



Ricerca di soggetti disponibili a supportare attività aziendali con contributi privati da erogarsi mediante contratti di sponsorizzazione o liberalità

Bando di riferimento:

P17 deliberazione n. 2156 del 15/12/2016

Tipologia di riferimento: **P17-03**

- Formazione e ottimizzazione dei processi aziendali**
- Attività di sperimentazione studio, ricerca e sviluppo in campo medico scientifico, clinico, di perfezionamento**
 - Acquisito parere Comitato etico in data 15/06/2021**
 - Parere Comitato etico da richiedere**
 - Non necessario parere Comitato etico**

Scheda di progetto P17-03-68

Data di emissione	22/09/2022
Titolo	DIFFERENZA NELLA FREQUENZA DI KIR IN DONNE AFFETTE DA ABORTO SPONTANEO RICORRENTE (ASR) E CON RIPETUTI FALLIMENTI DI IMPIANTO (RIF), E ASSOCIAZIONE CON L'ASSETTO HLA DEL PARTNER.
Periodo riferimento	
Struttura proponente	Struttura proponente UOSD Ostetricia e Ginecologia 2 – Centro PMA
Responsabile progetto	Dott. Francesco M. Fusi UOSD Ostetricia e Ginecologia 2 – Centro PMA e-mail: ffusi@asst-pg23.it Referente del progetto dott. Francesco M. Fusi e-mail: ffusi@asst-pg23.it
Descrizione progetto	L'aborto spontaneo ricorrente (ASR) è definito dal RCOG e dalla ESHRE come la perdita fetale di tre o più feti prima della 24 w di gravidanza con lo stesso partner. Il rischio di ricorrenza in questi casi sarebbe del 31-32 %. Recentemente è stato



proposto di iniziare gli approfondimenti diagnostici dopo due aborti visto che il rischio di ricorrenza sarebbe solo di poco inferiore (24-29%) (Jaslow et al 2018 in Popescu et. Al, 2018).

Le indagini diagnostiche includono: anomalie cromosomiche rilevate mediante esecuzione del cariotipo sulla coppia e sul prodotto del concepimento, anomalie strutturali uterine – congenite o acquisite -, endocrinopatie, infezioni, malattie autoimmuni, anomalie della coagulazione – congenite o acquisite -, qualità dello sperma e fattori ambientali.

Alcuni studi hanno suggerito come recettori killer similimmunoglobuline (KIR) possano giocare un ruolo sul rischio di abortività spontanea ripetuta.

L'ipotesi, che parte della regolazione della placentazione risulti dal riconoscimento immunologico locale del trofoblasto da parte dei leucociti deciduali, deriva da tre osservazioni.

Primo: l'interazione nella decidua si verifica fra cellule di due individui geneticamente diversi (cellule allogeniche).

Secondo: il ruolo cruciale che la decidua svolge nella regolazione della placentazione è ovvio dagli studi dei disordini placentari che si verificano quando la decidua è assente: in questo scenario conosciuto come placenta percreta/accreta il trofoblasto invade la parete dell'utero senza controllo.

Terzo: è noto come il processo fisiopatologico che determina le principali complicanze della gravidanza sia legato alla corretta invasione dei vasi materni della decidua da parte del trofoblasto.

Durante la gravidanza le cellule del trofoblasto fetale infiltrano le arterie uterine per trasformarle in vasi ad alta conduttanza. Questa modificazione dei vasi arteriosi è essenziale per la crescita fetale normale. Lo strato più esterno dei villi coriali (sinciziotrofoblasto) è bagnato direttamente dal sangue materno che permette al feto di acquisire facilmente nutrienti, ma l'esposizione delle cellule del trofoblasto potrebbe causare una risposta alloimmune da parte della madre. Quel che accade nella fisiologia da parte del sistema immune dell'utero è di permettere alla placenta di trarre nutrimento dalla madre ma allo stesso tempo di prevenire una eccessiva invasione della decidua. La rottura del normale equilibrio fra le cellule invasive trofoblastiche e i tessuti uterini colonizzati durante il processo di placentazione, può dare origine a varie complicanze della gravidanza incluso l'aborto spontaneo ricorrente e disordini specifici della gravidanza come la preeclampsia. Un ruolo chiave è certamente svolto dalle cellule NK uterine o deciduali (uNK) un particolare tipo di cellule NK, che ne costituiscono la popolazione cellulare dominante nella gravidanza iniziale. Queste cellule vengono in stretto contatto con le cellule allogeniche del trofoblasto extravilloso (ETV). La maggior parte di esse appartiene al fenotipo CD 56 bright, che non ha effetto citotossico, ma invece secreta varie citochine e fattori attivanti la crescita angiogenica che hanno un ruolo modulante



fondamentale nei confronti della invasività del trofoblasto.

Attraverso i recettori KIR presenti sulla loro membrana, le cellule uNK riconoscono particolari molecole di classe HLA 1 espresse sul trofoblasto, e vengono stimulate o inibite a produrre i fattori solubili e manifestare bassa citotossicità necessaria al mantenimento di un feto semiallogenico. I recettori delle cellule uNK legano le molecole di tre degli antigeni HLA di classe 1 (HLA G – HL AE e HLA C) che sono espressi dal trofoblasto extravilloso e quelli che legano le molecole HLA C appartengono alla famiglia dei recettori delle cellule KIRs.

Dei tre HLA di classe 1 il sistema HLA C è altamente polimorfico cosicché gli allotipi HLA C presentati dal trofoblasto varieranno in relazione alla componente materna e paterna ereditata dal feto. I soggetti leganti i KIRs delle uNK agli HLA C sono definiti da un bimorfismo nel dominio alfa1 delle catene pesanti HLA C.

Gli allotipi C1 sono liganti per i KIR2DL2/3 (inibitori) e possibilmente KIR2DS2 (attivanti), mentre gli allotipi C2 sono legati dai KIR2DL1 (inibitori) e dai KIR2DS1 (attivanti).

Gli aplotipi KIR sono combinazioni di regioni centromeriche e telomeriche con estesa possibilità di ricombinazione fra loro, tuttavia, sebbene il locus KIR contenga un numero variabile di geni, gli allotipi possono essere divisi in due gruppi: A e B, che differiscono principalmente per la presenza sull'aplotipo B di KIR attivanti. I geni dei KIR codificano sia per recettori inibenti sia per recettori attivanti espressi sulle cellule uNK e l'aplotipo A contiene principalmente KIR inibitori, mentre il B possiede geni addizionali che hanno principalmente azione attivante.

In ogni gravidanza, la stessa donna esprime KIRs diversi sulle uNK. L'allotipo HLA-C di derivazione paterna espresso sul trofoblasto potrebbe essere diverso in ogni gravidanza (seppure insorta con lo stesso partner) in relazione a quale dei due alleli paterni HLAC il feto avrà ereditato.

La possibilità che la combinazione di due sistemi genici variabili, uno nella madre e uno nel feto, potrebbe determinare l'outcome della interazione fra il trofoblasto e le cellule uNK ha condotto agli studi iniziali sulla preeclampsia, una malattia che trova le sue radici nel sottostante difetto del processo di placentazione. La gestosi è associata con certe combinazioni di KIR materni e varianti genetiche HLAC sia negli africani che negli europei e i piccoli studi sulle coppie affette da poliabortività e da difetto di crescita intrauterino hanno indicato una relazione simile. Più recentemente analisi delle varianti materne KIR e HLA C fetali nelle gravidanze normali che hanno esitato in pesi neonatali diversi ha indicato l'influenza di queste due sistemi genici nel determinare il peso fetale ai due estremi che si associano entrambi a mortalità e morbilità fetale e materna. Quando espressi sulle cellule uNK i singoli KIRs possono conferire loro segnale inibitorio o attivatorio alla produzione di fattori solubili che ne determinano alta o bassa citotossicità verso il trofoblasto.

L'aplotipo A ha solo sette geni KIR: tre geni strutturali presenti in tutti gli individui



e tre KIR inibitori. L'unico KIR attivante presente sull'aplotipo A, il KIR2DS4, è generalmente non funzionante. L'aplotipo B ha un numero variabile di KIR addizionali, la maggior parte dei quali attivanti. Tutti gli alleli HLA C possono essere divisi in due gruppi chiamati C1 e C2, in relazione a quale aminoacido (asparagina o lisina) è presente alla posizione 80 delle molecole HLA C. Questa è la regione dove i KIRs legano le molecole HLAC: gli epitopi legandi KIR C1 e C2. Due KIRs si legano agli epitopi C2: quello inibitorio KIR2DL1 e quello attivante KIR2DS1. Solo un KIR lega l'epitopo C1 e impartisce un segnale debolmente inibitorio (KIR2DL2/3). Quando le donne che hanno ereditato due aplotipi A (note come genotipo KIR AA) incontrano un trofoblasto che esprime un epitopo C2, allora il trofoblasto è più facile che non sia in grado di assicurare alla placenta un buon supporto vascolare materno (Moffett et al 2017), con un aumento di ritardo di crescita fetale e di preeclampsia. Inoltre il rischio sembra maggiore se il C2 fetale è di derivazione da un allele paterno rispetto a uno materno. La ragione di questo è sconosciuta e non è nemmeno chiaro perché l'effetto degli epitopi C1 paterni ereditati dal feto sia neutrale. Come queste differenze genetiche possono tradursi in differenti funzioni delle cellule NK? La funzione cellulare delle NK è determinata dalla summa dei segnali attivanti ed inibenti che le cellule NK ricevono. Poiché i KIRs attivanti si trovano solo sugli aplotipi KIR B, un individuo con due aplotipi A (genotipo AA) avrà solo geni KIR che codificano per recettori che impartiranno alle cellule NK uterine un potente segnale inibitorio. Il candidato verosimilmente responsabile di questo effetto deleterio sull'aplotipo KIR A è il KIR2DL1 perché lega strettamente e specificamente gli epitopi C2 dell'HLA C. Negli europei quando inizia una gravidanza con un epitopo C2 derivato dal padre, la madre è protetta quando possiede un aplotipo KIR B che contiene un fattore attivante per l'epitopo C2: il KIR2DS1. Perciò questa combinazione ha un effetto protettivo perché quando è presente un epitopo C2 paterno il forte segnale del KIR2DL1 sulle cellule NK è controbilanciato da un segnale attivante.

Sulla base di tale ipotesi patogenetica, diversi studi hanno analizzato l'espressione dei diversi KIR e HLA-C ed il rischio di abortività spontanea ripetuta.

Flores et al (2017) hanno mostrato come il fenotipo KIR2DL2 in uno studio che ha incluso 88 donne con aborto ripetuto e 139 controlli sani fosse meno presente nelle donne con abortività ripetuta che nei controlli. Lungo questa linea di osservazione uno studio condotto in Cina (Hong et al 2008) ha suggerito che KIR2DL2/HLA-C2C2 è associato ad aumentato rischio di aborto spontaneo

L'insuccesso riproduttivo si può verificare anche nelle coppie afferenti ai centri di fecondazione assistita che possono andare incontro a ripetuti fallimenti nell'impianto (RIF), intesi come la mancata insorgenza delle gravidanze dopo almeno tre embriotransfer di embrioni di buona qualità (Coughlan 2014, Koot 2012 Toth 2011 in Novak 2017). Molti fattori possono contribuire al fallimento, incluse la qualità ovocitaria e spermatica, le anomalie cromosomiche dei genitori, le anomalie genetiche o metaboliche dell'embrione, la scarsa recettività endometriale, disturbi immunologici nel sito di impianto, e alcune patologie

	ginecologiche come l'endometriosi, i fibromi uterini, l'idrosalpinge e i polipi endometriali. La stessa procedura di fecondazione in vitro di per sè stessa potrebbe influenzare negativamente l'impianto. Tuttavia un meccanismo che potrebbe spiegare gli insuccessi ripetuti dopo procreazione medicalmente assistita (PMA) potrebbe essere simile a quello osservato negli aborto ripetuti spontanei legato alla espressione dei KIR e HLA.
Obiettivi del progetto	<p>Pochi dati sono a disposizione sulla espressione di KIR e HLA in donne sottoposte a PMA. E' quindi interessante analizzare le differenze nella espressione dei KIR potenzialmente associati al rischio di abortività ripetuta in coppie con aborto ripetuto spontaneo od in seguito a PMA.</p> <p>Nello specifico, si intende valutare la differenza della frequenza di distribuzione di KIR2DL2 nei casi di abortività ripetuta spontanea ed in seguito a fallimenti ripetuti in PMA (obiettivo primario) e descrivere la frequenza dei differenti KIR e la loro associazione con antigeni del sistema HLA-C dei partner nelle donne con abortività ripetuta spontanea e Ripetuto fallimento di impianto in PMA (obiettivo secondario)</p>
Fasi e tempi di realizzazione stimati	3 anni dall'inizio effettivo della sperimentazione.
Stato di avanzamento	studio non ancora avviato
Collaborazioni con altre strutture aziendali o altri soggetti esterni	SIMT laboratorio immunogenetica UOC Ostetricia e Ginecologia 1
Risorse Professionali	Borsa di studio / contratto di libera professione della durata di ...//..... per/...(ruolo) laureato in .../.....
Strumentazione	Nessun supporto strumentale aggiuntivo richiesto.
Contropartita per i finanziatori	Citazione nell'eventuale pubblicazione inerente al progetto con la dicitura: "Progetto realizzato con il contributo non condizionato di"



Finanziamento richiesto	<p>È richiesto un finanziamento di Euro 50.000</p> <p>E' richiesto un finanziamento minimo complessivo da parte di vari soggetti di 50.000 euro in 3 anni, I fondi saranno interamente destinati alla esecuzione dei test di laboratorio, alla loro analisi e alla valutazione statistica dei risultati.</p>
Criteri ed indicatori per la verifica del raggiungimento degli obiettivi	Rapporti annuali e valutazione del raggiungimento degli obiettivi