterocigosis (MT) de las pacientes con fallo reproductivo recurrente (FRR) y las mujeres del grupo control sano (GCS) (B) Frecuencia del dimorfismo B en la posición -21, se representa la homocigosis para T (TT), la homocigosis para M (MM) y la heterocigosis (MT) de las pacientes con fallo de implantación recurrente (FIR) y abortos de repetición (AR) en combinación y el grupo control sano (GCS). Abreviaturas: TT: homocigosis de treonina en la posición -21 de HLA-B; MT: heterocigosis de metionina y treonina en la posición -21 de HLA-B; MM: homocigosis de metionina en la posición -21 de HLA-B.

Como se observa en la gráfica 25B, los grupos FIR y AR siguieron un patrón parecido a FRR, tanto en FIR como en AR la homocigosis para TT es significativamente mayor 55,88% y 65,85% respectivamente frente al 30% en el grupo control sano, con un p-valor= 0,0372 y 0,0025 respectivamente. Se analizó la heterocigosidad MT, se encontró una disminución de la frecuencia genética tanto en el grupo FIR como en el grupo AR, 35,29% y 31,7% respectivamente, frente a un 54,76% del grupo control sano, siendo significativa la estadística para este hallazgo en el grupo AR, p-valor=0,0278. En cuanto a la homocigosidad para MM no se observan diferencias significativas en ninguno de los dos grupos debido al tamaño muestral reducido, aunque la tendencia que se observa es un aumento en el grupo control sano (tabla suplementaria 8, figura 25B, figura 28).

6. Matriz que combina el dimorfismo -21 HLA-B con haplotipos KIR en pacientes con FRR y un GCS

El siguiente objetivo fue investigar una posible correlación entre pacientes con genotipo KIR AA y el dimorfismo -21 HLA-B potencialmente perjudicial. Para lograr esto, se estudió colectivamente la combinación de los KIR de interés con el correspondiente dimorfismo -21 HLA-B de los propios pacientes. En primer lugar, se analizó el haplotipo KIR CenAA en pacientes y controles, junto con el dimorfismo TT o MM, obteniendo los siguientes resultados: al analizar el haplotipo Cen AA con TT, se observó una prevalencia significativamente mayor en el 42,67% de los pacientes con AR en comparación con el 4,76% en el grupo de control, con un valor $p=0,0005$. Sin embargo, al examinar el haplotipo KIR Cen AA con el dimorfismo MM, observamos una inversión del hallazgo anterior; aunque no fue estadísticamente significativo, había una cierta tendencia, 9,52% en el GCS en comparación con el 1,33% en el grupo de FRR (tabla 12, figura 26A).

Por otro lado, se estudió el haplotipo KIR Cen BB, primero con el dimorfismo TT, donde se observó un aumento significativo en el grupo de control en comparación con el grupo de FRR, siendo del 18,6% y 2,66% respectivamente, con un valor p de 0,0045. En segundo lugar, se analizó la combinación con el dimorfismo MM, y nuevamente se observó una mayor presencia en el GCS, aunque este hallazgo no fue estadísticamente significativo, con un 7,14% en el GCS en comparación con un 0% en el grupo de FRR. Estos son resultados preliminares, pero existe cierta tendencia, ya que el dimorfismo MM es más prevalente en el grupo GCS (tabla 12).

Adicionalmente, para obtener más información, se realizó un análisis de los pacientes basado en el haplotipo telomérico, acoplado con el dimorfismo -21 HLA-B. Se encontró una tendencia similar a la observada en la región telomérica, con un aumento en la presencia de homocigosis T cuando el paciente presenta TelAA, lo que es significativo en comparación con el grupo de control, alcanzando un 45,33% frente a un 16,67% con un valor p de 0,0027 (tabla 12, figura 26C). En las combinaciones restantes no se encontraron resultados significativos debido a datos insuficientes. El tamaño de muestra en la zona TelBB es inadecuado para extraer conclusiones definitivas, ya que la prevalencia de este haplotipo en la población es extremadamente baja, casi negligible (tabla 12).

Tabla 12. Matriz de la frecuencia de los haplotipos KIR centroméricos y teloméricos combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 de los diferentes grupos de estudio.

		GCS		FRR				
		N	%	N	%	Odds Ratio	IC 95%	P-Valor
Cen AA	TT	2	4,76	32	42,67	14,4186	3,2387 – 64,1916	0,0005
	MT	5	11,9	8	10,66	0,8836	0,2695 – 2,8966	NS
	MM	4	9,52	1	1,33	0,1284	0,0139 – 1,1891	0,0707
Cen BB	TT	9	18,6	2	2,66	0,1005	0,0206 – 0,4908	0,0045
	MT	13	30,95	3	4	0,0929	0,0246 – 0,3505	0,0005
	MM	3	7,14	0	0	0,0747	0,0038 – 1,4835	NS
Tel AA	TT	7	16,67	34	45,33	41,463	1,6357 – 10,5109	0,0027
	MT	9	21,42	17	22,67	10,747	0,4309 – 2,6807	NS
	MM	3	7,14	3	4	0,5417	0,1043 – 2,8123	NS
Tel BB	TT	1	2,38	1	1,33	0,5541	0,0338 – 9,0930	NS
	MT	0	0	0	0	-	-	-
	MM	0	0	0	0	-	-	-

FRR: fallo reproductivo recurrente; GCS: grupo control sano; IC: intervalo de confianza; NS: no significativo; Cen AA: haplotipo KIR centromérico A; Cen BB: haplotipo KIR centromérico B; Tel AA: haplotipo KIR telomérico A; Tel BB: haplotipo KIR telomérico B; TT: homocigosis de treonina en la posición -21 de HLA-B; MT: heterocigosis de metionina y treonina en la posición -21 de HLA-B; MM: homocigosis de metionina en la posición -21 de HLA-B.

Teniendo en cuenta la estratificación por grupos, se observó un patrón similar al del grupo FRR, en cuanto a la homocigosis en TT, los datos son significativos también en el grupo FIR como en el grupo AR, aunque en este último grupo la significación es mayor. Los datos revelaron que existe una homocigosis para TT en conjunto con el haplotipo KIR CenAA con una frecuencia de 44,12% y 48,78% respectivamente en comparación con el 4,76% que se encuentra en el GCS con unos p-valores = 0,0007 y 0,0002 respectivamente (tabla suplementaria 9, figura 26B).

En cuanto a la homocigosis para T en combinación con el Tel AA el patrón es similar al anterior siendo esta combinación más frecuente en el grupo FIR y AR suponiendo un 38,23% y un 51,21% respectivamente en comparación con un 16,67% en el grupo control sano con p-valores = 0,0433 y 0,0012 respectivamente. Estos resultados revelaron que tanto en el haplotipo CenAA como el haplotipo TelAA, el dimorfismo que prevalece en las pacientes con FIR y AR es la homocigosis para T, tal y como se esperaba según la hipótesis (tabla suplementaria 10, figura 26D).

En cuanto a la homocigosis en M con combinación con CenAA, los datos, al igual que en el grupo FRR no fueron significativos ni en FIR ni en AR por la falta de tamaño muestral, pero sí que existe una pequeña tendencia disminuida en ambos grupos (tabla suplementaria, figura 26B).

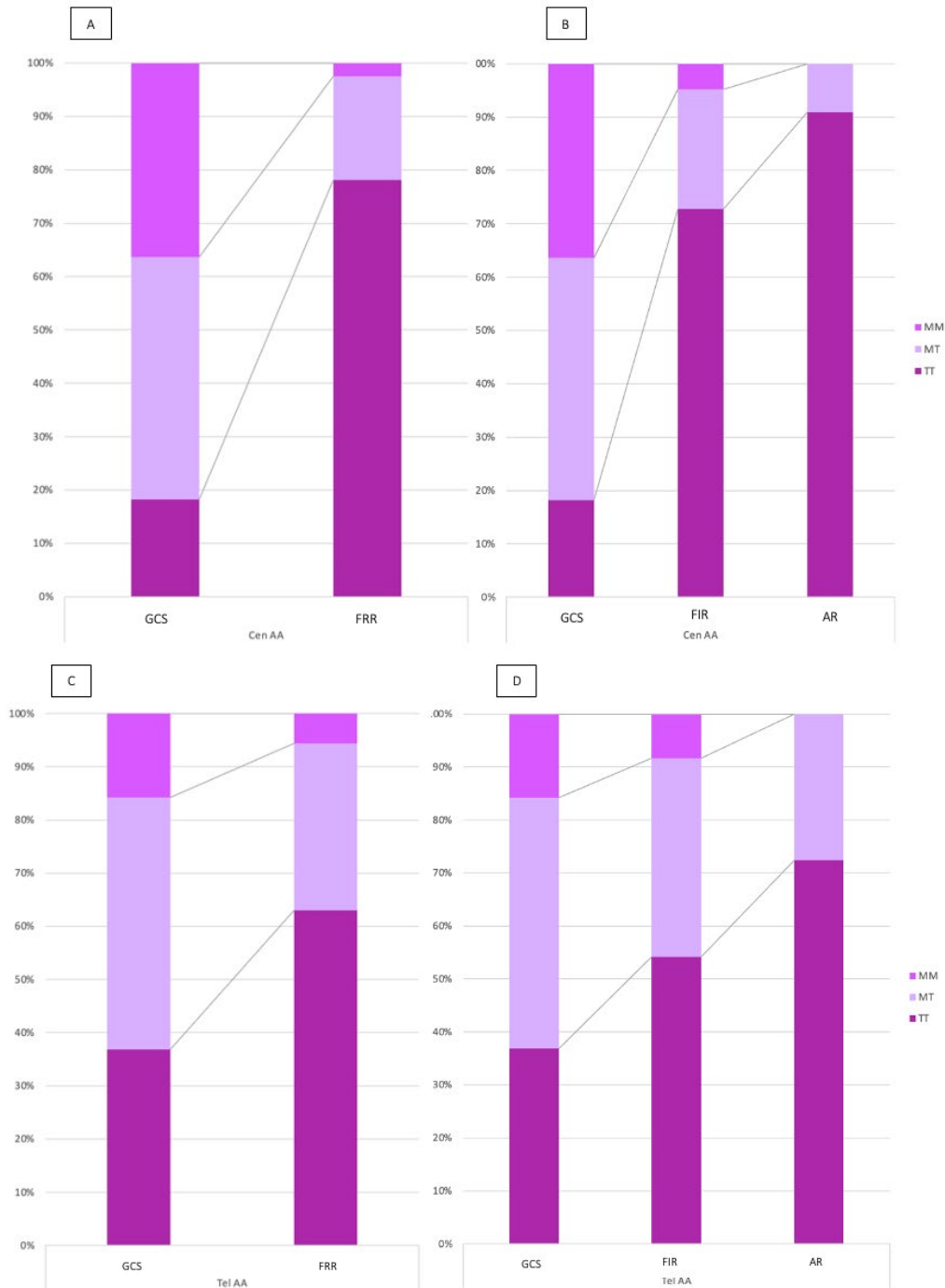
FRECUENCIAS DEL DIMORFISMO HLA-B EN LA POSICIÓN -21 Y LOS HAPLOTIPOS KIR Cen AA y Tel AA

Figura 26. Frecuencias del dimorfismo HLA-B en la posición -21 y los haplotipos KIR Cen AA y Tel AA en los diferentes grupos de estudio.

(A) Frecuencia del haplotipo KIR centromérico AA combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 en las pacientes con fallo reproductivo recurrente (FRR) (B) Frecuencia del haplotipo KIR centromérico AA combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 en las pacientes con fallo de implantación recurrente (FIR) y abortos de repetición (AR) en combinación con KIR cen AA y el grupo control sano. (C) Frecuencia del haplotipo KIR telomérico AA combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 en las pacientes con fallo reproductivo recurrente (FRR) y el grupo control sano (GCS). (D) Frecuencia del haplotipo KIR telomérico AA combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 en las pacientes con fallo de implantación recurrente (FIR) y abortos de repetición (AR) en combinación con KIR Cen AA y el grupo control sano (GCS). Abreviaturas: TT: homocigosis de treonina en la posición -21 de HLA-B; MT: heterocigosis de metionina y treonina en la posición -21 de HLA-B; MM: homocigosis de metionina en la posición -21 de HLA-B; Cen AA: haplotipo KIR centromérico A; Tel AA: haplotipo KIR telomérico A.

7. Combinación de la hipótesis de falta de ligando para receptores KIR inhibitorios y el dimorfismo de HLA-B en la posición -21 en pacientes con FRR y GCS

Finalmente, nuestro objetivo fue determinar si las dos hipótesis que presentamos podrían estar asociadas en la cohorte de este estudio. Por lo tanto, comparamos la ausencia de ligandos para los receptores KIR que estudiamos previamente con la presencia del dimorfismo -21 de HLA-B. Nuestros resultados indicaron que cuando hay ausencia del ligando para el gen *2DL1*, la presencia del dimorfismo TT se incrementa en el grupo de FRR, alcanzando un 16% en comparación con el 2,5% en el GCS. (tabla 13, figura 27 A, figura 28).

Se analizó la falta de ligando para *KIR2DL1* y el dimorfismo M de HLA-B, se observó que casi la mitad de los casos están presentes en el GCS (42,5%) en comparación con solo el 12% en el grupo de FRR, con un valor p de 0,0004. Esta combinación podría beneficiar sinérgicamente el desarrollo de un embarazo exitoso (tabla 13, figura 27 A, figura 28).

Se analizaron las combinaciones restantes, la ausencia de ligando para *KIR2DL2/3*, un factor de riesgo establecido para FRR, se incrementó en combinación con TT de HLA-B en el grupo de FRR, alcanzando un 17,3% en comparación con el 2,5% en la población de control, con un valor p de 0,04. Esta combinación podría representar un potente biomarcador pronóstico para FRR (tabla 13, figura 27B, figura 28). Curiosamente, la ausencia de ligando combinada con el dimorfismo M no mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos. Por último, se analizó la ausencia de ligando para *KIR3DL1* con TT, no se encontró diferencias significativas; sin embargo, si los combinamos con el dimorfismo M, su presencia es mayor en el grupo de control, con un valor p de 0,03. Esta combinación también podría ser un factor beneficioso para el desarrollo fetal (tabla 13, figura 27C, figura 28).

Tabla 13. Matriz de la frecuencia de la hipótesis de ausencia de ligando para los KIR inhibitorios de interés combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 en los diferentes grupos de estudio.

	GCS		FRR				
	N	%	N	%	Odds Ratio	IC 95%	P-Valor
KIR 2DL1 (ausencia C2) /TT	1	2,5	8	10,38	4,6377	0,5594 – 38,4471	NS
KIR 2DL1 (ausencia C2) /M	17	42,5	3	3,89	0,0572	0,0154 – 0,2123	< 0,0001
KIR 2DL2/3(ausencia C1) /TT	1	2,5	13	17,3	8,31	1,0453 – 66,0849	0,04
KIR 2DL2/3 (ausencia C1) /M	2	4,87	7	9,09	1,9500	0,3861 – 9,8492	NS
KIR 3DL1 (ausencia Bw4) /TT	0	0	12	10,67	15,8397	0,9131 – 274,7588	0,0577
KIR 3DL1 (ausencia Bw4) /M	5	12,5	16	20,77	1,8885	0,6379 – 5,5912	NS

FRR: fallo reproductivo recurrente (FRR); GCS: grupo control sano; C1: haplotipo HLA-C C1; C2: haplotipo HLA-C C2; Bw4: haplotipo HLA-B Bw4; TT: homocigosis de treonina en la posición -21 de HLA-B; M: heterocigosis de metionina y treonina en la posición -21 y homocigosis de metionina en la posición -21 de HLA-B; IC: intervalo de confianza; NS: no significativo

En los grupos FIR y AR, las diferencias son aún más visuales sobre todo en el grupo AR (Figura 27 D, E y F).

En cuanto a los resultados en AR y FIR, fueron similares a los obtenidos con el grupo general FRR, se observa que para *KIR2DL1*, la falta de ligando prevalece en el GCS, sin embargo, cuando existe presencia de homocigosis en TT, prevalece en las pacientes, un 14,7% y un 7,31% respectivamente frente a un 2,5% en GCS (tabla suplementaria 11, figura 27D, figura 28).

En el estudio del dimorfismo MM o MT, se observó como la frecuencia fue significativamente más alta en el GCS presentándose en un 42,5% frente a 5,88% en las pacientes con FIR y 2,43% en las pacientes con AR y obteniendo un p-valor = 0,0023 y 0,0016 respectivamente (tabla suplementaria 11, figura 27D, figura 28).

Se analizó el receptor *KIR2DL2/3* con la falta de su ligando específico C1, que a priori se había determinado que su ausencia podría ser marcador de riesgo para el FRR además cuando se combina con la homocigosis para TT, los datos revelaron una frecuencia significativa muy alta en las pacientes con AR, siendo un 24,4% frente a un 2,5% en las pacientes del GCS. Estos resultados no estaban indicando una distinción clara entre el grupo con FIR y el grupo AR (tabla suplementaria 11, figura 27E, figura 28).

Por último, se analizaron los resultados para el receptor *KIR3DL1* con la falta de su ligando específico Bw4. En los resultados no se encontraron diferencias significativas, para estos grupos de estudio al analizar *KIR3DL1* con la combinación del dimorfismo HLA-B en la posición -21. Aun así, se observa como existe una tendencia para la homocigosis TT tanto en el grupo FIR como para el grupo AR, se necesitaría un tamaño muestral más grande se podrían obtener resultados de este grupo de estudio (tabla suplementaria 11, figura 27F, figura 28).

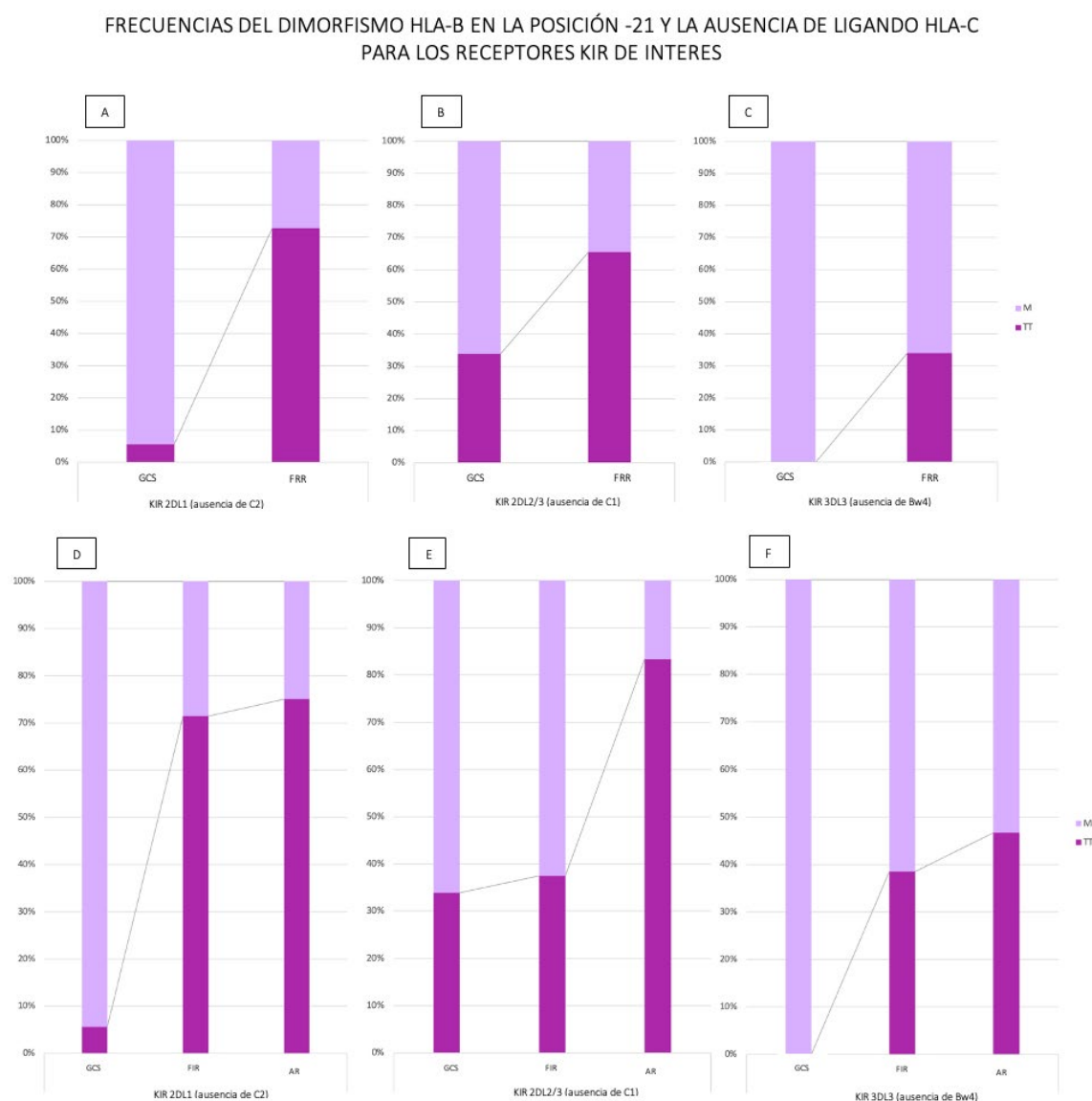


Figura 27. Frecuencias del dimorfismo HLA-B en la posición -21 y la ausencia de ligando para los receptores KIR en los diferentes grupos de estudio.

(A) Frecuencia de la hipótesis de ausencia de ligando para el gen KIR2DL1 combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 de las pacientes con fallo reproductivo recurrente (FRR) y el grupo control sano (GCS). (B) Frecuencia de la hipótesis de ausencia de ligando para los genes KIR2DL2/3 combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 de las pacientes con fallo reproductivo recurrente (FRR) y el grupo control sano (GCS). (C) Frecuencia de la hipótesis de ausencia de ligando para los el gen KIR3DL1 combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 de las pacientes con fallo reproductivo recurrente (FRR) y el grupo control sano (GCS). (D) Frecuencia de la hipótesis de ausencia de ligando para el gen KIR2DL1 combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 de las pacientes con abortos de repetición (AR) y fallo de implantación recurrente (FIR) en comparación el grupo control sano (GCS). (E) Frecuencia de la hipótesis de ausencia de ligando para los genes KIR2DL2/3 combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 de las pacientes con abortos de repetición (AR) y fallo de implantación recurrente (FIR) en comparación el grupo control sano (GCS). (F) Frecuencia de la hipótesis de ausencia de ligando para el gen KIR3DL1 combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 de las pacientes con abortos de repetición (AR) y fallo de implantación recurrente (FIR) en comparación el grupo control sano (GCS). Abreviaturas: C1: haplotipo HLA-C C1; C2: haplotipo HLA-C C2; Bw4: haplotipo HLA-B Bw4; TT: homocigosis de treonina en la posición -21 de HLA-B; M: heterocigosis de metionina y treonina en la posición -21 y homocigosis de metionina en la posición -21 de HLA-B; KIR: receptor de células NK de tipo inmunoglobulina.

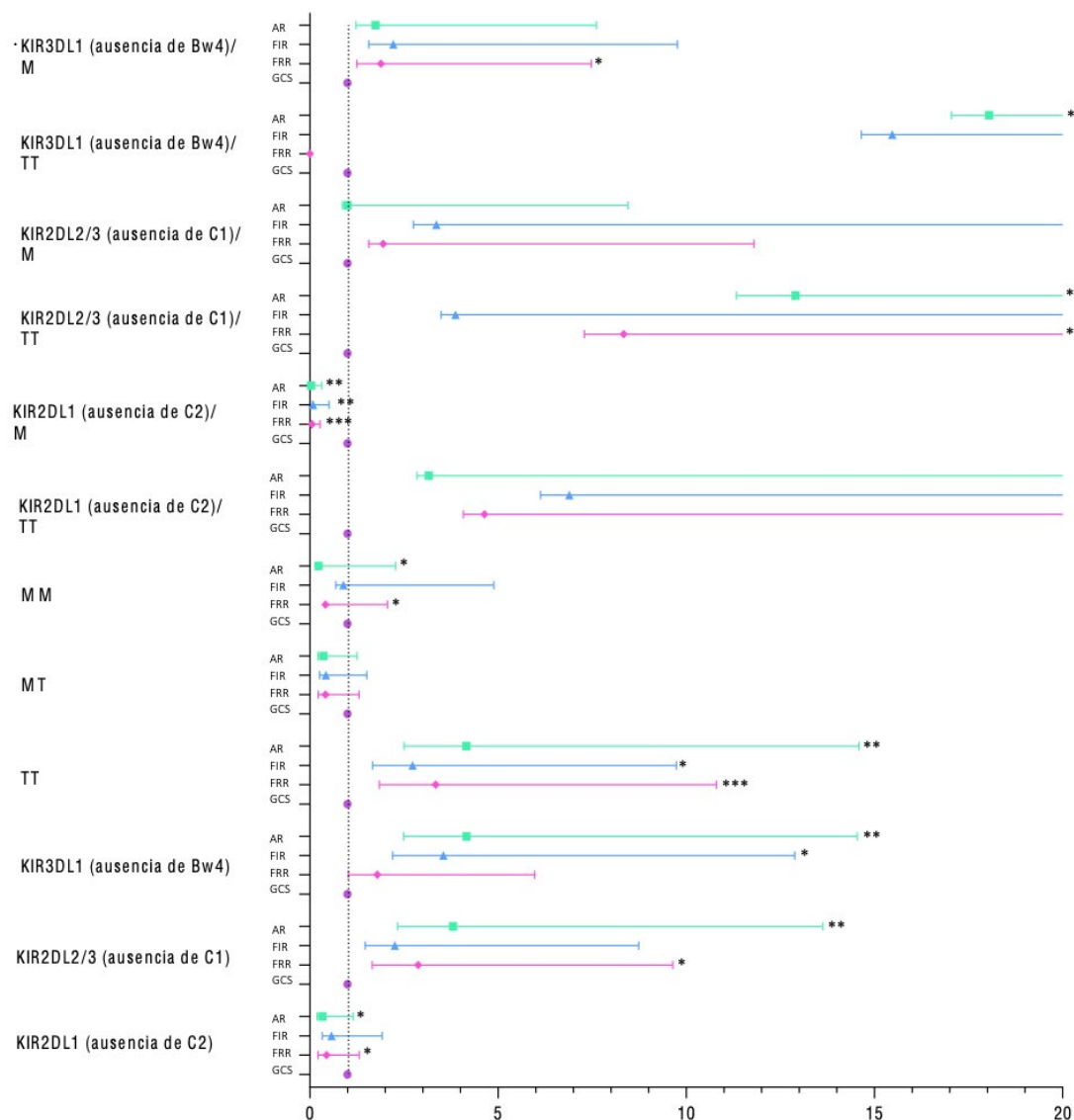


Figura 28. Representación de los Odds Ratio y los intervalos de confianza 95%, de los grupos FRR, AR y FIR en comparación con la el grupo control sano (GCS).

Los valores de p se derivan de pruebas U de Mann Whitney para comparar dos grupos y Kruskal-Wallis para comparar tres o más grupos. Datos con p-valor significativos mostrados * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Está representados los Odds ratio de la hipótesis de pérdida de ligando específico para los KIR inhibidores KIR2DL1, KIR2DL2/3 y KIR3DL1, también la frecuencia del dimorfismo HLA-B en la posición -21, y la combinación de la ausencia de ligando específico con el dimorfismo HLA-B en posición -21. Abreviaturas: C1: haplotipo HLA-C C1; C2: haplotipo HLA-C C2; Bw4: haplotipo HLA-B Bw4; TT: homocigosis de treonina en la posición -21 de HLA-B; M: heterocigosis de metionina y treonina en la posición -21 y homocigosis de metionina en la posición -21 de HLA-B; KIR: receptor de células NK de tipo inmunoglobulina.

Bloque II (B). Estudio de los receptores KIR y NKG por citometría de flujo

1. Evaluación de los receptores KIR y NKG2 mediante citometría de flujo en las pacientes con RFF y un GCS

En la segunda parte del bloque II se evaluaron los parámetros KIR de interés y de NKG2, para observar la correlación entre la expresión fenotípica de receptores y su genética, además con el objetivo de observar la existencia de diferencias en estos receptores de membrana en los grupos de estudio. Se realizó el análisis de citometría en un total de 46 pacientes de las cuales 28 pertenecen al grupo AR y 18 pertenecen al grupo FIR. Estos grupos se compararon con un grupo control sano de 8 mujeres.

Se analizó el porcentaje total de células NK entre los diferentes grupos de estudio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, tampoco se encontraron diferencias cuando se analizaron las células NK citotóxicas (CD56^{Dim}CD16+) y células NK inmunomoduladoras (CD56^{Bright}) por separado.

En primer lugar, se analizó la expresión de NKG2A; los resultados muestran que la expresión NKG2A fue significativamente mayor en el grupo FRR en comparación con el GCS. Si se subdivide el grupo FRR, se observa que en porcentaje total de NK NKG2A no existen diferencias significativas entre el grupo AR y FIR con el grupo GCS (Figura 29, A y D).

Se encontró que el porcentaje de expresión de NKG2A en las células NK CD56^{bright} hubo un aumento significativo en el grupo FRR (71,68%) ($P < 0,001$) y el grupo AR (76,85%) ($P\text{-valor} = 0,0001$) en comparación con el grupo GCS (44,16%). En el grupo FIR (59,65%) existió una tendencia en la que se observó la expresión de NKG2A aumentada. Si se comparan las variables AR y FIR, la expresión de NKG2A se encontró significativamente aumentada en AR con un $p\text{-valor} = 0,0006$ (figura 29, B y E)).

En las células NK CD56^{dim}CD16 (células NK citotóxicas) se observó una distribución parecida a los casos anteriores, se observó que en el grupo FRR la expresión de NKG2A está significativamente aumentada (35,05%) en comparación con el grupo control (17,94%) ($P\text{-valor} = 0,006$), además, se observó que en el grupo AR estaba significativamente aumentada (37,8%) en comparación con el grupo GSC ($p\text{-valor} = 0,002$). En cuanto al grupo FIR, no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la expresión de NKG2A (24,45%) en comparación con el grupo GCS, aunque sí que se observó mayor expresión del mismo. Se compararon los dos grupos AR y FIR, en el grupo AR la expresión fue significativamente mayor, con un $p\text{-valor} = 0,007$ (figura 29, C y F).

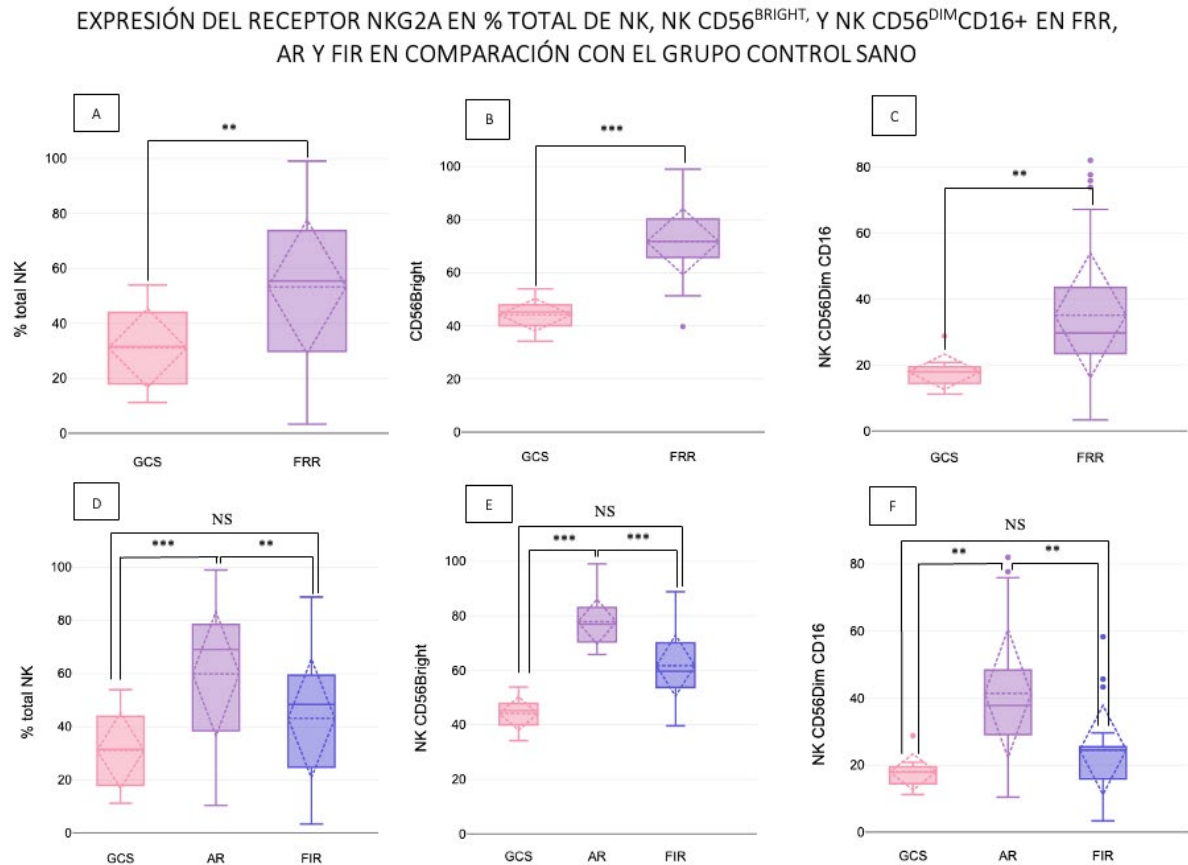


Figura 29. Expresión del receptor NKG2A en porcentaje total de NK, NK CD56^{Bright}, y NK CD56^{DIM}CD16+ en FRR, AR y FIR en comparación con el grupo control sano.

(A) Porcentaje de NKG2A en el % total de células NK, en el grupo fallo reproductivo recurrente (FRR) y el grupo control sano (GCS); (B) Porcentaje de NKG2A en las células CD56^{Bright} en el grupo fallo reproductivo recurrente (FRR) y el grupo control sano (GCS); (C) Porcentaje de NKG2A en las células CD56^{Dim}CD16+ en el grupo fallo reproductivo recurrente (FRR) y el grupo control sano (GCS); (D) Porcentaje de NKG2A en el % total de células NK, en el grupo aborto recurrente (AR), fallo de implantación recurrente (FIR) y el grupo control sano (GCS); (E) Porcentaje de NKG2A en células NK CD56^{Bright}, en el grupo aborto recurrente (AR), fallo de implantación recurrente (FIR) y el grupo control sano (GCS); (F) Porcentaje de NKG2A en células NK CD56^{Dim}CD16+ en el grupo aborto recurrente (AR), fallo de implantación recurrente (FIR) y el grupo control sano (GCS). Test utilizado para comparación entre grupos Test de Kruskal-Wallis y Test de Dunn para comparaciones múltiples. Datos mostrados como mediana, rango intercuartílico (IQR). Datos con p-valor significativos mostrados * P<0,05 **P<0,01; ***P<0,001. NS: no significativo.

Otro de los receptores que se analizaron fue la expresión de KIR2DL1 en las poblaciones de NK y que se observó igual que en el caso anterior, diferencias significativas entre grupos (figura 30).

Se realizó el análisis en el porcentaje total de células NK y en el grupo FRR y GCS y no se observó diferencias significativas, tampoco se observó diferencias significativas de expresión entre el grupo GCS con el grupo AR o el grupo FIR. Sin embargo, en el grupo FIR la expresión de KIR2DL1 estaba disminuida en comparación con el grupo GCS y en comparación con el grupo AR (79,20%) esta disminuido significativamente (65,32%) p-valor=0,002 (figura 30, A).

En cuanto a la población de NK CD56^{Bright} y las células NK CD56^{Dim}CD16+ en comparación con el GCS (89,5%) no se encontraron diferencias significativas en cuando se compara entre los grupos FRR, AR y FIR, pero sí cuando se compararon los grupos AR y FIR. El grupo AR en las células CD56^{Bright} tiene una expresión de KIR2DL1 del 87,25% mientras el grupo FIR 71,25%, siendo significativamente menor p-valor=0,009 (figura 30, B y C).

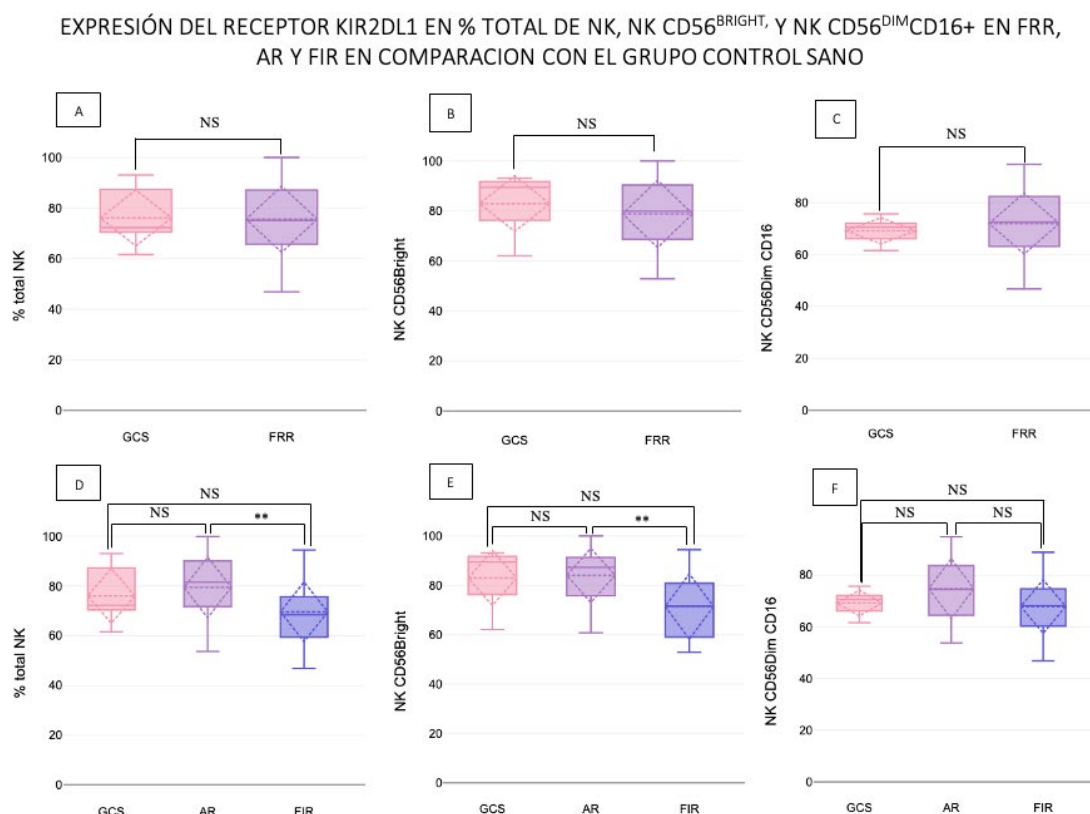


Figura 30. Expresión del receptor KIR2DL1 en porcentaje total de NK, NK CD56^{Bright}, y NK CD56^{Dim}CD16+ en FRR, AR y FIR en comparación con el grupo control sano.

(A) Porcentaje de KIR2DL1 en el % total de células NK, en el grupo fallo reproductivo recurrente (FRR) y el grupo control sano (GCS); (B) Porcentaje de KIR2DL1 en las células CD56^{Bright} en el grupo fallo reproductivo recurrente (FRR) y el grupo control sano (GCS); (C) Porcentaje de KIR2DL1 en las células CD56^{Dim}CD16+ en el grupo fallo reproductivo recurrente (FRR) y el grupo control sano (GCS); (D) Porcentaje de KIR2DL1 en el % total de células NK, en el grupo aborto recurrente (AR), fallo de implantación recurrente (FIR) y el grupo control sano (GCS); (E) Porcentaje de KIR2DL1 en células NK CD56^{Bright}, en el grupo aborto recurrente (AR), fallo de implantación recurrente (FIR) y el grupo control sano (GCS); (F) Porcentaje de KIR2DL1 en células NK CD56^{Dim}CD16+ en el grupo aborto recurrente (AR), fallo de implantación recurrente (FIR) y el grupo control sano (GCS). Test utilizado para comparación entre grupos, Test de Kruskal-Wallis y Test de Dunn para comparaciones múltiples. Datos mostrados como mediana, rango intercuartílico (IQR). Datos con p-valor significativos mostrados * P<0,05 **P<0,01; ***P<0,001. NS: no significativo.

Se estudió el receptor KIR3DL1, sí observamos las gráficas del porcentaje de células NK totales, la expresión de KIR3DL1 es similar en el grupo FRR en comparación con el grupo control. Se analizaron los grupos AR y FIR, la expresión de KIR3DL1 en FIR fue ligeramente mayor (22,2%) en comparación con el grupo GCS (19,3%), sin embargo, en el grupo AR la expresión fue significativamente mayor en el (37,6%) p-valor=0,01 (figura 31, D).

Se caracterizó al grupo de células NK CD56^{Bright}, se encontró que el grupo FRR tenía una expresión de KIR3DL1 significativamente mayor (30,9%) en comparación con el grupo GCS (17%), con p-valor= 0,003, además si se estudiaron los grupos AR y FIR, se encontró que el grupo FIR (23%) mantenía una expresión de KIR3DL1 parecida al grupo GCS (17%) mientras que en el grupo AR la expresión es significativamente mayor (35%) en comparación con el grupo GCS, p-valor=0,002. Además, se comparó el grupo AR con el grupo FIR, la expresión de KIR3DL1 también es significativamente mayor el primero, es decir en AR con p-valor=0,044 (figura 31, E).

En el grupo de células NK CD56^{Dim}CD16+, en ninguno de los casos la expresión de KIR3DL1 fue significativa en comparación con el grupo GCS, y tampoco en comparación entre grupos AR y FIR, sí que existe mayor expresión en FRR como en AR y FIR, sería necesario aumentar la n de este estudio para en obtener resultados concluyentes (figura 31, F).

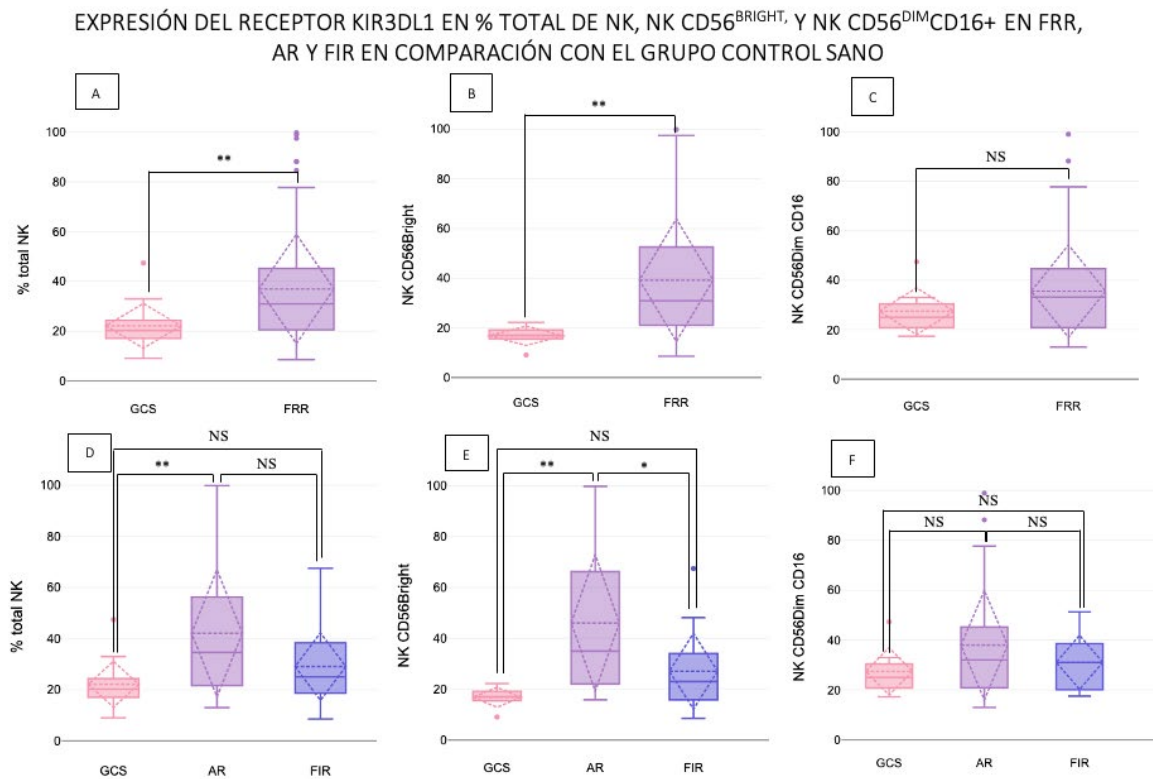


Figura 31. Expresión del receptor KIR3DL1 en porcentaje total de NK, NK CD56^{Bright}, y NK CD56^{DIM}CD16+ en FRR, AR y FIR en comparación con el grupo control sano.

(A) Porcentaje de KIR3DL1 en el % total de células NK, en el grupo fallo reproductivo recurrente (FRR) y el grupo control sano (GCS); (B) Porcentaje de KIR3DL1 en las células CD56^{Bright} en el grupo fallo reproductivo recurrente (FRR) y el grupo control sano (GCS); (C) Porcentaje de KIR3DL1 en las células CD56^{Dim}CD16+ en el grupo fallo reproductivo recurrente (FRR) y el grupo control sano (GCS); (D) Porcentaje de KIR3DL1 en el % total de células NK, en el grupo aborto recurrente (AR), fallo de implantación recurrente (FIR) y el grupo control sano (GCS); (E) Porcentaje de KIR3DL1 en células NK CD56^{Bright}, en el grupo aborto recurrente (AR), fallo de implantación recurrente (FIR) y el grupo control sano (GCS); (F) Porcentaje de KIR3DL1 en células NK CD56^{Dim}CD16+ en el grupo aborto recurrente (AR), fallo de implantación recurrente (FIR) y el grupo control sano (GCS). Test utilizado para comparación entre grupos, Test de Kruskal-Wallis y Test de Dunn para comparaciones múltiples. Datos mostrados como mediana, rango intercuartílico (IQR). Datos con p-valor significativos mostrados * P<0,05 **P<0,01; ***P<0,001. NS: no significativo.

En último lugar, se analizó la expresión de NKG2C y comenzando por el porcentaje total de células NK, se observó que en el grupo FRR no existían diferencias en la expresión de este receptor de membrana en comparación con el grupo GCS, también se confirmó que tanto en las subpoblaciones de células NK CD56^{Bright} y células NK CD56^{Dim}CD16+, el grupo FRR no muestra tampoco diferencias significativas respecto al grupo control (figura 32, A, B, C).

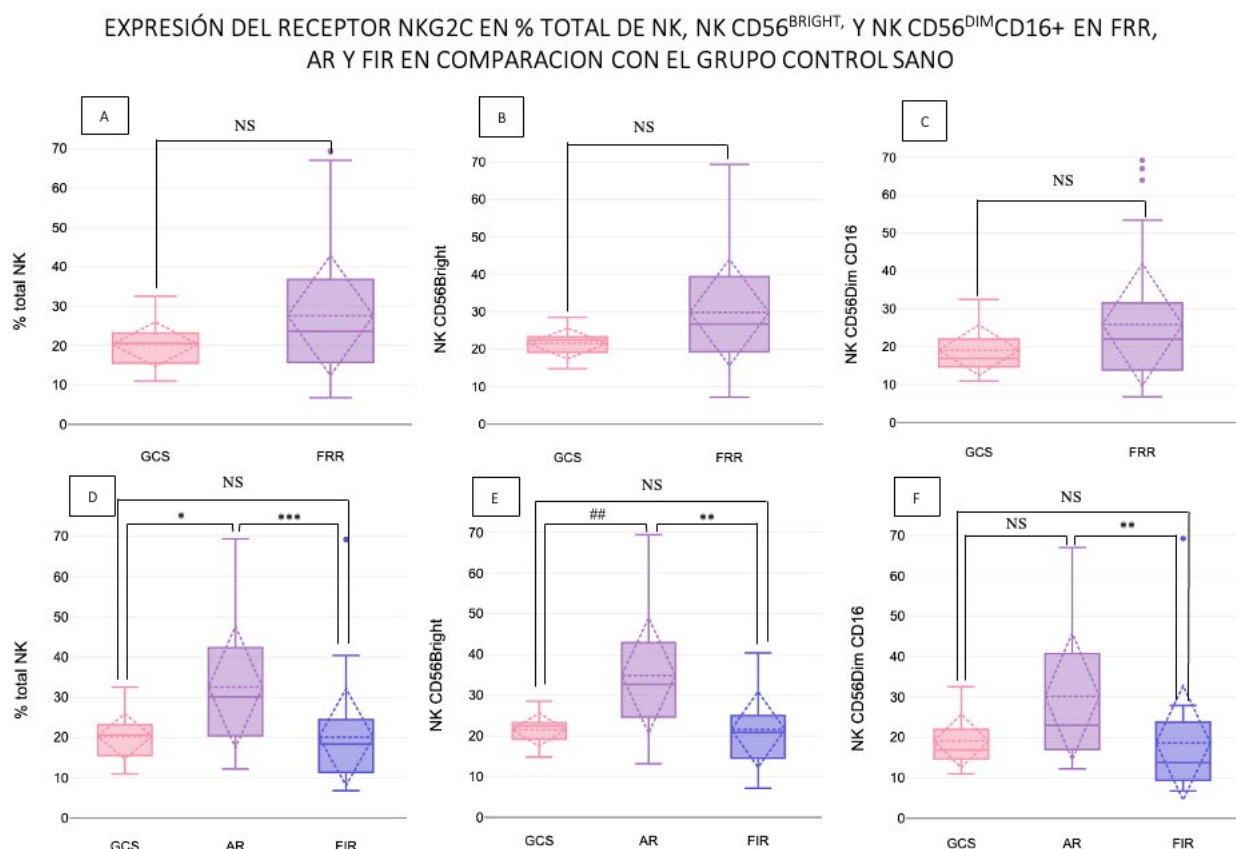


Figura 32. Expresión del receptor NKG2C en porcentaje total de NK, NK CD56^{Bright}, y NK CD56^{Dim}CD16+ en FRR, AR y FIR en comparación con el grupo control sano.

(A) Porcentaje de NKG2C en el % total de células NK, en el grupo fallo reproductivo recurrente (FRR) y el grupo control sano (GCS); (B) Porcentaje de NKG2C en las células CD56^{Bright} en el grupo fallo reproductivo recurrente (FRR) y el grupo control sano (GCS); (C) Porcentaje de NKG2C en las células CD56^{Dim}CD16+ en el grupo fallo reproductivo recurrente (FRR) y el grupo control sano (GCS); (D) Porcentaje de NKG2C en el % total de células NK, en el grupo aborto recurrente (AR), fallo de implantación recurrente (FIR) y el grupo control sano (GCS); (E) Porcentaje de NKG2C en células NK CD56^{Bright}, en el grupo aborto recurrente (AR), fallo de implantación recurrente (FIR) y el grupo control sano (GCS); (F) Porcentaje de NKG2C en células NK CD56^{Dim}CD16+ en el grupo aborto recurrente (AR), fallo de implantación recurrente (FIR) y el grupo control sano (GCS). Test utilizado para comparación entre grupos, Test de Kruskal-Wallis y Test de Dunn para comparaciones múltiples. Datos mostrados como mediana, rango intercuartílico (IQR). Datos con p-valor significativos mostrados * P<0,05 **P<0,01; ***P<0,001. NS: no significativo.

En cuanto la expresión de NKG2C en los grupos AR y FIR, se observó una distribución diferente pues que en el porcentaje de células totales, NK CD56^{Bright} y células NK CD56^{Dim}CD16+; el grupo FIR mantiene una expresión de NKG2C muy similar al grupo GCS.

En cuanto a la expresión en AR de NKG2C, en el porcentaje de células NK totales, se observó que la expresión de este receptor es significativamente mayor (30,1%) en comparación con el grupo GCS (20,6%) con un p-valor=0,031, esta diferencia aún es mayor si se compara con el grupo FIR (18,4%), y suponiendo un p-valor <0,001 (figura 32, D).

En el análisis en las células NK CD56^{Bright} el patrón de expresión fue bastante parecido también se observó un aumento en el grupo AR que no es significativo, pero sí que se observó una tendencia que si se aumenta el tamaño muestral, se podría obtener resultado significativo ya que cuenta con un porcentaje de expresión del 32,65% en comparación con 22,65% en el grupo GCS, además con p-valor= 0,06. En cuanto a la comparación con el grupo FIR en este caso sí que fue significativo el resultado pues en este grupo la expresión supone un 20,9%, obteniendo un p-valor=0,004 (figura 32, E).

Por último, en las células NK células NK CD56^{Dim}CD16+, también se observó que en el grupo AR la expresión de este receptor también estaba aumentada (23%) pero no a niveles de significación cuando se compara con el grupo GCS (16,95%), sin embargo, cuando este resultado se compara con el grupo FIR (13,8%), sí que observamos diferencias significativas en ambos grupos obteniendo un p-valor=0,009 (figura 32, F).

2. Análisis de la expresión de los receptores de células NK en combinación con la genética HLA-C, HLA-B y KIR en las pacientes con RFF y un GCS

El siguiente análisis consistió en combinar la información genética de los alelos específicos para los receptores que fueron estudiados mediante citometría de flujo, con el objetivo de determinar si existe alguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de AR y FIR.

En primer lugar, se analizó el dimorfismo HLA-B en posición -21, TT o MT/MM en combinación con la expresión de NKG2A. En la figura 33, se representa el porcentaje de expresión de NKG2A en las células CD56^{Bright} (figura 33, A), y en las células CD56^{Dim} CD16+ (figura 33, B) en los grupos AR y FIR. Se representa la presencia genética de TT o MT/MM con un recuadro marcado de color gris oscuro.

Los resultados obtenidos mostraron que en las células NK inmunomoduladoras CD56^{Bright}, con homocigosis para T, se encontró un aumento de expresión de NKG2A significativo en el grupo AR en comparación con el grupo FIR, con un p-valor= 0,0001. En cuanto a la presencia genética de MT/MM, la expresión de NKG2A fue similar en ambos grupos (figura 33, A).

En las células NK citotóxicas CD56^{Dim}CD16+, cuando existe homocigosis para T, la expresión de NKG2A se encontró significativamente aumentada en el grupo AR en comparación con el grupo FIR cuando existe la presencia de homocigosis para TT p-valor=0,038. Sin embargo, al igual que en las células NK moduladoras, cuando existió presencia genética MT/MM, la expresión de NKG2A es similar en ambos grupos, no se encontraron por tanto diferencias significativas (figura 33, B).

En primer lugar, se analizó los distintos haplotipos de HLA-C C1C1, C1C2 y C2C2 en combinación con el receptor KIR2DL1, el cual tiene como ligando específico C2. En la siguiente figura se representa la expresión de KIR2DL1 en las células NKCD56^{Bright} (figura 34, A) y la expresión de KIR2DL1 en las células NKCD56^{Dim}CD16+ (figura 34, B) en los grupos FIR y AR con la presencia de cada uno de los haplotipos HLA-C marcados en el centro de la figura 33.

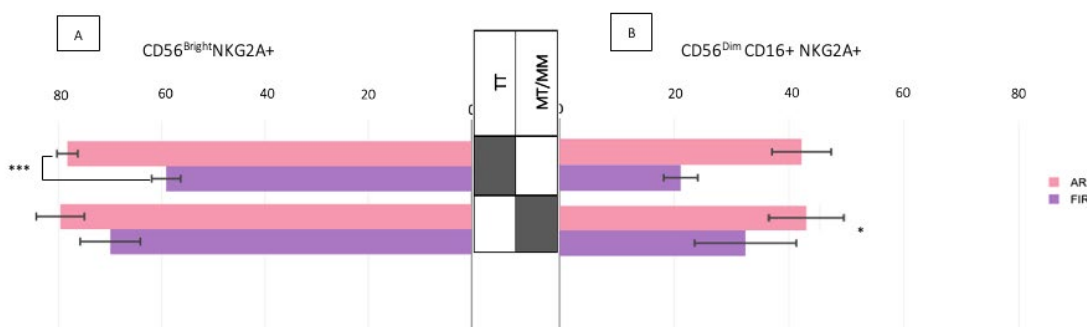
EXPRESIÓN DEL RECEPTOR NKG2A EN NK CD56^{BRIGHT}, Y NK CD56^{DIM}CD16+ AR Y FIR EN COMBINACIÓN CON DIMORFISMO HLA-B EN POSICIÓN -21

Figura 33. Expresión del receptor NKG2A en NK CD56^{BRIGHT}, y NK CD56^{DIM}CD16+ AR y FIR en combinación con dimorfismo HLA-B en posición -21.

La frecuencia en AR (barras rosas) y FIR (barras moradas) de la expresión de NKG2A en células (A) NK CD56^{Bright} y (B) NK CD56^{Dim} CD16+. Que genéticamente se combinan con los haplotipos que se muestran señalados en la tabla de en medio de la figura HLA C1C1, C1C2 o C2C2. Los valores de p se derivan de pruebas de Test de Kruskal-Wallis y Test de Dunn para comparaciones múltiples. Datos mostrados como mediana, rango intercuartílico (IQR). Datos con p-valor significativos mostrados * P<0,05 **P<0,01; ***P<0,001.

En cuanto a los resultados obtenidos, cuando las pacientes AR eran homocigotas para HLA-C2, es decir, el ligando específico del receptor KIR2DL1, se encontró la expresión en las NK CD56^{Bright} significativamente mayor en comparación con el grupo FIR con un p-valor=0,0007(figura 34, A). En las NK CD56^{Dim} CD16+ también se observó un aumento en la expresión de este receptor en el grupo AR sin ser significativo, quizá por la falta de tamaño muestral (figura 34, B).

En la homocigosis para HLA-C1, ligando que no es específico para KIR2DL1, también existió un aumento significativamente mayor de la expresión de este receptor en el grupo AR en comparación con el grupo FIR, con un p-valor=0,019 (figura 34, A).

En las células NK CD56^{Bright}, la expresión de KIR2DL1 no varió en función del haplotipo HLA-C en el grupo AR y tampoco en el grupo FIR (figura 34, A). Sin embargo, en las células NK CD56^{Dim} CD16+, según el haplotipo HLA-C sí que existió un aumento de la expresión de KIR2DL1 significativo cuando se compara el haplotipo de homocigosis para C1 y para C2 con un p-valor=0,037 (figura 34, B). Por lo tanto, en las células NK CD56^{Bright} la expresión de KIR2DL1 se mantiene, mientras que, en las células citotóxicas, cuando existe HLA-C1C1 la expresión de KIR2DL1 es menor, mientras que en las pacientes que tienen homocigosis para HLA-C2 la expresión de KIR2DL1 se mantiene al nivel de las inmunomoduladoras.

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR KIR2DL1 EN NK CD56^{BRIGHT}, Y NK CD56^{DIM}CD16+ AR Y FIR EN COMBINACIÓN CON HAPLOTIPO HLA-C

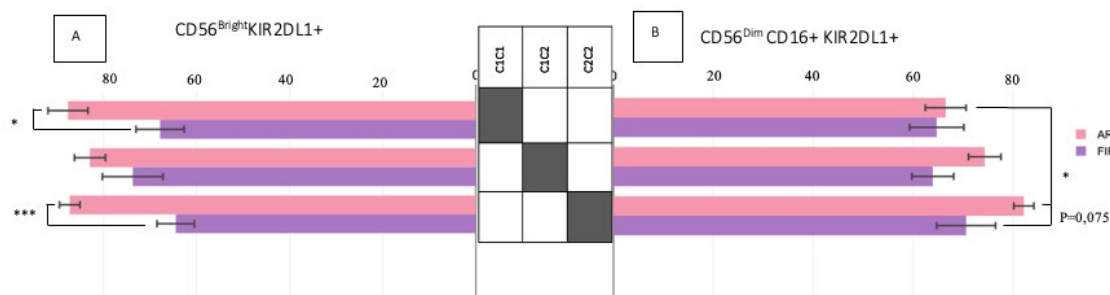


Figura 34. Expresión del receptor KIR2DL1 en NK CD56^{BRIGHT}, y NK CD56^{DIM}CD16+ AR y FIR en combinación con haplotipo HLA-C.

La frecuencia en AR (barras rosas) y FIR (barras moradas) de la expresión de KIR2DL1 en células (A) NK CD56^{Bright} y (B) NK CD56^{Dim} CD16+. Que genéticamente se combinan con los haplotipos que se muestran señalados en la tabla de en medio de la figura HLA C1C1, C1C2 o C2C2. Los valores de p se derivan de pruebas de Test de Kruskal-Wallis y Test de Dunn para comparaciones múltiples. Datos mostrados como mediana, rango intercuartílico (IQR). Datos con p-valor significativos mostrados * P<0,05 **P<0,01; ***P<0,001.

Se realizó el análisis de la expresión del receptor KIR3DL1, en combinación con su ligando específico que es HLA-Bw4, para ello se dividieron las pacientes en homocigotas para Bw4, homocigotas para Bw6 y heterocigotas Bw6-Bw4, y se comparó la expresión del receptor entre los grupos AR y FIR (figura 35).

La expresión de KIR3DL1 en NK CD56^{Bright} según el haplotipo específico que contiene la paciente reveló resultados interesantes. Por un lado, en el grupo FIR no se observó variación en la expresión según el haplotipo HLA-B. Sin embargo, en el grupo AR se observó que la expresión de KIR3DL1 es dosis dependiente; cuando no existe haplotipo con ligando específico, la expresión del receptor es similar a la expresión en el grupo FIR. Cuando existe heterocigosidad, es decir, Bw4Bw6, la expresión de KIR3DL1 se vio significativamente aumentado en el grupo AR (65,6%) en comparación con 38,55% en FIR, con un p-valor=0,023. Y cuando existió homocigosidad para Bw4, el porcentaje de expresión de KIR3DL1 se vio significativamente mayor (80,01%) en el grupo AR en comparación con el grupo FIR (23%), con p-valor=0,045 (figura 35, A).

Además, cuando se comparó la expresión de KIR3DL1 de NKCD56^{Bright}, entre los distintos haplotipos HLA-B del grupo AR, se observa que hay un aumento significativo de la expresión en las pacientes que son homocigotas para HLA-Bw6, y las pacientes que son homocigotas para HLA-Bw4, con un p-valor=0,029 (figura 35, A).

En cuanto a las células NK citotóxicas CD56^{Dim} CD16+, los resultados en la homocigosis para HLA-Bw6 se mantuvo de modo que la expresión de KIR3DL1 es la misma en ambos grupos. Sin embargo, en la heterocigosis HLA-Bw4Bw6 hubo una tendencia a aumentar la expresión en el grupo AR (55,4%) en comparación con el grupo FIR (37,2%) sin ser significativa, p-valor= 0,7, y en el grupo de homocigosis para Bw4 también hay una tendencia, pero sin ser significativa (figura 35, B).

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR KIR3DL1 EN NK CD56^{BRIGHT}, Y NK CD56^{DIM}CD16+ AR Y FIR EN COMBINACIÓN CON HAPLOTIPO HLA-B

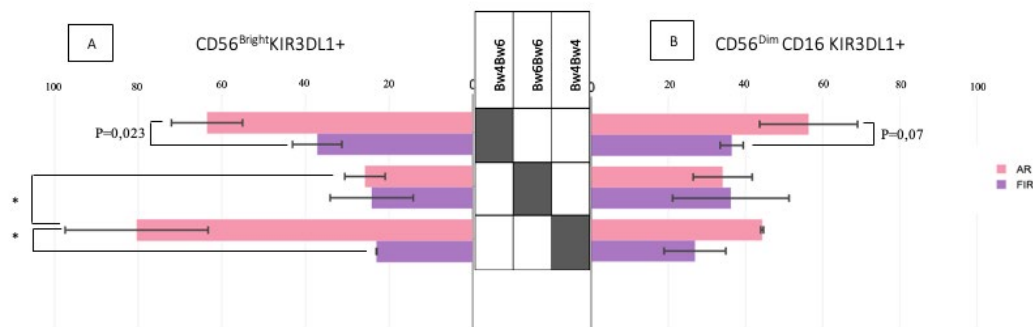


Figura 35. Expresión del receptor KIR3DL1 en NK CD56^{BRIGHT}, y NK CD56^{DIM}CD16+ AR y FIR en combinación con el haplotipo HLA-B

La frecuencia en AR (barras rosas) y FIR (barras moradas) de la expresión de KIR3DL1 en células (A) NK CD56^{Bright} y (B) NK CD56^{Dim} CD16+. Que genéticamente se combinan con los haplotipos que se muestran señalados en la tabla de en medio de la figura HLA Bw4Bw6, Bw6Bw6 o Bw4Bw4. Los valores de p se derivan de pruebas de Test de Kruskal-Wallis y Test de Dunn para comparaciones múltiples. Datos mostrados como mediana, rango intercuartílico (IQR). Datos con p-valor significativos mostrados * P<0,05 **P<0,01; ***P<0,001.

Por último, se analizó el dimorfismo HLA-B en posición -21, TT o MT/MM en combinación con la expresión de NKG2C. En la figura 36, se representa el porcentaje de expresión de NKG2C en las células CD56^{Bright} en la izquierda, y en las células CD56^{Dim} CD16+ hacia la derecha en los grupos AR y FIR. Se representa la presencia genética de TT o MT/MM con un recuadro marcado de color gris oscuro.

Los resultados obtenidos mostraron que en las células NK inmunomoduladoras CD56^{Bright}, cuanto existe genéticamente homocigosis para T, hubo un aumento de expresión significativo en el grupo AR en comparación con el grupo FIR, con un p-valor= 0,05. En cuanto a la presencia genética de MT/MM, la expresión de NKG2A fue similar en ambos grupos (figura 36, A).

En las células NK citotóxicas CD56^{Dim}CD16+, con homocigosis para T, en la expresión de NKG2C no se vio significación estadística, aunque parece que hay una tendencia a estar aumentada en el grupo AR en comparación con el grupo FIR. Sin embargo, al igual que en las células NK moduladoras, cuando existió presencia genética MT/MM, la expresión de NKG2C fue similar en ambos grupos, no existiendo por tanto diferencias significativas (figura 36, B).

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR NKG2C EN NK CD56^{BRIGHT}, Y NK CD56^{DIM} AR Y FIR EN COMBINACIÓN CON DIMORFISMO HLA-B EN POSICIÓN -21

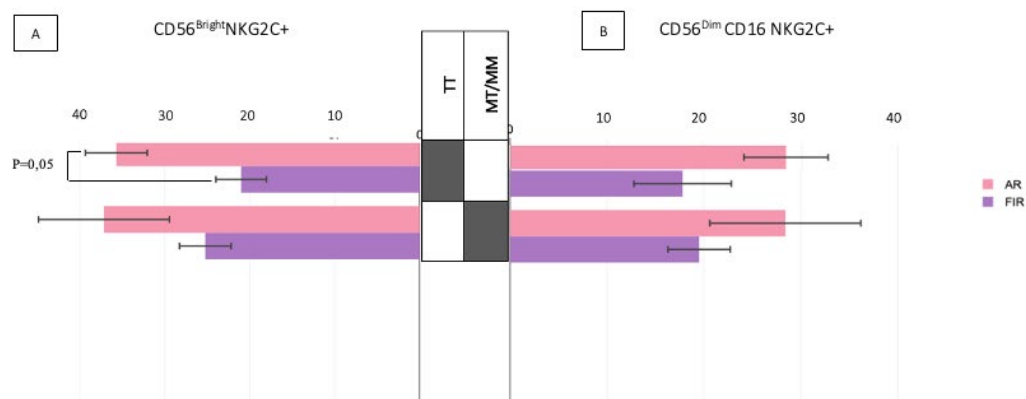


Figura 36. Expresión del receptor NKG2C en NK CD56^{BRIGHT}, y NK CD56^{DIM}CD16+ AR y FIR en combinación con dimorfismo HLA-B en posición -21.

La frecuencia en AR (barras rosas) y FIR (barras moradas) de la expresión de NKG2C en células (A) NK CD56^{Bright} y NK (B) CD56^{Dim}CD16. Que genéticamente se combinan con el dimorfismo HLA-B el cual está ubicado en la tabla de en medio de la figura HLA-B -21 TT, MT/MM. Los valores de p se derivan de pruebas de Test de Kruskal-Wallis y Test de Dunn para comparaciones múltiples. Datos mostrados como mediana, rango intercuartílico (IQR). Datos con p-valor significativos mostrados * P<0,05 **P<0,01; ***P<0,001.

Datos significativos englobados y algoritmo diagnóstico final

1. Resumen de parámetros significativos entre los grupos AR, FIR y GCS

El conjunto de resultados obtenidos indica que el grupo FIR y AR si son posibles de discriminar entre estas dos condiciones patológicas en el momento del diagnóstico. Se observa que existen variables y marcadores de estudio para AR y FIR que muestran diferencias significativas al realizar el análisis estadístico. Se reveló la importancia de diagnosticar a las pacientes en el grupo indicado y así ser capaces de realizar un buen uso de los biomarcadores indicados para cada tipo patología.

Por tanto, a modo de resumen, se exponen en la figura 37 los marcadores que son estadísticamente significativos y más relevantes para cada grupo mediante un heatmap que facilita la discriminación de los parámetros más importantes en los grupos AR y FIR en comparación con GCS y los grupos AR y FIR comparados entre sí.

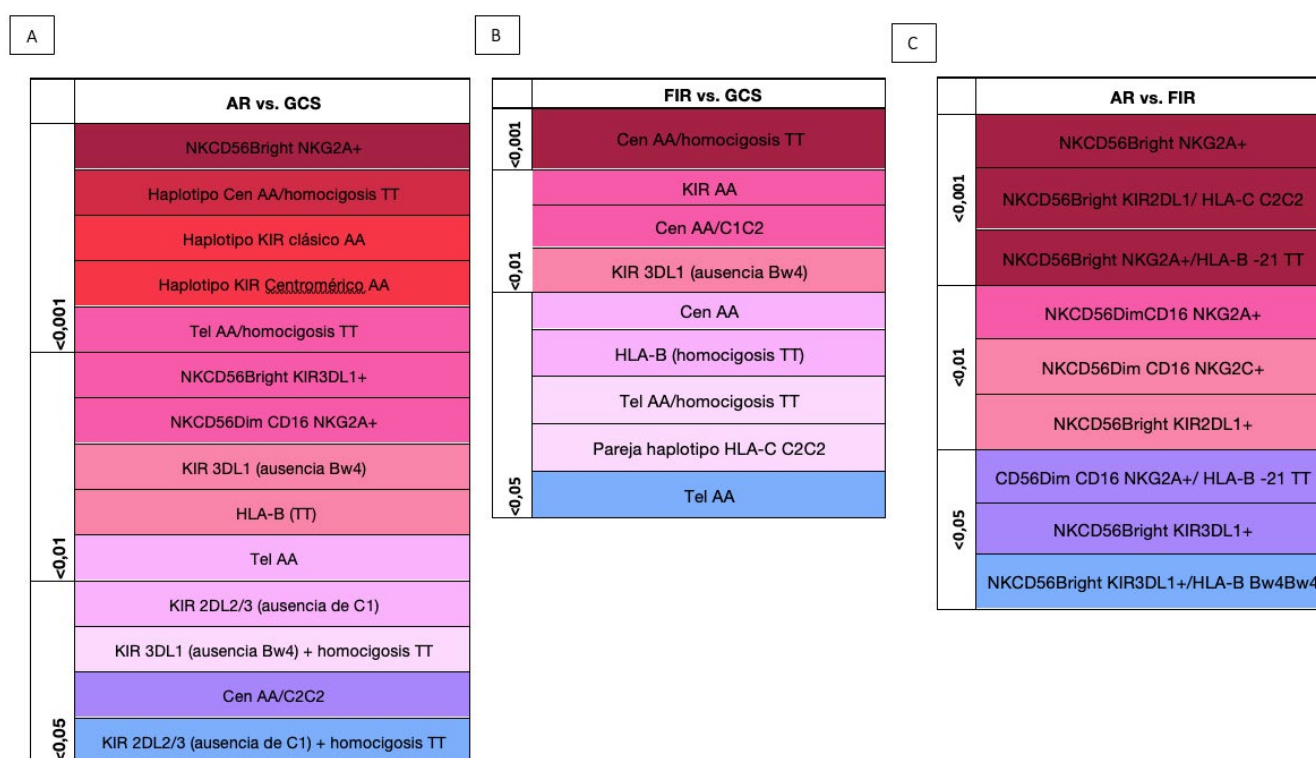


Figura 37. Representación tipo Heatmap de los p valores obtenidos tras la comparativa entre grupos, GC vs AR; GC vs FIR y AR vs FIR.

Las variables en un rojo más intenso son aquellas más significativas con una $P < 0,01$, mientras que a medida que disminuye la significación el color va cambiando hacia un violeta y azul que se vuelve más intenso cuanto menos significativa resulta la variable. (A) Se representan las variables significativas del grupo abortos de repetición (AR) en comparación con el grupo control sano (GCS). (B) Se representan las variables significativas del grupo fallo de implantación recurrente (FIR) en comparación con el grupo control sano (GCS). (C) Se representan las variables significativas del grupo abortos de repetición (AR) en comparación con el grupo fallo de implantación recurrente (FIR).

En este resumen se observan ciertas diferencias en los dos grupos de estudio que facilitaría a la hora del diagnóstico el diagnóstico al estudiarse por separado.

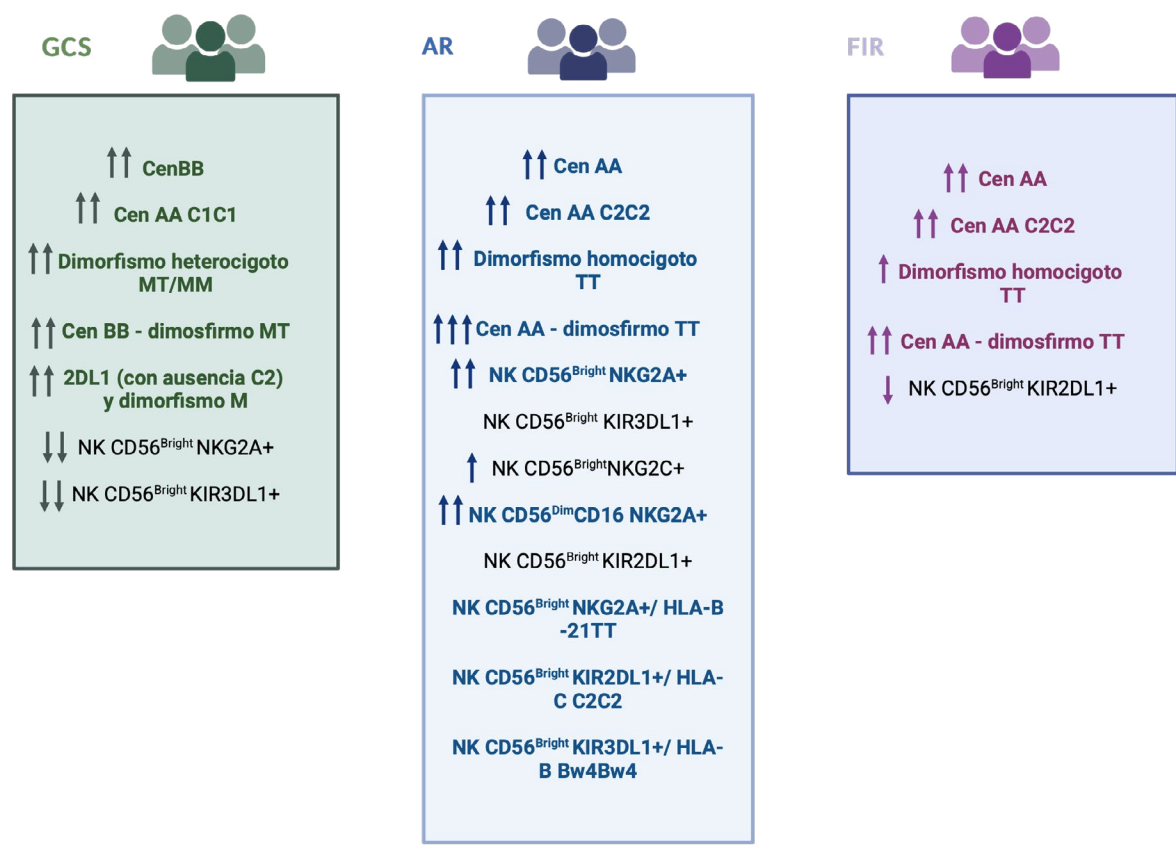


Figura 38. Gráfico resumen de marcadores significativos en cada grupo de estudio.

Grupo control sano (GCS) en azul, abortos de repetición (AR) en morado y fallos de implantación recurrente (FIR) en azul. En el grupo AR y FIR los parámetros que se elevan significativamente en ambos grupos están en negro, aquellos que son exclusivos de grupo están cada uno en su color correspondiente (morado para AR y azul para FIR). Creado en BioRender. Gil, R. (2024) <https://BioRender.com/u97h668>

2. Evaluación de la capacidad de discriminación pacientes con FRR y un GCS mediante curvas ROC

Una vez obtenidos aquellos parámetros estadísticamente significativos en el análisis global, se procedió a realizar una evaluación de la capacidad de estos marcadores para discriminar entre los grupos de estudio, incluyendo el GCS y AR, AR y FIR y poder determinar su utilidad dentro del algoritmo diagnóstico, como objetivo dentro de la memoria de tesis. Se realizaron análisis multivariantes de regresión logística para cada parámetro, y se representó mediante curvas ROC mediante el índice de Youden. Los datos obtenidos en el análisis de curva ROC se muestran en la **Tabla 14** para GCS vs el Grupo AR, **Tabla 15** para el Grupo AR vs FIR. Las curvas ROC con las áreas bajo la curva (AUC) más altas se representan en la **Figura 39** para el Grupo AR y GCS **Figura 40** entre los Grupos AR y FIR.

Tabla 14. Resumen del análisis de regresión logística multivariante entre el grupo control sano (GCS) y el grupo abortos de repetición (AR) de menor p valor a mayor.

AR vs. GCS	AUC	P-valor	Punto de corte (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
NK CD56 ^{Bright} NKG2A+	1	0,0001	65,8	100	100
NK CD56 ^{Dim} CD16 NKG2A+	0,875	0,002	15	92,9	71,4
NK CD56 ^{Bright} KIR3DL1+	0,921	0,002	15,8	96,4	57,1
NK CD56 ^{Bright} NKG2C+	0,806	0,06	15,9	92,9	85,7

AUC: área bajo la curva. Abreviaturas: AUC: área bajo la curva.

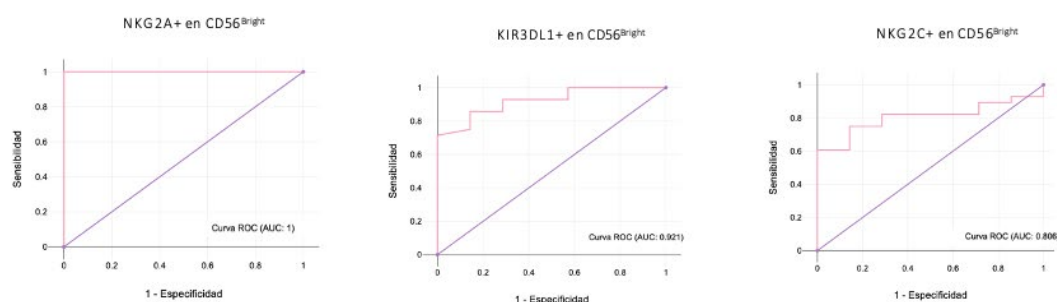


Figura 39. Representación del análisis de regresión logística multivariante mediante curvas ROC

Obtenidas en el análisis entre el grupo control sano (GCS) y el grupo de abortos de repetición (AR) con las áreas bajo la curva (AUC) más altas.

Tabla 15. Resumen del análisis de regresión logística multivariante entre el grupo abortos de repetición (AR) y grupo fallo reproductivo recurrente (FIR) de menor p valor a mayor.

AR vs. FIR	AUC	P-valor	Punto de corte (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
NK CD56 ^{Bright} NKG2A+	0,866	0,0006	65,8	100	33,3
NK CD56 ^{Dim} CD16 NKG2A+	0,75	0,007	10,5	96,4	83,3
NK CD56 ^{Bright} KIR2DL1+	0,762	0,009	60,8	100	66,6
NK CD56 ^{Bright} KIR3DL1+	0,715	0,044	15,8	100	72,2
NK CD56 ^{Bright} NKG2C+	0,776	0,004	13,2	100	83,3
NK CD56 ^{Dim} CD16 NKG2C+	0,728	0,009	12,2	96,4	55,5
NK CD56 ^{Bright} NKG2A+ /-21 HLA-B TT	0,937	0,001	65,8	100	23
NK CD56 ^{Dim} CD16 NKG2A+ /-21 HLA-B TT	0,812	0,038	10,4	95	84,6
NK CD56 ^{Bright} KIR2DL1+ /HLA-C2C2	0,712	0,0007	66,5	100	62,5
NK CD56 ^{Bright} KIR3DL1+/HLA-Bw4Bw4	0,917	0,045	15,8	100	50
NK CD56 ^{Bright} KIR3DL1+/HLA-Bw4Bw6	0,706	0,023	15,8	100	71,4

Abreviaturas: AUC: área bajo la curva.

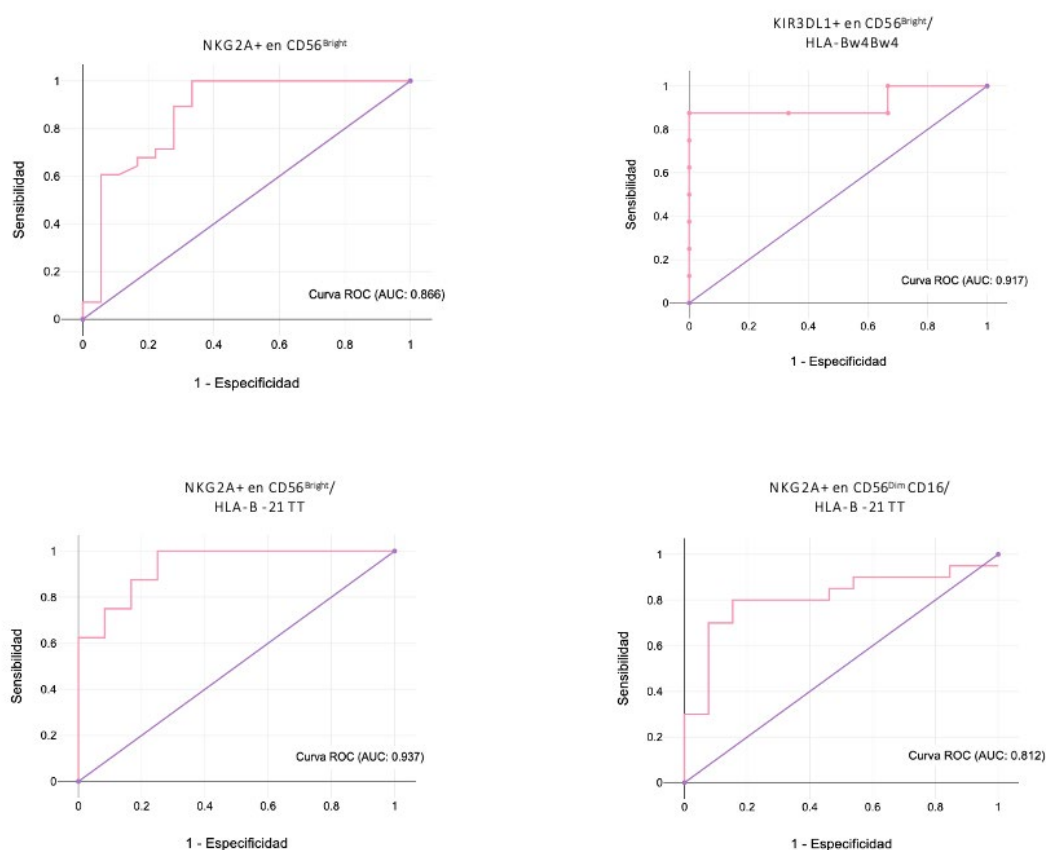


Figura 40. Representación de aquellas curvas ROC obtenidas en el análisis entre el grupo fallo de implantación recurrente (FIR) y el grupo de abortos de repetición (AR) con las áreas bajo la curva (AUC) más altas.

3. Diseño del algoritmo diagnóstico en pacientes con AR y FIR y un GCS

En este apartado y después de todos los análisis realizados anteriormente, se ha decidido realizar un algoritmo diagnóstico mediante árboles de decisión que podría ser de utilidad para la práctica clínica para la toma de decisiones y poder diagnosticar a pacientes con AR o FIR de causa inmunológica.

En primer lugar, en el diseño de este estudio se analizaron genéticamente dos bloques de población diferentes; el primero, está reflejado en los resultados en el bloque I; se analizaron 397 pacientes con fallo reproductivo recurrente, y estos se diferenciaron después en 5 grupos, de los cuales los de interés fueron el grupo AR y el grupo FIR. Los resultados que se reflejan en el segundo bloque de pacientes; se analizaron un total de 77 pacientes con fallo reproductivo recurrente, también separados en los grupos AR y FIR.

De este estudio genético se observó que existen diferencias significativas entre los dos grupos AR y FIR en comparación con el GCS, pero no existen diferencias significativas en los resultados genéticos de los dos grupos con la patología (representado en el bloque I y bloque II A de los resultados anteriores).

Posteriormente se realizó un estudio de la expresión de receptores en membrana mediante citometría de flujo con el que se quiso observar si los resultados obtenidos en genética estaban relacionados con su posterior expresión. Este análisis se realizó en pacientes recogidas del bloque II. Al realizar el análisis se vieron resultados esperables coincidiendo con la bibliografía existente y, además, los resultados demostraron que con algunos de estos parámetros sí que se es capaz discriminar distinguir el grupo FIR y AR.

Con todos los resultados obtenidos, se realizaron mediante análisis multivariante dos tipos de árboles de decisión diferentes; en primer lugar, se proponen dos árboles de decisión genética, en los que se representan los resultados más relevantes para poder discriminar AR y FIR del GCS. Por un lado, se representa la comparación de GCS con el grupo AR (figura 41) y en segundo lugar el GCS con el grupo FIR (figura 42). Además, se realizó un árbol de decisión donde se representan los resultados más relevantes que se obtuvieron a partir de la expresión de receptores estudiada por citometría de flujo y que permiten discriminar entre el grupo AR y el grupo FIR (figura 43).

La precisión del estudio de decisión fue de un 0,75. Este resultado quiere decir que está dentro de una buena precisión, pero existe un porcentaje de error que debería ser eliminado, por tanto, un aumento de N podría llevar a obtener resultados de precisión diagnóstica.

Árbol de Decisión – Genes KIR HLA-C y Dimorfismo HLA-B

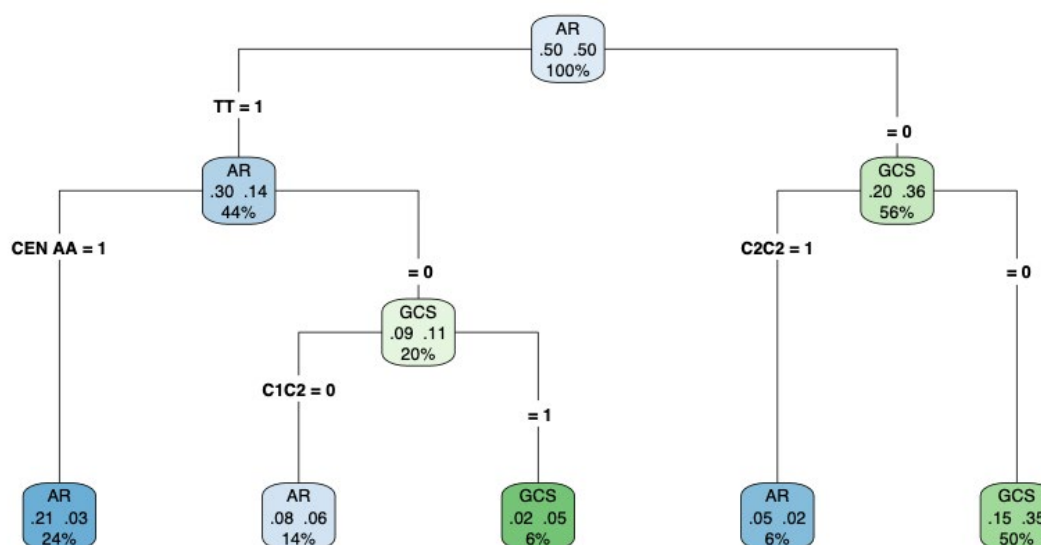


Figura 41. Representación gráfica del algoritmo de decisión mediante un árbol de decisión para los grupos GCS y el Grupo AR.

En color verde se muestra las variables de decisión para el grupo control sano (GCS) y en azul se muestran las variables de decisión que son relevantes a la hora de diagnosticar el grupo abortos de repetición (AR), las variables de más importancia diagnóstica se representan en las ramas más altas y conforme más abajo la importancia disminuye.

Árbol de Decisión – Genes KIR HLA-C y Dimorfismo HLA-B

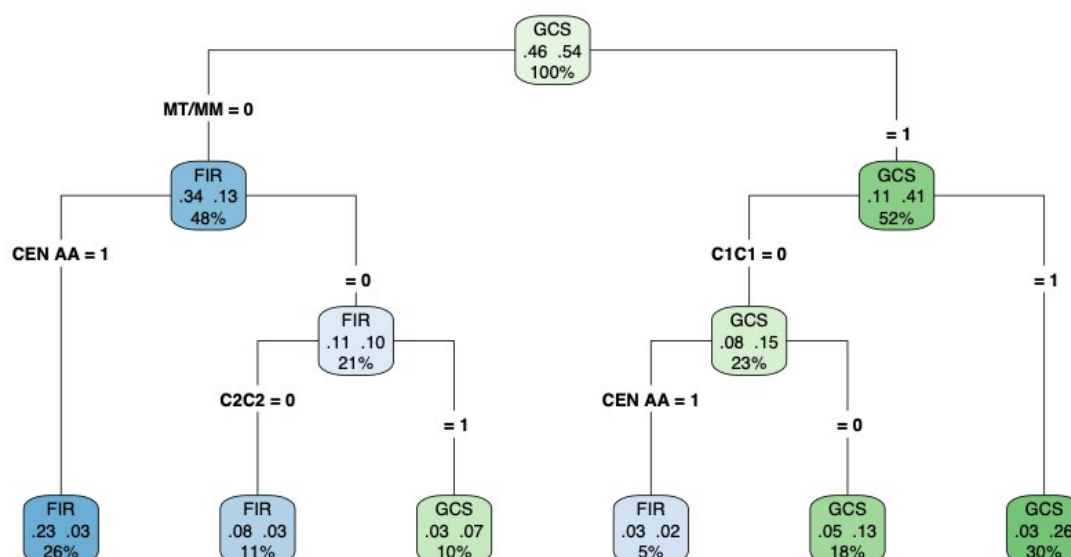


Figura 42. Representación gráfica del algoritmo de decisión mediante un árbol de decisión para los grupos GCS y el Grupo FIR.

En color verde se muestra las variables de decisión para el grupo control sano (GCS) y en azul se muestran las variables de decisión que son relevantes a la hora de diagnosticar el grupo fallo de implantación recurrente (FIR), las variables de más importancia diagnóstica se representan en las ramas más altas y conforme más abajo la importancia disminuye.

La jerarquía de los parámetros más importantes que deben considerarse para un diagnóstico genético de AR y FIR de causa inmunológica, es: el dimorfismo HLA-B en la posición -21. En ambos casos, tener homocigosis para TT es el parámetro más relevante si se compara con un grupo control sano. Posteriormente, el parámetro Cen AA es el segundo nodo variante que definirá estas dos condiciones (figura 41 y 42).

Para definir AR, cuando no existe presencia de homocigosis para TT, los tres parámetros más importantes a tener en cuenta serían, la homocigosis para T, la homocigosis para C2 y la presencia de haplotipo KIR Cen AA (figura 41 y 42).

Para la definición de FIR, cuando no existe presencia de homocigosis para T, los parámetros más importantes a tener en cuenta en FIR son la presencia de homocigosis T, la presencia de haplotipo KIR Cen AA, y la ausencia de HLA-C C1C1 (figura 41 y 42).

Por último, el árbol de decisión que refleja las diferencias por la que se podrían discriminar FIR de AR, se muestra en la figura 43. Se observa que la expresión de NKG2A es la variable más relevante, y cuando se obtiene un resultado mayor al 65% en la membrana de las células NK, se podría discriminar una paciente con abortos de repetición. Además, el segundo de los valores más relevantes, es la expresión de KIR3DL1, un nivel de expresión de KIR3DL1 mayor al 16% será también un parámetro que clasificará la paciente en abortos de repetición.

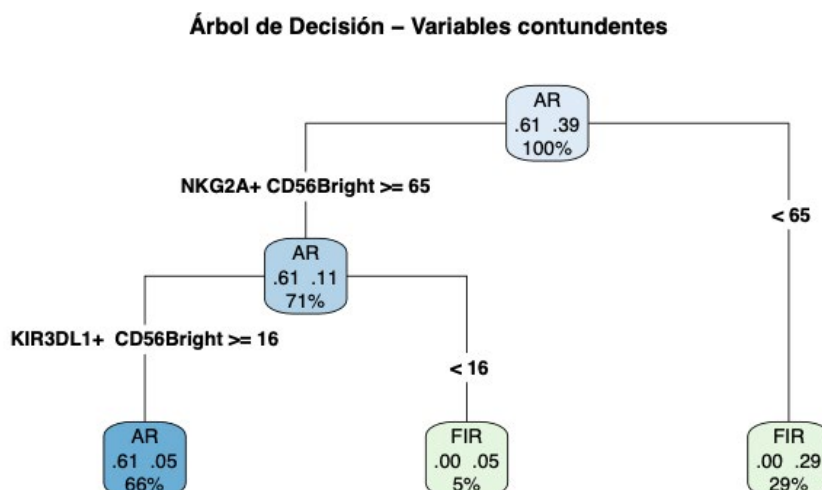


Figura 43. Representación gráfica del algoritmo de decisión mediante un árbol de decisión para los grupos AR y el Grupo FIR.

En color azul se muestra las variables de decisión para el grupo fallo de implantación recurrente (FIR) y en verde se muestran las variables de decisión que son relevantes a la hora de diagnosticar el grupo abortos de repetición (AR), las variables de más importancia diagnóstica se representan en las ramas más altas y conforme más abajo la importancia disminuye.





DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Este trabajo de tesis propone un **algoritmo diagnóstico** preciso basado en la evaluación de biomarcadores inmunológicos en sangre periférica. En particular, se analizan biomarcadores asociados a células NK citotóxicas e inmunomoduladoras, así como biomarcadores genéticos, en concreto, los genes KIR, HLA-C y HLA-B. El objetivo de este estudio es desarrollar una herramienta eficaz que sea útil en la práctica clínica habitual para el diagnóstico diferencial entre AR y FIR de origen inmunológico.

Los receptores inhibitorios en el sistema inmunitario constituyen puntos de control fundamentales para asegurar la correcta función de las células que lo integran. Además de suprimir la activación, estos receptores desempeñan funciones adicionales; al unirse a sus ligandos, preparan y calibran las funciones de las células NK, un fenómeno conocido como **educación** [239]. Las células NK representan la principal población celular del sistema inmunitario involucrada en el adecuado desarrollo del feto durante los primeros meses del embarazo. No obstante, el papel de las interacciones activadoras e inhibitorias que conducen a la educación y a la actividad funcional de estas células ha sido escasamente explorado en este contexto.

Los principales receptores inhibitorios capaces de educar a las células NK son **el receptor CD94/NKG2A**, que se une al antígeno HLA-E [164, 188, 192], y los receptores KIR, que se unen a diferentes moléculas de HLA de clase I, dando mayor importancia al HLA-C. La adecuada educación de las células NK parece ser importante no solo para el desarrollo fetal, sino también para otros mecanismos vitales del organismo, como la respuesta inmunitaria frente a enfermedades (por ejemplo, en el contexto del cáncer) y en trasplantes de células hematopoyéticas en pacientes con malignidades hematológicas. Actualmente, la investigación sobre la educación de las células NK está cobrando importancia en el ámbito de las complicaciones obstétricas [138], si bien sus mecanismos no se conocen completamente.

A medida que la investigación avanza, se considera de gran importancia profundizar en la educación de las células NK y su relación con el FRR, AR y FIR. Los hallazgos de este estudio no solo tienen implicaciones clínicas, sino que también pueden guiar futuras investigaciones hacia un entendimiento más profundo de los biomarcadores inmunológicos y su influencia en la predicción de los resultados en el embarazo.

Una mejor comprensión de la interacción entre los receptores KIR y las moléculas HLA-C podría contribuir significativamente a la personalización de estrategias diagnósticas y terapéuticas para las parejas que enfrentan estos difíciles trastornos reproductivos.

Este trabajo de tesis explora dos vías de interacción de las células NK: la vía de la educación a través de los receptores KIR que hipotetiza que la pérdida de ciertos ligandos específicos podría facilitar la inmunomodulación de las células NK para una correcta gestación. Y, en segundo lugar, la vía de educación a través

del receptor NKG2A, que hipotetiza que la interacción con su ligando específico podría favorecer repuestas más eficaces y funcionalmente mejor desarrolladas.

A continuación, se va a exponer la discusión estructurada en los distintos bloques que se han planteado en el apartado de resultados.

1. BLOQUE I (datos publicados)

En las últimas dos décadas, la investigación en el ámbito del embarazo ha revelado que las mujeres con el genotipo KIR AA se enfrentan a un riesgo significativamente mayor de desarrollar complicaciones obstétricas, siendo la preeclampsia una de las afecciones más estudiadas [93]. Este riesgo también se ha observado en casos de FRR, especialmente cuando el embrión expresa moléculas de HLA-C2 heredadas del padre. Estos hallazgos subrayan la complejidad de la interacción entre el sistema inmunitario materno y el trofoblasto, destacando la necesidad de una comprensión más profunda de estos mecanismos [93].

En la presente tesis, se han validado los resultados comentados [93] y se ha observado que un alto porcentaje de pacientes con FRR presenta una frecuencia notablemente elevada de receptores KIR AA con respecto a la población control, además de un cociente receptor inhibidor/activador que también es significativamente alto. No obstante, se considera que definir este haplotipo según la nomenclatura clásica como el más relevante puede ser impreciso. Esta confusión surge del hecho de que la clasificación de los haplotipos involucra cuatro alelos diferentes: dos en la región centromérica y dos en la telomérica [160]. Esto genera numerosas combinaciones que pueden diluir información crucial para el diagnóstico diferencial del FRR.

La clasificación clásica [160], si bien ha sido validada por los resultados representados en este trabajo, pero podría ocultar detalles importantes sobre los haplotipos que son críticos para el diagnóstico de los pacientes. Una de las contribuciones más significativas de la investigación que se aborda en este trabajo es la insistencia en la necesidad de definir los haplotipos por separado, es decir, en centroméricos y teloméricos, cosa que no desarrollan otros trabajos de la literatura científica. Esta práctica no solo mejorará la identificación de los riesgos asociados, sino que permitirá una evaluación más precisa de los casos de haplotipo KIR AB y sus implicaciones clínicas.

La importancia de esta distinción se centra en el motivo centromérico, donde se localiza *KIR2DL1*, un receptor que ha demostrado tener una fuerte capacidad inhibidora al unirse al HLA-C2 del trofoblasto, y cuya asociación con el FRR es bien documentada. Al considerar el análisis del haplotipo CenAA, podemos identificar un biomarcador que tiene el potencial de ser decisivo en la práctica clínica [160]. Ignorar este aspecto podría resultar en la pérdida de más del 10% de los pacientes que poseen este haplotipo significativo.

Además, al estudiar los grupos de AR y FIR por separado, los resultados han mostrado similitudes que sugieren que un análisis exhaustivo en ambos trastornos podría ser altamente beneficioso en la identificación de pacientes con fallo gestacional de causa aloinmune. Esta dualidad en el enfoque puede proporcionar una visión más completa y facilitar la identificación de patrones que podrían pasar desapercibidos al considerar los trastornos de manera aislada, este abordaje no se desarrolla en las publicaciones mencionadas anteriormente [93, 160].

El análisis que se ha realizado sobre HLA-C, alineada con estudios previos, ha revelado un aumento significativo del alelo HLA-C2 paterno en el grupo de FIR. Aunque el aumento es menos marcado en el grupo de abortos de repetición, sigue siendo significativo. Un estudio que analizó cerca de 700 transferencias de un único embrión euploide ha demostrado que no considerar las combinaciones HLA-C KIR puede incrementar el riesgo de pérdida gestacional en hasta un 50%. En ese contexto, las mujeres con KIR AA y embriones HLA-C2C2 mostraron un riesgo de aborto significativamente mayor, validado por numerosos estudios [93].

En los resultados del trabajo que se aborda, las pacientes con FIR, que también se someten a transferencias, podrían estar enfrentando un riesgo elevado debido a la presencia del HLA-C2 paterno, lo que sugiere que esta combinación debe ser considerada en la toma de decisiones clínicas. La segunda contribución importante es la necesidad de evaluar la incongruencia HLA-C-KIR en los grupos de pacientes.

Además, en el GCS, se observó una frecuencia significativamente alta de HLA-C1. Al analizar las combinaciones de HLA-C, encontramos que en presencia del haplotipo KIR Cen AA, la frecuencia de HLA-C1 era significativamente mayor. Estos hallazgos subrayan la relevancia crítica de estudiar la incongruencia HLA-C-KIR, un aspecto que no debe pasarse por alto al tomar decisiones clínicas.

Otra aportación de este trabajo es la matriz de combinaciones entre KIR materno y HLA-C de la pareja, lo que se ha denominado como código inmunológico de la gestación. Se sugiere que la combinación de HLA-C1 con KIR CenAA podría ofrecer una protección significativa, lo que resulta especialmente valioso en contextos como la fecundación in vitro o la ovodonación. Esta sinergia podría ser clave para aumentar las tasas de éxito reproductivo, proporcionando una base sólida para personalizar los enfoques en tratamientos de fertilidad. También se resalta en este trabajo de tesis la relevancia del haplotipo CenBB como uno significativamente presentes en el grupo control, por lo que la presencia de este haplotipo podría ser un signo de protección a tener en cuenta en el FRR, incluyendo tanto AR como FIR.

Estas combinaciones refieren que sí que podría ser importante la interacción y educación que las células NK sufren a través de la interacción con los ligandos que el EVT fetal porta.

La comprensión de la función de las células NK a través de una mezcla de señales activadoras e inhibitorias, podría una visión más profunda sobre el comportamiento inmunológico durante el embarazo y conducir a intervenciones más efectivas en pacientes que sufren de FRR de causa inmunológica.

Por lo tanto, este trabajo de tesis pretende reflejar la importancia de que se preste atención a la incongruencia HLA-C-KIR en la práctica clínica. El estudio HLA-C/KIR no solo se puede mejorar la atención a las pacientes, sino también contribuir a un avance significativo en el campo de la medicina reproductiva.

2. BLOQUE II

2.1. Estudio genético de genes KIR, HLA-C y dimorfismo HLA-B en posición -21

El siguiente paso en este proyecto de investigación fue determinar si se podía identificar alguna combinación genética de la propia paciente que sirviera como biomarcador de riesgo para el FIR y el AR, lo que daría importancia a la necesidad de una previa educación que las células NK sufren por los propios ligandos de la paciente. Este análisis se fundamenta en la hipótesis de la pérdida de ligando KIR inhibitorio, ampliamente reconocida en el contexto del trasplante de células hematopoyéticas en pacientes con malignidades hematológicas. Esta hipótesis, respaldada por Leung et al. [240], postula que la ausencia de un ligando específico para un receptor KIR inhibitorio puede comprometer la respuesta inmunitaria de las células NK, lo cual es fundamental para mantener la homeostasis inmunológica durante el embarazo.

Este trabajo de tesis, está centrado en algunos de los genes KIR inhibitorios más estudiados y relevantes, incluyendo *KIR2DL1*, *KIR2DL2/3* y *KIR3DL1*, junto con sus respectivos ligandos: HLA-C2, HLA-C1 y HLA-Bw4. En estos resultados se observa que, en el grupo GCS presenta una destacada ausencia de ligandos específicos para *KIR2DL1* (HLA-C2), lo que podría interpretarse como un marcador de protección. En contraste, en los grupos de fallo reproductivo y aborto recurrente, observamos un aumento en la ausencia de ligandos específicos para los genes *KIR2DL2/3* y *KIR3DL1* (HLA-C1 y HLA-Bw4), sugiriendo que estas combinaciones podrían ser utilizadas como marcadores de riesgo.

Por lo tanto, la tercera contribución pretende resaltar la importancia de considerar la ausencia de HLA-C1 y HLA-Bw4 en relación con los genes *KIR2DL2/3* y *KIR3DL1* como biomarcadores de riesgo en el diagnóstico de AR y FIR.

Resumiendo, los hallazgos sobre la educación de las células NK a través de los receptores KIR, se propone que el análisis genético del haplotipo CenAA se considere como un biomarcador de riesgo efectivo para el diagnóstico de AR y FIR. Otro de los factores que se considera relevante es el análisis específico de HLA-C, especialmente HLA-C2, en presencia de CenAA. Por último, la evaluación de la ausencia de ligandos C1 para *KIR2DL2/3* y Bw4 para *KIR3DL1* podría ser una buena estrategia diagnóstica si se integrara en el análisis. Todos estos biomarcadores pueden ofrecer una visión más completa y precisa de los riesgos asociados con estos trastornos obstétricos.

2.2. Estudio de la expresión de los receptores KIR y NKG en las células NK

El receptor NKG2A se ha identificado como un componente esencial en la educación óptima de las dNK en modelos murinos [138]. Su ausencia no solo compromete la funcionalidad de estas células, sino que también repercute significativamente en la dinámica vascular útero-placentaria, el crecimiento fetal y el desarrollo cerebral. Por lo tanto, la correcta interacción de NKG2A con su ligando específico es crucial para el éxito obstétrico.

En este trabajo de tesis, se ha explorado el dimorfismo en la posición -21 de la secuencia líder HLA-B, que codifica para treonina o metionina [136, 183]. Los resultados revelaron que la homocigosis para la variante T se presenta en un 55-65% de las pacientes con AR y FIR, en comparación con un 30% en el grupo control. Este hallazgo es fundamental, ya que los individuos homocigotos para T no pueden proporcionar péptidos funcionales para HLA-E, lo que reduce su capacidad funcional [183]. En modelos murinos, se ha demostrado que el entorno materno ejerce un papel crítico en la educación de estas células [241], mientras que el HLA-C fetal, al unirse a KIR2DL1, puede estar relacionado con un bajo peso al nacer y un aumento en el riesgo de preeclampsia. Sin embargo, la vía de educación de las células NK mediada por HLA-B, HLA-E y NKG2A sigue siendo un área poco explorada.

Además, estudios recientes [138] han indicado que la variante -21T de HLA-B confiere un riesgo del 7% de desarrollar preeclampsia. Esto sugiere que el dimorfismo M/T y M/M determina una mayor expresión de HLA-E en la membrana, lo que favorece la educación de las células NK a través de NKG2A.

Un aspecto innovador de esta investigación fue el análisis combinado de la genética del dimorfismo de HLA-B junto con los receptores KIR inhibitorios (KIR2DL1, KIR2DL2/3 y KIR3DL1) y su ausencia de ligandos específicos (HLA-C2, HLA-C1 y HLA-Bw4, respectivamente). Este enfoque no había sido previamente investigado en el contexto reproductivo. La combinación de la falta de ligando para estos receptores, junto con la homocigosis T en HLA-B, se presenta como un prometedor marcador de riesgo para el diagnóstico de AR y FIR. Tanto la función de la NK modificada por la vía KIR como por la vía NKG2A, sugiere que las células NK de estas pacientes podrían estar experimentando una educación aberrante, lo que podría desestabilizar los procesos inflamatorios durante el embarazo.

Los estudios genética independientes de otros análisis no son suficiente para caracterizar para discriminar AR de FIR, sin embargo, sí que permiten la diferenciación de estas dos patologías del GCS..

Este estudio sobre los receptores KIR y NKG2A en las células NK de sangre periférica como biomarcadores de riesgo es pionero en el contexto de fallo reproductivo recurrente. Conociendo que NKG2A está presente en un 95% de las células NK uterinas durante los primeros meses de embarazo, se convierte en un receptor clave para la educación y el desarrollo adecuado del embarazo, junto con los receptores KIR.

Los resultados obtenidos bajos los perfiles genéticos de interacción de receptores KIR y sus ligandos HLA-C, y el dimorfismo en HLA-B, se decidió seguir el proyecto mediante estudio de la expresión de los receptores en la membrana de las células NK CD56^{Bright} y CD56^{DIM} CD16+, para observar si existe algún nexo entre la genética y su expresión. Utilizando citometría de flujo multiparamétrica, se analizó la expresión de NKG2A, KIR2DL1, KIR3DL1 y NKG2C, y comparamos los niveles de expresión en los grupos de FRR, AR y FIR con el grupo control sano. Aunque algunas diferencias significativas se observaron entre el grupo control y el grupo AR, lo que más llamó la atención fueron las diferencias entre los grupos AR y FIR, lo que sugiere que estas alteraciones en la expresión de receptores podrían ser clave para distinguir inmunológicamente entre estos dos trastornos.

Los hallazgos más destacados de este trabajo de tesis fueron en el estudio de las células NK modulatoras CD56^{Bright}, donde la expresión del receptor NKG2A emergió como un biomarcador significativo de riesgo para el grupo AR. Este receptor mostró una expresión significativamente aumentada en comparación con el GCS y con el grupo FIR. Este incremento podría explicarse por la falta de ligando específico HLA-E, actuando como una respuesta compensatoria a la homocigosis para T en la posición -21 de HLA-B, que impide que HLA-E se exprese adecuadamente en la membrana.

Este hallazgo está respaldado por la investigación de Sheereve et al. [138], que sugiere que la ausencia de ligando específico para NKG2A podría estar relacionada con el desarrollo de complicaciones obstétricas como la preeclampsia. La relevancia de este aumento en el grupo AR, pero no en el FIR, sugiere que los mecanismos fisiopatológicos de pérdida del embrión son distintos. En el caso del AR, el feto logra implantarse, pero la pérdida ocurre posteriormente, posiblemente debido a una respuesta inmunológica desfavorable. Por el contrario, las pacientes con FIR no logran la implantación del embrión, lo que indica que la educación y funcionalidad de las células NK podrían no ser tan críticas en su caso.

Otro marcador notable es KIR3DL1, cuya expresión también se incrementó en las células NK del grupo AR. Este receptor presenta un comportamiento dosis-dependiente, ya que su expresión en membrana aumenta en presencia de la doble dosis de su ligando específico Bw4. En el grupo FIR, en cambio, los niveles de KIR3DL1 permanecen estables. Este hallazgo es relevante, dado que todos los alotipos de HLA-B contienen epítomos Bw4 o Bw6, y solo Bw4 actúa como ligando para KIR3DL1, un estudio de [242] encontró una mayor frecuencia de KIR3DL1 en pacientes con complicaciones obstétricas cuando Bw4 estaba presente, lo que contrasta con los análisis genéticos representados en este trabajo; muestran una menor frecuencia de ligando Bw4 en las poblaciones AR y FIR. Sin embargo, la expresión de KIR3DL1 sí se incrementa en presencia de Bw4, lo que sugiere que este proceso de educación podría tener un papel aún no completamente entendido en el grupo AR.

Por lo tanto, una de las contribuciones importante de este trabajo es la sugerencia de considerar la expresión de NKG2A y KIR3DL1 en las células NK moduladoras CD56^{Bright} como parámetros diferenciadores entre los grupos AR y FIR. Estos resultados subrayan la importancia de una evaluación detallada de la expresión de receptores en el contexto del fallo reproductivo.

Finalmente, con el objetivo de facilitar la interpretación los hallazgos, hemos desarrollado un algoritmo que permite diferenciar entre el grupo control sano y los grupos FIR y AR. Este algoritmo integra tanto análisis genéticos como de expresión de receptores en células NK, configurando así una herramienta valiosa para el diagnóstico y la toma de decisiones clínicas en el manejo de estas patologías.

Este enfoque no solo proporciona una base científica sólida para la identificación de marcadores de riesgo, sino que también abre nuevas vías para intervenciones clínicas que podrían mejorar las tasas de éxito reproductivo en pacientes con antecedentes de complicaciones obstétricas.

3. Estudio de diseño algorítmico

Al abordar el diagnóstico de pacientes con AR o FIR, se propone seguir un enfoque sistemático que incorpore tanto análisis genéticos como estudios de expresión de receptores en células NK. Este enfoque integral no solo permite identificar biomarcadores de riesgo, sino que también ayuda a personalizar la estrategia clínica para cada paciente.

Primer Paso: Análisis Genético

El primer paso que se propone para el diagnóstico es un estudio genético que evalúe biomarcadores de riesgo clave. Esto incluye:

1. **Homocigosis para T en HLA-B:** la presencia de esta variante se ha asociado con una menor capacidad para presentar péptidos funcionales a las células NK [138], lo que puede comprometer la educación y funcionalidad de estas células durante el embarazo.
2. **Análisis de HLA-C:** es crucial identificar la presencia de moléculas HLA-C2, ya que su ausencia en combinación con ciertos haplotipos KIR, como KIR Cen AA, se ha relacionado con un aumento en el riesgo de complicaciones obstétricas. Estos hallazgos respaldan la necesidad de un enfoque genético detallado para evaluar el riesgo de AR y FIR.
3. **Evaluación del haplotipo KIR Cen AA:** Este haplotipo ha demostrado ser un factor de riesgo significativo, y su identificación puede ser determinante en la gestión clínica.

Segundo Paso: Estudio de Citometría de Flujo

En segundo lugar, se propone un análisis mediante citometría de flujo que se centra en la expresión de receptores en células NK CD56^{Bright}, para la discriminación de AR y FIR. En particular, dos receptores han mostrado ser indicadores clave:

1. **NKG2A:** Un nivel de expresión superior al 65% en células NK moduladoras puede indicar un riesgo elevado de AR (resultados anteriormente representados). Este aumento sugiere una respuesta compensatoria a la falta de ligando HLA-E, lo que podría afectar negativamente la funcionalidad de las células NK y, por ende, la viabilidad del embarazo.
2. **KIR3DL1:** Una expresión superior al 16% en estas células también es un marcador relevante (resultados anteriormente). Este receptor es dosis-dependiente y su aumento en presencia de su ligando Bw4 puede ser indicativo de una educación adecuada de las células NK en el contexto de AR.

El estudio de la expresión de receptores complementa y el análisis genético, podría proporcionar una visión más completa del estado inmunológico de la paciente.

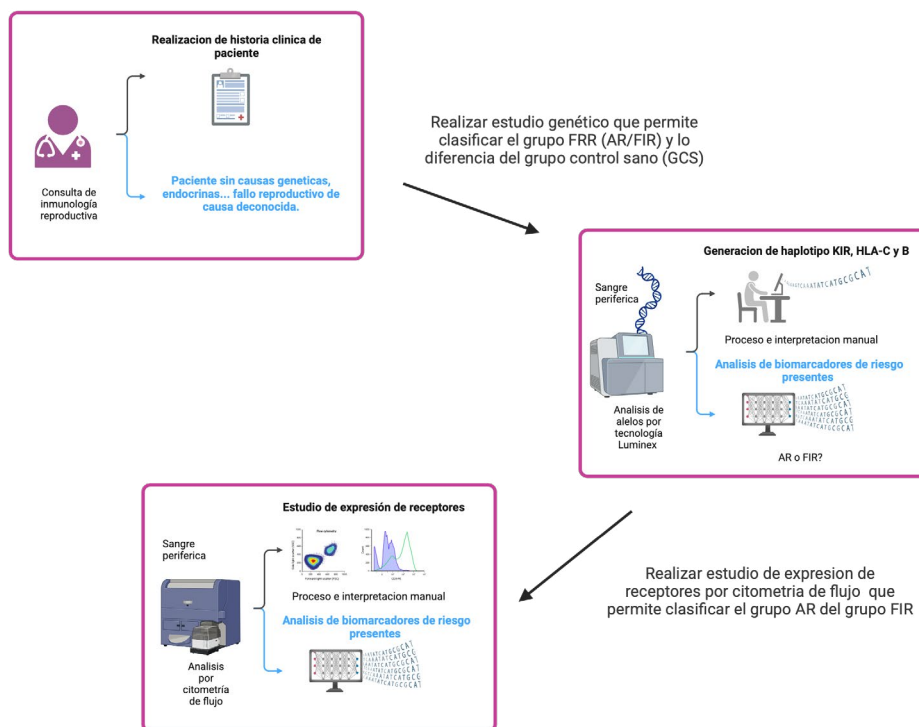


Figura 44. Protocolo de obtención de resultados para el diagnóstico diferencial de pacientes. Creado en BioRender. Gil, R. (2024) <https://BioRender.com/h071469>

A lo largo de esta investigación, se han observado evidencias en la importancia de evaluar tanto los aspectos genéticos como los fenotípicos de las células NK, en particular sus receptores inhibitorios y moduladores, para identificar biomarcadores que puedan predecir el riesgo de estas complicaciones obstétricas.

La identificación de la homocigosis para el alelo T en HLA-B y la presencia del haplotipo KIR Cen AA como factores de riesgo, junto con el análisis de la expresión de receptores como NKG2A y KIR3DL1 en células NK moduladoras CD56^{Bright}, resalta la complejidad de las interacciones inmunológicas en el contexto del embarazo. Estos hallazgos sugieren que la educación adecuada de las células NK es fundamental no solo para la implantación, sino también para el mantenimiento del embarazo. La evidencia de que un aumento de NKG2A se correlaciona con complicaciones en el grupo de AR, mientras que KIR3DL1 presenta un comportamiento dosis-dependiente, proporciona un marco para entender cómo las variaciones en la expresión de estos receptores pueden influir en el resultado obstétrico.

Además, el contraste entre los perfiles genéticos y los de expresión en los grupos de AR y FIR indica que las causas subyacentes de estas condiciones pueden ser distintas, lo que subraya la necesidad de un enfoque personalizado en el diagnóstico y tratamiento. La implementación de un algoritmo que combine tanto la evaluación genética como la citometría de flujo para analizar los receptores NK puede revolucionar la forma en que se abordan estos trastornos, permitiendo a los clínicos tomar decisiones más informadas y dirigidas.

En conclusión, esta investigación no solo aporta nuevos conocimientos sobre los biomarcadores de riesgo en AR y FIR, sino que también subraya la importancia de una evaluación integral que considere múltiples factores en la salud reproductiva. A medida que se avanza en este campo, es importante profundizar en las interacciones complejas entre el sistema inmunitario y la biología del embarazo, con el objetivo de mejorar los resultados para las pacientes que enfrentan estos desafiantes trastornos reproductivos. Mediante un enfoque más matizado y basado en la evidencia, se podrá contribuir a una mayor tasa de éxito en los tratamientos reproductivos.

Limitaciones del estudio

A lo largo de esta investigación, se han abordado aspectos que podrían ser importantes para comprensión de los mecanismos subyacentes al AR y el FIR, destacando la relevancia de biomarcadores genéticos y la expresión de receptores en células NK de sangre periférica. Sin embargo, es fundamental reconocer las limitaciones que han influido en nuestros hallazgos y que podrían afectar la interpretación de los resultados.

La **principal limitación** de este estudio es el tamaño muestral, especialmente en el Grupo FIR y en el GCS. La dificultad para clasificar adecuadamente a las pacientes con FIR se debe a la cantidad de variables de las que se dispone y la variación en su presentación clínica. La conformación del grupo control sano se vio obstaculizada por criterios de inclusión estrictos, requiriendo mujeres con al menos dos hijos recién nacidos vivos sin complicaciones gestacionales. Esta exigencia limitó la capacidad de obtener un grupo control con fertilidad probada y edad comparable al grupo de estudio, potencialmente afectando la solidez de las comparaciones realizadas.

Otra limitación relevante es la **homogeneidad de los datos**. La elevada cantidad de variables en estudio dificultó la obtención de una población completamente homogénea. A pesar de los esfuerzos por minimizar los casos perdidos y homogeneizar la muestra, es probable que la diversidad en las características de los participantes haya introducido variabilidad en los resultados. Esta heterogeneidad podría haber influido en la interpretación de los biomarcadores y su asociación con AR y FIR.

Se enfatiza la importancia de realizar una validación posterior de los datos obtenidos en cohortes similares. Es fundamental verificar la fiabilidad de los biomarcadores identificados y los porcentajes de clasificación mediante estudios adicionales de mayor envergadura. La validación de estos hallazgos en cohortes más amplias y diversas contribuirá a fortalecer la evidencia sobre la utilidad clínica de los biomarcadores propuestos, facilitando su implementación efectiva en la práctica clínica.

Perspectivas futuras

Este estudio ha facilitado una profundización en la identificación de marcadores relevantes en dos patologías obstétricas críticas: AR y FIR. Mediante el análisis de los genes KIR, HLA-B y HLA-C, utilizando la tecnología Luminex, y la evaluación de la expresión de receptores en células NK a través de citometría de flujo, se ha establecido una base para el desarrollo de un algoritmo diagnóstico. Este algoritmo podría contribuir a la identificación de patrones específicos en pacientes afectadas por estas patologías.

No obstante, se reconoce que la robustez de nuestros resultados podría ser fortalecida mediante un incremento en el tamaño de la muestra, especialmente en el grupo de FIR y en el GCS. La dificultad para clasificar adecuadamente a las pacientes con FIR ha representado un desafío significativo, lo que pone de manifiesto la necesidad de establecer criterios de inclusión más claros y homogéneos. Además, la obtención de controles con fertilidad comprobada, específicamente aquellas que han tenido al menos dos hijos vivos sin complicaciones, ha complicado el proceso de selección.

En lo que respecta a la homogeneidad de los datos, se han realizado esfuerzos significativos para minimizar el número de casos perdidos; sin embargo, la diversidad de las variables estudiadas continúa representando un desafío. La validación posterior de nuestros hallazgos es fundamental, no solo para corroborar la utilidad de los marcadores identificados, sino también para determinar su aplicabilidad en el ámbito clínico.

Se considera esencial realizar un seguimiento longitudinal de la expresión de los receptores en las células natural killer (NK) a lo largo de cada trimestre del embarazo. Esta metodología permitirá observar posibles cambios dinámicos en la expresión y su correlación con el estado del embarazo. Además, se propone investigar los efectos de diferentes fármacos en cultivos celulares de células NK, comparando los resultados obtenidos con aquellos de pacientes sanos. Este enfoque podría proporcionar información valiosa sobre la influencia de los tratamientos en la función de estas células durante la gestación.

Asimismo, la exploración de la evaluación de células NK uterinas a partir de sangre menstrual podría proporcionar una perspectiva única sobre las diferencias entre las células NK moduladoras en sangre periférica y aquellas que residen en el endometrio. Mediante el uso de citometría de flujo y cultivos celulares, se buscará corroborar que los marcadores analizados en sangre periférica se asocian con los presentes en el tejido endometrial. Este hallazgo podría tener importantes implicaciones para la comprensión de la inmunología reproductiva.

En conclusión, este estudio no solo establece una propuesta para el diagnóstico de AR y FIR, sino que también abre la posibilidad de realizar futuras investigaciones que podrían transformar la comprensión y el manejo de estas complejas condiciones obstétricas.





CONCLUSIONES

Conclusiones

Esta investigación subraya la complejidad de las interacciones inmunológicas durante el embarazo y proporciona nuevas perspectivas para el diagnóstico y manejo del AR y FIR. Los hallazgos sugieren que:

1. El haplotipo KIR Cen AA es un biomarcador de riesgo significativo para el diagnóstico de AR y FIR.
2. La presencia del alelo HLA-C2 paterno aumenta el riesgo de FIR y, en menor medida, de AR.
3. La ausencia de ligandos HLA-C1 para el gen *KIR2DL2/3* y HLA-Bw4 para el gen *KIR3DL1* se identifica como un marcador de riesgo para AR y FIR.
4. El haplotipo CenBB se presenta como un posible factor protector contra el FRR.
5. La homocigosis para la variante T en la posición -21 de HLA-B se observa en un 55-65% de pacientes con AR y FIR, comparado con un 30% en controles.
6. La combinación de la falta de ligandos para genes *KIR2DL2/3* y la homocigosis T en HLA-B se propone como un marcador de riesgo prometedor para AR y FIR.
7. Los resultados genéticos, aunque diferencian entre controles y pacientes, no logran distinguir efectivamente entre AR y FIR, sugiriendo que la genética por sí sola es insuficiente para caracterizar estas entidades como diferentes.
8. El estudio por citometría de flujo de NKG2A y KIR3DL1 en células NK moduladoras en sangre periférica podría ser un buen biomarcador para el diagnóstico diferencial de AR y FIR.





BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. BROSENS, I., PIJNENBORG, R., VERCRUYSE, L., & ROMERO, R. (2011). THE “GREAT OBSTETRICAL SYNDROMES” ARE ASSOCIATED WITH DISORDERS OF DEEP PLACENTATION. *AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY*, 204(3), 193–201. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.AJOG.2010.08.009](https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.08.009)
2. CARTER, A. M., & ENDERS, A. C. (2004). COMPARATIVE ASPECTS OF TROPHOBLAST DEVELOPMENT AND PLACENTATION. *REPRODUCTIVE BIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY : RB&E*, 2, 46. [HTTPS://DOI.ORG/10.1186/1477-7827-2-46](https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-46)
3. SCHLAFKE, S., & ENDERS, A. C. (1975). CELLULAR BASIS OF INTERACTION BETWEEN TROPHOBLAST AND UTERUS AT IMPLANTATION. *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 12(1), 41–65. [HTTPS://DOI.ORG/10.1095/BIOLREPROD12.1.41](https://doi.org/10.1095/biolreprod12.1.41)
4. HERTIG, A. T., ROCK, J., & ADAMS, E. C. (1956). A DESCRIPTION OF 34 HUMAN OVA WITHIN THE FIRST 17 DAYS OF DEVELOPMENT. *THE AMERICAN JOURNAL OF ANATOMY*, 98(3), 435–493. [HTTPS://DOI.ORG/10.1002/AJA.1000980306](https://doi.org/10.1002/aja.1000980306)
5. PIJNENBORG, R. AND VERCRUYSE, L. (2013). A.A.W. HUBRECHT AND THE NAMING OF THE TROPHOBLAST. *PLACENTA* 34, 314-319. DOI:10.1016/J.PLACENTA.2013.01.002
6. MOFFETT, A., & LOKE, C. (2006). IMMUNOLOGY OF PLACENTATION IN EUTHERIAN MAMMALS. *NATURE REVIEWS. IMMUNOLOGY*, 6(8), 584–594. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NRI1897](https://doi.org/10.1038/NRI1897)
7. ROOPENIAN, D., AKILESH, S. FcRN: THE NEONATAL Fc RECEPTOR COMES OF AGE. *NAT REV IMMUNOL* 7, 715–725 (2007). [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NRI2155](https://doi.org/10.1038/NRI2155)
8. JENNEWEIN, M. F., GOLDFARB, I., DOLATSHAHI, S., COSGROVE, C., NOELETTE, F. J., KRYKBAEVA, M., DAS, J., SARKAR, A., GORMAN, M. J., FISCHINGER, S., BOUDREAU, C. M., BROWN, J., COOPERRIDER, J. H., ANEJA, J., SUSCOVICH, T. J., GRAHAM, B. S., LAUER, G. M., GOETGHEBUER, T., MARCHANT, A., LAUFFENBURGER, D., ... ALTER, G. (2019). Fc GLYCAN-MEDIATED REGULATION OF PLACENTAL ANTIBODY TRANSFER. *CELL*, 178(1), 202–215.e14. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.CELL.2019.05.044](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.044)
9. SIMPSON, R. A., MAYHEW, T. M. AND BARNES, P. R. (1992). FROM 13 WEEKS TO TERM, THE TROPHOBLAST OF HUMAN PLACENTA GROWS BY THE CONTINUOUS RECRUITMENT OF NEW PROLIFERATIVE UNITS: A STUDY OF NUCLEAR NUMBER USING THE DISECTOR. *PLACENTA* 13, 501-512. DOI:10.1016/0143-4004(92)90055-X
10. BENIRSCHKE, K., BURTON, G. J. AND BAERGEN, R. N. (2012). *PATHOLOGY OF THE HUMAN PLACENTA*, 6TH EDN. BERLIN: SPRINGER

11. VELICKY, P., MEINHARDT, G., PLESSL, K., VONDRA, S., WEISS, T., HASLINGER, P., LENDL, T., AUMAYR, K., MAIRHOFER, M., ZHU, X., SCHÜTZ, B., HANNIBAL, R. L., LINDAU, R., WEIL, B., ERNERUDH, J., NEESEN, J., EGGER, G., MIKULA, M., RÖHRL, C., URBAN, A. E., ... POLLHEIMER, J. (2018). GENOME AMPLIFICATION AND CELLULAR SENESCENCE ARE HALLMARKS OF HUMAN PLACENTA DEVELOPMENT. *PLOS GENETICS*, 14(10), e1007698. [HTTPS://DOI.ORG/10.1371/JOURNAL.PGEN.1007698](https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1007698)
12. PIJNENBORG R, DIXON G, ROBERTSON WB, BROSENS I (1980) TROPHOBLASTIC INVASION OF HUMAN DECIDUA FROM 8 TO 18 WEEKS OF PREGNANCY. *PLACENTA* 1:3–19
13. PIJNENBORG R, VERCRUYSE L, HANSSSENS M (2006) THE UTERINE SPIRAL ARTERIES IN HUMAN PREGNANCY: FACTS AND CONTROVERSIES. *PLACENTA* 27:939–958
14. BROSENS, I., ROBERTSON, W. B., & DIXON, H. G. (1967). THE PHYSIOLOGICAL RESPONSE OF THE VESSELS OF THE PLACENTAL BED TO NORMAL PREGNANCY. *THE JOURNAL OF PATHOLOGY AND BACTERIOLOGY*, 93(2), 569–579. [HTTPS://DOI.ORG/10.1002/PATH.1700930218](https://doi.org/10.1002/PATH.1700930218)
15. MOFFETT, A., CHAZARA, O., & COLUCCI, F. (2017). MATERNAL ALLO-RECOGNITION OF THE FETUS. *FERTILITY AND STERILITY*, 107(6), 1269–1272. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.FERTNSTERT.2017.05.001](https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2017.05.001)
16. POLLHEIMER, J., VONDRA, S., BALTAYEVA, J., BERISTAIN, A. G., & KNÖFLER, M. (2018). REGULATION OF PLACENTAL EXTRAVILLOUS TROPHOBLASTS BY THE MATERNAL UTERINE ENVIRONMENT. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY*, 9, 2597. [HTTPS://DOI.ORG/10.3389/FIMMU.2018.02597](https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.02597)
17. BOYD, J. D. AND HAMILTON, W. J. (1970). *THE HUMAN PLACENTA*. W. HEFFER & SONS LTD
18. BURTON, G. J., JAUNIAUX, E., & WATSON, A. L. (1999). MATERNAL ARTERIAL CONNECTIONS TO THE PLACENTAL INTERVILLOUS SPACE DURING THE FIRST TRIMESTER OF HUMAN PREGNANCY: THE BOYD COLLECTION REVISITED. *AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY*, 181(3), 718–724. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0002-9378\(99\)70518-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(99)70518-1)
19. HUSTIN, J., & SCHAAPS, J. P. (1987). ECHOGRAPHIC [CORRECTED] AND ANATOMIC STUDIES OF THE MATERNOTROPHOBLASTIC BORDER DURING THE FIRST TRIMESTER OF PREGNANCY. *AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY*, 157(1), 162–168. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0002-9378\(87\)80371-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(87)80371-X)
20. COLECTIVA, A. (2022B). XXVIII LECCIONES EN SALUD SOCIAL Y AMBIENTAL. [HTTPS://DOI.ORG/10.59466/LC00122CS0002](https://doi.org/10.59466/LC00122CS0002)
21. GREEN-TOP GUIDELINE. THE INVESTIGATION AND TREATMENT OF COUPLES WITH RECURRENT FIRST-TRIMESTER AND SECOND-TRIMESTER MISCARRIAGE. 2011

22. KOLTE, A. M., BERNARDI, L. A., CHRISTIANSEN, O. B., QUENBY, S., FARQUHARSON, R. G., GODDIJN, M., STEPHENSON, M. D., & ESHRE SPECIAL INTEREST GROUP, EARLY PREGNANCY (2015). TERMINOLOGY FOR PREGNANCY LOSS PRIOR TO VIABILITY: A CONSENSUS STATEMENT FROM THE ESHRE EARLY PREGNANCY SPECIAL INTEREST GROUP. HUMAN REPRODUCTION (OXFORD, ENGLAND), 30(3), 495–498. [HTTPS://DOI.ORG/10.1093/HUMREP/DEU299](https://doi.org/10.1093/humrep/deu299)
23. GRUPO DE TRABAJO DE FRACASO REPRODUCTIVO. RECOMENDACIONES PARA EL MANEJO DEL ABORTO RECURRENTE. SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FERTILIDAD. 2019. 1–22 p.
24. EGERUP, P., KOLTE, A. M., LARSEN, E. C., KROG, M., NIELSEN, H. S., & CHRISTIANSEN, O. B. (2016). RECURRENT PREGNANCY LOSS: WHAT IS THE IMPACT OF CONSECUTIVE VERSUS NON-CONSECUTIVE LOSSES?. HUMAN REPRODUCTION (OXFORD, ENGLAND), 31(11), 2428–2434. [HTTPS://DOI.ORG/10.1093/HUMREP/DEW169](https://doi.org/10.1093/humrep/dew169)
25. PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE (2012). EVALUATION AND TREATMENT OF RECURRENT PREGNANCY LOSS: A COMMITTEE OPINION. FERTILITY AND STERILITY, 98(5), 1103–1111. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.FERTNSTERT.2012.06.048](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.048)
26. EL HACHEM, H., CREPAUX, V., MAY-PANLOUP, P., DESCAMPS, P., LEGENDRE, G., & BOUET, P. E. (2017). RECURRENT PREGNANCY LOSS: CURRENT PERSPECTIVES. INTERNATIONAL JOURNAL OF WOMEN'S HEALTH, 9, 331–345. [HTTPS://DOI.ORG/10.2147/IJWH.S100817](https://doi.org/10.2147/IJWH.S100817)
27. KWAK-KIM J. (2012). CLINICAL REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY IN CRITICAL DEMAND. AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY (NEW YORK, N.Y. : 1989), 67(4), 267. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/J.1600-0897.2012.01125.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2012.01125.x)
28. SHUFARO, Y., & SCHENKER, J. G. (2011). IMPLANTATION FAILURE, ETIOLOGY, DIAGNOSIS AND TREATMENT. INTERNATIONAL JOURNAL OF INFERTILITY AND FETAL MEDICINE, 2(1), 1-7. [HTTPS://DOI.ORG/10.5005/JIP-JOURNALS-10016-1009](https://doi.org/10.5005/JIP-JOURNALS-10016-1009)
29. DE GINECOLOGÍA SE. ESTUDIO DEL FALLO REPETIDO DE IMPLANTACIÓN Y SUS POSIBLES ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS (2017). PROGRESOS DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA: REVISTA OFICIAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA 2018; 61(3): 299-313
30. SHAULOV, T., SIERRA, S., & SYLVESTRE, C. (2020). RECURRENT IMPLANTATION FAILURE IN IVF: A CANADIAN FERTILITY AND ANDROLOGY SOCIETY CLINICAL PRACTICE GUIDELINE. REPRODUCTIVE BIOMEDICINE ONLINE, 41(5), 819–833. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.RBMO.2020.08.007](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.08.007)
31. BUSNELLI, A., RESCHINI, M., CARDELLICCHIO, L., VEGETTI, W., SOMIGLIANA, E., & VERCELLINI, P. (2020). HOW COMMON IS REAL REPEATED IMPLANTATION FAILURE? AN INDIRECT ESTIMATE OF THE PREVALENCE. REPRODUCTIVE BIOMEDICINE ONLINE, 40(1), 91–97. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.RBMO.2019.10.014](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.10.014)

32. KOLANSKA, K., BENDIFALLAH, S., COHEN, J., PLACAIS, L., SELLERET, L., JOHANET, C., SUNER, L., DELHOMMEAU, F., CHABBERT-BUFFET, N., DARAI, E., ANTOINE, J. M., KAYEM, G., FAIN, O., MATHIEU D'ARGENT, E., & MEKINIAN, A. (2021). UNEXPLAINED RECURRENT IMPLANTATION FAILURES: PREDICTIVE FACTORS OF PREGNANCY AND THERAPEUTIC MANAGEMENT FROM A FRENCH MULTICENTRE STUDY. *JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY*, 145, 103313. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JRI.2021.103313](https://doi.org/10.1016/j.jri.2021.103313)
33. MAGNUS, M. C., WILCOX, A. J., MORKEN, N. H., WEINBERG, C. R., & HÅBERG, S. E. (2019). ROLE OF MATERNAL AGE AND PREGNANCY HISTORY IN RISK OF MISCARRIAGE: PROSPECTIVE REGISTER BASED STUDY. *BMJ (CLINICAL RESEARCH ED.)*, 364, l869. [HTTPS://DOI.ORG/10.1136/BMJ.L869](https://doi.org/10.1136/bmj.l869)
34. AGENOR, A., & BHATTACHARYA, S. (2015). INFERTILITY AND MISCARRIAGE: COMMON PATHWAYS IN MANIFESTATION AND MANAGEMENT. *WOMEN'S HEALTH (LONDON, ENGLAND)*, 11(4), 527–541. [HTTPS://DOI.ORG/10.2217/WHE.15.19](https://doi.org/10.2217/whe.15.19)
35. LÓPEZ MORATALLA, N., (2012). EL PRECIO DEL «MILAGRO» DE LOS NACIMIENTOS POR LAS TÉCNICAS DE FECUNDACIÓN ASISTIDA. *CUADERNOS DE BIOÉTICA*, XXIII(2),421-466.[FECHA DE CONSULTA 12 DE DICIEMBRE DE 2024]. ISSN: 1132-1989. RECUPERADO DE: [HTTPS://WWW.REDALYC.ORG/ARTICULO.OA?ID=87524464008](https://www.redalyc.org/articulo.OA?id=87524464008)
36. HONG LI, Y., & MARREN, A. (2018). RECURRENT PREGNANCY LOSS: A SUMMARY OF INTERNATIONAL EVIDENCE-BASED GUIDELINES AND PRACTICE. *AUSTRALIAN JOURNAL OF GENERAL PRACTICE*, 47(7), 432–436. [HTTPS://DOI.ORG/10.31128/AJGP-01-18-4459](https://doi.org/10.31128/AJGP-01-18-4459)
37. ROYAL COLLEGE OF OBSTETRICIANS & GYNAECOLOGISTS. THE INVESTIGATION AND TREATMENT OF COUPLES WITH RECURRENT FIRST-TRIMESTER AND SECOND TRIMESTER MISCARRIAGE; GUIDELINE NO. 17; ROYAL COLLEGE OF OBSTETRICIANS & GYNAECOLOGISTS: LONDON, UK, 2011
38. MORAGIANNI, V. A., JONES, S. M., & RYLEY, D. A. (2012). THE EFFECT OF BODY MASS INDEX ON THE OUTCOMES OF FIRST ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY CYCLES. *FERTILITY AND STERILITY*, 98(1), 102–108. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.FERTNSTERT.2012.04.004](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.004)
39. CAVALCANTE, M. B., SARNO, M., PEIXOTO, A. B., ARAUJO JÚNIOR, E., & BARINI, R. (2019). OBESITY AND RECURRENT MISCARRIAGE: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS. *THE JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNAECOLOGY RESEARCH*, 45(1), 30–38. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/JOG.13799](https://doi.org/10.1111/jog.13799)
40. CARRINGTON, B., SACKS, G., & REGAN, L. (2005). RECURRENT MISCARRIAGE: PATHOPHYSIOLOGY AND OUTCOME. *CURRENT OPINION IN OBSTETRICS & GYNECOLOGY*, 17(6), 591–597. [HTTPS://DOI.ORG/10.1097/01.GCO.0000194112.86051.26](https://doi.org/10.1097/01.GCO.0000194112.86051.26)

41. MAGNUS, M. C., WILCOX, A. J., MORKEN, N. H., WEINBERG, C. R., & HÅBERG, S. E. (2019). ROLE OF MATERNAL AGE AND PREGNANCY HISTORY IN RISK OF MISCARRIAGE: PROSPECTIVE REGISTER BASED STUDY. *BMJ (CLINICAL RESEARCH ED.)*, 364, l869. [HTTPS://DOI.ORG/10.1136/BMJ.L869](https://doi.org/10.1136/bmj.l869)
42. TOTH, B., WÜRFEL, W., BOHLMANN, M., ZSCHOCKE, J., RUDNIK-SCHÖNEBORN, S., NAWROTH, F., SCHLEUSSNER, E., ROGENHOFER, N., WISCHMANN, T., VON WOLFF, M., HANCKE, K., VON OTTE, S., KUON, R., FEIL, K., & TEMPFER, C. (2018). RECURRENT MISCARRIAGE: DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC PROCEDURES. GUIDELINE OF THE DGGG, OEGGG AND SGGG (S2K-LEVEL, AWMF REGISTRY NUMBER 015/050). *GEBURTSHILFE UND FRAUENHEILKUNDE*, 78(4), 364–381. [HTTPS://DOI.ORG/10.1055/A-0586-4568](https://doi.org/10.1055/a-0586-4568)
43. ZHANG, LIQIANG & LIU, WEIWEI & HOU, KUN & LIN, JINTAI & ZHOU, CHENGHU & TONG, XIAOHUA & WANG, ZIYE & YUEBIN, WANG & JIANG, YANXIAO & WANG, ZIWEI & ZHENG, YIBO & LAN, YONGLIAN & LIU, SUHONG & NI, RUIJING & LIU, MENGYAO & ZHU, PANPAN. (2019). AIR POLLUTION-INDUCED MISSED ABORTION RISK FOR PREGNANCIES. *NATURE SUSTAINABILITY*. 2. 10.1038/s41893-019-0387-Y.
44. KRIEG SA, SHAHINE LK, LATHI RB. ENVIRONMENTAL EXPOSURE TO ENDOCRINE-DISRUPTING CHEMICALS AND MISCARRIAGE. VOL. 106, FERTILITY AND STERILITY. *FERTIL STERIL*; 2016. P. 941–7.
45. ESHRE GUIDELINE GROUP ON RPL, BENDER ATIK, R., CHRISTIANSEN, O. B., ELSON, J., KOLTE, A. M., LEWIS, S., MIDDELDORP, S., NELEN, W., PERAMO, B., QUENBY, S., VERMEULEN, N., & GODDIJN, M. (2018). ESHRE GUIDELINE: RECURRENT PREGNANCY LOSS. *HUMAN REPRODUCTION OPEN*, 2018(2), HOY004. [HTTPS://DOI.ORG/10.1093/HROPEN/HOY004](https://doi.org/10.1093/hropen/hoy004)
46. PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. ELECTRONIC ADDRESS: ASRM@ASRM.ORG, & PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE (2018). SMOKING AND INFERTILITY: A COMMITTEE OPINION. *FERTILITY AND STERILITY*, 110(4), 611–618. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.FERTNSTERT.2018.06.016](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.06.016)
47. RAI, R., & REGAN, L. (2006). RECURRENT MISCARRIAGE. *LANCET (LONDON, ENGLAND)*, 368(9535), 601–611. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0140-6736\(06\)69204-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69204-0)
48. DENG, T., LIAO, X., & ZHU, S. (2022). RECENT ADVANCES IN TREATMENT OF RECURRENT SPONTANEOUS ABORTION. *OBSTETRICAL & GYNECOLOGICAL SURVEY*, 77(6), 355–366. [HTTPS://DOI.ORG/10.1097/OGX.0000000000001033](https://doi.org/10.1097/OGX.0000000000001033)
49. LEE, H. A., AHN, E. H., KIM, J. H., KIM, J. O., RYU, C. S., LEE, J. Y., CHO, S. H., LEE, W. S., & KIM, N. K. (2018). ASSOCIATION STUDY OF FRAMESHIFT AND SPLICE VARIANT POLYMORPHISMS WITH RISK OF IDIOPATHIC RECURRENT PREGNANCY LOSS. *MOLECULAR MEDICINE REPORTS*, 18(2), 2417–2426. [HTTPS://DOI.ORG/10.3892/MMR.2018.9202](https://doi.org/10.3892/MMR.2018.9202)

50. BAHIA, W., FINAN, R. R., AL-MUTAWA, M., HADDAD, A., SOUA, A., JANHANI, F., MAHJOUB, T., & ALMAWI, W. Y. (2018). GENETIC VARIATION IN THE PROGESTERONE RECEPTOR GENE AND SUSCEPTIBILITY TO RECURRENT PREGNANCY LOSS: A CASE-CONTROL STUDY. *BJOG : AN INTERNATIONAL JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNAECOLOGY*, 125(6), 729–735. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/1471-0528.14949](https://doi.org/10.1111/1471-0528.14949)
51. DENDANA, M., BAHIA, W., FINAN, R. R., AL-MUTAWA, M., & ALMAWI, W. Y. (2018). ASSOCIATION OF ADIPONECTIN GENE VARIANTS WITH IDIOPATHIC RECURRENT MISCARRIAGE ACCORDING TO OBESITY STATUS: A CASE-CONTROL STUDY. *JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE*, 16(1), 76. [HTTPS://DOI.ORG/10.1186/s12967-018-1453-3](https://doi.org/10.1186/s12967-018-1453-3)
52. DIMITRIADIS, E., MENKHORST, E., SAITO, S., KUTTEH, W. H., & BROSENS, J. J. (2020). RECURRENT PREGNANCY LOSS. *NATURE REVIEWS. DISEASE PRIMERS*, 6(1), 98. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/s41572-020-00228-z](https://doi.org/10.1038/s41572-020-00228-z)
53. KHALIFE, D., GHAZEERI, G., & KUTTEH, W. (2019). REVIEW OF CURRENT GUIDELINES FOR RECURRENT PREGNANCY LOSS: NEW STRATEGIES FOR OPTIMAL EVALUATION OF WOMEN WHO MAY BE SUPERFERTILE. *SEMINARS IN PERINATOLOGY*, 43(2), 105–115. [HTTPS://DOI.ORG/10.1053/j.semperi.2018.12.008](https://doi.org/10.1053/j.semperi.2018.12.008)
54. PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE (2012). EVALUATION AND TREATMENT OF RECURRENT PREGNANCY LOSS: A COMMITTEE OPINION. *FERTILITY AND STERILITY*, 98(5), 1103–1111. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/j.fertnstert.2012.06.048](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.048)
55. COLLEY, E., HAMILTON, S., SMITH, P., MORGAN, N. V., COOMARASAMY, A., & ALLEN, S. (2019). POTENTIAL GENETIC CAUSES OF MISCARRIAGE IN EUPLOID PREGNANCIES: A SYSTEMATIC REVIEW. *HUMAN REPRODUCTION UPDATE*, 25(4), 452–472. [HTTPS://DOI.ORG/10.1093/humupd/dmz015](https://doi.org/10.1093/humupd/dmz015)
56. LA, X., WANG, W., ZHANG, M., & LIANG, L. (2021). DEFINITION AND MULTIPLE FACTORS OF RECURRENT SPONTANEOUS ABORTION. *ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY*, 1300, 231–257. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/978-981-33-4187-6_11](https://doi.org/10.1007/978-981-33-4187-6_11)
57. CARBONNEL, M., PIRTEA, P., DE ZIEGLER, D., & AYOUBI, J. M. (2021). UTERINE FACTORS IN RECURRENT PREGNANCY LOSSES. *FERTILITY AND STERILITY*, 115(3), 538–545. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/j.fertnstert.2020.12.003](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.12.003)
58. ONO, S., YONEZAWA, M., WATANABE, K., ABE, T., MINE, K., KUWABARA, Y., AKIRA, S., & TAKESHITA, T. (2017). RETROSPECTIVE COHORT STUDY OF THE RISK FACTORS FOR SECONDARY INFERTILITY FOLLOWING HYSTEROSCOPIC METROPLASTY OF THE UTERINE SEPTUM IN WOMEN WITH RECURRENT PREGNANCY LOSS. *REPRODUCTIVE MEDICINE AND BIOLOGY*, 17(1), 77–81. [HTTPS://DOI.ORG/10.1002/rmb2.12072](https://doi.org/10.1002/rmb2.12072)

59. SHI, Y., YAMADA, H., SASAGAWA, Y., TANIMURA, K., & DEGUCHI, M. (2022). UTERINE ENDOMETRIUM MICROBIOTA AND PREGNANCY OUTCOME IN WOMEN WITH RECURRENT PREGNANCY LOSS. *JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY*, 152, 103653. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JRI.2022.103653](https://doi.org/10.1016/J.JRI.2022.103653)
60. MASUCCI, L., D'IPPOLITO, S., DE MAIO, F., QUARANTA, G., MAZZARELLA, R., BIANCO, D. M., CASTELLANI, R., INVERSETTI, A., SANGUINETTI, M., GASBARRINI, A., SCAMBIA, G., & DI SIMONE, N. (2023). CELIAC DISEASE PREDISPOSITION AND GENITAL TRACT MICROBIOTA IN WOMEN AFFECTED BY RECURRENT PREGNANCY LOSS. *NUTRIENTS*, 15(1), 221. [HTTPS://DOI.ORG/10.3390/NU15010221](https://doi.org/10.3390/NU15010221)
61. AZZIZ, R., CARMINA, E., CHEN, Z., DUNAIF, A., LAVEN, J. S., LEGRO, R. S., LIZNEVA, D., NATTERSON-HOROWITZ, B., TEEDE, H. J., & YILDIZ, B. O. (2016). POLYCYSTIC OVARY SYNDROME. *NATURE REVIEWS. DISEASE PRIMERS*, 2, 16057. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NRDP.2016.57](https://doi.org/10.1038/NRDP.2016.57)
62. GOETSCH AL, KIMELMAN D, WOODRUFF TK. POLYCYSTIC OVARY SYNDROME. *FERTILITY PRESERVATION AND RESTORATION FOR PATIENTS WITH COMPLEX MEDICAL CONDITIONS: SPRINGER*; 2017: 231-48.
63. PALOMBA, S., DE WILDE, M. A., FALBO, A., KOSTER, M. P., LA SALA, G. B., & FAUSER, B. C. (2015). PREGNANCY COMPLICATIONS IN WOMEN WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME. *HUMAN REPRODUCTION UPDATE*, 21(5), 575–592. [HTTPS://DOI.ORG/10.1093/HUMUPD/DMV029](https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMV029)
64. NEGRO, R., & STAGNARO-GREEN, A. (2014). CLINICAL ASPECTS OF HYPERTHYROIDISM, HYPOTHYROIDISM, AND THYROID SCREENING IN PREGNANCY. *ENDOCRINE PRACTICE : OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY AND THE AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS*, 20(6), 597–607. [HTTPS://DOI.ORG/10.4158/EP13350.RA](https://doi.org/10.4158/EP13350.RA)
65. CAO, Y., WANG, X., CAO, Z., & CHENG, X. (2015). ASSOCIATION OF VITAMIN D RECEPTOR GENE TAQI POLYMORPHISMS WITH TUBERCULOSIS SUSCEPTIBILITY: A META-ANALYSIS. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE*, 8(6), 10187–10203.
66. TERZIC, M.; AIMAGAMBETOVA, G. PROTHROMBOTIC GENE POLYMORPHISMS AND ADVERSE REPRODUCTIVE OUTCOMES IN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY. IN *MANAGEMENT OF INFERTILITY: A PRACTICAL APPROACH*; ACADEMIC PRESS: CAMBRIDGE, MA, USA, 2023; PP. 55–63. ISBN 978-0-323-89907-9
67. ALECSANDRU, D., KLIMCZAK, A. M., GARCIA VELASCO, J. A., PIRTEA, P., & FRANASIAK, J. M. (2021). IMMUNOLOGIC CAUSES AND THROMBOPHILIA IN RECURRENT PREGNANCY LOSS. *FERTILITY AND STERILITY*, 115(3), 561–566. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.FERTNSTERT.2021.01.017](https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2021.01.017)
68. LIU, X., CHEN, Y., YE, C., XING, D., WU, R., LI, F., CHEN, L., & WANG, T. (2021). HEREDITARY THROMBOPHILIA AND RECURRENT PREGNANCY LOSS: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS. *HUMAN REPRODUCTION (OXFORD, ENGLAND)*, 36(5), 1213–1229. [HTTPS://DOI.ORG/10.1093/HUMREP/DEAB010](https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEAB010)

69. SANTOS, T. D. S., IEQUE, A. L., DE CARVALHO, H. C., SELL, A. M., LONARDONI, M. V. C., DEMARCHI, I. G., DE LIMA NETO, Q. A., & TEIXEIRA, J. J. V. (2017). ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME AND RECURRENT MISCARRIAGE: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS. *JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY*, 123, 78–87. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JRI.2017.09.007](https://doi.org/10.1016/j.jri.2017.09.007)
70. ORNOY, A., YACOBI, S., MATALON, S. T., BLANK, M., BLUMENFELD, Z., MILLER, R. K., & SHOENFELD, Y. (2003). THE EFFECTS OF ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES OBTAINED FROM WOMEN WITH SLE/APS AND ASSOCIATED PREGNANCY LOSS ON RAT EMBRYOS AND PLACENTAL EXPLANTS IN CULTURE. *LUPUS*, 12(7), 573–578. [HTTPS://DOI.ORG/10.1191/0961203303LU405OA](https://doi.org/10.1191/0961203303LU405OA)
71. YANG, Z., SHEN, X., ZHOU, C., WANG, M., LIU, Y., & ZHOU, L. (2021). PREVENTION OF RECURRENT MISCARRIAGE IN WOMEN WITH ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME: A SYSTEMATIC REVIEW AND NETWORK META-ANALYSIS. *LUPUS*, 30(1), 70–79. [HTTPS://DOI.ORG/10.1177/0961203320967097](https://doi.org/10.1177/0961203320967097)
72. VOMSTEIN, K., FEIL, K., STROBEL, L., AULITZKY, A., HOFER-TOLLINGER, S., KUON, R. J., & TOTH, B. (2021). IMMUNOLOGICAL RISK FACTORS IN RECURRENT PREGNANCY LOSS: GUIDELINES VERSUS CURRENT STATE OF THE ART. *JOURNAL OF CLINICAL MEDICINE*, 10(4), 869. [HTTPS://DOI.ORG/10.3390/JCM10040869](https://doi.org/10.3390/jcm10040869)
73. MEULEMAN, T., HAASNoot, G. W., VAN LITH, J. M. M., VERDUIJN, W., BLOEMENKAMP, K. W. M., & CLAAS, F. H. J. (2018). PATERNAL HLA-C IS A RISK FACTOR IN UNEXPLAINED RECURRENT MISCARRIAGE. *AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY (NEW YORK, N.Y. : 1989)*, 79(2), 10.1111/AJI.12797. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/AJI.12797](https://doi.org/10.1111/AJI.12797)
74. AIMAGAMBETOVA, G., HAJJEJ, A., MALALLA, Z. H., FINAN, R. R., SARRAY, S., & ALMAWI, W. Y. (2019). MATERNAL HLA-DR, HLA-DQ, AND HLA-DP LOCI ARE LINKED WITH ALTERED RISK OF RECURRENT PREGNANCY LOSS IN LEBANESE WOMEN: A CASE-CONTROL STUDY. *AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY (NEW YORK, N.Y. : 1989)*, 82(4), E13173. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/AJI.13173](https://doi.org/10.1111/AJI.13173)
75. RASMARK ROEPKE, E., MATTHIESEN, L., RYLANCE, R., & CHRISTIANSEN, O. B. (2017). IS THE INCIDENCE OF RECURRENT PREGNANCY LOSS INCREASING? A RETROSPECTIVE REGISTER-BASED STUDY IN SWEDEN. *ACTA OBSTETRICIA ET GYNECOLOGICA SCANDINAVICA*, 96(11), 1365–1372. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/AOGS.13210](https://doi.org/10.1111/AOGS.13210)
76. COMBA, C., BASTU, E., DURAL, O., YASA, C., KESKIN, G., OZSURMELI, M., BUYRU, F., & SERDAROGLU, H. (2015). ROLE OF INFLAMMATORY MEDIATORS IN PATIENTS WITH RECURRENT PREGNANCY LOSS. *FERTILITY AND STERILITY*, 104(6), 1467–74.E1. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.FERTNSTERT.2015.08.011](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.08.011)
77. LI, D., ZHENG, L., ZHAO, D., XU, Y., & WANG, Y. (2021). THE ROLE OF IMMUNE CELLS IN RECURRENT SPONTANEOUS ABORTION. *REPRODUCTIVE SCIENCES (THOUSAND OAKS, CALIF.)*, 28(12), 3303–3315. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S43032-021-00599-Y](https://doi.org/10.1007/s43032-021-00599-y)

78. CHRISTIANSEN, O. B., RASMUSSEN, K. L., JERSILD, C., & GRUNNET, N. (1994). HLA CLASS II ALLELES CONFER SUSCEPTIBILITY TO RECURRENT FETAL LOSSES IN DANISH WOMEN. *TISSUE ANTIGENS*, 44(4), 225–233. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/J.1399-0039.1994.TB02387.X](https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1994.tb02387.x)
79. THOMSEN, C. K., STEFFENSEN, R., NIELSEN, H. S., KOLTE, A. M., KROG, M. C., EGERUP, P., LARSEN, E. C., HVIID, T. V., & CHRISTIANSEN, O. B. (2021). HLA-DRB1 POLYMORPHISM IN RECURRENT PREGNANCY LOSS: NEW EVIDENCE FOR AN ASSOCIATION TO HLA-DRB1*07. *JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY*, 145, 103308. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JRI.2021.103308](https://doi.org/10.1016/j.jri.2021.103308)
80. CHOO S. Y. (2007). THE HLA SYSTEM: GENETICS, IMMUNOLOGY, CLINICAL TESTING, AND CLINICAL IMPLICATIONS. *YONSEI MEDICAL JOURNAL*, 48(1), 11–23. [HTTPS://DOI.ORG/10.3349/YMJ.2007.48.1.11](https://doi.org/10.3349/ymj.2007.48.1.11)
81. MEULEMAN, T., LASHLEY, L. E., DEKKERS, O. M., VAN LITH, J. M., CLAAS, F. H., & BLOEMENKAMP, K. W. (2015). HLA ASSOCIATIONS AND HLA SHARING IN RECURRENT MISCARRIAGE: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS. *HUMAN IMMUNOLOGY*, 76(5), 362–373. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.HUMIMM.2015.02.004](https://doi.org/10.1016/j.humimm.2015.02.004)
82. ARUNA, M.; NAGARAJA, T.; BHASKAR, S.A.; TARAKESWARI, S.; REDDY, A.G.; THANGARAJ, K.; SINGH, L.; REDDY, B.M. NOVEL ALLELES OF HLA-DQ AND -DR LOCI SHOW ASSOCIATION WITH RECURRENT MISCARRIAGES AMONG SOUTH INDIAN WOMEN. *HUM. REPROD.* 2011, 26, 765–774
83. KRUSE, C., STEFFENSEN, R., VARMING, K., & CHRISTIANSEN, O. B. (2004). A STUDY OF HLA-DR AND -DQ ALLELES IN 588 PATIENTS AND 562 CONTROLS CONFIRMS THAT HLA-DRB1*03 IS ASSOCIATED WITH RECURRENT MISCARRIAGE. *HUMAN REPRODUCTION (OXFORD, ENGLAND)*, 19(5), 1215–1221. [HTTPS://DOI.ORG/10.1093/HUMREP/DEH200](https://doi.org/10.1093/humrep/deh200)
84. MASUCCI, L., D’IPPOLITO, S., DE MAIO, F., QUARANTA, G., MAZZARELLA, R., BIANCO, D. M., CASTELLANI, R., INVERSETTI, A., SANGUINETTI, M., GASBARRINI, A., SCAMBIA, G., & DI SIMONE, N. (2023). CELIAC DISEASE PREDISPOSITION AND GENITAL TRACT MICROBIOTA IN WOMEN AFFECTED BY RECURRENT PREGNANCY LOSS. *NUTRIENTS*, 15(1), 221. [HTTPS://DOI.ORG/10.3390/NU15010221](https://doi.org/10.3390/nu15010221)
85. DI BIASE, A. R., MARASCO, G., RAVAIOLI, F., DAJTI, E., COLECCHIA, L., RIGHI, B., D’AMICO, V., FESTI, D., IUGHETTI, L., & COLECCHIA, A. (2021). GUT MICROBIOTA SIGNATURES AND CLINICAL MANIFESTATIONS IN CELIAC DISEASE CHILDREN AT ONSET: A PILOT STUDY. *JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY*, 36(2), 446–454. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/JGH.15183](https://doi.org/10.1111/jgh.15183)
86. BEER, A. E., KWAK, J. Y., & RUIZ, J. E. (1996). IMMUNOPHENOTYPIC PROFILES OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN WOMEN WITH RECURRENT PREGNANCY LOSSES AND IN INFERTILE WOMEN WITH MULTIPLE FAILED IN VITRO FERTILIZATION CYCLES. *AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY (NEW YORK, N.Y. : 1989)*, 35(4), 376–382. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/J.1600-0897.1996.TB00497.X](https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1996.tb00497.x)

87. YAMADA, H., MORIKAWA, M., KATO, E. H., SHIMADA, S., KOBASHI, G., & MINAKAMI, H. (2003). PRE-CONCEPTIONAL NATURAL KILLER CELL ACTIVITY AND PERCENTAGE AS PREDICTORS OF BIOCHEMICAL PREGNANCY AND SPONTANEOUS ABORTION WITH NORMAL CHROMOSOME KARYOTYPE. *AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY* (NEW YORK, N.Y. : 1989), 50(4), 351–354. [HTTPS://DOI.ORG/10.1034/J.1600-0897.2003.00095.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-0897.2003.00095.x)
88. PERRICONE, R., DI MUZIO, G., PERRICONE, C., GIACOMELLI, R., DE NARDO, D., FONTANA, L., & DE CAROLIS, C. (2006). HIGH LEVELS OF PERIPHERAL BLOOD NK CELLS IN WOMEN SUFFERING FROM RECURRENT SPONTANEOUS ABORTION ARE REVERTED FROM HIGH-DOSE INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULINS. *AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY* (NEW YORK, N.Y. : 1989), 55(3), 232–239. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/J.1600-0897.2005.00356.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2005.00356.x)
89. FUKUI, A., FUNAMIZU, A., YOKOTA, M., YAMADA, K., NAKAMURA, R., FUKUHARA, R., KIMURA, H., & MIZUNUMA, H. (2011). UTERINE AND CIRCULATING NATURAL KILLER CELLS AND THEIR ROLES IN WOMEN WITH RECURRENT PREGNANCY LOSS, IMPLANTATION FAILURE AND PREECLAMPSIA. *JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY*, 90(1), 105–110. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JRI.2011.04.006](https://doi.org/10.1016/j.jri.2011.04.006)
90. RAMOS-MEDINA, R., GARCÍA-SEGOVIA, Á., LEÓN, J. A., ALONSO, B., TEJERA-ALHAMBRA, M., GIL, J., CAPUTO, J. D., SEYFFERTH, A., AGUARÓN, Á., VICENTE, Á., ORDOÑEZ, D., ALONSO, J., DE ALBORNOZ, E. C., CARBONE, J., CABALLERO, P., FERNANDEZ-CRUZ, E., ORTIZ-QUINTANA, L., & SÁNCHEZ-RAMÓN, S. (2013). NEW DECISION-TREE MODEL FOR DEFINING THE RISK OF REPRODUCTIVE FAILURE. *AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY* (NEW YORK, N.Y. : 1989), 70(1), 59–68. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/AJI.12098](https://doi.org/10.1111/AJI.12098)
91. TAMBLYN, J. A., PILARSKI, N. S. P., MARKLAND, A. D., MARSON, E. J., DEVAL, A., HEWISON, M., MORRIS, R. K., & COOMARASAMY, A. (2022). VITAMIN D AND MISCARRIAGE: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS. *FERTILITY AND STERILITY*, 118(1), 111–122. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.FERTNSTERT.2022.04.017](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.04.017)
92. LOKE Y, KING A. HLA CLASS I MOLECULES IN IMPLANTATION. *FETAL AND MATERNAL MEDICINE REVIEW* 2001; 12: 299-314.
93. HIBY, S. E., WALKER, J. J., O'SHAUGHNESSY, K. M., REDMAN, C. W., CARRINGTON, M., TROWSDALE, J., & MOFFETT, A. (2004). COMBINATIONS OF MATERNAL KIR AND FETAL HLA-C GENES INFLUENCE THE RISK OF PREECLAMPSIA AND REPRODUCTIVE SUCCESS. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE*, 200(8), 957–965. [HTTPS://DOI.ORG/10.1084/JEM.20041214](https://doi.org/10.1084/JEM.20041214)
94. PATEL, R. N., QUACK, K. C., HILL, J. A., & SCHUST, D. J. (2003). EXPRESSION OF MEMBRANE-BOUND HLA-G AT THE MATERNAL-FETAL INTERFACE IS NOT ASSOCIATED WITH PREGNANCY MAINTENANCE AMONG PATIENTS WITH IDIOPATHIC RECURRENT PREGNANCY LOSS. *MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION*, 9(9), 551–557. [HTTPS://DOI.ORG/10.1093/MOLEHR/GAG070](https://doi.org/10.1093/molehr/gag070)

95. ANDER, S. E., DIAMOND, M. S., & COYNE, C. B. (2019). IMMUNE RESPONSES AT THE MATERNAL-FETAL INTERFACE. *SCIENCE IMMUNOLOGY*, 4(31), EAAT6114. [HTTPS://DOI.ORG/10.1126/SCIIMMUNOL.AAT6114](https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat6114)
96. MAHNKE, K., KNOP, J., & ENK, A. H. (2003). INDUCTION OF TOLEROGENIC DCs: 'YOU ARE WHAT YOU EAT'. *TRENDS IN IMMUNOLOGY*, 24(12), 646–651. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.IT.2003.09.012](https://doi.org/10.1016/j.it.2003.09.012)
97. SHIMA, T., & KATO, K. (2018). THE ROLES OF DENDRITIC CELLS IN THE MAINTENANCE OF PREGNANCY. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY*, 9, 1028.
98. CHAOUAT, G., & LEDEE-BATAILLE, N. (2015). TOLERANCE AND IMMUNITY AT THE MATERNAL-FETAL INTERFACE. *NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY*, 15(9), 585-598.
99. ABU-RAYA, B., MICHALSKI, C., SADARANGANI, M., & LAVOIE, P. M. (2020). MATERNAL IMMUNOLOGICAL ADAPTATION DURING NORMAL PREGNANCY. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY*, 11, 575197. [HTTPS://DOI.ORG/10.3389/FIMMU.2020.575197](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.575197)
100. SAITO S, NAKASHIMA A, MYOJO-HIGUMA S, SHIOZAKI A (2008) THE BALANCE BETWEEN CYTOTOXIC NK CELLS AND REGULATORY NK CELLS IN HUMAN PREGNANCY. *J REPROD IMMUNOL* 77: 14-22.
101. HIBY SE, REGAN L, LO W, FARRELL L, CARRINGTON M, ET AL. (2008) ASSOCIATION OF MATERNAL KILLER-CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS AND PARENTAL HLA-C GENOTYPES WITH RECURRENT MISCARRIAGE. *HUM REPROD* 23: 972-976.
102. ERLEBACHER A. (2013). IMMUNOLOGY OF THE MATERNAL-FETAL INTERFACE. *ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY*, 31, 387–411. [HTTPS://DOI.ORG/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032712-100003](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100003)
103. YOCKEY, L. J., & IWASAKI, A. (2018). INTERFERONS AND PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN PREGNANCY AND FETAL DEVELOPMENT. *IMMUNITY*, 49(3), 397–412. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.IMMUNI.2018.07.017](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.07.017)
104. YANG, H., QIU, L., CHEN, G., YE, Z., LÜ, C., & LIN, Q. (2008). PROPORTIONAL CHANGE OF CD4+CD25+ REGULATORY T CELLS IN DECIDUA AND PERIPHERAL BLOOD IN UNEXPLAINED RECURRENT SPONTANEOUS ABORTION PATIENTS. *FERTILITY AND STERILITY*, 89(3), 656–661. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.FERTNSTERT.2007.03.037](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.03.037)
105. TILBURGS, T., ROELEN, D. L., VAN DER MAST, B. J., VAN SCHIP, J. J., KLEIJBURG, C., DE GROOT-SWINGS, G. M., KANHAI, H. H., CLAAS, F. H., & SCHERJON, S. A. (2006). DIFFERENTIAL DISTRIBUTION OF CD4(+)CD25(BRIGHT) AND CD8(+)CD28(-) T-CELLS IN DECIDUA AND MATERNAL BLOOD DURING HUMAN PREGNANCY. *PLACENTA*, 27 SUPPL A, S47–S53. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.PLACENTA.2005.11.008](https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.11.008)

106. LENTZ, L. S., STUTZ, A. J., MEYER, N., SCHUBERT, K., KARKOSSA, I., VON BERGEN, M., ZENCLUSSEN, A. C., & SCHUMACHER, A. (2022). HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN PROMOTES MURINE TREG CELLS AND RESTRICTS PREGNANCY-HARMFUL PROINFLAMMATORY TH17 RESPONSES. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY*, 13, 989247. [HTTPS://DOI.ORG/10.3389/FIMMU.2022.989247](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.989247)
107. RAMHORST, R., FRACCAROLI, L., ALDO, P., ALVERO, A. B., CARDENAS, I., LEIRÓS, C. P., & MOR, G. (2012). MODULATION AND RECRUITMENT OF INDUCIBLE REGULATORY T CELLS BY FIRST TRIMESTER TROPHOBLAST CELLS. *AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY (NEW YORK, N.Y. : 1989)*, 67(1), 17–27. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/J.1600-0897.2011.01056.X](https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01056.x)
108. WANG, S. C., LI, Y. H., PIAO, H. L., HONG, X. W., ZHANG, D., XU, Y. Y., TAO, Y., WANG, Y., YUAN, M. M., LI, D. J., & DU, M. R. (2015). PD-1 AND TIM-3 PATHWAYS ARE ASSOCIATED WITH REGULATORY CD8+ T-CELL FUNCTION IN DECIDUA AND MAINTENANCE OF NORMAL PREGNANCY. *CELL DEATH & DISEASE*, 6(5), e1738. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/CDDIS.2015.112](https://doi.org/10.1038/cddis.2015.112)
109. KOLDEHOFF, M., CIERNA, B., STECKEL, N. K., BEELEN, D. W., & ELMAAGACLI, A. H. (2013). MATERNAL MOLECULAR FEATURES AND GENE PROFILING OF MONOCYTES DURING FIRST TRIMESTER PREGNANCY. *JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY*, 99(1-2), 62–68. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JRI.2013.07.001](https://doi.org/10.1016/j.jri.2013.07.001)
110. ENGERT, S., RIEGER, L., KAPP, M., BECKER, J. C., DIETL, J., & KÄMMERER, U. (2007). PROFILING CHEMOKINES, CYTOKINES AND GROWTH FACTORS IN HUMAN EARLY PREGNANCY DECIDUA BY PROTEIN ARRAY. *AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY (NEW YORK, N.Y. : 1989)*, 58(2), 129–137. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/J.1600-0897.2007.00498.X](https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2007.00498.x)
111. GORDON, S., & TAYLOR, P. R. (2005). MONOCYTE AND MACROPHAGE HETEROGENEITY. *NATURE REVIEWS. IMMUNOLOGY*, 5(12), 953–964. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NRI1733](https://doi.org/10.1038/nri1733)
112. AUFRAY, C., FOGG, D., GARFA, M., ELAIN, G., JOIN-LAMBERT, O., KAYAL, S., SARNACKI, S., CUMANO, A., LAUVAU, G., & GEISSMANN, F. (2007). MONITORING OF BLOOD VESSELS AND TISSUES BY A POPULATION OF MONOCYTES WITH PATROLLING BEHAVIOR. *SCIENCE (NEW YORK, N.Y.)*, 317(5838), 666–670. [HTTPS://DOI.ORG/10.1126/SCIENCE.1142883](https://doi.org/10.1126/science.1142883)
113. PORCHERAY, F., VIAUD, S., RIMANIOL, A. C., LÉONE, C., SAMAH, B., DEREUDDRE-BOSQUET, N., DORMONT, D., & GRAS, G. (2005). MACROPHAGE ACTIVATION SWITCHING: AN ASSET FOR THE RESOLUTION OF INFLAMMATION. *CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY*, 142(3), 481–489. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/J.1365-2249.2005.02934.X](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02934.x)
114. BULMER, J. N., MORRISON, L., & SMITH, J. C. (1988). EXPRESSION OF CLASS II MHC GENE PRODUCTS BY MACROPHAGES IN HUMAN UTEROPLACENTAL TISSUE. *IMMUNOLOGY*, 63(4), 707–714.

115. LASH, G. E., PITMAN, H., MORGAN, H. L., INNES, B. A., AGWU, C. N., & BULMER, J. N. (2016). DECIDUAL MACROPHAGES: KEY REGULATORS OF VASCULAR REMODELING IN HUMAN PREGNANCY. *JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY*, 100(2), 315–325. [HTTPS://DOI.ORG/10.1189/JLB.1A0815-351R](https://doi.org/10.1189/jlb.1A0815-351R).
116. SVENSSON, J., JENMALM, M. C., MATUSSEK, A., GEFFERS, R., BERG, G., & ERNERUDH, J. (2011). MACROPHAGES AT THE FETAL-MATERNAL INTERFACE EXPRESS MARKERS OF ALTERNATIVE ACTIVATION AND ARE INDUCED BY M-CSF AND IL-10. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950)*, 187(7), 3671–3682. [HTTPS://DOI.ORG/10.4049/JIMMUNOL.1100130](https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1100130)
117. PIACENTINI, M., & AUTUORI, F. (1994). IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF TISSUE TRANSGLUTAMINASE AND BCL-2 IN RAT UTERINE TISSUES DURING EMBRYO IMPLANTATION AND POST-PARTUM INVOLUTION. *DIFFERENTIATION; RESEARCH IN BIOLOGICAL DIVERSITY*, 57(1), 51–61. [HTTPS://DOI.ORG/10.1046/J.1432-0436.1994.5710051.X](https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.1994.5710051.x)
118. HOUSER B. L. (2012). DECIDUAL MACROPHAGES AND THEIR ROLES AT THE MATERNAL-FETAL INTERFACE. *THE YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE*, 85(1), 105–118.
119. SAYAMA, S., NAGAMATSU, T., SCHUST, D. J., ITAOKA, N., ICHIKAWA, M., KAWANA, K., YAMASHITA, T., KOZUMA, S., & FUJII, T. (2013). HUMAN DECIDUAL MACROPHAGES SUPPRESS IFN- γ PRODUCTION BY T CELLS THROUGH COSTIMULATORY B7-H1:PD-1 SIGNALING IN EARLY PREGNANCY. *JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY*, 100(2), 109–117. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JRI.2013.08.001](https://doi.org/10.1016/j.jri.2013.08.001)
120. HSU, P., SANTNER-NANAN, B., DAHLSTROM, J. E., FADIA, M., CHANDRA, A., PEEK, M., & NANAN, R. (2012). ALTERED DECIDUAL DC-SIGN+ ANTIGEN-PRESENTING CELLS AND IMPAIRED REGULATORY T-CELL INDUCTION IN PREECLAMPSIA. *THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY*, 181(6), 2149–2160. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.AJPATH.2012.08.032](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.08.032)
121. SOJKA, D. K., YANG, L., & YOKOYAMA, W. M. (2019). UTERINE NATURAL KILLER CELLS. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY*, 10, 960. [HTTPS://DOI.ORG/10.3389/FIMMU.2019.00960](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00960)
122. LONG, E. O., KIM, H. S., LIU, D., PETERSON, M. E., & RAJAGOPALAN, S. (2013). CONTROLLING NATURAL KILLER CELL RESPONSES: INTEGRATION OF SIGNALS FOR ACTIVATION AND INHIBITION. *ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY*, 31, 227–258. [HTTPS://DOI.ORG/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-020711-075005](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075005)
123. VENTO-TORMO, R., EFREMOVA, M., BOTTING, R. A., TURCO, M. Y., VENTO-TORMO, M., MEYER, K. B., PARK, J. E., STEPHENSON, E., POLAŃSKI, K., GONCALVES, A., GARDNER, L., HOLMQVIST, S., HENRIKSSON, J., ZOU, A., SHARKEY, A. M., MILLAR, B., INNES, B., WOOD, L., WILBREY-CLARK, A., PAYNE, R. P., ... TEICHMANN, S. A. (2018). SINGLE-CELL RECONSTRUCTION OF THE EARLY MATERNAL-FETAL INTERFACE IN HUMANS. *NATURE*, 563(7731), 347–353. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/S41586-018-0698-6](https://doi.org/10.1038/s41586-018-0698-6)

124. MORANDI, F., & PISTOIA, V. (2014). INTERACTIONS BETWEEN HLA-G AND HLA-E IN PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL CONDITIONS. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY*, 5, 394. [HTTPS://DOI.ORG/10.3389/FIMMU.2014.00394](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00394)
125. BÖTTCHER, J. P., BONAVIDA, E., CHAKRAVARTY, P., BLEES, H., CABEZA-CABRERIZO, M., SAMMICHELI, S., ROGERS, N. C., SAHAI, E., ZELENAY, S., & REIS E SOUSA, C. (2018). NK CELLS STIMULATE RECRUITMENT OF CDC1 INTO THE TUMOR MICROENVIRONMENT PROMOTING CANCER IMMUNE CONTROL. *CELL*, 172(5), 1022–1037.E14. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.CELL.2018.01.004](https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.004)
126. TIMEVA, T., SHTEREV, A., & KYURKCHIEV, S. (2014). RECURRENT IMPLANTATION FAILURE: THE ROLE OF THE ENDOMETRIUM. *JOURNAL OF REPRODUCTION & INFERTILITY*, 15(4), 173–183.
127. YANG, F., ZHENG, Q., & JIN, L. (2019). DYNAMIC FUNCTION AND COMPOSITION CHANGES OF IMMUNE CELLS DURING NORMAL AND PATHOLOGICAL PREGNANCY AT THE MATERNAL-FETAL INTERFACE. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY*, 10, 2317. [HTTPS://DOI.ORG/10.3389/FIMMU.2019.02317](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02317)
128. ACAR, N., USTUNEL, I., & DEMIR, R. (2011). UTERINE NATURAL KILLER (UNK) CELLS AND THEIR MISSIONS DURING PREGNANCY: A REVIEW. *ACTA HISTOCHEMICA*, 113(2), 82–91. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.ACTHIS.2009.12.001](https://doi.org/10.1016/j.acthis.2009.12.001)
129. SMITH, S. D., DUNK, C. E., APLIN, J. D., HARRIS, L. K., & JONES, R. L. (2009). EVIDENCE FOR IMMUNE CELL INVOLVEMENT IN DECIDUAL SPIRAL ARTERIOLE REMODELING IN EARLY HUMAN PREGNANCY. *THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY*, 174(5), 1959–1971. [HTTPS://DOI.ORG/10.2353/AJPATH.2009.080995](https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080995)
130. ROBSON, A., HARRIS, L. K., INNES, B. A., LASH, G. E., ALJUNAIDY, M. M., APLIN, J. D., BAKER, P. N., ROBSON, S. C., & BULMER, J. N. (2012). UTERINE NATURAL KILLER CELLS INITIATE SPIRAL ARTERY REMODELING IN HUMAN PREGNANCY. *FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY*, 26(12), 4876–4885. [HTTPS://DOI.ORG/10.1096/FJ.12-210310](https://doi.org/10.1096/fj.12-210310)
131. GAYNOR, L. M., & COLUCCI, F. (2017). UTERINE NATURAL KILLER CELLS: FUNCTIONAL DISTINCTIONS AND INFLUENCE ON PREGNANCY IN HUMANS AND MICE. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY*, 8, 467. [HTTPS://DOI.ORG/10.3389/FIMMU.2017.00467](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00467)
132. CHAKRABORTY, D., RUMI, M. A., KONNO, T., & SOARES, M. J. (2011). NATURAL KILLER CELLS DIRECT HEMOCHORIAL PLACENTATION BY REGULATING HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR DEPENDENT TROPHOBLAST LINEAGE DECISIONS. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 108(39), 16295–16300. [HTTPS://DOI.ORG/10.1073/PNAS.1109478108](https://doi.org/10.1073/pnas.1109478108)

133. LIMA, P. D., ZHANG, J., DUNK, C., LYE, S. J., & CROY, B. A. (2014). LEUKOCYTE DRIVEN-DECIDUAL ANGIOGENESIS IN EARLY PREGNANCY. *CELLULAR & MOLECULAR IMMUNOLOGY*, 11(6), 522–537. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/CMI.2014.63](https://doi.org/10.1038/cmi.2014.63)
134. GUPTA, S., AGARWAL, A., BANERJEE, J., & ALVAREZ, J. G. (2007). THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN SPONTANEOUS ABORTION AND RECURRENT PREGNANCY LOSS: A SYSTEMATIC REVIEW. *OBSTETRICAL & GYNECOLOGICAL SURVEY*, 62(5), 335–354. [HTTPS://DOI.ORG/10.1097/01.OGX.0000261644.89300.DF](https://doi.org/10.1097/01.OGX.0000261644.89300.DF)
135. CHOU, Y. C., CHEN, C. H., CHEN, M. J., CHANG, C. W., CHEN, P. H., YU, M. H., CHEN, Y. J., TSAI, E. M., YANG, P. S., LIN, S. Y., & TZENG, C. R. (2020). KILLER CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS (KIR) AND HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN-C (HLA-C) ALLORECOGNITION PATTERNS IN WOMEN WITH ENDOMETRIOSIS. *SCIENTIFIC REPORTS*, 10(1), 4897. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/S41598-020-61702-Y](https://doi.org/10.1038/s41598-020-61702-y)
136. LEE, N., LLANO, M., CARRETERO, M., ISHITANI, A., NAVARRO, F., LÓPEZ-BOTET, M., & GERAGHTY, D. E. (1998). HLA-E IS A MAJOR LIGAND FOR THE NATURAL KILLER INHIBITORY RECEPTOR CD94/NKG2A. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 95(9), 5199–5204. [HTTPS://DOI.ORG/10.1073/PNAS.95.9.5199](https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5199)
137. KING, A., ALLAN, D. S., BOWEN, M., POWIS, S. J., JOSEPH, S., VERMA, S., HIBY, S. E., MCMICHAEL, A. J., LOKE, Y. W., & BRAUD, V. M. (2000). HLA-E IS EXPRESSED ON TROPHOBLAST AND INTERACTS WITH CD94/NKG2 RECEPTORS ON DECIDUAL NK CELLS. *EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, 30(6), 1623–1631. [HTTPS://DOI.ORG/10.1002/1521-4141\(200006\)30:6<1623::AID-IMMU1623>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200006)30:6<1623::AID-IMMU1623>3.0.CO;2-M)
138. SHREEVE, N., DEPIERREUX, D., HAWKES, D., TRAHERNE, J. A., SOVIO, U., HUHN, O., JAYARAMAN, J., HOROWITZ, A., GHADIALY, H., PERRY, J. R. B., MOFFETT, A., SLED, J. G., SHARKEY, A. M., & COLUCCI, F. (2021). THE CD94/NKG2A INHIBITORY RECEPTOR EDUCATES UTERINE NK CELLS TO OPTIMIZE PREGNANCY OUTCOMES IN HUMANS AND MICE. *IMMUNITY*, 54(6), 1231–1244.E4. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.IMMUNI.2021.03.021](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.03.021)
139. C. A. GARCIA, J. ROBINSON, AND J. A. MADRIGAL, “NATURAL KILLER CELL RECEPTORS: FUNTIONAL ROLES,” *INMUNOLOGÍA*, VOL. 22, NO. 2, PP. 190–202, 2003
140. LANIER, L. L., CORLISS, B. C., WU, J., LEONG, C., & PHILLIPS, J. H. (1998). IMMUNORECEPTOR DAP12 BEARING A TYROSINE-BASED ACTIVATION MOTIF IS INVOLVED IN ACTIVATING NK CELLS. *NATURE*, 391(6668), 703–707. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/35642](https://doi.org/10.1038/35642)
141. VILCHES, C., & PARHAM, P. (2002). KIR: DIVERSE, RAPIDLY EVOLVING RECEPTORS OF INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY. *ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY*, 20, 217–251. [HTTPS://DOI.ORG/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.20.092501.134942](https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.20.092501.134942)

142. MARSH, S. G., PARHAM, P., DUPONT, B., GERAGHTY, D. E., TROWSDALE, J., MIDDLETON, D., VILCHES, C., CARRINGTON, M., WITT, C., GUETHLEIN, L. A., SHILLING, H., GARCIA, C. A., HSU, K. C., & WAIN, H. (2003). KILLER-CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTOR (KIR) NOMENCLATURE REPORT, 2002. HUMAN IMMUNOLOGY, 64(6), 648–654. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/s0198-8859\(03\)00067-3](https://doi.org/10.1016/s0198-8859(03)00067-3)
143. CARRILLO-BUSTAMANTE, P., KEŞMİR, C., & DE BOER, R. J. (2016). THE EVOLUTION OF NATURAL KILLER CELL RECEPTORS. IMMUNOGENETICS, 68(1), 3–18. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/s00251-015-0869-7](https://doi.org/10.1007/s00251-015-0869-7)
144. L.A. GUETHLEIN, P.J. NORMAN, H. G. HILTON, AND P. PARHAM, “CO-EVOLUTION OF MHC CLASS I AND VARIABLE NK CELL RECEPTORS IN PLACENTAL MAMMALS,” IMMUNOL REV, VOL. 267, NO. 1, PP. 259–282, 2015, DOI: 10.1111/IMR.12326.CO-EVOLUTION.
145. VILCHES, C., PANDO, M. J., & PARHAM, P. (2000). GENES ENCODING HUMAN KILLER-CELL IG-LIKE RECEPTORS WITH D1 AND D2 EXTRACELLULAR DOMAINS ALL CONTAIN UNTRANSLATED PSEUDOEXONS ENCODING A THIRD IG-LIKE DOMAIN. IMMUNOGENETICS, 51(8-9), 639–646. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/s002510000184](https://doi.org/10.1007/s002510000184)
146. WAGTMANN, N., RAJAGOPALAN, S., WINTER, C. C., PERUZZI, M., & LONG, E. O. (1995). KILLER CELL INHIBITORY RECEPTORS SPECIFIC FOR HLA-C AND HLA-B IDENTIFIED BY DIRECT BINDING AND BY FUNCTIONAL TRANSFER. IMMUNITY, 3(6), 801–809. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/1074-7613\(95\)90069-1](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90069-1)
147. SELVAKUMAR, A., STEFFENS, U., & DUPONT, B. (1996). NK CELL RECEPTOR GENE OF THE KIR FAMILY WITH TWO IG DOMAINS BUT HIGHEST HOMOLOGY TO KIR RECEPTORS WITH THREE IG DOMAINS. TISSUE ANTIGENS, 48(4 PT 1), 285–294. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/j.1399-0039.1996.tb02647.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1996.tb02647.x)
148. TORKAR, M., NORGATE, Z., COLONNA, M., TROWSDALE, J., & WILSON, M. J. (1998). ISOTYPIC VARIATION OF NOVEL IMMUNOGLOBULIN-LIKE TRANSCRIPT/KILLER CELL INHIBITORY RECEPTOR LOCI IN THE LEUKOCYTE RECEPTOR COMPLEX. EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 28(12), 3959–3967. [HTTPS://DOI.ORG/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199812\)28:12<3959::AID-IMMU3959>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199812)28:12<3959::AID-IMMU3959>3.0.CO;2-2)
149. GÓMEZ-LOZANO, N., GARDINER, C. M., PARHAM, P., & VILCHES, C. (2002). SOME HUMAN KIR HAPLOTYPES CONTAIN TWO KIR2DL5 GENES: KIR2DL5A AND KIR2DL5B. IMMUNOGENETICS, 54(5), 314–319. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/s00251-002-0476-2](https://doi.org/10.1007/s00251-002-0476-2)
150. SHILLING, H. G., GUETHLEIN, L. A., CHENG, N. W., GARDINER, C. M., RODRIGUEZ, R., TYAN, D., & PARHAM, P. (2002). ALLELIC POLYMORPHISM SYNERGIZES WITH VARIABLE GENE CONTENT TO INDIVIDUALIZE HUMAN KIR GENOTYPE. JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950), 168(5), 2307–2315. [HTTPS://DOI.ORG/10.4049/JIMMUNOL.168.5.2307](https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.168.5.2307)

151. JIANG, W., JOHNSON, C., JAYARAMAN, J., SIMECEK, N., NOBLE, J., MOFFATT, M. F., COOKSON, W. O., TROWSDALE, J., & TRAHERNE, J. A. (2012). COPY NUMBER VARIATION LEADS TO CONSIDERABLE DIVERSITY FOR B BUT NOT A HAPLOTYPES OF THE HUMAN KIR GENES ENCODING NK CELL RECEPTORS. *GENOME RESEARCH*, 22(10), 1845–1854. [HTTPS://DOI.ORG/10.1101/GR.137976.112](https://doi.org/10.1101/GR.137976.112)
152. MIDDLETON, D., & GONZALEZ, F. (2010). THE EXTENSIVE POLYMORPHISM OF KIR GENES. *IMMUNOLOGY*, 129(1), 8–19. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/J.1365-2567.2009.03208.X](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03208.x)
153. HSU, K. C., CHIDA, S., GERAGHTY, D. E., & DUPONT, B. (2002). THE KILLER CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTOR (KIR) GENOMIC REGION: GENE-ORDER, HAPLOTYPES AND ALLELIC POLYMORPHISM. *IMMUNOLOGICAL REVIEWS*, 190, 40–52. [HTTPS://DOI.ORG/10.1034/J.1600-065X.2002.19004.X](https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2002.19004.x)
154. FAURE, M., & LONG, E. O. (2002). KIR2DL4 (CD158D), AN NK CELL-ACTIVATING RECEPTOR WITH INHIBITORY POTENTIAL. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950)*, 168(12), 6208–6214. [HTTPS://DOI.ORG/10.4049/JIMMUNOL.168.12.6208](https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.168.12.6208)
155. COOLEY, S., WEISDORF, D. J., GUETHLEIN, L. A., KLEIN, J. P., WANG, T., LE, C. T., MARSH, S. G., GERAGHTY, D., SPELLMAN, S., HAAGENSEN, M. D., LADNER, M., TRACHTENBERG, E., PARHAM, P., & MILLER, J. S. (2010). DONOR SELECTION FOR NATURAL KILLER CELL RECEPTOR GENES LEADS TO SUPERIOR SURVIVAL AFTER UNRELATED TRANSPLANTATION FOR ACUTE MYELOGENOUS LEUKEMIA. *BLOOD*, 116(14), 2411–2419. [HTTPS://DOI.ORG/10.1182/BLOOD-2010-05-283051](https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-05-283051)
156. PYO, C. W., GUETHLEIN, L. A., VU, Q., WANG, R., ABI-RACHED, L., NORMAN, P. J., MARSH, S. G., MILLER, J. S., PARHAM, P., & GERAGHTY, D. E. (2010). DIFFERENT PATTERNS OF EVOLUTION IN THE CENTROMERIC AND TELOMERIC REGIONS OF GROUP A AND B HAPLOTYPES OF THE HUMAN KILLER CELL IG-LIKE RECEPTOR LOCUS. *PLOS ONE*, 5(12), E15115. [HTTPS://DOI.ORG/10.1371/JOURNAL.PONE.0015115](https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0015115).
157. UHRBERG, M., VALIANTE, N. M., SHUM, B. P., SHILLING, H. G., LIENERT-WEIDENBACH, K., CORLISS, B., TYAN, D., LANIER, L. L., & PARHAM, P. (1997). HUMAN DIVERSITY IN KILLER CELL INHIBITORY RECEPTOR GENES. *IMMUNITY*, 7(6), 753–763. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S1074-7613\(00\)80394-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80394-5)
158. KOŁTAN, S., KOŁTAN, A., SOSZYŃSKA, K., MATIAKOWSKA, K., MORGUT-KLIMKOWSKA, M., GRZEŚK, E., GRZEŚK, G., DĄBROWSKA, A., URBAŃCZYK, A., KONIECZEK, J., STYCZYŃSKI, J., HAUS, O., & WYSOCKI, M. (2021). KILLER-CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTOR GENOTYPE AND HAPLOTYPE COMBINATIONS IN CHILDREN TREATED FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. *CENTRAL-EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, 46(2), 210–216. [HTTPS://DOI.ORG/10.5114/CEJI.2021.108178](https://doi.org/10.5114/CEJI.2021.108178)
159. CISNEROS, E., MORARU, M., GÓMEZ-LOZANO, N., MUNTASELL, A., LÓPEZ-BOTET, M., & VILCHES, C. (2020).

- HAPLOTYPE-BASED ANALYSIS OF KIR-GENE PROFILES IN A SOUTH EUROPEAN POPULATION-DISTRIBUTION OF STANDARD AND VARIANT HAPLOTYPES, AND IDENTIFICATION OF NOVEL RECOMBINANT STRUCTURES. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY*, 11, 440. [HTTPS://DOI.ORG/10.3389/FIMMU.2020.00440](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00440)
160. GIL LABORDA, R., DE FRÍAS, E. R., SUBHI-ISSA, N., DE ALBORNOZ, E. C., MELIÁ, E., ÓRDENES, M., VERDÚ, V., VIDAL, J., SUÁREZ, E., SANTILLÁN, I., ORDÓÑEZ, D., PINTADO-VERA, D., GONZÁLEZ VILLAFÁÑEZ, V., LORENZO, Á., FARIÑAS, M., RODRÍGUEZ-PAÍNO, M., NÚÑEZ BELTRÁN, M., GARCÍA SEGOVIA, Á., DEL OLMO, A., MARTÍN CAÑADAS, F., ... SÁNCHEZ-RAMÓN, S. (2024). CENTROMERIC AA MOTIF IN KIR AS AN OPTIMAL SURROGATE MARKER FOR PRECISION DEFINITION OF ALLOIMMUNE REPRODUCTIVE FAILURE. *SCIENTIFIC REPORTS*, 14(1), 3354. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/S41598-024-53766-X](https://doi.org/10.1038/s41598-024-53766-x)
161. SCHÖNBERG, K., FISCHER, J. C., KÖGLER, G., & UHRBERG, M. (2011). NEONATAL NK-CELL REPERTOIRES ARE FUNCTIONALLY, BUT NOT STRUCTURALLY, BIASED TOWARD RECOGNITION OF SELF HLA CLASS I. *BLOOD*, 117(19), 5152–5156. [HTTPS://DOI.ORG/10.1182/BLOOD-2011-02-334441](https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-02-334441)
162. BÉZIAT, V., LIU, L. L., MALMBERG, J. A., IVARSSON, M. A., SOHLBERG, E., BJÖRKLUND, A. T., RETIÈRE, C., SVERREMARK-EKSTRÖM, E., TRAHERNE, J., LJUNGMAN, P., SCHAFFER, M., PRICE, D. A., TROWSDALE, J., MICHAËLSSON, J., LJUNGGREN, H. G., & MALMBERG, K. J. (2013). NK CELL RESPONSES TO CYTOMEGALOVIRUS INFECTION LEAD TO STABLE IMPRINTS IN THE HUMAN KIR REPERTOIRE AND INVOLVE ACTIVATING KIRS. *BLOOD*, 121(14), 2678–2688. [HTTPS://DOI.ORG/10.1182/BLOOD-2012-10-459545](https://doi.org/10.1182/BLOOD-2012-10-459545).
163. CHAROUDEH, H. N., TERSZOWSKI, G., CZAJA, K., GONZALEZ, A., SCHMITTER, K., & STERN, M. (2013). MODULATION OF THE NATURAL KILLER CELL KIR REPERTOIRE BY CYTOMEGALOVIRUS INFECTION. *EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, 43(2), 480–487. [HTTPS://DOI.ORG/10.1002/EJI.201242389](https://doi.org/10.1002/EJI.201242389)
164. YAWATA, M., YAWATA, N., DRAGHI, M., PARTHENIOU, F., LITTLE, A. M., & PARHAM, P. (2008). MHC CLASS I-SPECIFIC INHIBITORY RECEPTORS AND THEIR LIGANDS STRUCTURE DIVERSE HUMAN NK-CELL REPERTOIRES TOWARD A BALANCE OF MISSING SELF-RESPONSE. *BLOOD*, 112(6), 2369–2380. [HTTPS://DOI.ORG/10.1182/BLOOD-2008-03-143727](https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-03-143727)
165. YAWATA, M., YAWATA, N., DRAGHI, M., LITTLE, A. M., PARTHENIOU, F., & PARHAM, P. (2006). ROLES FOR HLA AND KIR POLYMORPHISMS IN NATURAL KILLER CELL REPERTOIRE SELECTION AND MODULATION OF EFFECTOR FUNCTION. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE*, 203(3), 633–645. [HTTPS://DOI.ORG/10.1084/JEM.20051884](https://doi.org/10.1084/JEM.20051884)
166. RUGGERI L, MANCUSI A, BURCHIELLI E, AVERSA F, MARTELLI MF, VELARDI A. ALOREACTIVIDAD DE CÉLULAS ASESINAS NATURALES Y TRASPLANTE HEMATOPOYÉTICO HAPLOIDÉNTICO. *CITOTERAPIA*. 2006;8(6):554-8. DOI: 10.1080/14653240601078721. PMID: 17148031.

167. FAURIAT, C., ANDERSSON, S., BJÖRKLUND, A. T., CARLSTEN, M., SCHAFER, M., BJÖRKSTRÖM, N. K., BAUMANN, B. C., MICHAËLSSON, J., LJUNGGREN, H. G., & MALMBERG, K. J. (2008). ESTIMATION OF THE SIZE OF THE ALLOREACTIVE NK CELL REPERTOIRE: STUDIES IN INDIVIDUALS HOMOZYGOUS FOR THE GROUP A KIR HAPLOTYPE. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950)*, 181(9), 6010–6019. [HTTPS://DOI.ORG/10.4049/JIMMUNOL.181.9.6010](https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.181.9.6010)
168. VALIANTE, N. M., UHRBERG, M., SHILLING, H. G., LIENERT-WEIDENBACH, K., ARNETT, K. L., D'ANDREA, A., PHILLIPS, J. H., LANIER, L. L., & PARHAM, P. (1997). FUNCTIONALLY AND STRUCTURALLY DISTINCT NK CELL RECEPTOR REPERTOIRES IN THE PERIPHERAL BLOOD OF TWO HUMAN DONORS. *IMMUNITY*, 7(6), 739–751. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/s1074-7613\(00\)80393-3](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80393-3)
169. FISCHER, J. C., OTTINGER, H., FERENCIK, S., SRIBAR, M., PUNZEL, M., BEELEN, D. W., SCHWAN, M. A., GROSSE-WILDE, H., WERNET, P., & UHRBERG, M. (2007). RELEVANCE OF C1 AND C2 EPITOPES FOR HEMOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION: ROLE FOR SEQUENTIAL ACQUISITION OF HLA-C-SPECIFIC INHIBITORY KILLER IG-LIKE RECEPTOR. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950)*, 178(6), 3918–3923. [HTTPS://DOI.ORG/10.4049/JIMMUNOL.178.6.3918](https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.178.6.3918)
170. NGUYEN, S., DHEDIN, N., VERNANT, J. P., KUENTZ, M., AL JIJAKLI, A., ROUAS-FREISS, N., CAROSELLA, E. D., BOUDIFA, A., DEBRÉ, P., & VIEILLARD, V. (2005). NK-CELL RECONSTITUTION AFTER HAPLOIDENTICAL HEMATOPOIETIC STEM-CELL TRANSPLANTATIONS: IMMATUREITY OF NK CELLS AND INHIBITORY EFFECT OF NKG2A OVERRIDE GVL EFFECT. *BLOOD*, 105(10), 4135–4142. [HTTPS://DOI.ORG/10.1182/BLOOD-2004-10-4113](https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-10-4113)
171. STORKUS, W. J., ALEXANDER, J., PAYNE, J. A., CRESSWELL, P., & DAWSON, J. R. (1989). THE ALPHA 1/ALPHA 2 DOMAINS OF CLASS I HLA MOLECULES CONFER RESISTANCE TO NATURAL KILLING. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950)*, 143(11), 3853–3857.
172. SCARADAVOU A. HLA ANTIGENS. IN: TRANSFUSION MEDICINE AND HEMOSTASIS: CLINICAL AND LABORATORY ASPECTS, 2ND ED. AMSTERDAM: ELSEVIER INC, 2013, 191–197
173. SNARY, D., BARNSTABLE, C. J., BODMER, W. F., & CRUMPTON, M. J. (1977). MOLECULAR STRUCTURE OF HUMAN HISTOCOMPATIBILITY ANTIGENS: THE HLA-C SERIES. *EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, 7(8), 580–585. [HTTPS://DOI.ORG/10.1002/EJI.1830070816](https://doi.org/10.1002/EJI.1830070816)
174. ZEMMOUR, J., & PARHAM, P. (1992). DISTINCTIVE POLYMORPHISM AT THE HLA-C LOCUS: IMPLICATIONS FOR THE EXPRESSION OF HLA-C. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE*, 176(4), 937–950. [HTTPS://DOI.ORG/10.1084/JEM.176.4.937](https://doi.org/10.1084/JEM.176.4.937)
175. WINTER, C. C., GUMPERZ, J. E., PARHAM, P., LONG, E. O., & WAGTMANN, N. (1998). DIRECT BINDING AND FUNCTIONAL TRANSFER OF NK CELL INHIBITORY RECEPTORS REVEAL NOVEL PATTERNS OF HLA-C ALLOTYPE RECOGNITION. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950)*, 161(2), 571–577.

176. MANDELBOIM, O., REYBURN, H. T., VALÉS-GÓMEZ, M., PAZMANY, L., COLONNA, M., BORSELLINO, G., & STROMINGER, J. L. (1996). PROTECTION FROM LYSIS BY NATURAL KILLER CELLS OF GROUP 1 AND 2 SPECIFICITY IS MEDIATED BY RESIDUE 80 IN HUMAN HISTOCOMPATIBILITY LEUKOCYTE ANTIGEN C ALLELES AND ALSO OCCURS WITH EMPTY MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX MOLECULES. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE*, 184(3), 913–922. [HTTPS://DOI.ORG/10.1084/JEM.184.3.913](https://doi.org/10.1084/jem.184.3.913)
177. PARHAM, P., NORMAN, P. J., ABI-RACHED, L., & GUETHLEIN, L. A. (2012). HUMAN-SPECIFIC EVOLUTION OF KILLER CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTOR RECOGNITION OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS I MOLECULES. *PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON. SERIES B, BIOLOGICAL SCIENCES*, 367(1590), 800–811. [HTTPS://DOI.ORG/10.1098/RSTB.2011.0266](https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0266)
178. CARRETERO, M., CANTONI, C., BELLÓN, T., BOTTINO, C., BIASSONI, R., RODRÍGUEZ, A., PÉREZ-VILLAR, J. J., MORETTA, L., MORETTA, A., & LÓPEZ-BOTET, M. (1997). THE CD94 AND NKG2-A C-TYPE LECTINS COVALENTLY ASSEMBLE TO FORM A NATURAL KILLER CELL INHIBITORY RECEPTOR FOR HLA CLASS I MOLECULES. *EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, 27(2), 563–567. [HTTPS://DOI.ORG/10.1002/EJI.1830270230](https://doi.org/10.1002/eji.1830270230)
179. TROWSDALE J. (2001). GENETIC AND FUNCTIONAL RELATIONSHIPS BETWEEN MHC AND NK RECEPTOR GENES. *IMMUNITY*, 15(3), 363–374. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S1074-7613\(01\)00197-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00197-2)
180. LANIER, L. L., CORLISS, B., WU, J., & PHILLIPS, J. H. (1998). ASSOCIATION OF DAP12 WITH ACTIVATING CD94/NKG2C NK CELL RECEPTORS. *IMMUNITY*, 8(6), 693–701. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S1074-7613\(00\)80574-9](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80574-9)
181. VANCE, R. E., JAMIESON, A. M., & RAULET, D. H. (1999). RECOGNITION OF THE CLASS IB MOLECULE QA-1(B) BY PUTATIVE ACTIVATING RECEPTORS CD94/NKG2C AND CD94/NKG2E ON MOUSE NATURAL KILLER CELLS. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE*, 190(12), 1801–1812. [HTTPS://DOI.ORG/10.1084/JEM.190.12.1801](https://doi.org/10.1084/jem.190.12.1801)
182. BRAUD, V. M., ALLAN, D. S., O'CALLAGHAN, C. A., SÖDERSTRÖM, K., D'ANDREA, A., OGG, G. S., LAZETIC, S., YOUNG, N. T., BELL, J. I., PHILLIPS, J. H., LANIER, L. L., & MCMICHAEL, A. J. (1998). HLA-E BINDS TO NATURAL KILLER CELL RECEPTORS CD94/NKG2A, B AND C. *NATURE*, 391(6669), 795–799. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/35869](https://doi.org/10.1038/35869)
183. HOROWITZ, A., DJAOUD, Z., NEMAT-GORGANI, N., BLOKHUIS, J., HILTON, H. G., BÉZIAT, V., MALMBERG, K. J., NORMAN, P. J., GUETHLEIN, L. A., & PARHAM, P. (2016). CLASS I HLA HAPLOTYPES FORM TWO SCHOOLS THAT EDUCATE NK CELLS IN DIFFERENT WAYS. *SCIENCE IMMUNOLOGY*, 1(3), EAAG1672. [HTTPS://DOI.ORG/10.1126/SCIIMMUNOL.AAG1672](https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.AAG1672)
184. FLORES-VILLANUEVA, P. O., YUNIS, E. J., DELGADO, J. C., VITTINGHOFF, E., BUCHBINDER, S., LEUNG, J. Y., UGLIALORO, A. M., CLAVIJO, O. P., ROSENBERG, E. S., KALAMS, S. A., BRAUN, J. D., BOSWELL, S. L., WALKER,

- B. D., & GOLDFELD, A. E. (2001). CONTROL OF HIV-1 VIREMIA AND PROTECTION FROM AIDS ARE ASSOCIATED WITH HLA-BW4 HOMOZYGOSITY. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 98(9), 5140–5145. [HTTPS://DOI.ORG/10.1073/PNAS.071548198](https://doi.org/10.1073/pnas.071548198)
185. MORETTA, A., MARCENARO, E., PAROLINI, S., FERLAZZO, G., & MORETTA, L. (2008). NK CELLS AT THE INTERFACE BETWEEN INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY. *CELL DEATH AND DIFFERENTIATION*, 15(2), 226–233. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/SJ.CDD.4402170](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402170)
186. VIVIER, E., TOMASELLO, E., BARATIN, M., WALZER, T., & UGOLINI, S. (2008). FUNCTIONS OF NATURAL KILLER CELLS. *NATURE IMMUNOLOGY*, 9(5), 503–510. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NI1582](https://doi.org/10.1038/ni1582)
187. LJUNGGREN, H. G., & KÄRRE, K. (1990). IN SEARCH OF THE ‘MISSING SELF’: MHC MOLECULES AND NK CELL RECOGNITION. *IMMUNOLOGY TODAY*, 11(7), 237–244. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/0167-5699\(90\)90097-S](https://doi.org/10.1016/0167-5699(90)90097-s)
188. ANFOSSI, N., ANDRÉ, P., GUIA, S., FALK, C. S., ROETYNCK, S., STEWART, C. A., BRESO, V., FRASSATI, C., REVIRON, D., MIDDLETON, D., ROMAGNÉ, F., UGOLINI, S., & VIVIER, E. (2006). HUMAN NK CELL EDUCATION BY INHIBITORY RECEPTORS FOR MHC CLASS I. *IMMUNITY*, 25(2), 331–342. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.IMMUNI.2006.06.013](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.06.013).
189. DORFMAN, J. R., & RAULET, D. H. (1996). MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX GENES DETERMINE NATURAL KILLER CELL TOLERANCE. *EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, 26(1), 151–155. [HTTPS://DOI.ORG/10.1002/EJI.1830260123](https://doi.org/10.1002/eji.1830260123)
190. OLSSON, M. Y., KÄRRE, K., & SENTMAN, C. L. (1995). ALTERED PHENOTYPE AND FUNCTION OF NATURAL KILLER CELLS EXPRESSING THE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX RECEPTOR LY-49 IN MICE TRANSGENIC FOR ITS LIGAND. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 92(5), 1649–1653. [HTTPS://DOI.ORG/10.1073/PNAS.92.5.1649](https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1649)
191. VITALE, M., ZIMMER, J., CASTRICONI, R., HANAU, D., DONATO, L., BOTTINO, C., MORETTA, L., DE LA SALLE, H., & MORETTA, A. (2002). ANALYSIS OF NATURAL KILLER CELLS IN TAP2-DEFICIENT PATIENTS: EXPRESSION OF FUNCTIONAL TRIGGERING RECEPTORS AND EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF INHIBITORY RECEPTOR(S) THAT PREVENT LYSIS OF NORMAL AUTOLOGOUS CELLS. *BLOOD*, 99(5), 1723–1729. [HTTPS://DOI.ORG/10.1182/BLOOD.V99.5.1723](https://doi.org/10.1182/BLOOD.V99.5.1723)
192. KIM, S., POURSIENE-LAURENT, J., TRUSCOTT, S. M., LYBARGER, L., SONG, Y. J., YANG, L., FRENCH, A. R., SUNWOO, J. B., LEMIEUX, S., HANSEN, T. H., & YOKOYAMA, W. M. (2005). LICENSING OF NATURAL KILLER CELLS BY HOST MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS I MOLECULES. *NATURE*, 436(7051), 709–713. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NATURE03847](https://doi.org/10.1038/nature03847)

193. CARRINGTON, M., WANG, S., MARTIN, M. P., GAO, X., SCHIFFMAN, M., CHENG, J., HERRERO, R., RODRIGUEZ, A. C., KURMAN, R., MORTEL, R., SCHWARTZ, P., GLASS, A., & HILDESHEIM, A. (2005). HIERARCHY OF RESISTANCE TO CERVICAL NEOPLASIA MEDIATED BY COMBINATIONS OF KILLER IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTOR AND HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN LOCI. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE*, 201(7), 1069–1075. [HTTPS://DOI.ORG/10.1084/JEM.20042158](https://doi.org/10.1084/JEM.20042158)
194. PARHAM P. (2005). IMMUNOGENETICS OF KILLER CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS. *MOLECULAR IMMUNOLOGY*, 42(4), 459–462. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.MOLIMM.2004.07.027](https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2004.07.027)
195. KHAKOO, S. I., THIO, C. L., MARTIN, M. P., BROOKS, C. R., GAO, X., ASTEMBORSKI, J., CHENG, J., GOEDERT, J. J., VLAHOV, D., HILGARTNER, M., COX, S., LITTLE, A. M., ALEXANDER, G. J., CRAMP, M. E., O'BRIEN, S. J., ROSENBERG, W. M., THOMAS, D. L., & CARRINGTON, M. (2004). HLA AND NK CELL INHIBITORY RECEPTOR GENES IN RESOLVING HEPATITIS C VIRUS INFECTION. *SCIENCE (NEW YORK, N.Y.)*, 305(5685), 872–874. [HTTPS://DOI.ORG/10.1126/SCIENCE.1097670](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1097670)
196. NELSON, G. W., MARTIN, M. P., GLADMAN, D., WADE, J., TROWSDALE, J., & CARRINGTON, M. (2004). CUTTING EDGE: HETEROZYGOTE ADVANTAGE IN AUTOIMMUNE DISEASE: HIERARCHY OF PROTECTION/SUSCEPTIBILITY CONFERRED BY HLA AND KILLER IG-LIKE RECEPTOR COMBINATIONS IN PSORIATIC ARTHRITIS. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950)*, 173(7), 4273–4276. [HTTPS://DOI.ORG/10.4049/JIMMUNOL.173.7.4273](https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.173.7.4273)
197. IVARSSON, M. A., LOH, L., MARQUARDT, N., KEKÄLÄINEN, E., BERGLIN, L., BJÖRKSTRÖM, N. K., WESTGREN, M., NIXON, D. F., & MICHAËLSSON, J. (2013). DIFFERENTIATION AND FUNCTIONAL REGULATION OF HUMAN FETAL NK CELLS. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION*, 123(9), 3889–3901. [HTTPS://DOI.ORG/10.1172/JCI68989](https://doi.org/10.1172/JCI68989)
198. BOUDREAU, J. E., & HSU, K. C. (2018). NATURAL KILLER CELL EDUCATION AND THE RESPONSE TO INFECTION AND CANCER THERAPY: STAY TUNED. *TRENDS IN IMMUNOLOGY*, 39(3), 222–239. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.IT.2017.12.001](https://doi.org/10.1016/J.IT.2017.12.001)
199. SCHAFER, J. R., SALZILLO, T. C., CHAKRAVARTI, N., KARAROUDI, M. N., TRIKHA, P., FOLTZ, J. A., WANG, R., LI, S., & LEE, D. A. (2019). EDUCATION-DEPENDENT ACTIVATION OF GLYCOLYSIS PROMOTES THE CYTOLYTIC POTENCY OF LICENSED HUMAN NATURAL KILLER CELLS. *THE JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY*, 143(1), 346–358.E6.
200. GOODRIDGE, J. P., JACOBS, B., SAETERSMOEN, M. L., CLEMENT, D., HAMMER, Q., CLANCY, T., SKARPEN, E., BRECH, A., LANDSKRON, J., GRIMM, C., PFEFFERLE, A., MEZA-ZEPEDA, L., LORENZ, S., WIIGER, M. T., LOUCH, W. E., ASK, E. H., LIU, L. L., OEI, V. Y. S., KJÄLLQUIST, U., LINNARSSON, S., ... MALMBERG, K. J. (2019). REMODELING OF SECRETORY LYSOSOMES DURING EDUCATION TUNES FUNCTIONAL POTENTIAL IN NK CELLS. *NATURE COMMUNICATIONS*, 10(1), 514. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/s41467-019-08384-x](https://doi.org/10.1038/s41467-019-08384-x).

201. MOFFETT, A., HIBY, S. E., & SHARKEY, A. M. (2015). THE ROLE OF THE MATERNAL IMMUNE SYSTEM IN THE REGULATION OF HUMAN BIRTHWEIGHT. *PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON. SERIES B, BIOLOGICAL SCIENCES*, 370(1663), 20140071. [HTTPS://DOI.ORG/10.1098/RSTB.2014.0071](https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0071)
202. HUHN, O., ZHAO, X., ESPOSITO, L., MOFFETT, A., COLUCCI, F., & SHARKEY, A. M. (2021). HOW DO UTERINE NATURAL KILLER AND INNATE LYMPHOID CELLS CONTRIBUTE TO SUCCESSFUL PREGNANCY?. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY*, 12, 607669. [HTTPS://DOI.ORG/10.3389/FIMMU.2021.607669](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.607669)
203. SHMELEVA, E. V., & COLUCCI, F. (2021). MATERNAL NATURAL KILLER CELLS AT THE INTERSECTION BETWEEN REPRODUCTION AND MUCOSAL IMMUNITY. *MUCOSAL IMMUNOLOGY*, 14(5), 991–1005. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/S41385-020-00374-3](https://doi.org/10.1038/s41385-020-00374-3)
204. ALECSANDRU, D., & GARCÍA-VELASCO, J. A. (2017). WHY NATURAL KILLER CELLS ARE NOT ENOUGH: A FURTHER UNDERSTANDING OF KILLER IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTOR AND HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN. *FERTILITY AND STERILITY*, 107(6), 1273–1278. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.FERTNSTERT.2017.04.018](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.04.018)
205. KULKARNI, S., MARTIN, M. P., & CARRINGTON, M. (2008). THE YIN AND YANG OF HLA AND KIR IN HUMAN DISEASE. *SEMINARS IN IMMUNOLOGY*, 20(6), 343–352. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.SMIM.2008.06.003](https://doi.org/10.1016/j.smim.2008.06.003)
206. MOFFETT, A., & COLUCCI, F. (2014). UTERINE NK CELLS: ACTIVE REGULATORS AT THE MATERNAL-FETAL INTERFACE. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION*, 124(5), 1872–1879. [HTTPS://DOI.ORG/10.1172/JCI68107](https://doi.org/10.1172/JCI68107)
207. MALE, V., SHARKEY, A., MASTERS, L., KENNEDY, P. R., FARRELL, L. E., & MOFFETT, A. (2011). THE EFFECT OF PREGNANCY ON THE UTERINE NK CELL KIR REPERTOIRE. *EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, 41(10), 3017–3027. [HTTPS://DOI.ORG/10.1002/EJI.201141445](https://doi.org/10.1002/eji.201141445)
208. CHAZARA, O., XIONG, S., & MOFFETT, A. (2011). MATERNAL KIR AND FETAL HLA-C: A FINE BALANCE. *JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY*, 90(4), 703–716. [HTTPS://DOI.ORG/10.1189/JLB.0511227](https://doi.org/10.1189/jlb.0511227)
209. HIBY, S. E., APPS, R., SHARKEY, A. M., FARRELL, L. E., GARDNER, L., MULDER, A., CLAAS, F. H., WALKER, J. J., REDMAN, C. W., MORGAN, L., TOWER, C., REGAN, L., MOORE, G. E., CARRINGTON, M., & MOFFETT, A. (2010). MATERNAL ACTIVATING KIRS PROTECT AGAINST HUMAN REPRODUCTIVE FAILURE MEDIATED BY FETAL HLA-C2. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION*, 120(11), 4102–4110. [HTTPS://DOI.ORG/10.1172/JCI43998](https://doi.org/10.1172/JCI43998)
210. KENNEDY, P. R., CHAZARA, O., GARDNER, L., IVARSSON, M. A., FARRELL, L. E., XIONG, S., HIBY, S. E., COLUCCI, F., SHARKEY, A. M., & MOFFETT, A. (2016). ACTIVATING KIR2DS4 IS EXPRESSED BY UTERINE NK CELLS AND CONTRIBUTES TO SUCCESSFUL PREGNANCY. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950)*, 197(11), 4292–4300. [HTTPS://DOI.ORG/10.4049/JIMMUNOL.1601279](https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1601279)

211. SHARKEY, A. M., GARDNER, L., HIBY, S., FARRELL, L., APPS, R., MASTERS, L., GOODRIDGE, J., LATHBURY, L., STEWART, C. A., VERMA, S., & MOFFETT, A. (2008). KILLER IG-LIKE RECEPTOR EXPRESSION IN UTERINE NK CELLS IS BIASED TOWARD RECOGNITION OF HLA-C AND ALTERS WITH GESTATIONAL AGE. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY* (BALTIMORE, MD. : 1950), 181(1), 39–46. [HTTPS://DOI.ORG/10.4049/JIMMUNOL.181.1.39](https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.181.1.39)
212. DAMBAEVA, S. V., LEE, D. H., SUNG, N., CHEN, C. Y., BAO, S., GILMAN-SACHS, A., KWAK-KIM, J., & BEAMAN, K. D. (2016). RECURRENT PREGNANCY LOSS IN WOMEN WITH KILLER CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTOR KIR2DS1 IS ASSOCIATED WITH AN INCREASED HLA-C2 ALLELIC FREQUENCY. *AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY* (NEW YORK, N.Y. : 1989), 75(2), 94–103. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/AJI.12453](https://doi.org/10.1111/AJI.12453)
213. MANSOUR, L., ALKHURJI, A., BABAY, Z. A., ALQADHEEB, S., AL-KHULAIFI, F., AL-TALHI, R., & ALOMAR, S. (2020). ASSOCIATION OF KILLER IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTOR AND HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN CLASS I LIGAND WITH RECURRENT ABORTION IN SAUDI WOMEN. *GENETIC TESTING AND MOLECULAR BIOMARKERS*, 24(2), 78–84. [HTTPS://DOI.ORG/10.1089/GTMB.2019.0224](https://doi.org/10.1089/GTMB.2019.0224)
214. RAJAGOPALAN, S., & LONG, E. O. (2005). UNDERSTANDING HOW COMBINATIONS OF HLA AND KIR GENES INFLUENCE DISEASE. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE*, 201(7), 1025–1029. [HTTPS://DOI.ORG/10.1084/JEM.20050499](https://doi.org/10.1084/JEM.20050499)
215. PAPÚCHOVÁ, H., MEISSNER, T. B., LI, Q., STROMINGER, J. L., & TILBURGS, T. (2019). THE DUAL ROLE OF HLA-C IN TOLERANCE AND IMMUNITY AT THE MATERNAL-FETAL INTERFACE. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY*, 10, 2730. [HTTPS://DOI.ORG/10.3389/FIMMU.2019.02730](https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02730)
216. ALTER, G., MARTIN, M. P., TEIGEN, N., CARR, W. H., SUSCOVICH, T. J., SCHNEIDEWIND, A., STREECK, H., WARING, M., MEIER, A., BRANDER, C., LIFSON, J. D., ALLEN, T. M., CARRINGTON, M., & ALTFELD, M. (2007). DIFFERENTIAL NATURAL KILLER CELL-MEDIATED INHIBITION OF HIV-1 REPLICATION BASED ON DISTINCT KIR/HLA SUBTYPES. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE*, 204(12), 3027–3036. [HTTPS://DOI.ORG/10.1084/JEM.20070695](https://doi.org/10.1084/JEM.20070695)
217. MARTIN, M. P., GAO, X., LEE, J. H., NELSON, G. W., DETELS, R., GOEDERT, J. J., BUCHBINDER, S., HOOTS, K., VLAHOV, D., TROWSDALE, J., WILSON, M., O'BRIEN, S. J., & CARRINGTON, M. (2002). EPISTATIC INTERACTION BETWEEN KIR3DS1 AND HLA-B DELAYS THE PROGRESSION TO AIDS. *NATURE GENETICS*, 31(4), 429–434. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NG934](https://doi.org/10.1038/NG934)
218. BUTSCH KOVACIC, M., MARTIN, M., GAO, X., FUKSENKO, T., CHEN, C. J., CHENG, Y. J., CHEN, J. Y., APPLE, R., HILDESHEIM, A., & CARRINGTON, M. (2005). VARIATION OF THE KILLER CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS AND HLA-C GENES IN NASOPHARYNGEAL CARCINOMA. *CANCER EPIDEMIOLOGY, BIOMARKERS & PREVENTION : A PUBLICATION OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, COSPONSORED BY THE*

AMERICAN SOCIETY OF PREVENTIVE ONCOLOGY, 14(11 PT 1), 2673–2677. [HTTPS://DOI.ORG/10.1158/1055-9965.EPI-05-0229](https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0229)

219. OMOSUN, Y. O., BLACKSTOCK, A. J., WILLIAMSON, J., VAN EIJK, A. M., AYISI, J., OTIENO, J., LAL, R. B., TER KUILE, F. O., SLUTSKER, L., & SHI, Y. P. (2018). ASSOCIATION OF MATERNAL KIR GENE CONTENT POLYMORPHISMS WITH REDUCTION IN PERINATAL TRANSMISSION OF HIV-1. *PLOS ONE*, 13(1), E0191733. [HTTPS://DOI.ORG/10.1371/JOURNAL.PONE.0191733](https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0191733)
220. LUC-AIMÉ, K. S., LOUIS-MARIE, Y., GABRIEL, L. E., YENGO, C. K., ESEMU LIVO, F., & ASSOBO, N. J. C. (2021). KILLER-CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS (KIR) IN HIV-EXPOSED INFANTS IN CAMEROON. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY RESEARCH*, 2021, 9053280. [HTTPS://DOI.ORG/10.1155/2021/9053280](https://doi.org/10.1155/2021/9053280)
221. CELLA, M., LONGO, A., FERRARA, G. B., STROMINGER, J. L., & COLONNA, M. (1994). NK3-SPECIFIC NATURAL KILLER CELLS ARE SELECTIVELY INHIBITED BY BW4-POSITIVE HLA ALLELES WITH ISOLEUCINE 80. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE*, 180(4), 1235–1242. [HTTPS://DOI.ORG/10.1084/JEM.180.4.1235](https://doi.org/10.1084/JEM.180.4.1235)
222. CARR, W. H., PANDO, M. J., & PARHAM, P. (2005). KIR3DL1 POLYMORPHISMS THAT AFFECT NK CELL INHIBITION BY HLA-BW4 LIGAND. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950)*, 175(8), 5222–5229. [HTTPS://DOI.ORG/10.4049/JIMMUNOL.175.8.5222](https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.175.8.5222)
223. GUMPERZ, J. E., BARBER, L. D., VALIANTE, N. M., PERCIVAL, L., PHILLIPS, J. H., LANIER, L. L., & PARHAM, P. (1997). CONSERVED AND VARIABLE RESIDUES WITHIN THE BW4 MOTIF OF HLA-B MAKE SEPARABLE CONTRIBUTIONS TO RECOGNITION BY THE NKB1 KILLER CELL-INHIBITORY RECEPTOR. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950)*, 158(11), 5237–5241.
224. QI, Y., MARTIN, M. P., GAO, X., JACOBSON, L., GOEDERT, J. J., BUCHBINDER, S., KIRK, G. D., O'BRIEN, S. J., TROWSDALE, J., & CARRINGTON, M. (2006). KIR/HLA PLEIOTROPISM: PROTECTION AGAINST BOTH HIV AND OPPORTUNISTIC INFECTIONS. *PLOS PATHOGENS*, 2(8), E79. [HTTPS://DOI.ORG/10.1371/JOURNAL.PPAT.0020079](https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.0020079)
225. AHLENSTIEL, G., MARTIN, M. P., GAO, X., CARRINGTON, M., & REHERMANN, B. (2008). DISTINCT KIR/HLA COMPOUND GENOTYPES AFFECT THE KINETICS OF HUMAN ANTIVIRAL NATURAL KILLER CELL RESPONSES. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION*, 118(3), 1017–1026. [HTTPS://DOI.ORG/10.1172/JCI32400](https://doi.org/10.1172/JCI32400)
226. HOU, L., STEINER, N. K., CHEN, M., BELLE, I., KUBIT, A. L., NG, J., & HURLEY, C. K. (2008). LIMITED ALLELIC DIVERSITY OF STIMULATORY TWO-DOMAIN KILLER CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS. *HUMAN IMMUNOLOGY*, 69(3), 174–178. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.HUMIMM.2008.01.009](https://doi.org/10.1016/J.HUMIMM.2008.01.009)

227. NAMEKAWA, T., SNYDER, M. R., YEN, J. H., GOEHRING, B. E., LEIBSON, P. J., WEYAND, C. M., & GORONZY, J. (2000). KILLER CELL ACTIVATING RECEPTORS FUNCTION AS COSTIMULATORY MOLECULES ON CD4+CD28NULL T CELLS CLONALLY EXPANDED IN RHEUMATOID ARTHRITIS. JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950), 165(2), 1138–1145. [HTTPS://DOI.ORG/10.4049/JIMMUNOL.165.2.1138](https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.165.2.1138)
228. ŁUSZCZEK, W., MAŃCZAK, M., CISŁO, M., NOCKOWSKI, P., WIŚNIEWSKI, A., JASEK, M., & KUŚNIERCZYK, P. (2004). GENE FOR THE ACTIVATING NATURAL KILLER CELL RECEPTOR, KIR2DS1, IS ASSOCIATED WITH SUSCEPTIBILITY TO PSORIASIS VULGARIS. HUMAN IMMUNOLOGY, 65(7), 758–766. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.HUMIMM.2004.05.008](https://doi.org/10.1016/J.HUMIMM.2004.05.008)
229. MIDDLETON, D., HALFPENNY, I., MEENAGH, A., WILLIAMS, F., SIVULA, J., & TUOMILEHTO-WOLF, E. (2006). INVESTIGATION OF KIR GENE FREQUENCIES IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS. HUMAN IMMUNOLOGY, 67(12), 986–990. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.HUMIMM.2006.08.295](https://doi.org/10.1016/J.HUMIMM.2006.08.295)
230. KITAWAKI, J., XU, B., ISHIHARA, H., FUKUI, M., HASEGAWA, G., NAKAMURA, N., MIZUNO, S., OHTA, M., OBAYASHI, H., & HONJO, H. (2007). ASSOCIATION OF KILLER CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTOR GENOTYPES WITH SUSCEPTIBILITY TO ENDOMETRIOSIS. AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY (NEW YORK, N.Y. : 1989), 58(6), 481–486. [HTTPS://DOI.ORG/10.1111/J.1600-0897.2007.00533.x](https://doi.org/10.1111/J.1600-0897.2007.00533.x)
231. NAUMOVA, E., MIHAYLOVA, A., STOITCHKOV, K., IVANOVA, M., QUIN, L., & TONEVA, M. (2005). GENETIC POLYMORPHISM OF NK RECEPTORS AND THEIR LIGANDS IN MELANOMA PATIENTS: PREVALENCE OF INHIBITORY OVER ACTIVATING SIGNALS. CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY : CII, 54(2), 172–178. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/s00262-004-0575-z](https://doi.org/10.1007/s00262-004-0575-z)
232. VERHEYDEN, S., BERNIER, M., & DEMANET, C. (2004). IDENTIFICATION OF NATURAL KILLER CELL RECEPTOR PHENOTYPES ASSOCIATED WITH LEUKEMIA. LEUKEMIA, 18(12), 2002–2007. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/SJ.LEU.2403525](https://doi.org/10.1038/SJ.LEU.2403525)
233. BESSON, C., ROETYNCK, S., WILLIAMS, F., ORSI, L., AMIEL, C., LEPENDEVEN, C., ANTONI, G., HERMINE, O., BRICE, P., FERME, C., CARDE, P., CANIONI, D., BRIÈRE, J., RAPHAEL, M., NICOLAS, J. C., CLAVEL, J., MIDDLETON, D., VIVIER, E., & ABEL, L. (2007). ASSOCIATION OF KILLER CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTOR GENES WITH HODGKIN'S LYMPHOMA IN A FAMILIAL STUDY. PLOS ONE, 2(5), e406. [HTTPS://DOI.ORG/10.1371/JOURNAL.PONE.0000406](https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0000406)
234. BAHLER, D. W., HARTUNG, L., HILL, S., BOWEN, G. M., & VONDERHEID, E. C. (2008). CD158k/KIR3DL2 IS A USEFUL MARKER FOR IDENTIFYING NEOPLASTIC T-CELLS IN SÉZARY SYNDROME BY FLOW CYTOMETRY. CYTOMETRY. PART B, CLINICAL CYTOMETRY, 74(3), 156–162. [HTTPS://DOI.ORG/10.1002/CYTO.B.20395](https://doi.org/10.1002/CYTO.B.20395)

235. MORICE, W. G., KURTIN, P. J., LEIBSON, P. J., TEFFERI, A., & HANSON, C. A. (2003). DEMONSTRATION OF ABERRANT T-CELL AND NATURAL KILLER-CELL ANTIGEN EXPRESSION IN ALL CASES OF GRANULAR LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA. *BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY*, 120(6), 1026–1036. [HTTPS://DOI.ORG/10.1046/J.1365-2141.2003.04201.X](https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04201.x)
236. MOFFETT, A., & SHREEVE, N. (2023). LOCAL IMMUNE RECOGNITION OF TROPHOBLAST IN EARLY HUMAN PREGNANCY: CONTROVERSIES AND QUESTIONS. *NATURE REVIEWS. IMMUNOLOGY*, 23(4), 222–235. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/S41577-022-00777-2](https://doi.org/10.1038/s41577-022-00777-2)
237. ZEGERS-HOCHSCHILD, F., ADAMSON, G. D., DYER, S., RACOWSKY, C., DE MOUZON, J., SOKOL, R., RIENZI, L., SUNDE, A., SCHMIDT, L., COOKE, I. D., SIMPSON, J. L., & VAN DER POEL, S. (2017). THE INTERNATIONAL GLOSSARY ON INFERTILITY AND FERTILITY CARE, 2017. *FERTILITY AND STERILITY*, 108(3), 393–406. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.FERTNSTERT.2017.06.005](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005).
238. SANIDAD CDE, COMUNIDAD DELA, LEMINI C, DUE OF, ORGANIZACIÓN L, NACIONAL EC, ET AL. INTRODUCCIÓN DEFINICIÓN EPIDEMIOLOGÍA. 2021;1–11.
239. ORR, M. T., & LANIER, L. L. (2010). NATURAL KILLER CELL EDUCATION AND TOLERANCE. *CELL*, 142(6), 847–856. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.CELL.2010.08.031](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.031)
240. LEUNG, W., IYENGAR, R., TURNER, V., LANG, P., BADER, P., CONN, P., NIETHAMMER, D., & HANDGRETINGER, R. (2004). DETERMINANTS OF ANTILEUKEMIA EFFECTS OF ALLOGENEIC NK CELLS. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950)*, 172(1), 644–650. [HTTPS://DOI.ORG/10.4049/JIMMUNOL.172.1.644](https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.172.1.644).
241. KIECKBUSCH, J., GAYNOR, L. M., MOFFETT, A., & COLUCCI, F. (2014). MHC-DEPENDENT INHIBITION OF UTERINE NK CELLS IMPEDES FETAL GROWTH AND DECIDUAL VASCULAR REMODELLING. *NATURE COMMUNICATIONS*, 5, 3359. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NCOMMS4359](https://doi.org/10.1038/ncomms4359)
242. ORGUL, G., DALVA, K., DALVA-AYDEMIR, S., ALNIACIK, R. G., DONMEZ, H. G., CAKAR, A. N., BEKSAC, M., & BEKSAC, M. S. (2021). SIGNIFICANCE OF INHIBITORY MATERNAL KILLER-CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTOR (KIR) AND FETAL KIR LIGAND GENOTYPE COMBINATIONS IN PLACENTA RELATED OBSTETRIC COMPLICATIONS. *JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY*, 148, 103425. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JRI.2021.103425](https://doi.org/10.1016/j.jri.2021.103425)





DATOS SUPLEMENTARIOS

Bloque I

Tabla suplementaria 1. Haplotipo Cen/tel en grupos de esterilidad y muerte fetal.

FRECUENCIAS DE HAPLOTIPOS CENTROMÉRICOS Y TELOMÉRICOS DE KIR EN COMPARACIÓN CON LA POBLACIÓN DE REFERENCIA									
	P de Ref (n=402)	ES (n=60)				MF (n=28)			
	N (%)	N (%)	P	Odds Ratio	IC 95%	N (%)	P	Odds Ratio	IC 95%
cenAA	162 (40,34)	29 (48,33)	NS	1,198	0,742-1,933	12 (42,86)	NS	1,062	0,614-2,939
cenAB	178 (44,18)	22 (36,67)	NS	0,830	0,493-1,393	14 (50,00)	NS	1,110	0,607-2,029
cenBB	42 (10,61)	9 (15,00)	NS	1,411	0,655-3,037	2 (7,14)	NS	-	0-0.802
telAA	211 (55,07)	33 (55,00)	NS	0,999	0,634-1,573	16 (57,14)	NS	0,490	0,550-1,958
telAB	146 (36,23)	23 (38,33)	NS	1,058	0,632-1,772	11 (39,29)	NS	1,084	0,527-2,232
telBB	15 (3,83)	4 (6,67)	NS	1,725	0,558-5,332	1 (3,57)	NS	0,924	0,118-7,223

Abreviaturas: Cen AA: haplotipo KIR centromérico A; Cen AB: haplotipo KIR centromérico AB; Cen BB: haplotipo KIR centromérico B; Tel AA: haplotipo KIR telomérico A; Tel AB: haplotipo KIR telomérico AB; Ten BB: haplotipo KIR telomérico B; IC intervalo de confianza; ES: esterilidad; MF: muerte fetal.

Tabla suplementaria 2. Combinación de HLA-C1 y HLA-C2 en los diferentes grupos de estudio de mujeres con sus parejas.

FRR				AR				
N (%)	P	Odds Ratio	IC 95%	N (%)	P	Odds Ratio	95% CI	
28 (9,03)	0,004	0,260	0,105-0,642	10 (7,09)	<0,001	0,200	0,071-0,565	
52 (16,77)	NS	0,927	0,337-2,550	24 (17,02)	NS	0,943	0,326-2,729	
24 (7,74)	NS	2,349	0,306-18,029	13 (9,22)	NS	2,843	0,357-22,642	
43 (13,87)	NS	0,506	0,203-1,256	23 (16,31)	NS	0,612	0,234-1,601	
77 (24,84)	NS	2,864	0,843-9,726	38 (26,95)	0,050	3,197	0,914-11,178	
31 (10,00)	NS	-	-	7 (4,96)	NS	-	-	
20 (6,40)	NS	0,597	0,166-2,145	7 (4,96)	NS	0,452	0,109-1,866	
30 (9,68)	NS	3,000	0,394-22,840	9 (11,35)	NS	1,909	0,232-15,682	
5 (1,61)	NS	0,459	0,051-4,067	3 (2,13)	NS	0,608	0,061-6,067	

Abreviaturas: AR: aborto de repetición; FIR: fallo de implantación recurrente; FRR: fallo reproductivo recurrente; FRR: fallo reproductivo recurrente; NS: no significativo; C1C1: haplotipo HLA-C homocigoto C1; C1C2: haplotipo HLA-C heterocigoto; C2C2: haplotipo HLA-C homocigoto C2.

	FIR				GCS	Combinación HLA / Grupos
	N(%)	P	Odds Ratio	IC 95%	N (%)	
	10 (10,42)	0,002	0,305	0,107-0,867	8 (27,59)	C1C1/C1C1
	13 (13,54)	NS	0,751	0,243-2,320	5 (17,24)	C1C1/C1C2
	9 (9,38)	NS	2,896	0,351-23,878	1 (3,45)	C1C1/C2C2
	11 (11,46)	NS	0,406	0,141-1,170	7 (24,14)	C1C2/C1C1
	20 (20,83)	NS	2,280	0,626-8,307	3 (10,34)	C1C2/C1C2
	16 (16,67)	0,019	-	-	0 (0,00)	C1C2/C2C2
	9 (9,38)	NS	0,896	0,226-3,557	3 (10,34)	C2C2/C1C1
	7 (7,29)	NS	2,202	0,259-18,679	1 (3,45)	C2C2/C1C2
	1 (1,04)	NS	0,294	0,017-4,864	1 (3,45)	C2C2/C2C2

Tabla suplementaria 3. Matriz de combinaciones entre haplotipos KIR y HLA-C1 y C2 en los distintos grupos de estudio.

KIR	Combinación HLA/ Grupos	GCS	FRR				
		N (%)	N (%)	P	Odds Ratio	IC 95%	
cenAA	C1C1/C1C1	5 (17,24)	11 (3,55)	<0,001	0,176	0,056-0,549	
	C1C1/C1C2	4 (13,79)	25 (8,06)	NS	0,548	0,176-1,700	
	C1C1/C2C2	1 (3,45)	8 (2,58)	NS	0,741	0,089-6,146	
	C1C2/C1C1	2 (6,90)	28 (9,03)	NS	1,340	0,302-5,935	
	C1C2/C1C2	1 (3,45)	40 (12,90)	NS	4,148	0,549-31,337	
	C1C2/C2C2	0 (0,00)	16 (5,16)	NS	-	-	
	C2C2/C1C1	2 (6,89)	9 (2,90)	NS	0,837	0,102-6,850	
	C2C2/C1C2	1 (3,45)	12 (3,87)	NS	0,543	0,115-2,556	
	C2C2/C2C2	0 (0,00)	1 (0,32)	NS	-	-	
		N (%)	N(%)	P	Odds Ratio	IC 95%	
cenAB	C1C1/C1C1	2 (6,89)	15 (4,84)	NS	0,686	0,149-3,161	
	C1C1/C1C2	0 (0,00)	20 (6,45)	NS	-	-	
	C1C1/C2C2	0 (0,00)	15 (4,84)	NS	-	-	
	C1C2/C1C1	4 (13,79)	10 (3,23)	0,004	0,208	0,061-0,712	
	C1C2/C1C2	1 (3,45)	31 (10,00)	NS	3,111	0,409-23,662	
	C1C2/C2C2	0 (0,00)	14 (4,52)	NS	-	-	
	C2C2/C1C1	1 (3,45)	9 (2,90)	NS	0,837	0,102-6,851	
	C2C2/C1C2	0 (0,00)	14 (4,52)	NS	-	-	
	C2C2/C2C2	0 (0,00)	4 (1,29)	NS	-	-	
		N (%)	N (%)	P	Odds Ratio	IC 95%	
cenBB	C1C1/C1C1	1 (3,45)	2 (0,65)	NS	0,181	0,016-2,068	
	C1C1/C1C2	1 (3,45)	8 (2,58)	NS	0,741	0,089-6,146	
	C1C1/C2C2	0 (0,00)	1 (0,32)	NS	-	-	
	C1C2/C1C1	1 (3,45)	5 (1,61)	NS	0,459	0,051-4,067	
	C1C2/C1C2	1 (3,45)	6 (1,94)	NS	0,552	0,064-4,754	
	C1C2/C2C2	0 (0,00)	1 (0,32)	NS	-	-	
	C2C2/C1C1	0 (0,00)	2 (0,65)	NS	-	-	
	C2C2/C1C2	0 (0,00)	3 (0,97)	NS	-	-	
	C2C2/C2C2	1 (3,45)	0 (0,00)	NS	-	-	

GCS: grupo control sano; FRR: fallo reproductivo recurrente; FIR: fallo de implantación recurrente; AR: aborto de repetición; IC: intervalo de confianza; Cen AA: haplotipo centromérico A; Cen AB: haplotipo centromérico AB; Cen BB: haplotipo centromérico B; C1C1: haplotipo HLA-C homocigoto C1; C1C2: haplotipo HLA-C heterocigoto; C2C2: haplotipo HLA-C homocigoto C2.

	AR				FIR			
	N (%)	P	Odds Ratio	CI 95%	N (%)	P	Odds Ratio	IC 95%
	5 (3,54)	0,004	0.176	0,047-0,656	4 (4,17)	0,015	0,208	0,052-0,837
	12 (8,51)	NS	0,581	0,173-1,949	5 (5,21)	NS	0,343	0,085-1,375
	4 (2,84)	NS	0,817	0,088-7,593	4 (4,17)	NS	1,217	0,130-11,342
	16 (11,34)	NS	1,728	0,375-7,962	9 (9,38)	NS	1,396	0,284-6,861
	21 (14,89)	NS	4,900	0,632-37,981	10 (10,42)	NS	3,255	0,398-26,572
	4 (2,84)	NS	-	-	6 (6,25)	NS	-	-
	3 (2,13)	NS	0,293	0,046-1,840	4 (4,17)	NS	0,587	0,101-3,380
	7 (4,96)	NS	1,462	0,173-12,364	2 (2,08)	NS	0,595	0,052-6,816
	1 (0,71)	NS	-	-	0 (0,00)	NS	-	-
	N(%)	P	Odds Ratio	IC 95%	N(%)	P	Odds Ratio	IC 95%
	4 (2,84)	NS	0,394	0,068-2,261	6 (6,25)	NS	0,900	0,171-4,719
	7 (4,96)	NS	-	-	8 (8,33)	NS	-	-
	8 (5,67)	NS	-	-	5 (5,21)	NS	-	-
	3 (2,13)	0,004	0,135	0,028-0,644	2 (2,08)	0,009	0.133	0,023-0,768
	15 (10,64)	NS	3,333	0,422-26,291	8 (8,33)	NS	2,545	0,304-21,247
	3 (2,13)	NS	-	-	9 (9,38)	NS	-	-
	3 (2,13)	NS	0,608	0,061-6,067	5 (5,21)	NS	1,538	0,172-13,725
	7 (4,96)	NS	-	-	5 (5,21)	NS	-	-
	2 (1,42)	NS	-	-	1 (1,04)	NS	-	-
	N (%)	P	Odds Ratio	IC 95%	N (%)	P	Odds Ratio	IC 95%
	1 (0,71)	NS	0,200	0,012-3,293	0 (0,00)	NS	-	-
	5 (3,54)	NS	1,029	0,115-9,154	0 (0,00)	NS	-	-
	1 (0,71)	NS	-	-	0 (0,00)	NS	-	-
	4 (2,84)	NS	0,817	0,088-7,593	0 (0,00)	NS	-	-
	2 (1,42)	NS	0,402	0,035-4,597	2 (2,08)	NS	0,595	0,052-6,816
	0 (0,00)	NS	-	-	1 (1,04)	NS	-	-
	1 (0,71)	NS	-	-	0 (0,00)	NS	-	-
	2 (1,42)	NS	-	-	0 (0,00)	NS	-	-
	0 (0,00)	NS	-	-	0 (0,00)	NS	-	-

Bloque II

Tabla suplementaria 4. Frecuencias de haplotipos KIR clásicos en los diferentes grupos de estudio.

Clasificación clásica				
		KIR AA	KIR AB	KIR BB
GCS (N=75)	N	15	60	3
	%	20,00	80,00	4.00
FIR(N=34)	N	16	18	0
	%	47,05	52,94	0.00
	Odds Ratio	3,5556	0,2813	-
	IC 95%	1,4754 - 8.5685	0,1167-0,6778	-
	P-valor	0,0047	0,0047	-
AR (N=41)	N	20	21	0
	%	48,78	51,22	0
	Odds Ratio	3,8095	0,2625	-
	IC 95%	1,6549 – 8,7693	0,1140 – 0,6043	-
	P-valor	0,0017	0,0017	-

KIR: receptor similar a la inmunoglobulina de las células NK; FIR: fallo de implantación recurrente; AR: aborto de repetición; GCS: grupo control sano; IC: Intervalo de confianza; NS: no significativo.

Tabla suplementaria 5. Frecuencias de haplotipos KIR centroméricos y teloméricos en los distintos grupos de estudio.

Clasificación motivo centromérico y motivo telomérico							
		CenAA	CenAB	CenBB	TelAA	TelAB	TelBB
GCS (N=75)	N	26	35	14	42	27	6
	%	34,67	46,67	18,67	56	36	8
FIR (N=34)	N	19	14	3	26	10	1
	%	55,88	41,17	8,82	76,47	29,41	2,94
	Odds Ratio	2,3872	0,8000	0,4217	2,5536	0,7407	0,3485
	IC 95%	1,0437 – 5,4599	0,3524 – 1,8163	0,1127 – 1,5781	1,0235 – 6,3708	0,3086 – 1,7779	0,0403 – 3,0136
	P-valor	0,0393	NS	NS	0,0444	NS	NS
AR (N=41)	N	24	20	3	34	15	3
	%	58,53	48,78	7,31	82,92	36,58	7,31
	Odds Ratio	3,0154	1,0884	0,3440	3,8163	1,0256	0,9079
	IC 95%	1,3529 – 6,7206	0,5080 – 2,3323	0,0927 – 1,2763	1,5019 – 9,6973	0,4649 – 2,2629	0,2148 – 3,8372
	P-valor	0,0070	NS	NS	0,0049	NS	NS

KIR: receptor similar a la inmunoglobulina de las células NK; FIR: fallo de implantación recurrente; AR: aborto de repetición; GCS: grupo control sano; IC: intervalo de confianza; NS: no significativo. Cen AA: haplotipo KIR centromérico A; Cen AB: haplotipo KIR centromérico AB; Cen BB: haplotipo KIR centromérico B; Tel AA: haplotipo KIR telomérico A; Tel AB: haplotipo KIR telomérico AB; Ten BB: haplotipo KIR telomérico B.

Tabla suplementaria 6. Frecuencia de los haplotipos de HLA-C en combinación con KIR centromérico de las pacientes en los diferentes grupos de estudio.

Combinación de haplotipo HLA-C con KIR centromérico							
		Cen AA			Cen BB		
		C1C1	C1C2	C2C2	C1C1	C1C2	C2C2
GCS	N	17	6	3	4	6	3
	%	65,38	23,07	11,5	30,76	46,15	23,07
FIR	N	7	12	3	0	0	3
	%	36,84	63,15	15,78	0	0	15,78
	Odds Ratio	0,1373	5,7143	1,4375	-	-	3,6667
	IC 95%	0,0431 – 0,4375	1,5506 – 21,0584	0,2567 – 8,0506	-	-	0,4734 – 28,4013
	P-Value	0,0008	0,0088	NS	-	-	NS
AR	N	4	9	9	0	3	0
	%	16,66	37,5	37,5	0	12,5	0
	Odds Ratio	0,1059	2	4,6000	-	1,3333	-
	IC 95%	0,0276 – 0,4058	0,5840-6,8491	1,0687 – 19,8000	-	0,1957 – 9,0831	-
	P-Value	0,0011	NS	0,0404	-	NS	-

GCS: grupo control sano; IC: intervalo de confianza. FIR: fallo de implantación recurrente; AR: aborto de repetición; IC: intervalo de confianza; NS: no significativo; NS: no significativo; C1C1: haplotipo HLA-C homocigoto C1; C1C2: haplotipo HLA-C heterocigoto; C2C2: haplotipo HLA-C homocigoto C2; Cen AA: haplotipo KIR centromérico A; Cen BB: haplotipo KIR centromérico B.

Tabla suplementaria 7 Frecuencia de los haplotipos de HLA-C2, C1 y Bw4 específicos para los receptores KIR2DL1, KIR2DL2/3 y KIR3DL1 respectivamente en los distintos grupos de estudio.

		KIR2DL1 (ausencia de C2)	KIR2DL2/2DL3 (ausencia de C1)	KIR3DL1 (ausencia de Bw4)
FIR	N	11	8	12
	%	32,35	23,53	35,29
	Odds Ratio	0,5767	2,2564	3,5455
	IC 95%	0,2464 – 1,3497	0,7857 – 6,4803	1,3460 – 9,3388
	P-Value	NS	NS	0,0104
AR	N	9	14	16
	%	23,95	34,14	39,02
	Odds Ratio	0,3392	3,8025	4,1600
	IC 95%	0,1424 – 0,8080	1,4712 – 9,8281	1,6663 – 10,3855
	P-Value	0,0146	0,0058	0,0023

IC: intervalo de confianza. AR: abortos de repetición; FIR: fallo de implantación recurrente; NS: no significativo

Tabla suplementaria 8. Frecuencia del dimorfismo B en la posición -21, se representa la homocigosis para T (TT), la homocigosis para M (MM) y la heterocigosis (MT) en los distintos grupos de estudio.

		TT	MT	MM
FIR	N	19	12	3
	%	55,88	35,29	8,82
	Odds Ratio	2,7282	0,4269	0,8903
	IC 95%	1,0615-7,0117	0,1675-1,0879	0,1982-3,9985
	P-Value	0,0372	0,0745	NS
AR	N	27	13	1
	%	65,85	31,7	2,43
	Odds Ratio	4,1538	0,3634	0,2300
	IC 95%	1,6527-10,4401	0,1475-0,8953	0,0258-2,0520
	P-Value	0,0025	0,0278	NS

FIR: fallo implantación recurrente; AR: aborto recurrente; IC: intervalo de confianza; NS: no significativo.

Tabla suplementaria 9. Matriz de la frecuencia de los haplotipos KIR centroméricos combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 en los distintos grupos de estudio.

		Cen AA			Cen BB		
		TT	MT	MM	TT	MT	MM
GCS	N	2	5	4	9	13	3
	%	4,76	11,9	9,52	18,6	30,95	7,14
FIR	N	15	6	1	0	0	1
	%	44,12	13,63	2,94	0	0	2,94
	Odds Ratio	15,3947	1,5429	0,2879	-	-	0,3838
	IC 95%	3,1899 – 74,2966	0,4266 – 5,5797	0,0306 – 2,7053	-	-	0,0381 – 3,8699
	P-Value	0,0007	NS	NS	0,0412	0,0171	NS
AR	N	20	2	0	2	3	0
	%	48,78	4,87	0	4,87	7,31	0
	Odds Ratio	18,571	0,3692	-	0,1823	0,1700	0,1325
	IC 95%	3,9522 – 87,2678	0,0674 – 2,0237	-	0,0367 – 0,9049	0,0442 – 0,6539	0,0066 – 2,6500
	P-Value	0,0002	NS	NS	0,0373	0,0099	NS

FIR: fallo de implantación recurrente; AR: aborto de repetición; GCS: grupo control sano; Cen AA: haplotipo KIR centromérico A; Cen BB: haplotipo KIR centromérico B; TT: homocigosis de treonina en la posición -21 de HLA-B; MT: heterocigosis de metionina y treonina en la posición -21 de HLA-B; MM: homocigosis de metionina en la posición -21 de HLA-B.

Tabla suplementaria 10. Matriz de la frecuencia de los haplotipos KIR teloméricos combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 en los distintos grupos de estudio.

		Tel AA			Tel BB		
		TT	MT	MM	TT	MT	MM
GCS	N	7	9	3	1	0	0
	%	16,67	21,42	7,14	2,38	0	0
FIR	N	13	9	2	0	0	0
	%	38,23	26,47	5,88	0	0	0
	Odds Ratio	3,0068	1,28	0,7917	-	-	-
	IC 95%	1,0336 – 8,7468	0,4427 – 3,7012	0,1245 – 5,0348	-	-	-
	P-Value	0,0433	NS	NS	NS	-	-
AR	N	21	8	0	1	0	0
	%	51,21	19,51	0	2,43	0	0
	Odds Ratio	5,1000	0,8620	-	1	-	-
	IC 95%	1,8423 – 14,1183	0,2958 – 2,5113	-	0,0604 – 16,5485	-	-
	P-Value	0,0017	NS	NS	NS	-	-

IC: intervalo de confianza; NS: no significativo. FIR: fallo de implantación recurrente; AR: aborto de repetición; GCS: grupo control sano; Tel AA: haplotipo KIR telomérico A; Tel BB: haplotipo KIR telomérico B; TT: homocigosis de treonina en la posición -21 de HLA-B; MT: heterocigosis de metionina y treonina en la posición -21 de HLA-B; MM: homocigosis de metionina en la posición -21 de HLA-B.

Tabla suplementaria 11 Matriz de la frecuencia de la hipótesis de ausencia de ligando para los KIR inhibitorios de interés combinado con el dimorfismo del HLA-B en la posición -21 en los distintos grupos de estudio.

		KIR2DL1 (ausencia de C2) /TT	KIR2DL1 (ausencia de C2) /M	KIR2DL2/3 (ausencia de C1) /TT	KIR2DL2/3 (ausencia de C1) /M	KIR3DL1 (ausencia de Bw4) /TT	KIR3DL1 (ausencia de Bw4) /M
GCS	N	1	17	1	2	0	5
	%	2,5	42,5	2,5	4,87	0	12,5
FIR	N	5	2	3	5	5	8
	%	14,7	5,88	8,82	14,7	14,7	23,53
	Odds Ratio	6,8966	0,0882	3,871	33621	15,4746	2,2154
	IC 95%	0,7644-62,2193	0,0186-0,4190	0,3837-39,0484	0,6088-18,5670	0,8235-290,7708	0,6502-7,5488
	P-value	NS	,0023	NS	NS	0,0672	NS
AR	N	3	1	10	2	7	8
	%	7,31	2,43	24,4	4,87	17,07	19,51
	Odds Ratio	3,000	0,0353	12,9032	1,000	18,0435	1,7455
	IC 95%	0,2992-30,0803	0,0044- 0,2823	1,5667-106,2681	0,1340-7,4605	0,9946,327,3220	0,5189-5,8716
	P-value	NS	0,0016	0,0174	NS	0,0504	NS

FIR: fallo de implantación recurrente; AR: aborto de repetición; GCS: el grupo control sano; IC: intervalo de confianza; NS: no significativo; TT: homocigosis de treonina en la posición -21 de HLA-B; MT: heterocigosis de metionina y treonina en la posición -21 de HLA-B; MM: homocigosis de metionina en la posición -21 de HLA-B; C1C1: haplotipo HLA-C homocigoto C1; C1C2: haplotipo HLA-C heterocigoto; C2C2: haplotipo HLA-C homocigoto C2



OPEN

Centromeric AA motif in KIR as an optimal surrogate marker for precision definition of alloimmune reproductive failure

Raquel Gil Laborda¹, Edgard Rodríguez de Frías¹, Nabil Subhi-Issa¹, Elena Carrillo de Albornoz^{3,4}, Elena Meliá³, Marcos Órdenes⁴, Victoria Verdú^{5,6}, Juan Vidal³, Esther Suárez³, Isabel Santillán^{5,7}, Daniel Ordóñez^{3,4}, David Pintado-Vera⁸, Victoria González Villafañez⁵, Ángel Lorenzo^{3,4}, Manuel Fariñas⁹, Mario Rodríguez-Paño⁹, María Núñez Beltrán¹, Áurea García Segovia¹⁰, Ainhoa del Olmo¹, Fernando Martín Cañadas¹¹, Rosa Daurelio⁵, Alfonso de la Fuente⁷, José Manuel González Casbas⁷, Vega Cabezuelo³, Francisco Ros Berrueto¹², Miguel Ángel Moreno Hidalgo¹³, Silvia Iniesta⁴, Beatriz Bueno⁴, Álvaro Martínez Acera^{3,4}, Alexandra Izquierdo¹, José Luis Vicario¹³, Miguel Fernández-Arquero¹ & Silvia Sánchez-Ramón²✉

Throughout pregnancy, the decidua is predominantly populated by NK lymphocytes expressing Killer immunoglobulin-like receptors (KIR) that recognize human leukocyte antigen-C (HLA-C) ligands from trophoblast cells. This study aims to investigate the association of KIR-HLA-C phenotypes in couples facing infertility, particularly recurrent pregnancy loss (RPL) and recurrent implantation failure (RIF), in comparison to a reference population and fertile controls. This observational, non-interventional retrospective case-control study included patients consecutively referred to our Reproductive Immunology Unit from 2015 to 2019. We analyzed the frequencies of KIR and HLA-C genes. As control groups, we analyzed a reference Spanish population for KIR analysis and 29 fertile controls and their male partners for KIR and HLA-C combinations. We studied 397 consecutively referred women with infertility and their male partners. Among women with unexplained RPL (133 women) and RIF (176 women), the centromeric (cen)AA KIR genotype was significantly more prevalent compared to the reference Spanish population ($p = 0.001$ and 0.02 , respectively). Furthermore, cenAA was associated with a 1.51-fold risk of RPL and a 1.2-fold risk of RIF. Conversely, the presence of BB KIR showed a lower risk of reproductive failure compared to non-BB KIR (OR: 0.12, $p < 0.001$). Women and their partners with HLA-C1C1/C1C1 were significantly less common in the RPL-Group ($p < 0.001$) and RIF-Group ($p = 0.002$) compared to the control group. Moreover, the combination of cenAA/C1C1 in women with C1C1 partners was significantly higher in the control group than in the RPL ($p = 0.009$) and RIF ($p = 0.04$) groups, associated with a 5-fold increase in successful pregnancy outcomes. In our cohort, the cenAA KIR haplotype proved to be a more accurate biomarker than the classic AA KIR haplotype for assessing the risk of RPL and RIF, and might be particularly useful to identify women at increased risk among the heterogeneous KIR AB or Bx population. The classification of centromeric KIR haplotypes outperforms classical KIR haplotypes, making it a better indicator of potential maternal-fetal KIR-HLA-C mismatch in patients.

¹Department of Immunology, IML and IdISSC, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain. ²Clinical Immunology Unit, Hospital Ruber Internacional, Madrid, Spain. ³Woman Unit, Hospital Ruber Internacional, Madrid, Spain. ⁴Assisted Reproductive Unit, Hospital Ruber Internacional, Madrid, Spain. ⁵Clínica GINEFIV, Madrid, Spain. ⁶Clínica IVF, Madrid, Spain. ⁷Instituto Europeo de Fertilidad (IEF), Madrid, Spain. ⁸Sterility and Infertility Unit, Hospital Quiron Salud, Pamplona, Spain. ⁹Clínica Hemomadrid, Madrid, Spain. ¹⁰Sanitas Assisted Reproduction Unit, Clínica Sanitas Millenium Alcobendas, Madrid, Spain. ¹¹Instituto Malavé de Ginecología, Málaga, Andalucía, Spain. ¹²Assisted Reproduction Unit in HM Fertility Center, Gabinete Velázquez, Madrid, Spain. ¹³Centro de Trasfusión de la Comunidad de Madrid, Madrid, Spain. ✉email: silvia.sanchez@ruberinternacional.es

Keywords Immunoglobulin-Like Receptor, Killer Cell, Natural Killer Cells, HLA-C Lymphocyte Antigen, Unexplained Recurrent Pregnancy Loss, Recurrent Pregnancy Loss, Recurrent Implantation Failure

Recurrent Pregnancy Loss (RPL) and Recurrent Implantation Failure (RIF) are discrete clinical conditions characterized by distinct gynecological and immunological risk factors¹. RPL is a multifaceted reproductive disorder with diverse potential causes and contributing factors that extend beyond embryonic abnormalities. Nevertheless, the etiology remains unexplained in nearly 50% of cases². Conversely, RIF encompasses various risk factors, including maternal factors such as age, BMI, stress, and tobacco use, along with embryonic genetic abnormalities, which contribute to 50–70% of implantation failures^{3,4}. Despite the advances in in vitro fertilization (IVF) and preimplantation genetic testing (PGT), more than 30% of euploid embryos fail to result in a live birth. This suggests the involvement of immunological, endocrine, or hematologic factors, such as obstetrical antiphospholipid syndrome (OAPS) and thyroid disorders. In the past decade, various maternal inflammatory processes have been associated with RPL and RIF, encompassing a proinflammatory profile of peripheral natural killer (NK) cells, T lymphocyte differentiation, and altered function of uterine NK (uNK) cells^{5,6}.

The first trimester of pregnancy witnesses a significant presence of uNK cells in the endometrium, constituting about 70% of maternal immune cells during the implantation window^{7–9}. These cells play a pivotal role in placental development and the remodeling of uterine spiral arteries in early pregnancy. Disrupted uNK cell function can lead to defective uterine spiral artery remodeling and shallow placental implantation, which are associated with serious obstetric syndromes beyond RPL, like preeclampsia (PE)¹⁰, fetal growth restriction (FGR), and stillbirth (S)^{7,11}. More recently, uterine innate lymphoid cells (uILCs) including subsets of tissue-resident uNKs cells and non-NK ILCs, mainly ILC1, ILC3 and LTi-like cells, interact with ligands expressed on fetal extravillous trophoblasts (EVT)¹².

Human Leukocyte Antigens (HLA) expressed by the EVT in early pregnancy, such as oligomorphic HLA-E and HLA-G¹³, alongside the highly polymorphic HLA-C, play a pivotal role in the selective recognition by uNK cells. Killer Immunoglobulin-like Receptors (KIRs), a distinctive set of receptors on uNK cells, engage with HLA-C at the maternal–fetal interface. Featuring both activating and inhibitory motifs, KIR finely modulate uNK cell activity and contribute to early placental development⁵. KIRs interact with various HLA-C allotypes, categorized into C1 and C2 groups^{14,15}. While HLA-C1 molecules have minimal impact on uNK cell activity, the binding of HLA-C2 to KIR2DL1 or KIR2DS1 strongly inhibits or activates uNK cells, respectively¹⁶.

KIR genes are inherited in linkage disequilibrium, forming two haplotypes: haplotype A, distinguished by a fixed combination of nine genes (7 protein-coding genes and 2 pseudogenes) predominantly exerting inhibitory effects, including KIR2DL1; and haplotype B, encompassing a more diverse KIR gene content, exerting non-effect or activator effects on NK cells (Fig. 1)¹⁷. Further subdivision of each KIR haplotype into centromeric and telomeric motifs contributes to genetic polymorphism^{18,19}. The recombination of these motifs accounts for most KIR genotypes observed in the European population. KIR2DL1 alleles inherited within the centromeric motifs of haplotype A (cenA) exert stronger inhibitory and educating effects on uNK cells compared to those inherited within centromeric motifs of haplotype B (cenB). This distinction arises from the specific combination of receptors defining each haplotype^{16,20,21}.

Previous research observed an increased frequency of KIR AA in women experiencing RPL²², as well as in cases of PE^{10,23,24}. Conversely, other studies reported a decreased frequency of inhibitory KIRs^{25,26} or a prevalence of activating KIRs in patients with RPL²⁷. Recent findings also indicated a higher miscarriage rate in women with the KIR AA haplotype undergoing IVF, although KIR frequency in the RIF group was not reported²⁸. In a study by Morin et al., the KIR AA and HLA-C2 combination strongly correlated with subsequent embryo loss in a retrospective cohort of nearly 700 individual euploid embryo transfers, while KIR Bx (comprising AB and BB) was linked to 30% of pregnancy loss independently of HLA-C²⁹.

While the negative impact of the KIR AA haplotype on reproduction is well documented, the influence of other KIR gene combinations remains less explored. This knowledge gap can be attributed, in part, to varying classifications of KIR genotypes. According to the World Health Organization (WHO) and the Human Genome Organization Subcommittee on KIR Nomenclature, haplotype A is defined by a fixed combination of nine genes, whereas haplotype Bx encompassing any other KIR gene combination, is less distinctly characterized and displays considerable heterogeneity³⁰. Recent research has made significant strides in comprehending the structure and variability patterns of the KIR gene complex, culminating in an enhanced classification system based on centromeric and telomeric motifs (Fig. 1).

In this study, we sought to assess the prevalence of two cenAA in a substantial cohort of women experiencing unexplained RPL and RIF. Our findings suggest that cenAA could potentially serve as a more robust biomarker for predicting adverse pregnancy outcomes compared to the classical AA haplotype. Importantly, this may be especially valuable in identifying women at an elevated risk within the heterogeneous KIR AB or Bx population.

Materials and methods

Study design

Our study was designed as a retrospective, observational case–control study, specifically aimed at assessing whether the classification of KIR into centromeric and telomeric motifs introduces additional clinical significance beyond the classical KIR classification.

Subjects

Our study group included women with RPL and RIF, S and FD of unknown etiology along with their partners. These individuals were consecutively referred for immunological evaluation at a single Reproductive Immunology Unit of Hospital Ruber Internacional between 2015 and 2019. Routine clinical assessments were conducted

Haplotype	Cen motif	Tel motif	Centromeric genes					Telomeric genes					Cen and tel genes					Framework genes				
			2DS2	2DL2	2DL3	2DP1	2DL1	3DL1	2DS4	2DS4N	3DS1	2DS1	2DL5	2DS3	2DS5	2DL3	3DP1	2DL4	3DL2			
A	Cen A	Tel A																				
	Cen A	Tel B																				
B	Cen B1	Tel A																				
	Cen B1	Tel B																				
	Cen B2	Tel A																				
	Cen B2	Tel B																				

Figure 1. The KIR gene cluster is characterized by its centromeric (Cen) and telomeric (Tel) gene content motifs. Within the KIR locus, the genes are organized in a distinct manner. The centromeric and telomeric regions are separated by a unique recombination site sequence, which allows for the exchange of genes between the centromeric and telomeric motifs. The common motifs contain a set of conserved framework genes, shaded in gray, while the B haplotype genes are represented in orange, and the A haplotype genes are shown in pink. The centromeric genes crucial for haplotype generation, namely 2DL2, 2DL3, and 2DS2, play a pivotal role. The co-occurrence of 2DL2 and 2DL3 results in the AB haplotype, while the presence of solely 2DL3 yields the AA haplotype, and solely 2DL2 leads to the BB haplotype. The 2DS2 allele exclusively manifests within the AB or BB haplotypes. Turning to the telomeric haplotype, key genes involved in its determination include 3DL1, 3DS1, 2DS4, and 2DS1. Specifically, the AB haplotype emerges when a concurrent presence of 3DL1 and 2DS4 accompanies 3DS1 and 2DS1. Conversely, the exclusive presence of 3DL1 and 2DS4 delineates the AA haplotype, while the co-presence of 3DS1 and 2DS1 characterizes the BB haplotype.

on these patients, and the findings were systematically documented for subsequent group analyses. The reference population group for KIR genotype was derived from a study by Vilches et al.³¹, focusing on a Spanish Population. For KIR-HLA-C combinations comparative purposes, our control group consisted of 29 women and their partners with a history of at least two natural uncomplicated pregnancies resulting in the birth of at least two healthy newborns. This group was used for further analysis and comparisons from our laboratory³².

The study adhered to the Declaration of Helsinki. For the study group, the Institutional Ethics Committee of Clinical Research of the Center (CEIC del Hospital RUBER Internacional) approved the study protocol (Project No. Sa-16290 / 19-EC: 401, code: MARINMFR_01_2020). Informed consent was waived by the center's ethics committee (CEIC del Hospital RUBER Internacional) due to the anonymized nature of the database and the impracticality of contacting each patient to obtain specific consent for the retrospective research. As for the healthy control group, we examined fertile women and their partners in the setting of another project (FIS PI19/01450). The study protocol including fertile healthy controls was approved by the Ethics Committee of Hospital Clínico San Carlos, and all subjects provided signed informed consent.

In this context, we defined the following groups: Sterility (S): Defined as the inability to achieve a clinical pregnancy after 12 months of regular, unprotected sexual intercourse, following the International Glossary on Infertility and Fertility Care³³. Recurrent Pregnancy Loss (RPL): Defined as the loss of two or more pregnancies, including non-visualized pregnancy losses, according to the European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guidelines. Recurrent Implantation Failure (RIF): Defined as the failure to achieve a clinical pregnancy after more than 3 high-quality embryo transfers or after the transfer of ≥ 10 embryos in multiple transfers in women below 40 years of age. Fetal Death (FD): Defined as a composite outcome that included women with a history of late fetal loss (between 22 and 28 weeks of pregnancy) and stillbirth (after 28 weeks of gestational age)³⁴.

HLA-C and KIR genotyping

The KIR and HLA-C genotypes of both woman and their male partner of each group were determined. DNA isolation was performed with the MagNA Pure appliance, an automated system that allows DNA isolation from peripheral blood. For the isolation, we used the Isolation Kit I -Large Volume (Ref: 03730972001 Roche Diagnostics GmbH).

Before genotyping HLA-C and KIR, a PCR-SSP is performed from the following specific Kits, Lifecodes HLA-C eRES SSO Typing Kit (Ref: 628921, Immucor Medizinische diagnostik GmbH), and Lifecodes KIR Typing Kit (Ref: 545110R, Immucor Medizinische diagnostik GmbH). The HLA-C and KIR typing were performed using the Luminex equipment; the testing for patients was carried out at the Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid, while the controls were tested at the Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid. The DNA samples were analyzed for the presence of the 14 KIR genes (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DS1) and 2 pseudo-genes (2DP1 and 3DP1).

To ensure the accuracy of the analysis, HLA-C alleles were categorized into two groups based on the amino acid present at position 80 of the alpha domain of the molecule. Those containing asparagine were assigned to the C1 group, while alleles containing lysine were assigned to the C2 group.

Individual KIR gene analysis was conducted, and the combinations of genes were compared to haplotypes previously identified in the South European population. As part of the quality control process, KIR genotype results with missing framework KIR genes were excluded from the analysis.

As shown in Fig. 1, the assignment of cenA or cenB motifs relied on the identification of KIR2DL3 or KIR2DS2-2DL2, respectively. Similarly, in the telomeric region, the assignment of telA or telB motifs was determined by the identification of KIR3DL1-2DS4 or KIR3DS1-2DS1, respectively. Genes such as KIR-2DS3, KIR-2DS5, and KIR-2DL5 were considered components of cenB and telB motifs, irrespective of their specific positions among adjacent KIR genes. Patients with two cenA and two telA motifs were categorized as having the AA genotype, while those with two telB and two telB motifs were classified as having the KIR BB genotype. The AB (Bx) genotype was assigned when any other combination of A and B motifs was present. Additionally, the gene dose of KIR 2DL1A was estimated based on the number of cenA motifs identified in each patient, following the method previously described by Moffet³⁵.

Statistical analysis

The analysis conducted in this study primarily focused on the computation of frequencies associated with various KIR genotypes, as well as centromeric and telomeric motifs. We studied 397 patients with uRRF consecutively referred to our Reproductive Immunology Unit between 2015 and 2019 and compared the KIR genotype against a reference population. We calculated the statistical power of cenAA for this cohort of patients with respect to reference Spanish population, resulting in a statistical power of 90% with a confidence interval of 95%. These frequencies were determined within the study cohort, comprising individuals with RPL and RIF, and specific subgroups within this cohort. Subsequently, a comparative assessment was made by juxtaposing these frequencies against those documented for the Spanish population and a fertile cohort of women and their couples. Demographic, clinical, and immunological data were subjected to comparison using the chi-square (χ^2) test, one-way analysis of variance (ANOVA), or the Kruskal–Wallis test, as deemed appropriate. Logistic regression was employed to scrutinize the correlation between KIR/HLA-C haplotypes and pregnancy outcomes, with odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) calculated. Stratified analysis was implemented to mitigate confounding factors. All statistical analyses were two-sided, with a significance level set at $P < 0.05$, indicating statistical significance. To address the issue of multiple comparisons, a Bonferroni correction was applied, adjusting the P-value to 0.0125 (0.05/4). The statistical analyses were executed utilizing SPSS (version 22.0; SPSS Institute, Chicago, IL, USA) and Stata (version 14.0; STATA Corp, College Station, TX, USA).

Results

Epidemiological and obstetrical features of the study subjects

In this investigation, we have systematically analyzed 397 patients with uRIF who were consecutively referred to our Reproductive Immunology Unit between 2015 and 2019. By comparing the KIR genotype of this cohort against a reference population, we aim to elucidate potential correlations and clinical implications associated with the specific centromeric and telomeric motifs. Their obstetrical history at the time of immunological evaluation revealed different diagnoses: 15.11% were diagnosed with primary sterility (S-Group); 33.50% with RIF (RIF-Group); 44.33% with RPL (RPL-Group); and 7.05% had a previous FD (FD-Group). Table 1 shows that all groups shared similar characteristics, allowing for comparability in further analysis.

We then narrowed our focus to patients without OAPS as the primary cause of recurrent infertility, aiming to minimize confounding factors associated with maternofetal HLA-C-KIR mismatch. Among the 321 women without OAPS, the distribution among diagnostic groups remained consistent: 14.95% diagnosed with S, 34.58% with RIF, 43.61% with RPL, and 6.85% with FD. Additional insight revealed that individuals with sterility pursued pregnancy at an average of 37.7 years, those with RIF had a mean of 2.2 previous good embryo transfers, and individuals with RPL experienced an average of 3 previous miscarriages (Table 1).

Classic KIR genotypes in unexplained reproductive failure

Transitioning to the investigation of KIR genotypes, we computed frequencies for various KIR genotypes and compared them to reported frequencies in the Spanish population (Table 2). In the entire cohort of patients with unexplained reproductive failure (uRF), the KIR AB genotype predominated, observed in 63.22% (251/397) of cases, followed by KIR AA in 35.01% (139/397) and KIR BB in 1.76% (7/397) of women.

After excluding patients with OAPS, a comparable distribution of KIR genotype was evident in the remaining cohort: KIR AB at 65.73% (211/321), KIR AA at 33.02% (106/321), and KIR BB at 1.25% (4/321).

Centromeric KIR AA motif was the only Cen/Tel motif associated with the likelihood of uRF

The distribution of centromeric and telomeric motifs in women with uRF is outlined in Table 3. Importantly, in our cohort, cenAA was significantly increased with respect to the reference Spanish population (49.12% vs. 40.34%; $p < 0.001$). The cenAB was the most prevalent in the reference population.

The presence of a cenAA motif was significantly associated with increased risk of being in the uRF-group (OR: 1.18; CI 0.949–1.560, $p < 0.001$). No significant differences in the frequencies of other centromeric and telomeric motifs were observed between patients in the uRF-group and the reference population.

Compared to the reference population, the frequency of the cenAA motif was significantly higher in the RIF-group (48.87% vs. 40.34%, $p = 0.028$) and the RPL-group (50.57% vs. 40.34%, $p = 0.001$) (Table 3 and

	S-group N°=60	RPL-group No=133	RIF-group No=176	FD-group No=28	HC No=29
Age (years)	36.7 ± 3.8	36.7 ± 3.8	35.8 ± 4.5	36.3 ± 4.5	37.9 ± 6.4
No. of miscarriages	3.0 ± 1.3	3.0 ± 1.3	0.3 ± 0.5		0
No. of IVF cycles	1.2 ± 2.0	1.2 ± 2.0	3.0 ± 1.4		0
No. of embryos	2.2 ± 1.4	2.2 ± 1.4	9.0 ± 4.2		NA

Table 1. Clinical and demographical features of the study groups. Values are expressed as mean ± SD. *FD* fetal death, *HC* healthy controls, *IVF* in vitro fertilization, *NS* no significant, *RPL* recurrent pregnancy loss, *RIF* recurrent implantation failure.

		Classic KIR haplotypes frequencies in comparison with reference population												
			Ref. P (n = 402)	uRF-group (n = 397)			RIF-group (n = 133)				RPL-group (n = 176)			
KIR		N (%)	N (%)	P	OR	95%CI	N (%)	P	OR	95%CI	N (%)	P	OR	95%CI
GLOBAL	AA	97 (24.15)	139 (35.01)	<0.001	1.464	1.093–1.961	45 (33.83)	0.008	1.606	1.051–2.152	63 (35.80)	<0.001	1.497	1.042–2.149
	AB	246 (61.12)	251 (63.22)	NS	1.035	0.828–1.292	87 (65.41)	NS	1.070	0.783–1.462	111 (63.07)	NS	1.032	0.776–1.371
	BB	59 (14.73)	7 (1.76)	<0.001	0.120	0.055–0.264	1 (0.80)	<0.001	0.051	0.007–0.371	2 (1.14)	<0.001	0.077	0.018–0.310
WITHOUT OAPS	AA	97 (24.15)	106 (33.02)	0.040	1.367	1.003–1.863	39 (35.14)	0.008	1.701	1.086–2.666	46 (32.86)	0.040	1.360	0.913–2.026
	AB	246 (61.12)	211 (65.73)	NS	1.076	0.851–1.359	72 (64.86)	NS	1.061	0.759–1.484	96 (68.57)	NS	1.087	0.801–1.475
	BB	59 (14.73)	2 (1.25)	<0.001	0.084	0.030–0.235	0 (0.00)	<0.001	-	-	1 (0.71)	<0.001	0.048	0.007–0.353

Table 2. Classic KIR haplotypes frequencies in each of the main study group and in the reference population. *KIR* killer cell immunoglobulin-like receptor, *RPL* recurrent pregnancy loss, *RIF* recurrent implantation failure, *uRF* unexplained recurrent fertility, *without OAPS* without fulfilling classification criteria for obstetric antiphospholipid syndrome.

	KIR centromeric and telomeric haplotypes frequencies in comparison with reference population												
	Ref. P. (n = 402)	uRF-group (n = 397)				RIF-group (n = 133)				RPL-group (n = 176)			
	N (%)	N (%)	P	OR	95%CI	N (%)	P	OR	95%CI	N (%)	P	OR	95%CI
cenAA	162 (40.34)	195 (49.12)	<0.001	1.218	0.949–1.560	65 (48.87)	0.028	1.212	0.856–1.710	89 (50.57)	0.001	1.513	1.060–2.158
cenAB	178 (44.18)	171 (43.07)	NS	0.974	0.759–1.250	64 (48.12)	NS	1.089	0.770–1.537	71 (40.34)	NS	0.913	0.658–1.264
cenBB	42 (10.61)	31 (7.81)	NS	0.735	0.454–1.187	5 (3.01)	0.001	0.283	0.099–0.802	16 (9.09)	NS	0.855	0.460–1.556
telAA	211 (55.07)	227 (57.18)	NS	1.038	0.825–1.306	76 (57.14)	NS	1.037	0.750–1.436	102 (57.95)	NS	1.052	0.785–1.410
telAB	146 (36.23)	157 (39.55)	NS	1.084	0.833–1.411	54 (40.60)	NS	1.121	0.776–1.618	54 (30.68)	NS	0.847	0.592–1.211
telBB	15 (3.83)	14 (3.53)	NS	0.912	0.439–1.894	3 (2.26)	NS	0.584	0.167–2.034	6 (3.41)	NS	0.882	0.339–2.291

Table 3. Centromeric and telomeric KIR haplotypes in the study groups and in the reference Spanish population. Ref. P. refers con control population data. OR odds ratio, CI confidence interval, RPL recurrent pregnancy loss, RIF recurrent implantation failure, uRF unexplained recurrent fertility.

Supplementary Table 1). The presence of a cenAA motif significantly increased the likelihood of being in the RIF (OR: 1.212; 0.856–1.710) and RPL (OR: 1.513; CI 1.060–2.158) groups.

Conversely, we observed that the frequency of the cenBB motif was significantly lower in the RIF-group (3.01% vs. 10.61%; $p = 0.001$) compared to the reference population, and this was consequently associated with a significantly reduced likelihood of being in the RIF group (OR: 0.283; CI 0.099–0.802).

The frequencies of the other cen/tel motifs among women in the S-, RPL- and FD-groups were similar to those described for the reference population (Table 3 and Supplementary Table 1).

HLA-C distribution in couples with known fertility and uRF

We performed a comprehensive analysis of HLA-C haplotypes in both women and their male partners across all the studied groups, as outlined in Table 4, compared to our control group of fertile couples. The frequency of the C1 haplotype was significantly lower in women from the uRF-group (26.44% vs. 48.27%, $p = 0.01$) and the RPL-group (26.70% vs. 48.27%, $p = 0.018$). Similarly, the frequency of the C1 haplotype was significantly lower in the male partners within the uRF-group (22.92% vs. 62.06%, $p < 0.001$), as well as in both the RPL (22.72% vs. 62.06%, $p < 0.001$) and RIF (31.25% vs. 62.06%, $p = 0.002$) subgroups when compared to the control group. Conversely, there was a statistically significant increase of the C2 haplotype in the RIF-group (27.08% vs. 6.89%, $p = 0.022$) compared to the control group. In addition, we noticed an upward trend of the C2 haplotype in the partners of the uRF and RPL groups.

Interestingly, the risk of RPL and RIF was significantly lower in male partners who possessed the C1 haplotype (OR: 0.179, CI 0.078–0.411; OR: 0.277, CI 0.116–0.660, respectively).

KIR and HLA-C combinations among couples with known fertility and uRF

We first focused on de combination HLA-C between women and partners (Supplementary Table 2). A significantly lower C1/C1 combinations was observed in the uRF-Group (9.03% vs. 27.59%, $p = 0.004$), RPL-Group (7.09% vs. 27.59%, $p < 0.001$), and RIF-Group (10.42% vs. 27.59%, $p = 0.002$) compared to the control group. Conversely, the frequency of HLA-C2/C2 partners was significantly higher in the RIF group, with a risk that was five times greater than that of the control group.

We then build a matrix of HLA-C haplotypes in the couples and maternal KIR across all the studied groups and compared to the fertile control group, as presented in Table 5 and Supplementary Table 3. We observed an increased frequency of at least one paternal C2 in the uRF-group (70.60% vs. 37.93%, $p < 0.001$), in RPL (68.75% vs. 37.93%, $p = 0.003$), and in RIF (71.63% vs. 37.93%, $p < 0.001$) groups compared with the control group. There was a significantly higher frequency of C2 haplotype in males of the RIF-group (27.08% vs. 6.89%, $p = 0.022$)

HLA haplotype/ Groups	Control	uRF-group				RPL-group				RIF-group			
	N (%)	N (%)	P	OR	CI 95%	N (%)	P	OR	CI 95%	N (%)	P	OR	CI 95%
C1C1 women	14 (48.27)	105 (26.44)	0.01	0.385	0.179–0.825	47 (26.70)	0.018	0.390	0.175–0.869	32 (33.33)	NS	0.535	0.230–1.244
C1C1 partner	18 (62.06)	91 (22.92)	<0.001	0.181	0.082–0.398	40 (22.72)	<0.001	0.179	0.078–0.411	30 (31.25)	0.002	0.277	0.116–0.660
C1C2 women	10 (34.48)	152 (38.04)	NS	1.178	0.533–2.602	68 (38.64)	NS	1.196	0.525–2.726	47 (48.95)	NS	1.822	0.768–4.324
C1C2 partner	9 (31.03)	159 (40.05)	NS	1.484	0.659–3.343	78 (44.32)	NS	1.768	0.762–4.101	40 (41.67)	NS	1.587	0.655–3.846
C2C2 women	5 (17.24)	54 (13.60)	NS	0.755	0.276–2.065	26 (14.77)	NS	0.832	0.291–2.376	17 (17.71)	NS	1.032	0.344–3.093
C2C2 partner	2 (6.89)	60 (15.11)	NS	0.240	0.126–0.455	23 (13.06)	NS	1.990	0.443–8.934	26 (27.08)	0.022	5.014	1.113–22.590

Table 4. Comparison of the frequency of the HLA-C1C1, C1C2 and C2C2 haplotypes between women groups (patients and controls) and men groups (patients and control partner). OR odds ratio, CI confidence interval, RPL recurrent pregnancy loss, RIF recurrent implantation failure, uRF unexplained recurrent fertility.

KIR haplotype	HLA combination/Groups	C-group		uRF-group		
		N (%)	N (%)	P	OR	CI 95%
cenAA	C1C1/C1C1	5 (17.24)	11 (3.55)	<0.001	0.176	0.056–0.549
	C1C1/C1C2	4 (13.79)	25 (8.06)	NS	0.548	0.176–1.700
	C1C1/C2C2	1 (3.45)	8 (2.58)	NS	0.741	0.089–6.146
	C1C2/C1C1	2 (6.90)	28 (9.03)	NS	1.340	0.302–5.935
	C1C2/C1C2	1 (3.45)	40 (12.90)	NS	4.148	0.549–31.337
	C1C2/C2C2	0 (0.00)	16 (5.16)	NS	–	–
	C2C2/C1C1	2 (6.89)	9 (2.90)	NS	0.837	0.102–6.850
	C2C2/C1C2	1 (3.45)	12 (3.87)	NS	0.543	0.115–2.556
	C2C2/C2C2	0 (0.00)	1 (0.32)	NS	–	–
cenAB	C1C1/C1C1	2 (6.89)	15 (4.84)	NS	0.686	0.149–3.161
	C1C1/C1C2	0 (0.00)	20 (6.45)	NS	–	–
	C1C1/C2C2	0 (0.00)	15 (4.84)	NS	–	–
	C1C2/C1C1	4 (13.79)	10 (3.23)	0.004	0.208	0.061–0.712
	C1C2/C1C2	1 (3.45)	31 (10.00)	NS	3.111	0.409–23.662
	C1C2/C2C2	0 (0.00)	14 (4.52)	NS	–	–
	C2C2/C1C1	1 (3.45)	9 (2.90)	NS	0.837	0.102–6.851
	C2C2/C1C2	0 (0.00)	14 (4.52)	NS	–	–
	C2C2/C2C2	0 (0.00)	4 (1.29)	NS	–	–
cenBB	C1C1/C1C1	1 (3.45)	2 (0.65)	NS	0.181	0.016–2.068
	C1C1/C1C2	1 (3.45)	8 (2.58)	NS	0.741	0.089–6.146
	C1C1/C2C2	0 (0.00)	1 (0.32)	NS	–	–
	C1C2/C1C1	1 (3.45)	5 (1.61)	NS	0.459	0.051–4.067
	C1C2/C1C2	1 (3.45)	6 (1.94)	NS	0.552	0.064–4.754
	C1C2/C2C2	0 (0.00)	1 (0.32)	NS	–	–
	C2C2/C1C1	0 (0.00)	2 (0.65)	NS	–	–
	C2C2/C1C2	0 (0.00)	3 (0.97)	NS	–	–
	C2C2/C2C2	1 (3.45)	0 (0.00)	NS	–	–

Table 5. Matrix of combinations between KIR haplotypes and HLA-C1 and C2 in the uRF and in the control group. OR odds ratio, CI confidence interval, uRF unexplained recurrent fertility.

compared to the control group, and an increasing trend in male partners of the uRF and RPL groups. Interestingly, this trend was not observed when considering only maternal C2.

Conversely, the C1 haplotype was less prevalent in women from the uRF-group (26.44% vs. 48.27%, $p=0.01$) and the RPL-group (26.70% vs. 48.27%, $p=0.018$), as well as in their partners in the uRF-group (22.92% vs. 62.06%, $p<0.001$), and both RPL (22.72% vs. 62.06%, $p<0.001$) and RIF (31.25% vs. 62.06%, $p=0.002$) subgroups when compared to the control group. Moreover, partners with the C1 haplotype had a significantly lower risk of RPL and RIF (OR: 0.179, CI 0.078–0.411; OR: 0.277, CI 0.116–0.660, respectively).

The cenBB motif was significantly more common in couples with known fertility compared to patients in the uRF-group (18.01% vs. 7.81%; $p=0.040$) and the RIF-group (18.01% vs. 3.01%; $p=0.004$). Although the cenBB motif was also more frequent in controls compared to patients in the RPL-group and FD-group, this difference did not reach statistical significance.

The frequency of the cenAA/C1C1 combination and C1C1 partners was significantly higher in the control group compared with uRPL (Table 5), with the RIF-Group and RPL-Group (33.3% vs. 9.01%; $p=0.048$; and 33.3% vs. 6.85%; $p=0.009$, respectively) (Supplementary Table 3). Women with the cenAA/C1C1 combination and HLA-C1C1 partners had almost a fivefold higher association with a successful reproductive outcome (OR: 0.220, CI 0.050–0.961) and (OR: 0.202, CI 0.046–0.871), respectively).

Discussion

In this comprehensive Spanish case–control study encompassing women experiencing uRF and their respective partners, we delved into the genetic patterns of KIR and the combinations of KIR and HLA-C alleles within the couples. Our findings validated previous data on the significantly elevated frequency of the KIR AA haplotype among women with uRF compared to a reference population outlined by Cisneros and Maffei in RIF^{31,36}. Upon categorizing patients into four distinct, non-overlapping groups, we identified a heightened prevalence of the KIR AA haplotype in the S-Group, RPL-Group, and RIF-Group, coupled with an increased susceptibility to encountering any of these complications in women possessing the KIR AA haplotype. These results substantiate earlier studies^{26,29,37}.

Moreover, we undertook a stratified analysis based on centromeric and telomeric zones. Despite the subdivision of the four groups into six additional combinations according to these motifs, cenAA emerged as a better biomarker for delineating the risk of RPL and RIF. Indeed, we demonstrated a significant increase of cenAA in the RIF, RLP, and S-Groups compared to the reference population.

This discovery may address the KIR Bx gap identified in the Morin study, as in our cohort, at least 56 patients with the cenAA haplotype but a classical AB haplotype (20 patients from the RIF-Group and 26 from the RPL-Group) might have been overlooked using the traditional nomenclature. This implies a potential loss of information concerning 14% of classic AB KIR patients. Consequently, our study emphasizes the significance of cen/tel classification, offering valuable clinical insights.

Furthermore, our research unveiled those women experiencing RPL and RIF demonstrated a diminished frequency of KIR BB, resulting in lower odds of encountering these complications. The KIR BB profile encompasses one or more activating receptors, and this shift in the KIR repertoire towards an activating phenotype may confer protective effects during early pregnancy. It is noteworthy that, unlike the KIR AA haplotype, which comprises AA genes in both centromeric and telomeric regions, KIR AB may carry a cenAA haplotype. This nuance might be overlooked when patients are categorized based on classical haplotypes. The centromeric motif assumes particular significance in this context, as KIR2DL1 is present in both cenA and all B haplotypes.

Within KIR cenA haplotypes, there exists a unique absence of other alleles to balance the inhibitory signal of the 2DL1 KIR, whereas cenB harbors weak inhibitory and activator alleles¹⁶. This distribution of alleles may elucidate the observed protective effect of the cenB genotype against uRF, while cenA increases the likelihood of pregnancy disorders. Interestingly, our study, for the first time, identified an association between the centromeric region of KIR genes and RIF and RPL. Our analysis revealed no differences in any telomeric haplotype, suggesting that the examination of centromeric regions may offer a more accurate means of defining the risk of RIF and RPL in our Spanish cohort. In contrast, Hiby et al. reported a protective role of telB in RPL patients instead of cenB haplotypes²².

Traditionally, published studies have predominantly focused on the analysis of individual KIR receptors in isolation. However, our study underscores the importance of a comprehensive examination of the entire KIR genotype, offering a more nuanced understanding of NK cell behavior. NK cells respond to a combination of activating and inhibiting receptors, and this holistic knowledge bears significant clinical implications.

Lastly, we scrutinized the KIR-HLA-C combinations matrix, as certain combinations have been linked to the risk of pregnancy complications^{8,11,13,38}. Our observations indicated a significantly reduced proportion of the KIR AA-C1C1 combination and C1C1 partners in the RIF and RPL-groups compared to the control group.

These findings suggest that the HLA-C1 haplotype may exert a protective effect in KIR cenAA women, leading to an elevated proportion of C2 alleles in the RPL and RIF groups, particularly in paternal C2 alleles. This aligns with observed paternal C2 effects in other obstetrical morbidities such as eclampsia²². Indeed, the KIR receptors in haplotype A that bind to C1 alleles, namely 2DL2 and 2DL3, are weaker and less specific than 2DL1 with C2. Despite exploring additional KIR/HLA-C combinations, the differences did not reach statistical significance. The observation that HLA C1C1 increases in the control group when KIR AA is prevalent may reinforce the significance of this immunological code recognition in ensuring pregnancy success, presenting broader evolutionary implications.

In couples where the maternal KIR genotype is AA, the observed combination may signify a compensatory mechanism. In populations with a high prevalence of KIR AA, our results demonstrate a corresponding increase in the C1C1 combination. This suggests an intricate interplay between maternal KIR AA and the prevalence of C1C1.

In summary, a key finding of this study is that cenAA could represent a better biomarker of adverse pregnancy outcomes than classical AA, and might be particularly useful to identify women at increased risk among the heterogeneous KIR AB or Bx population. When the cenAA is expressed in women, the HLA-C1C1 combination is significantly more common in control women and in their partners, in contrast to cases of uRF, RPL, and RIF. This co-presence acts as a protective factor, as it does not serve as the specific ligand for the main inhibitory receptor of the cenAA (2DL1). Consequently, this receptor does not exert its potentially detrimental function in NK cells.

Data availability

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 19 November 2022; Accepted: 5 February 2024

Published online: 09 February 2024

References

- Marron, K., Walsh, D. & Harrity, C. Detailed endometrial immune assessment of both normal and adverse reproductive outcome populations. *J. Assist. Reprod. Genet.* **36**(2), 199–210. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1300-8> (2019).
- Quiroga de Michelena, M. & Echevarria, J. Aborto recurrente. *Rev. Peru Ginecol. Obstet.* **42**(4), 37 (2015).
- Tur-Torres, M. H., Garrido-Gimenez, C. & Alijotas-Reig, J. Genetics of recurrent miscarriage and fetal loss. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **42**, 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.03.007> (2017).
- Rai, R. & Regan, L. Recurrent miscarriage. *Lancet* **368**(9535), 601–611. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69204-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69204-0) (2006).
- Moffett, A. & Loke, C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat. Rev. Immunol.* **6**(8), 584–594. <https://doi.org/10.1038/nri1897> (2006).
- Rajagopalan, S. & Long, E. O. Cell atlas reveals the landscape of early pregnancy. *Nature* **563**(7731), 337–338. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-07317-w> (2018).
- Moffett-King, A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat. Rev. Immunol.* **2**(9), 656–663 (2002).

8. Sharkey, A. M. *et al.* Killer Ig-like receptor expression in uterine NK cells is biased toward recognition of HLA-C and alters with gestational age. *J. Immunol.* **181**(1), 39–46. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.1.39> (2008).
9. Robson, A. *et al.* Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. *FASEB J.* **26**(12), 4876–4885. <https://doi.org/10.1096/fj.12-210310> (2012).
10. Hiby, S. E. *et al.* Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J. Exp. Med.* **200**(8), 957–965. <https://doi.org/10.1084/jem.20041214> (2004).
11. Chazara, O., Xiong, S. & Moffett, A. Maternal KIR and fetal HLA-C: A fine balance. *J. Leukoc. Biol.* **90**(4), 703–716. <https://doi.org/10.1189/jlb.0511227> (2011).
12. Huhn, O. *et al.* How do uterine natural killer and innate lymphoid cells contribute to successful pregnancy?. *Front. Immunol.* **21**(12), 607669. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.607669>. PMID:34234770; PMCID:PMC8256162 (2021).
13. Colucci, F. The role of KIR and HLA interactions in pregnancy complications. *Immunogenetics* **69**(8–9), 557–565. <https://doi.org/10.1007/s00251-017-1003-9> (2017).
14. Colonna, M., Borsellino, G., Falco, M., Ferrara, G. B. & Strominger, J. L. HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**(24), 12000–12004. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.12000> (1993).
15. Older Aguilar, A. M. *et al.* Coevolution of killer cell Ig-like receptors with HLA-C to become the major variable regulators of human NK cells. *J. Immunol.* **185**(7), 4238–4251. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001494> (2010).
16. Hilton, H. G. *et al.* Polymorphic HLA-C receptors balance the functional characteristics of KIR haplotypes. *J. Immunol.* **195**(7), 3160–3170. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501358> (2015).
17. Vilches, C. & Parham, P. KIR: Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Ann. Rev. Immunol.* **20**, 217–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.092501.134942> (2002).
18. Uhrberg, M. *et al.* Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* **7**(6), 753–763. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80394-5](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80394-5) (1997).
19. Hsu, K. C. *et al.* Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: Evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J. Immunol.* **169**(9), 5118–5129. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.9.5118> (2002).
20. Moradi, S. *et al.* Structural plasticity of KIR2DL2 and KIR2DL3 enables altered docking geometries atop HLA-C. *Nat. Commun.* **12**(1), 2173. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22359-x> (2021).
21. Moesta, A. K. & Parham, P. Diverse functionality among human NK cell receptors for the C1 epitope of HLA-C: KIR2DS2, KIR2DL2, and KIR2DL3. *Front. Immunol.* **3**, 336. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00336> (2012).
22. Hiby, S. E. *et al.* Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J. Clin. Investig.* **120**(11), 4102–4110. <https://doi.org/10.1172/JCI43998> (2010).
23. Larsen, T. G., Hackmon, R., Geraghty, D. E. & Hviid, T. Fetal human leukocyte antigen-C and maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors in cases of severe preeclampsia. *Placenta* **75**, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.11.008> (2019).
24. Yu, H. *et al.* Interaction of parental KIR and fetal HLA-C genotypes with the risk of preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy* **33**(4), 402–411. <https://doi.org/10.3109/10641955.2014.920026> (2014).
25. Varla-Leftherioti, M. *et al.* Natural killer (NK) cell receptors' repertoire in couples with recurrent spontaneous abortions. *Am. J. Reprod. Immunol.* **49**(3), 183–191. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0897.2003.00018.x> (2003).
26. Flores, A. C. *et al.* KIR receptors and HLA-C in the maintenance of pregnancy. *Tissue Antigens* **69**, 112–113. https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2006.762_8.x (2007).
27. Wang, S. *et al.* Increased activating killer immunoglobulin-like receptor genes and decreased specific HLA-C alleles in couples with recurrent spontaneous abortion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**(3), 696–701. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.125> (2007).
28. Alecsandru, D. *et al.* Parental human leukocyte antigen-C allotypes are predictive of live birth rate and risk of poor placentation in assisted reproductive treatment. *Fertil. Steril.* **114**(4), 809–817. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.05.008> (2020).
29. Alecsandru, D. *et al.* Maternal KIR haplotype influences live birth rate after double embryo transfer in IVF cycles in patients with recurrent miscarriages and implantation failure. *Hum. Reprod.* **29**(12), 2637–2643. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu251> (2014).
30. Marsh, S. G. *et al.* Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Hum. Immunol.* **64**(6), 648–654. [https://doi.org/10.1016/s0198-8859\(03\)00067-3](https://doi.org/10.1016/s0198-8859(03)00067-3) (2003).
31. Cisneros, E. *et al.* Haplotype-based analysis of KIR-gene profiles in a south european population-distribution of standard and variant haplotypes, and identification of novel recombinant structures. *Front. Immunol.* **11**, 440. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00440> (2020).
32. Nuñez-Beltrán, M., Sánchez-Ramón, S., Fernández-Arquero, M. & Herraiz-Martínez, M. A. Histocompatibilidad (HLA) KIR, A, B, C, DR y DQ en el fallo reproductivo recurrente. [Tesis de doctorado]. Universidad Complutense de Madrid (2021).
33. Zegers-Hochschild, F. *et al.* The international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Fertil. Steril.* **108**(3), 393–406. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005> (2017).
34. Sanidad, C. D. E., Comunidad, D. E. L. A., Lemini, C., Due, O. F., Organizaci, L. & Nacional, E. C. *et al.* Introducción Definición Epidemiología 1–11 (2021).
35. Huhn, O. *et al.* High-resolution genetic and phenotypic analysis of KIR2DL1 alleles and their association with pre-eclampsia. *J. Immunol.* **201**(9), 2593–2601. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800860> (2018).
36. Maftai, R. *et al.* The influence of maternal KIR haplotype on the reproductive outcomes after single embryo transfer in IVF cycles in patients with recurrent pregnancy loss and implantation failure-a single center experience. *J. Clin. Med.* **12**(5), 1905. <https://doi.org/10.3390/jcm12051905>. PMID:36902692; PMCID:PMC10004330 (2023).
37. Piekarska, K. *et al.* ERAP, KIR, and HLA-C profile in recurrent implantation failure. *Front. Immunol.* **12**, 755624. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.755624> (2021).
38. Male, V. *et al.* The effect of pregnancy on the uterine NK cell KIR repertoire. *Eur. J. Immunol.* **41**(10), 3017–3027 (2011).

Acknowledgements

We are immensely grateful to patients that made possible this study.

Author contributions

S.S.R. conceived the study; R.G.L., E.R.F. and S.S.R. analyzed the data and wrote the first draft. A.O. and A.I. contributed to the study design and data interpretation. M.N.B., E.C.A., E.M., M.O., V.V., J.V., E.S., I.S., D.O., D.P.V., V.G.V., A.L., M.F., M.R.P., A.G.S., F.M.C., R.D., A.F., J.M.G.C., V.C., F.R.B., S.I., B.B., A.M.A. and A.I. provided patient samples and clinical history; J.L.V. and M.A.M.H. carried out the laboratory experiments. A.O. and M.N.B. did some laboratory experiments; R.G.L. and E.G.F. did the statistical analysis. M.F.A. and S.S.R. contributed to all revisions of the manuscript, supervised the data analysis, and critically revised the manuscript for important intellectual content. All authors reviewed and approved the final version of the manuscript. All

authors concur with the submission of this manuscript, and the material submitted for publication is original research and has not been previously reported and is not under consideration for publication elsewhere.

Funding

The project received a research grant from the Carlos III Institute of Health, Ministry of Economy and Competitiveness (Spain), awarded on the 2019 call under the Health Strategy Action 2019–2023, within the National Research Program oriented to Societal Challenges, within the Technical, Scientific and Innovation Research National Plan 2019–2022, with reference PI19/01450.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53766-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.S.-R.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024

