



MICHELE CINTRA VICENTINI

**CORRELAÇÃO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA COM O
RESULTADO GESTACIONAL NO EXAME DE PROVA CRUZADA
POR CITOMETRIA DE FLUXO EM MULHERES SUBMETIDAS À
IMUNIZAÇÃO COM LEUCÓCITOS PATERNOS**

***FLOW CYTOMETRY CROSSMATCH IN WOMEN UNDERGOING
PATERNAL LEUKOCYTES IMMUNIZATION: CORRELATION
BETWEEN FLUORESCENCE INTENSITY AND PREGNANCY
OUTCOME***

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

MICHELE CINTRA VICENTINI

**CORRELAÇÃO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA COM O
RESULTADO GESTACIONAL NO EXAME DE PROVA CRUZADA
POR CITOMETRIA DE FLUXO EM MULHERES SUBMETIDAS À
IMUNIZAÇÃO COM LEUCÓCITOS PATERNOS**

Orientador: Prof. Dr. RICARDO BARINI
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. ISABELA NELLY MACHADO

***FLOW CYTOMETRY CROSSMATCH IN WOMEN UNDERGOING
PATERNAL LEUKOCYTES IMMUNIZATION: CORRELATION
BETWEEN FLUORESCENCE INTENSITY AND PREGNANCY
OUTCOME***

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação em
Tocoginecologia, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção do Título de Mestra em
Ciências da Saúde, área de concentração em Saúde Materna e Perinatal.

*Master's dissertation presented to the Surgery Sciences
Postgraduation Programme of the School of medical
Sciences of the University of Campinas to obtain the MSc
grade in Maternal and Perinatal Health.*

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA MICHELE CINTRA VICENTINI
E ORIENTADA PELO PROF. DR. RICARDO BARINI**

Assinatura do Orientador

Campinas, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS - CRB 8/8402

V662c	<p>Vicentini, Michele Cintra, 1987- Correlação da intensidade de fluorescência com o resultado gestacional no exame de prova cruzada por citometria de fluxo em mulheres submetidas a imunização com leucócitos paternos / Michele Cintra Vicentini. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.</p> <p>Orientador: Ricardo Barini. Coorientador: Isabela Nelly Machado. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Teste de histocompatibilidade. 2. Citometria de fluxo. 3. Aborto habitual. 4. Linfócitos. I. Barini, Ricardo, 1955-. II. Machado, Isabela Nelly. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Flow cytometry crossmatch in women undergoing paternal leukocytes immunization: correlation between fluorescence intensity and pregnancy outcome.

Palavras-chave em inglês:

Histocompatibility testing
Flow cytometry
Abortion, Habitual
Lymphocytes

Área de concentração: Saúde Materna e Perinatal

Titulação: Mestra em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Ricardo Barini [Orientador]
Sílvia Daher
Egle Cristina Couto de Carvalho

Data de defesa: 17-12-2013

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

Diagramação e arte-final: Assessoria Técnica do CAISM (ASTEC)

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

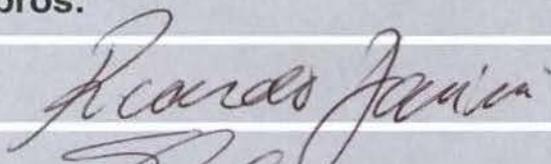
Aluna: MICHELE CINTRA VICENTINI

Orientador: Prof. Dr. RICARDO BARINI

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. ISABELA NELLY MACHADO

Membros:

1.



2.



3.



Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 17/12/2013

*Dedico esta,
bem como todas as minhas demais conquistas,
aos meus pais Joel e Clivanir,
ao meu irmão Ricardo
e aos meus avós Carlos e Adélia.*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

Agradeço também ao meu orientador Dr. Ricardo Barini, à minha coorientadora Dra. Isabela Nelly Machado e à minha chefe Simone Souza Lima, que me apoiaram e são os responsáveis por este trabalho.

Agradeço às minhas companheiras e amigas de trabalho Adriana, Ana Cláudia, Fernanda e Simone, pela paciência, pelo incentivo, pela força e principalmente pelo carinho e grande ajuda neste processo.

Agradeço aos meus grandes amigos Ana Lúcia, Ana Paula, Cibele, Gabriele, Helio, João, Liana, Mariana e Thaís pelo suporte e amizade durante este período.

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	vii
Resumo	ix
Summary	xi
1. Introdução	13
1.1. Imunologia da Gestação	13
1.2. Interface Materno-Fetal	14
1.3. Expressão de Antígenos Leucocitários Humanos	16
1.4. Linfócitos T e Citocinas	19
1.5. Células <i>Natural Killer</i>	20
1.6. Aborto espontâneo recorrente e Imunização com leucócitos paternos	22
1.7. Prova Cruzada por Citometria de Fluxo	24
2. Objetivos	32
2.1. Objetivo geral	32
2.2. Objetivos específicos	32
3. Sujeitos e Método	33
3.1. Desenho do estudo e tamanho amostral	33
3.2. Seleção de sujeitos, coleta das amostras e dos dados clínicos	33
3.3. Técnicas, exames e testes	34
3.3.1. Prova Cruzada por Citometria de Fluxo	34
3.3.2. Imunização com leucócitos paternos	39
3.4. Análise estatística, classificação e interpretação dos resultados	40
3.5. Aspectos Éticos	42
4. Resultados	44
5. Discussão	50
6. Conclusões	53
7. Referências Bibliográficas	54
8. Anexos	61
8.1. Anexo 1 – Ficha Clínica	61
8.2. Anexo 2 – Protocolo Allovita	63
8.3. Anexo 3 – Resumo das características clínicas e laboratoriais das 85 mulheres incluídas no estudo	66
8.4. Anexo 4 – Resumo das características gestacionais e laboratoriais das 85 mulheres incluídas no estudo	68
8.5. Anexo 5 – Parecer Consubstanciado do CEP	70
8.6. Anexo 6 – Artigo	72

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

- Ab2** – Anticorpos antiidiotípicos
- AER** – Aborto espontâneo recorrente
- AGH** – Anti imunoglobulina humana
- APCA** – Anticorpos bloqueadores
- FCXM** – Prova Cruzada por Citometria de Fluxo
- FITC** – Fluoresceína
- FSC** – *Foward Scatter*
- GMCSF** – Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
- HLA** – Antígenos Leucocitários Humanos
- IF** – Intensidade de Fluorescência
- IL 2** – Interleucina 2
- IL 4** – Interleucina 4
- IL 5** – Interleucina 5
- IL 7** – Interleucina 7
- IL 9** – Interleucina 9
- IL 10** – Interleucina 10
- IL 13** – Interleucina 13

- ILP** – Imunização com leucócitos paternos
- INF γ** – Interferom gama
- MCX** – Pova Cruzada por microlinfotoxicidade
- MHC** – Complexo Principal de Histocompatibilidade
- MIF** – Mediana da Intensidade de Fluorescência
- MLR-Bf** – Reação linfocitária de anticorpos bloqueadores
- NK** – *Natural Killer*
- Nku** – *Natural Killer* uterina
- PBS** – Tampão fosfato salino
- PE** – Ficoeritrina
- SHN** – Soro humano normal
- SSC** – *Side Scatter*
- Tc** – Linfócito T citotóxico
- Th** – *T helper*
- Th1** – *T helper 1*
- Th2** – *T helper 2*
- TNF α** – Fator de necrose tumoral alfa

Resumo

Introdução: O sucesso da gestação envolve mecanismos aloimunes, sendo o feto alogênico considerado um aloenxerto bem sucedido. A imunização com leucócitos paternos têm se apresentado como uma eficiente opção terapêutica para os casos de abortamento recorrente, induzindo a produção de anticorpos anti-paternos pelo sistema imune materno durante a gestação. Atualmente, o método de Prova Cruzada por citometria de fluxo (FCXM) vem sendo utilizada para auxílio na avaliação de pacientes com Aborto Espontâneo de Repetição (AER). **Objetivos:** Avaliar o resultado do FCMX em mulheres com antecedente de AER que engravidaram após tratamento com ILP de acordo com o resultado gestacional. **Material e Métodos:** 85 pacientes foram selecionadas para o estudo tendo como critérios de inclusão: mulheres com dois ou mais AER, FXCM inicial negativo contra os maridos e mulheres de AER primário. As mulheres divididas em 2 dois grupos 1) Sucesso Gestacional (SG) 2) Perda Gestacional (PG). Após um FCXM inicial negativo (FCXM pré) as pacientes foram imunizadas com doses de ILP e após 30 dias da última ILP um novo FCXM (FCXM pós) foi realizado, a mediana da intensidade de fluorescência (MIF) foi calculada nos 2 momentos e comparada nos 2 grupos. **Resultados:** Calculando a razão da

Intensidade de Fluorescência (IF FCXM pós / IF FCXM pré) para linfócitos T e B analisamos que não houve diferença significativa entre os dois grupos SG e PG, onde linfócito T apresentou $p = 0,119$ e linfócito B apresentou $p = 0,109$.

Conclusão: Não houve associação entre a variação da razão da MIF nos 2 grupos: SG e PG. Sendo assim, essa variação (razão da MIF), não pode ser usada como parâmetro laboratorial para avaliar o sucesso da ILP quanto ao resultado (“desfecho”) das gestações após o tratamento imunológico.

Summary

Introduction: Pregnancy is totally involved with mechanisms alloimmunes, which is considered as a successful allograft: the allogeneic. The immunization therapy with paternal allogeneic lymphocytes (PLI) has been exposed as an efficient therapeutic option for recurrent abortion cases (RSA). Currently, the method of Flow Cytometry Crossmatch (FCXM) has been used to assist in the evaluation of women with RSA. **Objective:** Evaluate the FCXM results in women with previous RSA, who became pregnant after treatment with PLI according to the pregnancy outcome **Material and Methods:** 85 women were selected for this study, the inclusion criteria were: women with two or more RSA, FXCM initial negative against their partners and women of primary RSA. They were divided into two groups 1) Success Outcome (SO) 2) Miscarriage (M). After an initial negative FCXM (first FCXM) patients were immunized with doses of PLI and after 30 days of the last PLI FCXM a new (post FCXM) was performed, the median fluorescence intensity (MFI) was calculated in 2 moments and compared into 2 groups. **Results:** Calculating the ratio of the Fluorescence Intensity (FCXM post IF / IF first FCXM) for T and B lymphocytes there was no significant difference between the two groups SO and M, where T lymphocytes

showed a value $P = 0.119$ and B-lymphocytes showed a value $P = 0.109$.

Conclusion: There was no association between the variation of the ratio of MFI in 2 groups: SO and M. Thus, this variation (ratio of MFI) cannot be used as laboratory parameter to evaluate the success of the outcome of PLI of pregnancies after immunological treatment.

1. Introdução

1.1. Imunologia da Gestação

A reprodução consiste em um processo árduo para o ser humano, pois a probabilidade da fecundação durante um ciclo fértil é de aproximadamente 30%, dos quais apenas 50% a 60% dos fetos nascerão vivos (1,2). A gestação constitui um paradoxo imunológico intrigante, pois o sistema imune materno está apto a reconhecer e tolerar o feto sem rejeitá-lo, possibilitando assim seu desenvolvimento e sobrevivência durante os nove meses de gestação (3).

O reconhecimento imunológico do feto pelo sistema imune materno foi proposto por Peter Medawar na década de 50. Em seu estudo, Medawar (3) sugeriu que o feto seria um enxerto semialogênico, uma vez que apresenta antígenos maternos e paternos. Sua sobrevivência estaria relacionada a uma supressão da resposta imunológica materna, ou seja, não haveria resposta deletéria ao feto (2,4,5,6,7). Medawar sugeriu também que haveria uma falta de expressão antigênica fetal, cuja origem poderia ser derivada de uma supressão funcional dos linfócitos maternos ou pela existência de uma separação

anatômica entre o feto e a mãe (2,5). Hoje, sabe-se que não há essa separação anatômica, mas sim um contato estreito de células imunes maternas com algumas células fetais (como os trofoblastos) (2).

A função dos linfócitos, de fato, muda ao decorrer da gestação, tornando verdadeira a hipótese proposta por Medawar de que haveria uma supressão funcional dos linfócitos maternos (2).

1.2. Interface Materno-Fetal

A interface materno-fetal é mediada pela da placenta e tem como característica a bidirecionalidade. A placenta atua como uma barreira imunológica e, como não há continuidade vascular entre mãe e filho, apresenta papel importante na tolerância fetal (1,2,4,6,7,8,9).

O precursor da placenta é o trofoblasto fetal que reveste o blastocisto e distingue-se em três populações diferentes (Figura 1.). A primeira é o citotrofoblasto viloso, que forma um conjunto de células trofoblásticas em divisão que permanecem nas vilosidades. A segunda população são células trofoblásticas que envolvem o citotrofoblasto formando o sinciotrofoblasto. A última população é formada pelo citotrofoblasto não viloso, cujas células são precursoras de células trofoblásticas que migram para a decídua e para o miométrio (1,2,4,10). Desta forma, o trofoblasto entra em contato direto com o sangue materno e com suas células imunes sem ser acometido pelo sistema imune materno (1,2,4,10).

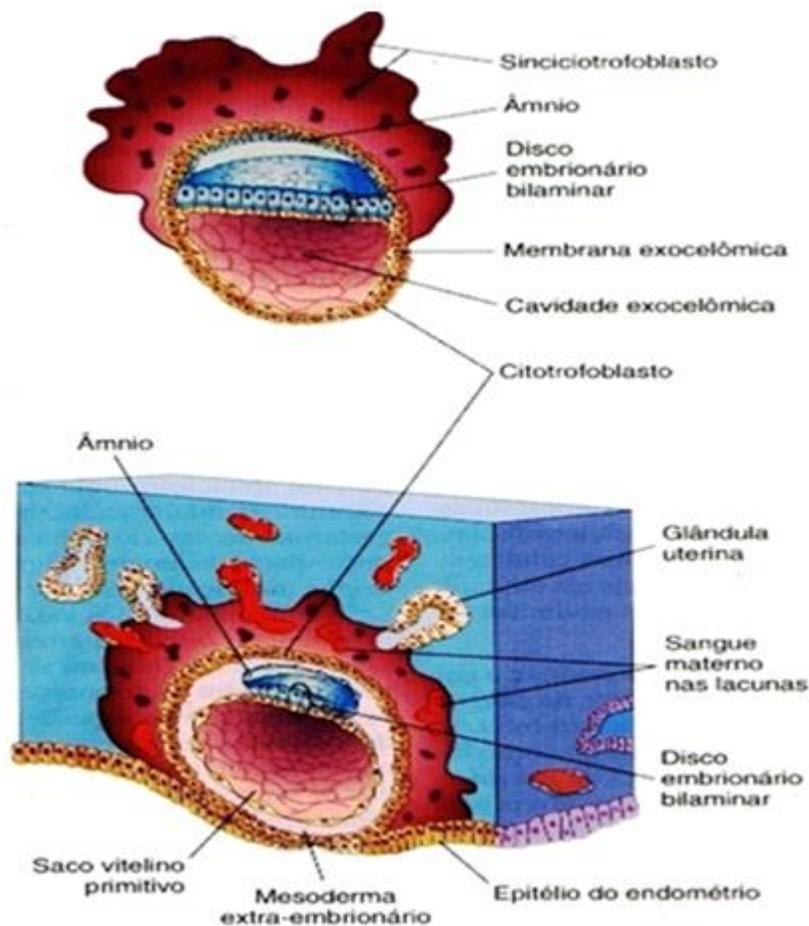


Figura 1. Implantação do blastocisto no endométrio. Ilustração dos três tipos celulares que revestem o trofoblasto. Retirada de Moore & Persuad.

Outro elemento importante na gestação é a decídua, tecido de origem materna, que apresenta diversas funções biológicas, nutritivas, estruturais e imunológicas. Os principais tipos de células leucocitárias presentes na decídua humana, durante as primeiras semanas de gestação, células *natural killer* (NK) CD56⁺ CD16⁻ CD3⁻ (80%), células T CD3⁺ (10%) e macrófagos CD14⁺ (10%). Estes leucócitos encontram-se em grande número e densidade, especificamente

no local de implantação do embrião (blastocisto) na decídua e desenvolvem importante papel no direcionamento de uma resposta citotóxica ou supressora (4,11,12,13,14).

1.3. Expressão de Antígenos Leucocitários Humanos

O MHC codifica os antígenos leucocitários humanos (HLA) que são encontrados na superfície da maioria das células do organismo humano e diferenciam o “próprio” do “não próprio” (14). Sua função principal é facilitar a apresentação de antígenos para os linfócitos T. O MHC pode ser dividido em duas classes: Classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F e HLA-G), e Classe II (HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR) (2,4,7,8).

O MHC de classe I é expresso por células nucleadas que estão envolvidas na apresentação de antígenos para linfócitos citotóxicos (Tc). Esta molécula também está envolvida na ativação e inibição de células NK (2). O MHC de classe II é expresso somente pelos linfócitos B, células apresentadoras de antígenos e células epiteliais, estando envolvido com o imuno-reconhecimento (2). A expressão de moléculas de HLA classe I é realizada pelas células do trofoblasto. Em 1986, Ellis et al. (15) identificaram um tipo de molécula de HLA pertencente a classe I que possuía expressão no citotrofoblasto não viloso, sendo denominada HLA-G.

No decorrer da gestação, a molécula de HLA-G promove “proteção imunológica” do feto, controlando a citotoxicidade das células *Natural Killer*

uterina (NKu) através da interação com os receptores inibitórios KIR2DL4 (expresso pelas células NK), LILRB1 (restrito a células estromais, compostas por fibroblastos e macrófagos) e LILRLB2 (detectado no músculo liso vascular). As moléculas de HLA-G são aptas a suprimirem a proliferação de linfócitos T, e influenciam os linfócitos Tc e as células NKu, alterando a secreção de citocinas (4,6,7, 11,16, 17,18,19,20).

Ligada à membrana da molécula HLA-G há uma parte solúvel denominada sHLA-G, que desempenha papel importante na modulação de células imunes, beneficiando a gestação, além de suprimir os linfócitos Tc. O sHLA-G pode estar envolvido com a implantação do embrião, o que pode ser evidenciado pelo aumento dos seus níveis em mulheres grávidas no primeiro trimestre, atingindo um pico no terceiro mês (20,21). Sugere-se que a interação entre os antígenos HLA-G do citotrofoblasto e as células NK (CD3⁻ CD56⁺ CD16⁻) presentes no endométrio determine a intensidade da invasão do endométrio pelo trofoblasto, influenciando o desenvolvimento da gestação (4,14).

O reconhecimento do HLA paterno como diferente do materno induz a produção de anticorpos bloqueadores que protegem o feto contra a atividade citotóxica materna (4,6,11,14). Os anticorpos bloqueadores são detectados desde o início da gestação, permanecendo por tempo indeterminado na corrente sanguínea materna e induzem a memória imunológica específica no caso de uma nova gestação com o mesmo parceiro (4,11,14).

Quando há o compartilhamento dos mesmos antígenos HLA por um casal, as moléculas HLA-G produzidas no tecido placentário são as mesmas que a mãe produziu para o seu próprio desenvolvimento intrauterino. Desta forma, não ocorre formação dos anticorpos bloqueadores, levando o sistema imune materno a identificar a gestação como um tecido próprio com crescimento anômalo, inibindo a produção de anticorpos bloqueadores (APCA) e anticorpos anti-idiotípicos (6,19). Conseqüentemente, as células NK são ativadas e desenvolvem uma resposta imune do tipo T helper 1 (Th1), a qual é caracterizada pela produção de determinadas citocinas e suas conseqüências deletérias ao tecido trofoblástico trofoblástico (22,23,24,25,26) Assim, o reconhecimento da molécula HLA-G, pelas células NK, é o que determina a resposta imune tipo T helper 2 (Th2) (12,27,28,29,30).

O balanço entre as respostas tipo Th1 e Th2 é influenciado por diversos fatores. Dentre esses fatores, podem-se destacar: o perfil de citocinas do meio, dose antigênica, tipo de antígeno, bem como a atividade de hormônios presentes no meio, como cortisol que direciona para resposta tipo Th2, enquanto que dehidroepiandrosterona direciona para Th1 (31).

A partir da identificação do compartilhamento dos mesmos antígenos HLA pelo casal, surgiu à hipótese imunológica aloimune, a qual propõe que a disparidade antigênica é benéfica para o desenvolvimento do embrião (19). Os antígenos HLA seriam a base para esta disparidade, na qual as moléculas de HLA-G paterno estimulam a expressão de anticorpos bloqueadores, que

permitirão o desenvolvimento dos tecidos placentários e proporcionarão proteção imunológica ao embrião (6,13).

1.4. Linfócitos T e Citocinas

Os linfócitos T podem ser divididos em dois grupos: os linfócitos T helper (Th) que auxiliam na imunidade celular através da produção de citocinas; e T citotóxicos (Tc), que destroem células infectadas e/ou patógenos (2). Outra classificação que pode ser designada aos linfócitos T baseia-se no tipo de citocinas produzidas por eles, nessa classificação, os linfócitos Tipo 1 (Th1) são responsáveis pela produção de interleucina 2 (IL-2), interferon- γ (INF- γ) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) promovem imunidade celular. Os linfócitos Th2 promovem a resposta imune humoral e produzem interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 9 (IL-9), interleucina 13 (IL-13) e interleucina 10 (IL10) (2,32). A diferenciação dos linfócitos em Th1 e Th2 pode ser influenciada por hormônios como a progesterona que, durante a gestação, é uma importante indutora da produção das citocinas Th2. Entretanto, o hormônio β hCG não apresenta influência na diferenciação das células T em Th1 e Th2 (32,33,34).

Os leucócitos decíduais contribuem para a expressão de receptores que medeiam o reconhecimento do trofoblasto fetal, a invasão trofoblástica e a produção de citocinas que modulam e regulam a resposta imune materna (7,33,34). Na gestação, a produção de citocinas ocorre desde a nidação até o parto, atuando estas substâncias como mediadoras responsáveis pela interação

dos diferentes tipos celulares na interface materno-fetal (6,7,35). Talvez, o aspecto mais importante dessas citocinas na gestação, seja que elas possuem um papel fisiológico normal se produzidas em locais pré-determinados e em quantidades que possam, de fato, promover o desenvolvimento do trofoblasto. Entretanto, cada citocina pode também ter um efeito fisiopatológico, caso seja liberada em quantidades ou locais anormais (7,35). Durante o processo imunológico da gestação normal, é observada uma predominância da resposta tipo Th2. Em pacientes com história de aborto de repetição e falhas repetidas de fertilização *in vitro* pode ser observada tendência à resposta tipo Th1 (11,35,36,37,38,39,40).

As citocinas Th1 podem causar danos à placenta, direta ou indiretamente, através da ativação de algumas células do sistema imune. O TNF- α pode causar a expulsão do embrião através da contração uterina, a necrose de embriões implantados, e pode também ocluir o suplemento sanguíneo para o feto (11). Foi demonstrado que o INF- γ inibe a secreção do Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF), o qual promove o crescimento e diferenciação do trofoblasto durante a gestação normal (11). As citocinas Th2 promovem a produção de anticorpos bloqueadores da atividade citotóxica, mantêm as células NK decíduais inibidas e têm potencial anti-inflamatório (6,11).

1.5. Células *Natural Killer*

As células NK representam a população predominante de linfócitos presentes na placenta, constituindo aproximadamente 10% dos linfócitos do

sangue periférico. Estas células são reconhecidas por sua atividade citotóxica, e apresentam papel importante na defesa imunológica, regulação, implantação embrionária e placentação (6,7,11,20,41,42). Em sua superfície, as células NK expressam antígenos que as caracterizam em NK circulantes e NK uterinas; CD56⁺CD16⁻ e CD56⁺CD16⁺, respectivamente. O antígeno CD16 caracteriza-se como um receptor de baixa afinidade para anticorpos IgG, e possui função de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (1,7,43). O antígeno CD56 pode ser diferenciado em dois grupos: o primeiro grupo são as CD56^{bright}, que são pouco citotóxicas, e o segundo grupo são as CD56^{dim}, que possuem alto nível de citotoxicidade (1,7,43).

As células NK circulantes são células timo-independentes e possuem papel permissivo na autoimunidade. As células NK uterinas proporcionam o suporte adequado para o trofoblasto e para o crescimento placentário e também auxiliam na vascularização da decídua além de participar da criação do local de imunossupressão na interface materno-fetal (7).

Em uma gestação normal, as células do trofoblasto produzem as citocinas interleucina 4 e 7 (IL-4 e IL-7), que são responsáveis pela estimulação de linfócitos Th2 e pelo aumento dos receptores inibitórios das células NK uterinas, havendo, dessa forma, um processo de maturação linfocitária que beneficia o desenvolvimento gestacional (6,20). Entretanto, a decídua de mulheres que sofreram aborto espontâneo de repetição apresenta diminuição (40%) dos níveis de CD56⁺CD16⁻, que são as células produtoras de fatores supressores e citocinas. O aumento dos níveis de CD56⁺CD16⁺ também encontrado no útero

de mulheres que sofreram aborto espontâneo de repetição, sugerindo que a atividade citotóxica está presente no local da implantação (7,11).

Acredita-se que altos níveis de NK circulantes são preditores de gravidez química e de aborto espontâneo de repetição. A produção de citocinas do tipo Th1 pode alterar a atividade das células NK, transformando-as em CD56⁺CD16⁺, as quais induzem a produção de IL-2, TNF α e INF γ - que são citocinas com características inflamatórias e trombóticas -, e induzindo a perda gestacional (6,7,11,42,43).

1.6. Aborto espontâneo recorrente e Imunização com leucócitos paternos

O AER ocorre em aproximadamente 1% a 3% das mulheres em idade reprodutiva. Possui definição clássica três ou mais perdas gestacionais consecutivas, caracterizadas pela eliminação por via vaginal de feto com peso inferior a 500 gramas e/ou idade gestacional inferior a 20 semanas, com ou sem sinais de vitalidade, comprovados por história clínica consistente, curetagem uterina ou exame anatomopatológico do material (13,20,28,29). Em 2008, o Comitê de Prática da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva revisou a definição de AER para duas ou mais perdas gestacionais consecutivas (44).

O AER pode ser classificado em primário e secundário. Aborto espontâneo recorrente primário é dito quando o casal não apresenta em sua história filho nascido vivo. O AER secundário é caracterizado por pelo menos uma gestação com sucesso, independente do número de perdas anteriores

(45). Em 50% dos casos, a etiologia do AER é desconhecida e várias hipóteses têm sido propostas, sendo as mais: as alterações cromossômicas, anomalias uterinas, distúrbios endócrinos e os estados prombóticos (19,29). Pandey et al. (11) mostraram que após duas perdas gestacionais, o risco de uma nova gestação resultar em aborto espontâneo é de aproximadamente 24%, 30% após três perdas e 40% após quatro perdas gestacionais (11).

Um dos tratamentos propostos para AER é a imunização com leucócitos paternos (ILP), descrita em 1981 (46,47). O uso de linfócitos paternos ou de doador surgiu da observação de pacientes submetidos à aloenxertos renais, que, após várias transfusões sanguíneas, apresentavam menor taxa de rejeição (48). Considerando-se o desconhecimento do exato mecanismo determinante do AER, a ILP tem sido considerada empírica. O mecanismo da ILP não foi completamente elucidado; contudo, estudos demonstram que os efeitos positivos da ILP são a produção de anticorpos bloqueadores (APCA), anticorpos anti-idiotípicos (Ab2) e reação linfocitária de anticorpos bloqueadores (MLR-Bf) (30,33). Perricone et al. (48) mostraram também que a ILP possui a capacidade de suprimir a atividade das células NK, possibilitando um melhor prognóstico gestacional (48).

Desde sua descrição na década de 80, muitos estudos avaliaram a eficácia da ILP. Em uma meta-análise que envolveu vários estudos duplo-cegos foi observado um efeito terapêutico positivo de 8% a 10% (49). Outros autores, em estudos mais recentes, sugeriram que esta imunoterapia é um possível tratamento para os casos de insucesso da fertilização *in vitro* e estudos revelaram a importância da ILP no tratamento de mulheres com AER comparadas

com grupos-controle, demonstrando que as mulheres que receberam o tratamento obtiveram um melhor resultado gestacional (29,37,39,40,50,51,52). Entretanto, estudos randomizados não confirmaram a eficácia da ILP no tratamento do AER, sugerindo que outros fatores, como número de perdas gestacionais, tempo de concepção depois da imunização e idade das mulheres poderiam influenciar o resultado da gestação (34,35,36,48).

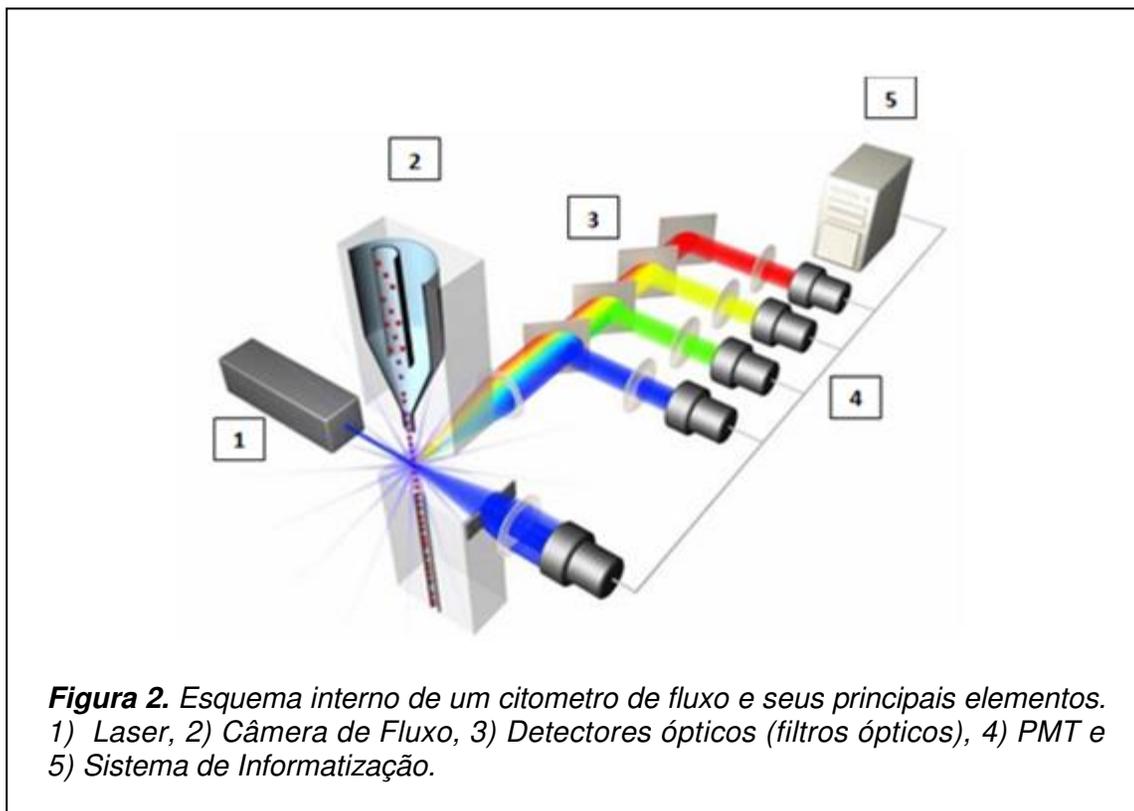
1.7. Prova Cruzada por Citometria de Fluxo

A heterogeneidade das pacientes com AER incluídas em estudos que demonstraram baixa eficácia do tratamento com ILP é um fator que pode ser minimizado através de métodos de monitoramento e testes laboratoriais que avaliem a resposta imune no decorrer do tratamento (49,50). Para minimizar a heterogeneidade dessas pacientes, o uso de testes laboratoriais como a Prova Cruzada por microlinfocitotoxicidade ou citometria de fluxo têm sido utilizados (49,50). Este teste possui o objetivo de detectar, no soro das pacientes, os anticorpos antilinfocitários (em geral anti-HLA) pré-formados contra antígenos presentes nos linfócitos do potencial doador (no caso da ILP, o marido) (51). Coincidentemente, a Prova Cruzada utilizada para avaliar a eficácia do tratamento imunológico é o mesmo que vem sendo utilizado para transplante de órgãos há mais de 20 anos (50,51,52).

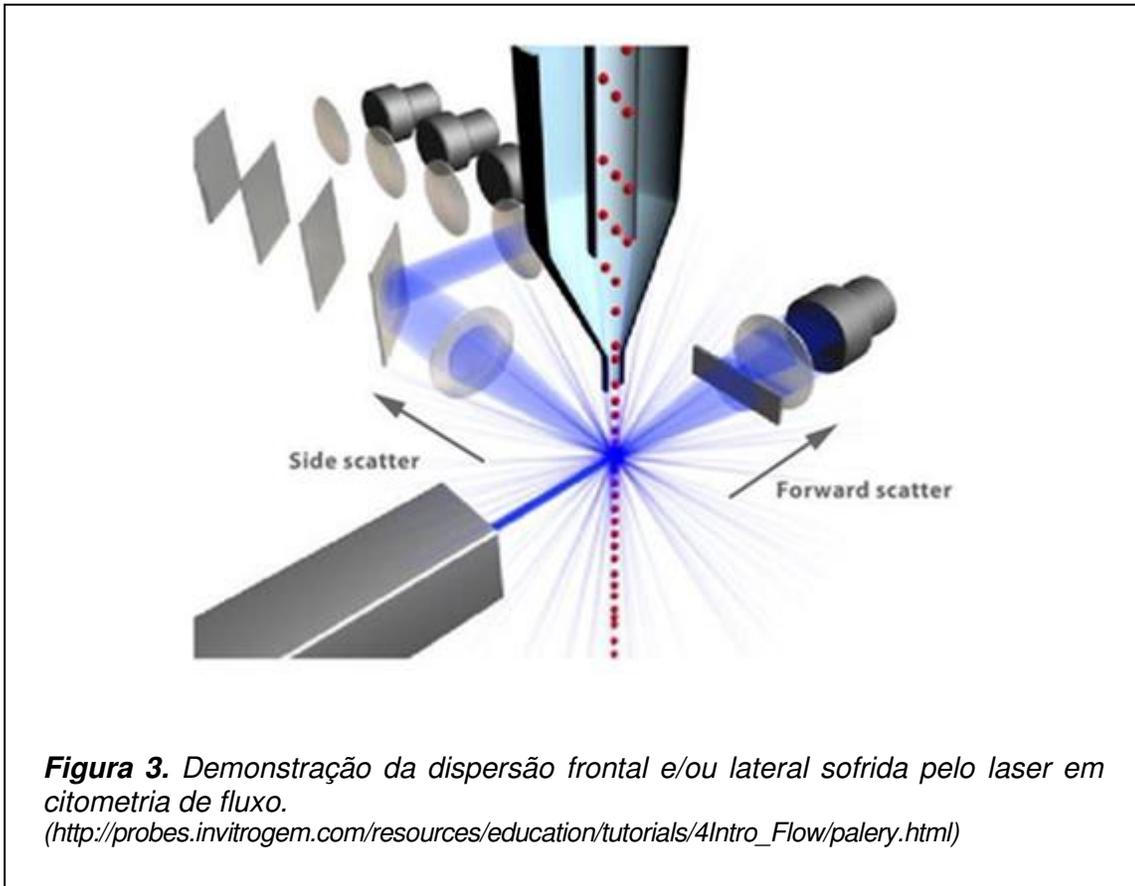
O método mais antigo de Prova Cruzada para avaliar as pacientes com AER é o de microlinfocitotoxicidade (MCX), no qual o soro da paciente é incubado com os linfócitos do marido, recebendo adição de soro de coelho como fonte

de complemento combinado com anti-imunoglobulina humana (AGH) para aumentar a sensibilidade do teste (52,53,54,55). O resultado do MCX é dado em um *score* que avalia a porcentagem de lise celular (56).

Atualmente, o método de Prova Cruzada por citometria de fluxo (FCXM) vem sendo utilizado, apresentando resultados relevantes para auxílio do tratamento imunológico. O citômetro de fluxo consiste em um equipamento para medição de partículas ou células de forma rápida e sensível. Seu sistema é formado por 5 itens: fontes de radiação (*laser*), câmera de fluxo, detectores ópticos (filtros ópticos) para seleção de intervalos de comprimento de onda, fotomultiplicadores apropriados (PMT) para a detecção da fluorescência e um sistema de informatização para armazenamento e processamento dos dados (Figura 2) (57).

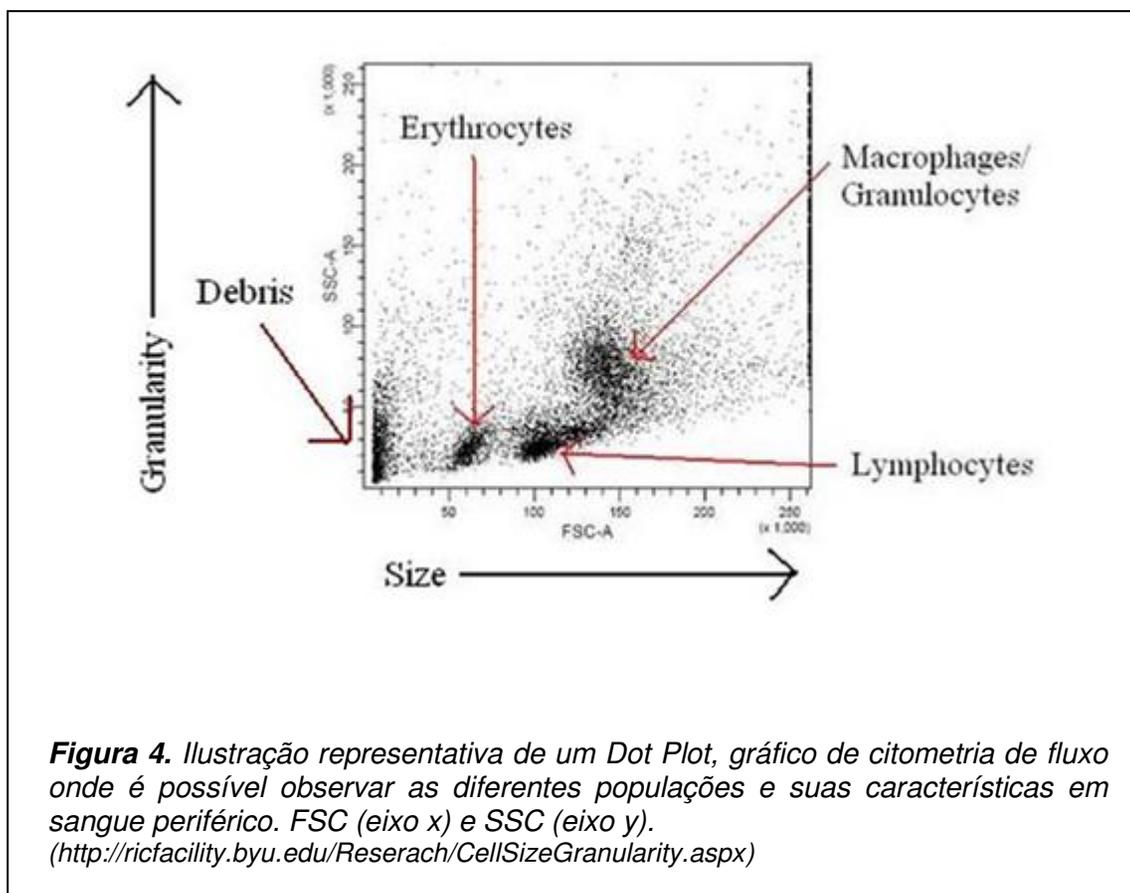


Uma vez em suspensão, as células são direcionadas através da Câmara de Fluxo para o *laser*, que sofre dispersão na direção frontal (*Forward Scatter* - FSC) que está relacionada ao tamanho celular. E na direção lateral (*Side Scatter* - SSC) que está relacionada à granulosidade e complexidade celular (Figura 3) (57).



Um dos métodos de citometria mais usado para estudar células envolve a utilização de moléculas fluorescentes conjugadas com anticorpos (fluorocromos), que permitem a diferenciação de diferentes populações celulares e suas características (Figura 4). Os fluorocromos aderem a moléculas específicas na superfície ou no interior celular. Quando o laser encontra o fluorocromo, um

sinal fluorescente (fluorescência) é emitido e detectado pelo citômetro. A fluorescência emitida é proporcional ao número de moléculas de fluorocromos ligados à célula (57).



Os detectores ópticos são idênticos entre si. O que determina qual fluorescência será detectada são os diferentes tipos de filtros ópticos. Toda vez que uma célula ou partícula “passa” pelo *laser*, os detectores ópticos geram um pulso de voltagem, uns mais brilhantes que outros, que é proporcional à quantidade de fluorescência emitida pelas células. Todos os pulsos de voltagem são gravados e apresentados graficamente em histogramas (Figura 5) (57).

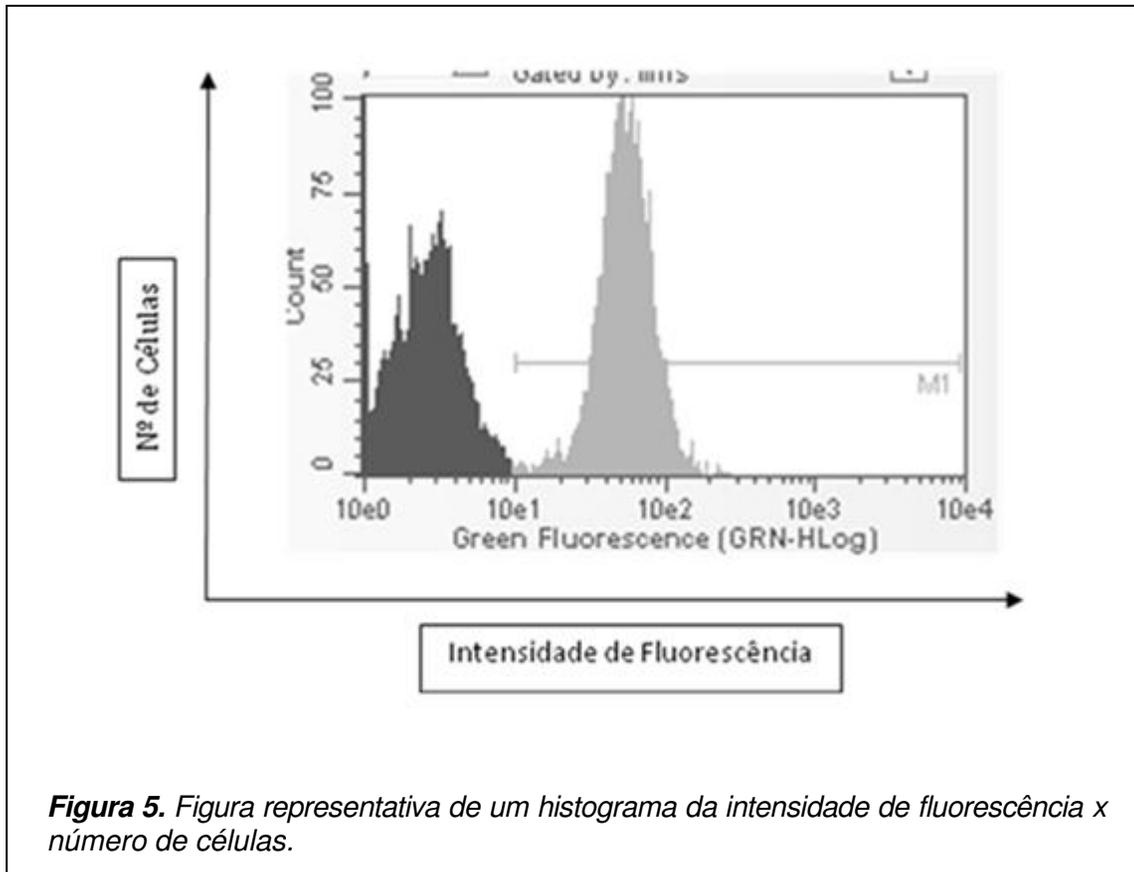


Figura 5. Figura representativa de um histograma da intensidade de fluorescência x número de células.

Quando as células são analisadas em citômetro de duas cores, o equipamento irá identificar as células que emitem fluorescência para dois fluorocromos (anticorpos monoclonais), no caso de FCXM seriam a fluoresceína (FITC - cor verde – linfócitos CD3 ou CD19) e ficoeritrina (PE - cor amarela - anti-imunoglobulina humana (IgG)). Quatro populações de células podem ser identificadas utilizando um gráfico (*dot plot*) (Figura 6). O *dot plot* é dividido em quatro quadrantes. As células que emitem fluorescência somente para PE aparecem no quadrante superior esquerdo e são consideradas “positivas” para IgG. As células que emitem baixa fluorescência para FITC e PE aparecem no quadrante inferior esquerdo e correspondem às células “negativas” para IgG e

CD3 ou CD19. No quadrante superior direito, aparecem às células que emitem fluorescência para as FITC e PE, correspondem às células chamadas “duplo positivas” para IgG + CD3 ou CD19. E no quadrante inferior direito aparecem as células que emitem fluorescência somente para FITC, e são consideradas “negativas” para IgG (57).

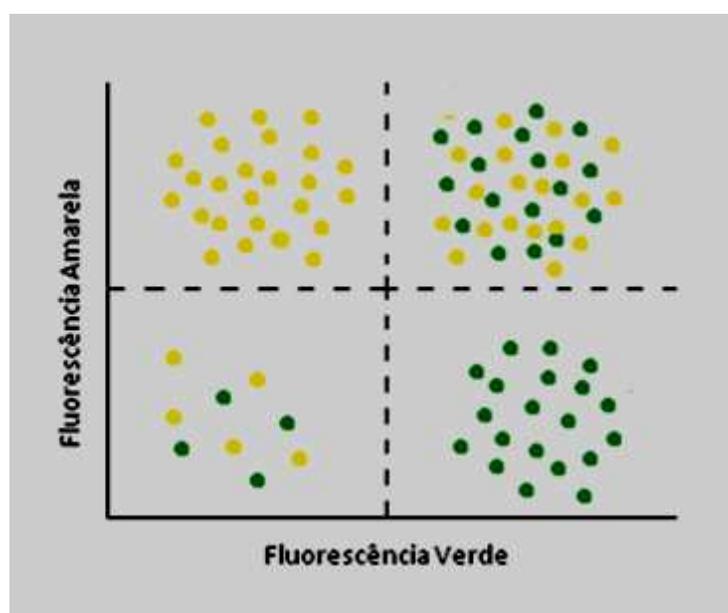


Figura 6. Figura representativa da divisão dos quadrantes do dot plot e suas respectivas fluorescências.

No tratamento imunológico com ILP, geralmente, as mulheres são submetidas a duas Provas Cruzadas, a primeira antes de iniciar o tratamento e outra após 30 a 40 dias da última dose de ILP. Mulheres que possuem FCXM inicial negativo são direcionadas ao tratamento imunológico. Matsubayashi et al. (49) demonstraram que 7 das 10 mulheres (70%) que apresentaram FCXM inicial e

pós-ILP negativos não obtiveram sucesso gestacional, ocorrendo novamente o aborto espontâneo. Entretanto, 83 mulheres de 94 (88,3%) que iniciaram o tratamento com FCXM negativo, e após o tratamento com ILP, obtiveram FCXM positivo, tendo como resultado o sucesso gestacional (nascimento) (49).

Gilman-Sachs et al. (52) demonstraram que o FCXM de 85% das mulheres analisadas após ILP apresentaram anticorpos contra linfócitos T e B; 6% e 3% apresentaram somente anticorpos para linfócitos T e B, respectivamente. Sendo assim, concluíram que a positividade do FCXM após ILP é induzida tanto pelos linfócitos T quanto pelos B (52).

O FCXM para AER consiste na incubação do soro da mulher com os linfócitos do marido, seguido da adição de PE conjugado com anti IgG para detecção de anticorpos maternos na superfície celular dos linfócitos) (50,51,52). Anticorpos monoclonais CD3 e CD19 conjugados com FITC são adicionados para especificar a reatividade das células T e B (41). Os resultados são expressos através da mediana da intensidade de fluorescência (MIF) do soro testado em comparação a um controle negativo, ou seja, quanto mais alta for a fluorescência de linfócitos T ou B maior será o nível de anticorpos contra os mesmos (50). Os resultados do FCXM para CD3 e CD19 são considerados positivos quando as células aparecem no quadrante superior direito. Em caso de FCXM negativo, as células aparecem no quadrante inferior direito.

Estudos comprovam que o FCXM é altamente sensível na detecção de anticorpos circulantes, na detecção e diferenciação das diferentes classes de

imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) e na análise direta de anticorpos contra os linfócitos T e B do marido (49,50,52,53,55,58). Na avaliação para mulheres com AER, o uso do FCXM baseia-se no fundamento de que a ILP induz a produção de anticorpos antipaternos pelo sistema imune materno durante a gestação, inibindo a resposta imune normal de rejeição do feto semialogênico (54). Assim, a prova cruzada por citometria de fluxo realizada após o tratamento poderia identificar se houve mudança na produção de anticorpos antipaternos, e poderia ser uma medida da eficácia do tratamento ILP do ponto de vista imunológico.

Uma vez identificado o “sucesso imunológico” da ILP pela mudança de um FCXM negativo para positivo, interessante seria avaliar a relação desse sucesso imunológico com o “sucesso gestacional”, do ponto de vista clínico. A avaliação da correlação entre FCXM e resultado gestacional de mulheres que realizaram o tratamento imunológico poderia contribuir para aumentar o conhecimento teórico acerca dessa opção terapêutica e para ajudar na busca de um teste laboratorial que pudesse contribuir para uma definição prognóstica nos casos de AER submetidos ao tratamento, justificando este estudo.

A identificação do momento correto, em que os casais submetidos ao tratamento imunológico estão aptos a tentar uma nova gestação, tem se tornado um desafio para os estudiosos da área. Atualmente, os casais realizam a prova cruzada antes e após tratamento; o resultado do teste é baseado na porcentagem de linfócitos CD3 e CD19, onde há um *cut off* que define o resultado como positivo para que haja a liberação do casal. Entretanto, não é possível se estabelecer o prognóstico gestacional a partir dessa avaliação.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o resultado do FCMX em mulheres com antecedente de AER que engravidaram após tratamento com ILP, de acordo com o resultado gestacional.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a MIF nas pacientes com AER em FCMX antes do tratamento ILP.
- Avaliar a MIF nas pacientes com AER em FCMX após o tratamento ILP.
- Calcular a variação da MIF para cada paciente (razão MIF pós/MIF pré).
- Comparar a razão da MIF com resultado de FCXM entre os grupos com diferentes desfechos gestacionais.

3. Sujeitos e Método

3.1. Desenho do estudo e tamanho amostral

Estudo descritivo de corte transversal. Para tanto, não foi calculado tamanho amostral mínimo.

3.2. Seleção de sujeitos, coleta das amostras e dos dados clínicos

Foram selecionadas mulheres com histórico de aborto espontâneo recorrente que apresentavam Prova Cruzada negativa contra seus parceiros e que realizaram tratamento imunológico com imunização com leucócitos paternos, admitidas na Clínica Dr. Ricardo Barini (Campinas- SP) e/ou Laboratório Allovita (Campinas – SP) no período de janeiro de 2011 a julho de 2013. Como segundo passo, dentro da amostra inicial, foram selecionadas as mulheres que engravidaram após tratamento imunológico. As mulheres selecionadas foram divididas em dois grupos: Sucesso gestacional (SG) e Perda gestacional (PG). Para fins deste estudo, foi considerado sucesso gestacional as gestações que resultaram em fetos com peso > 500 g ou idade gestacional \geq 21 semanas, independentemente da sobrevivência pós-natal. Foram excluídas mulheres com idade inferior a 15 anos e/ou presença de doenças malignas.

A coleta de sangue do casal foi realizada através de punção venosa. Para a técnica de Prova Cruzada por citometria de fluxo foi coletada uma amostra de sangue do marido em tubo com heparina, em um volume de 20 ml. E da mulher foi coletada uma amostra de sangue em tubo seco, em um volume de 10 ml. Para realização da ILP, foi coletada uma amostra de sangue do marido em tubo com heparina, em um volume que variou de 72 ml a 80 ml. As amostras foram identificadas e encaminhadas para o Laboratório Allovita, onde todos os processos laboratoriais descritos a seguir foram realizados.

Após o FCXM pré-tratamento negativo, as mulheres fizeram a ILP seguindo o Protocolo do laboratório Allovita (Anexo 2). Para fins deste estudo, foram consideradas tratadas as mulheres que receberam de 1 a 3 doses de ILP entre o FCXM pré e pós.

Os dados clínicos e laboratoriais incluídos no estudo foram obtidos diretamente nos prontuários médicos a partir de busca ativa. A pesquisa não incluiu o acompanhamento clínico e critérios de descontinuação dos casais.

3.3. Técnicas, exames e testes

3.3.1. Prova Cruzada por Citometria de Fluxo

Após a coleta dos materiais, o tubo seco contendo o sangue da mulher foi centrifugado por 5 minutos, a 2200 RPM, em temperatura ambiente para obtenção do soro. O tubo contendo o sangue do marido foi diluído com soro fisiológico (Laboratório Sanobiol; Minas Gerais, Brasil) em tubo cônico tipo

Falcon 50 ml (Greiner Bio-One; Carolina do Norte, EUA) para uma proporção de 1:1. Em seguida o sangue diluído foi transferido para um tubo cônico tipo *Falcon* 50 ml (Greiner Bio-One; Carolina do Norte, EUA) contendo gradiente *Ficoll-Hipaque* de densidade (GE Healthcare; Uppsala, Suécia) na proporção de duas partes de sangue diluído para uma de gradiente e centrifugado por 20 minutos a 1800 RPM a temperatura ambiente.

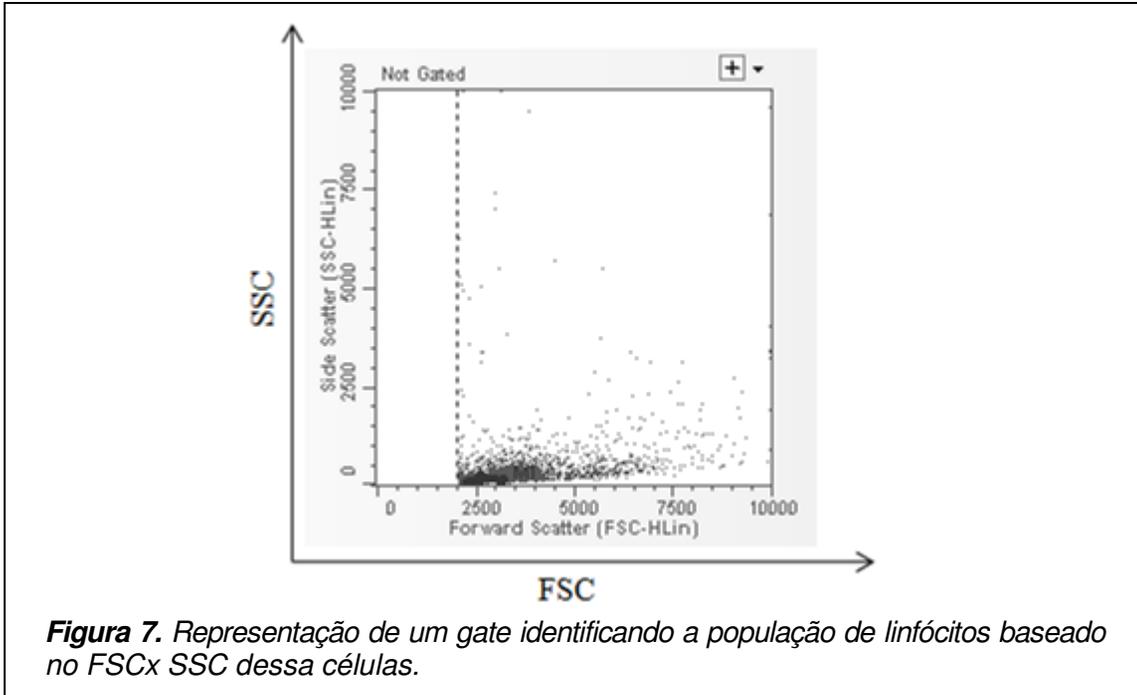
Finalizada a centrifugação, a “nuvem” de leucócitos formada entre o plasma e o gradiente de densidade foi aspirada cuidadosamente com o auxílio de pipeta Pasteur não estéril (Labcenter; São Paulo, Brasil) e transferida para um tubo cônico tipo *Falcon* de 15 ml (Greiner Bio-One; Carolina do Norte, EUA) e adicionou-se soro fisiológico até 15 ml e homogeneizado. Essa solução de células mais soro fisiológico foi centrifugada por 10 minutos a 1500 RPM a temperatura ambiente.

Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi resuspendido em 10 ml de soro fisiológico, homogeneizado e uma alíquota de 200 µl foi retirada para contagem e viabilidade celular. O tubo foi centrifugado por 10 minutos a 1200 RPM em temperatura ambiente. A contagem e viabilidade celular foram realizadas em câmara de Neubauer, pelo teste de exclusão com o corante Azul-Tripan (Merk Millipore; Darmstadt, Alemanha) em microscópio (Nikon Instruments Inc; Nova York, EUA). A concentração celular foi ajustada para $2,0 \times 10^6$ cel/ml e o *pellet* resuspendido em Meio *Hanks* (Sigma-Aldrich; Missouri, EUA).

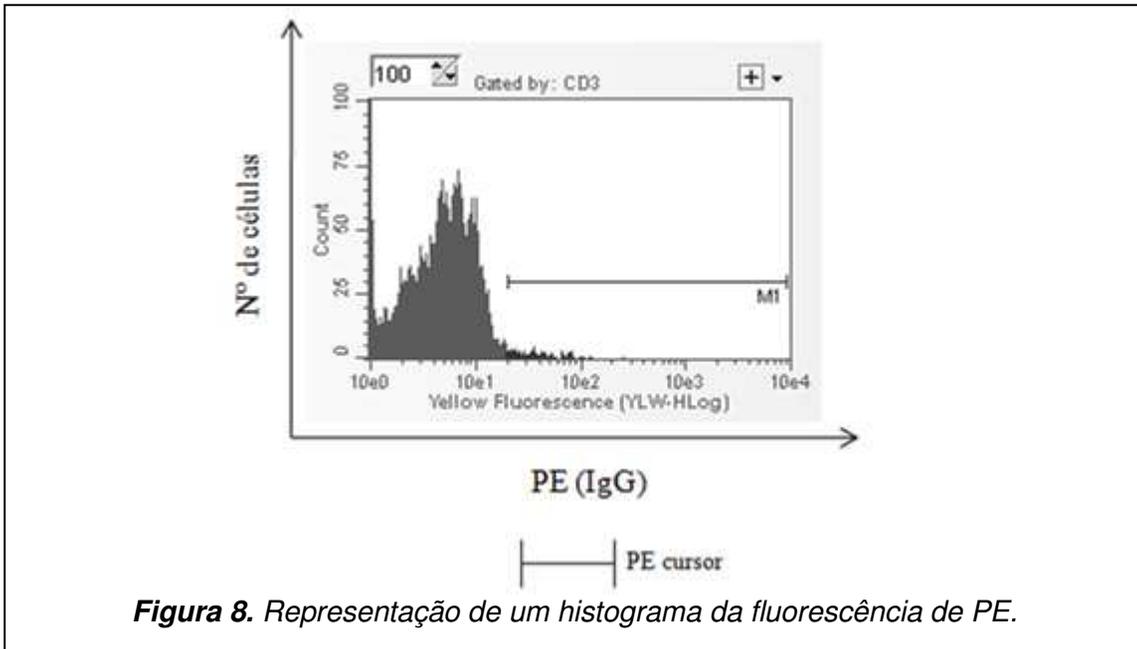
O soro da mulher sem diluição foi incubado junto com as células do marido em tubo tipo *ependorf* (Labcenter; São Paulo, Brasil) por 30 minutos em temperatura ambiente. Após essa incubação, as células foram lavadas duas vezes em tampão PBS (Laborclin; Paraná, Brasil), por 5 minutos, a 5000 RPM em temperatura ambiente. Após a última centrifugação as células foram marcadas com 1,0 µl de *Goat F(ab')₂ Anti-Human IgG PE* (Invitrogen; Califórnia, EUA) e 2,0 µl de *Mouse Anti-Human CD3 e CD19 FITC* (BD Biosciences; EUA) e incubadas no escuro por 20 minutos em geladeira. Uma última lavagem foi realizada após a marcação e o *pellet* celular ressuspendido em 200µl de PBS (Laborclin; Paraná, Brasil).

A leitura do FCXM foi realizada em citômetro de fluxo duas cores (Guava Technologies Inc; Califórnia, EUA) utilizando o *software CytoSoft 4.2* como instrumento de análise. O controle positivo foi preparado através de um *pool* de soro de mulheres com painel de reatividade de anticorpos. E para controle negativo foi utilizado Soro Humano Normal (SHN) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA) de origem masculina, grupo sanguíneo AB e sem citotoxicidade.

Os resultados de FCXM foram adquiridos por citometria de fluxo, os dados foram coletados com amplificação logarítmica, a MIF foi apresentada na escala linear de 1024 canais. Um *gate* foi desenhado manualmente ao redor da população de linfócitos baseando-se no FSC e no SSC dessas células (Figura 7).



A partir do *gate* de linfócitos, a fluorescência PE (fluorescência da IgG) foi representada graficamente em um histograma parâmetro único (número de células x PE), com escala linear de 1024 canais e amplificação logarítmica. Um cursor foi desenhado para no eixo x (FITC) do histograma para determinar a MIF de FITC (Figura 8).



Utilizando também o *gate* de linfócitos, a fluorescência das células CD3 ou CD19 (FITC) foi representada em um histograma de parâmetro único (número de células x FITC), com escala linear de 1024 canais e amplificação logarítmica. Um cursor foi desenhado para no eixo x (FITC) do histograma para determinar a MIF de FITC (Figura 9).

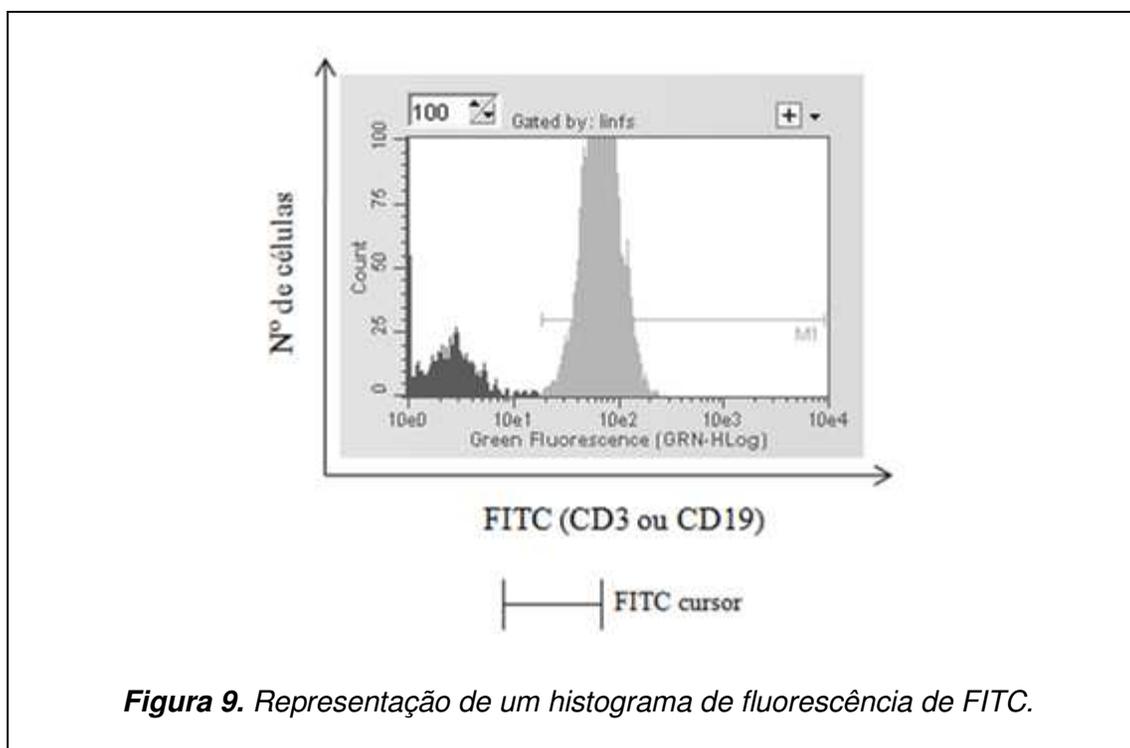
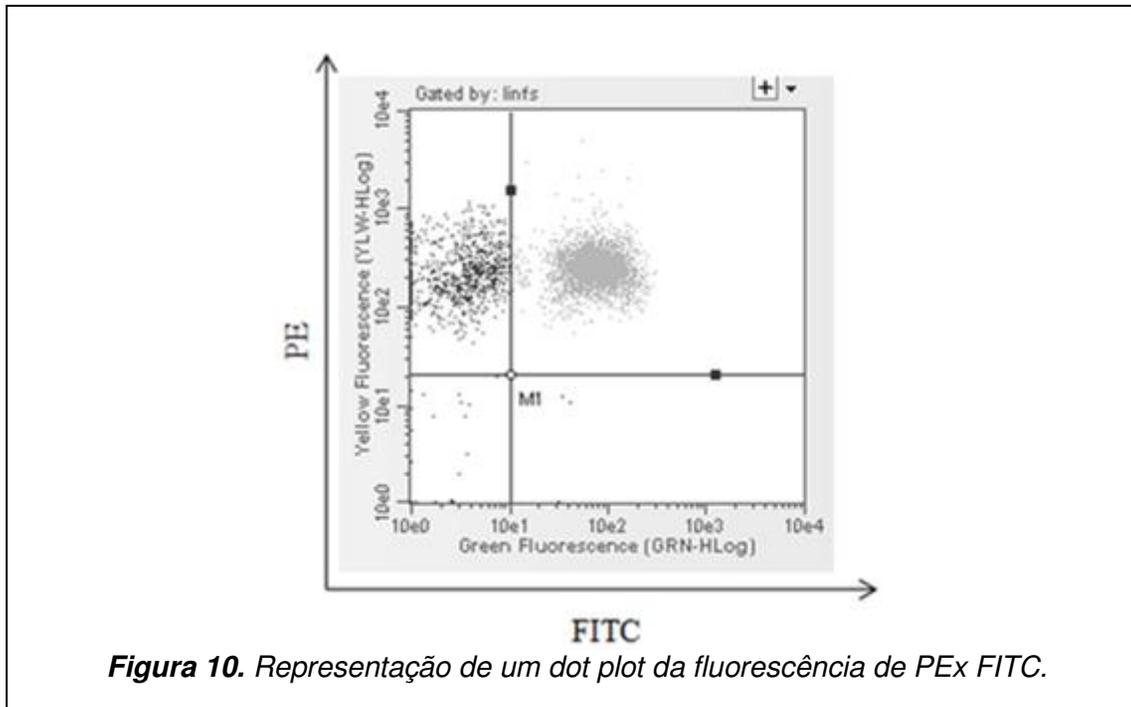


Figura 9. Representação de um histograma de fluorescência de FITC.

A fluorescência PE x FITC para linfócitos CD3 ou CD19, foi representada através de um *dot plot*, com escala linear de 1024 canais e amplificação logarítmica. O eixo x representando FITC e o eixo y representando PE (Figura 10).



Os resultados de CD3 e CD19 que obtiveram a MIF abaixo de 40 de reatividade foram considerados negativos, e os que obtiveram a MIF acima de 100 foram considerados positivos, segundo manual da Sociedade Americana de Histocompatibilidade e Imunogenética (43).

3.3.2. Imunização com leucócitos paternos

Após a coleta do material, o sangue do marido foi diluído com soro fisiológico (Laboratório Sanobiol; Minas Gerais, Brasil) em tubo cônico tipo *Falcon* 50 ml (Greiner Bio-One, Carolina do Norte; EUA) para uma proporção de 1:1, dentro de fluxo laminar (Veco; São Paulo, Brasil). Em seguida o sangue diluído foi transferido para tubos cônicos tipo *Falcon* 50 ml (Greiner Bio-One; Carolina do Norte, EUA) contendo gradiente *Ficoll-Hipaque* de densidade (GE Healthcare;

Uppsala, Suécia na proporção de duas partes de sangue diluído para uma de gradiente e centrifugado por 20 minutos a 1800 RPM a temperatura ambiente.

Finalizada a centrifugação, a “nuvem” de leucócitos formada entre o plasma e o gradiente de densidade foi aspirada cuidadosamente por pipeta Pasteur estéril (Labcenter; São Paulo, Brasil) e transferida para um tubo cônico tipo *Falcon* de 50 ml (Greiner Bio-One; Carolina do Norte, EUA) e adicionou-se soro fisiológico até o volume de 45 ml e homogeneizado. Essa solução de células mais soro fisiológico foi centrifugada por 10 minutos a 1500 RPM em temperatura ambiente. Após essa etapa o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuspendido em 20 ml de soro fisiológico, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 1200 RPM a temperatura ambiente.

As células foram ressuspendidas em 1 ml de solução fisiológica estéril, a suspensão celular foi aspirada por seringa descartável (BD; Paraná, Brasil) de 1 ml. Uma alíquota foi retirada para contagem celular realizada no citômetro de fluxo duas cores (Guava Technologies Inc; Califórnia, EUA). O número total de células variou entre 80-300 milhões. A suspensão de 1 ml foi administrada por via intradérmica no antebraço esquerdo da mulher. Os resultados da imunização foram verificados por Prova Cruzada após 30 a 40 dias da última dose.

3.4. Análise estatística, classificação e interpretação dos resultados

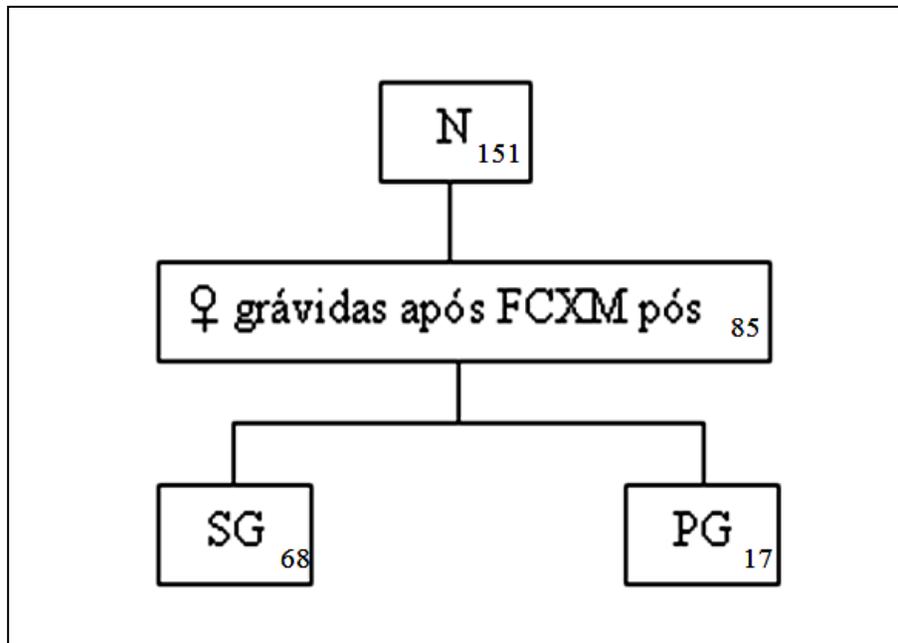
A análise de estatística foi determinada pelo programa (PASW Statistics 18), considerando-se um intervalo de confiança de 95% e valor $p < 0,05$ foi

aceito como significância estatística. Um banco de dados foi criado, no qual as mulheres foram classificadas como grupo SG ou PG. Dados como idade, número de AER prévios, número de ILP, concentração celular da ILP, doses de ILP na gestação, idade gestacional no parto ou aborto, foram utilizados para análise descritiva da amostra (Anexos 3 e 4).

A razão entre a MIF FCXM pós/ FCXM pré foi calculada e os valores da razão de linfócitos CD3 e CD19 foram comparados pelo Teste Mann-Whitney. Para a análise de correlação entre as variáveis: idade da mulher, número de AER prévio, Razão CD3, Razão CD19, ILP entre FCXM pré e pós, ILP na gestação, idade gestacional no parto ou aborto, foi realizada análise de medida não paramétrica utilizando o Teste de Correlação de Spearman's, designado por "rho" e representado pela letra grega "ρ". Quanto mais próximo de 1 for o coeficiente de correlação mais forte será a correlação entre os dados estudados.

Para fins de controle de qualidade, todos os casos selecionados a partir dos critérios de inclusão foram revistos /avaliados por pelo menos dois pesquisadores envolvidos na pesquisa antes de serem aplicados os critérios de exclusão. Todos os dados dos casos selecionados foram reavaliados por pelo menos dois pesquisadores envolvidos na pesquisa antes de serem digitados no programa de análise dos resultados. No programa de análise de resultados PASW Statistics 18, os dados digitados em cada célula foram revistos por pelo menos dois pesquisadores envolvidos na pesquisa.

O estudo teve o seguinte fluxograma como base:



3.5. Aspectos Éticos

Os dados clínicos e laboratoriais incluídos no estudo foram obtidos diretamente nos prontuários médicos, não havendo contato direto com os sujeitos, portanto não havendo necessidade do termo de consentimento livre esclarecido (TCLE), conforme consulta prévia ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) FCM-Unicamp. Uma ficha clínica, contendo idade, número de abortos prévios, número de gestações, resultado de FCMX pré e pós, número de ILP, concentração celular da ILP e resultado gestacional foi especialmente desenhada para este estudo (ANEXO 1). As fichas clínicas foram arquivadas em fichário próprio, em ordem numérica dos casos. Os dados das fichas foram

digitados de acordo com o programa específico preparado para a entrada dos dados deste estudo.

Durante todo o processo de análise dos dados, a identificação nominal das mulheres foi substituída pelo número do caso correspondente, assegurando o direito do sigilo pré-estabelecido na Declaração de Helsinki, 2000 e as normas da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde.

4. Resultados

Foram incluídas 85 mulheres que engravidaram após tratamento com ILP. Desse total, 68 mulheres foram incluídas no grupo de Sucesso Gestacional e 17 no grupo de Perda Gestacional. A média de idade das mulheres (N=85) foi de 33,5 anos (25 – 43 anos). A média do número de abortos espontâneos prévios foi de 2,6 (2 – 4).

No grupo de Sucesso Gestacional (SG), obteve-se que a média da idade foi de 33 anos (25 – 42 anos), a média do número de abortos espontâneos prévios foi de 2,6 (2 – 4) e a média do número de ILP entre FCXM pré e pós foi de 3,0 (2 – 3 doses). Em relação ao número de ILP durante a gestação a média foi de 3,5 (1 – 5). Em relação à Idade Gestacional ao parto a média foi de 36,5 semanas (24 – 40 semanas). Dessas 9 gestações (13%) foram partos com < 37 semanas (premature), as outras 59 gestações (87%) foram partos a termo. Das 9 gestações prematuras, 8 evoluíram para sobrevida pós-natal e 1 para óbito pós-natal. A média do intervalo entre a última ILP e a data da última menstruação (DUM) foi de 3 meses com mínima de (1 – 9 meses). A média do intervalo entre o FCXM pós e a DUM foi de 2,7 meses (1- 8 meses). A média da concentração celular da ILP entre FCXM pré e pós foi de 266×10^6 (72 – 408) (Tabela 1).

Analisando o grupo de Perda Gestacional (PG), obteve-se que a média da idade das mulheres foi de 35,4 anos (28 – 43 anos). A média do número de ILP entre FCXM pré e pós foi de 2,8 (2 – 3 doses). O número de abortos espontâneos prévios observados foi em média de 2,6 (2 – 4). Em relação à idade gestacional da ocorrência do novo aborto espontâneo a média foi de 7,1 semanas (5 -11 semanas). Dessas, 16 mulheres (16/17 = 94%) não realizaram cariótipo no material de aborto, e 1 mulher (6%) apresentou resultado de cariótipo com trissomia do cromossomo 8. A média do intervalo entre a última ILP e a data da concepção foi de 6,6 meses (1 – 9 meses). A média do intervalo em meses entre o FCXM pós e a DUM foi de 7,0 (6 – 8 meses). A média da concentração celular da ILP entre FCXM pré e pós foi de 155×10^6 (69 – 238).

Não houve diferença estatística significativa quanto à idade ($p = 0,073$) e número de abortos espontâneos prévios ($p = 0,765$) entre os 2 grupos em estudo. Os dados que apresentaram valor significativo ($p < 0,05$) foram o intervalo em meses entre a última dose da ILP e a DUM ($p = 0,037$) e o intervalo em meses entre o FCXM pós e a DUM ($p = 0,006$) (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação dos grupos SG e PG em relação a intervalo em meses entre a última ILP e a DUM e intervalo em meses entre o FCXM pós e a DUM

	Sucesso Gestacional n=68	Perda Gestacional n=17	p
Intervalo em meses entre a última ILP e a DUM	3,0 ± 1,9	6,6 ± 3,2	0,037
Intervalo em meses entre o FCXM pós e a DUM	2,7 ± 2,2	7,0 ± 0,8	0,006

Média ± DP

Foi observado que, para o total de mulheres do estudo (N=85), a mediana da MIF para linfócito CD3 no FCXM pré-tratamento foi de 4,3 (1,0 – 39,8). Para FCXM pós-tratamento a MIF foi de 48,7 (3,2 – 312,5). Em relação a linfócito CD19 a MIF encontrada para FCXM pré-tratamento foi de 6,0 com (1,0 – 76,8). Para FCXM pós- tratamento a MIF foi de 113,2 (2,4 – 805,4).

Analisando o grupo de SG (N=68) observou-se que a MIF para linfócitos CD3 no FCXM pré-tratamento foi de 3,8 (1,0 – 39,8). Para FCXM pós-tratamento a MIF para linfócitos CD3 foi de 50,2 (3,2 – 312,5). Observando a MIF para linfócito CD19 no FCXM pré-tratamento, a mediana foi de 6,1 (1,0 – 76,8) e no FCXM pós-tratamento a mediana foi de 122,2 (2,4 – 805,4) (Tabela 2).

Em relação ao grupo de PG (N=17) foi observado que a MIF para linfócitos CD3 no FCXM pré-tratamento foi de 5,3 com mínima de 2,5 e máxima de 16,9. No FCXM pós-tratamento a mediana foi de 42,1 com mínima de 20,3 e máxima de 248,0. Observando a MIF para linfócito CD19, obteve-se que no FCXM pré-tratamento a mediana foi de 5,0 com mínima de 2,6 e máxima de 43,8. E no FCXM pós-tratamento a mediana foi de 85,3 com mínima de 36,9 e máxima de 593,4 (Tabela 2).

A razão da MIF (MIF FCXM pós / MIF FCXM pré) para linfócitos T e B não apresentou diferença significativa comparando os dois grupos SG e PG, linfócito T apresentou $p = 0,119$ e linfócito B apresentou $p = 0,109$ (Tabela 2).

Tabela 2. Razão da MIF de CD3 e CD19 em FCXM em mulheres com AER após tratamento com ILP, entre os grupos SG e PG

	Razão CD3	valor p	Razão CD19	valor p
SG	19,76 (0,6 - 90,3)	0,119	21,56 (0,85 - 486,0)	0,109
PG	7,53 (1,5 - 40,6)		10,0 (3,2 - 118,7)	

Mediana (Min - Máx)

A partir da análise do grupo SG foi observado que a Razão da MIF de CD3 x Idade Gestacional (n=34) apresentou coeficiente de correlação fraco onde valor de ρ : 0,376 e $p = 0,029$; conseqüentemente sendo uma diferença significativa entre as duas variáveis. Houve também uma diferença significativa entre a Razão de MIF de CD3 e a Razão de MIF de CD19 (N=68), onde $p < 0,001$ e apresentando um coeficiente de correlação forte onde valor de ρ : 0,735 (Tabela 3).

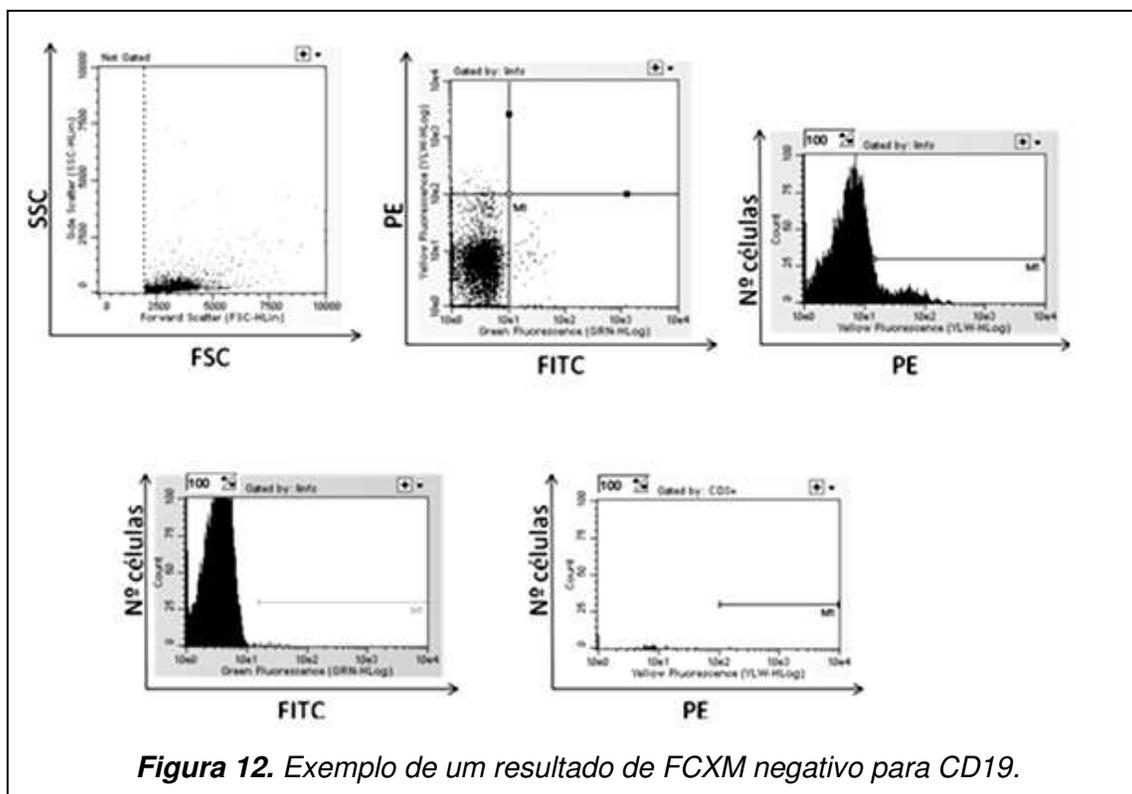
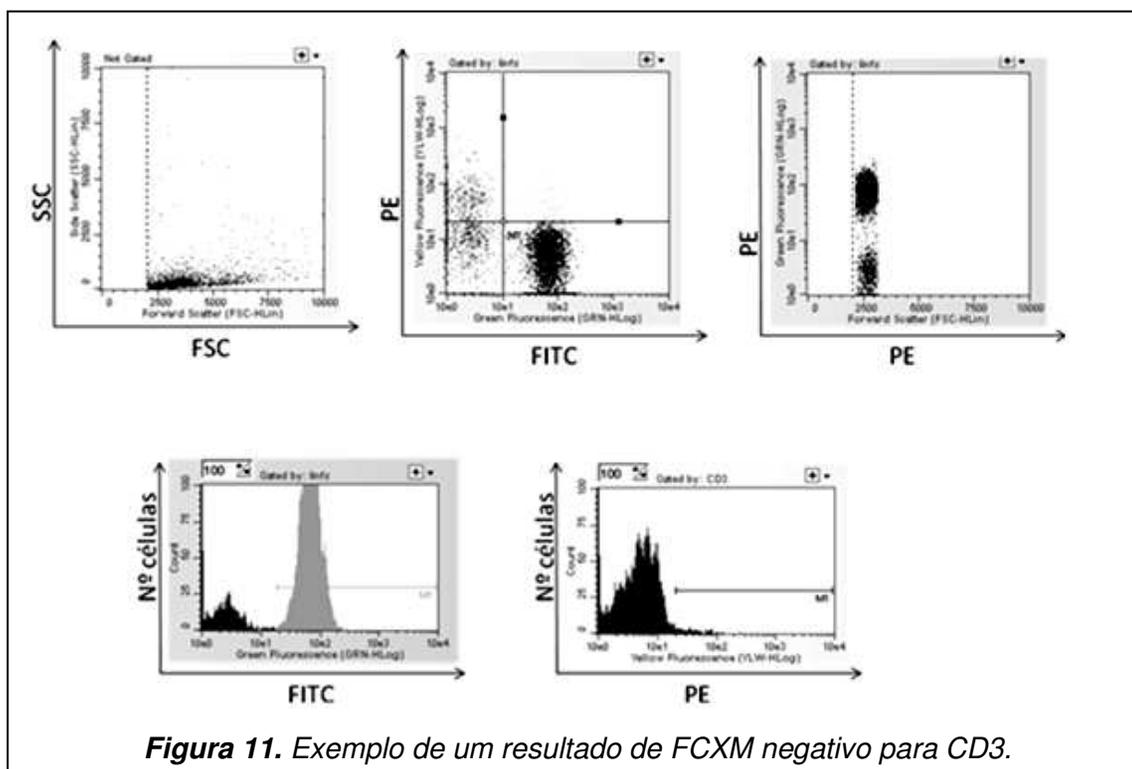
No grupo PG (N=17) também houve diferença significativa entre a relação da Razão da MIF de CD3 e Razão da MIF de CD19, onde $p = 0,019$ e coeficiente de correlação moderado onde valor de ρ : 0,561 (Tabela 3).

Tabela 3. Relação entre Razão da MIF de CD3 e Razão da MIF de CD19 entre os grupos de SG e PG

Razão MIF CD3 x CD19	SG	PG
Coeficiente de Correlação	0,735	0,561
Significância (2-tailed)	< 0,001	0,019
n	68	17

Quando foi analisado um FCXM pré-negativo de um casal em citômetro de 2 cores, não foi possível observar os linfócitos T (CD3) ou B (CD19) no quadrante superior direito (Figuras 11 e 12). Após as ILP repetiu-se o FCXM e

quando o mesmo apresentou resultado positivo foi possível detectar os linfócitos T ou B no quadrante superior direito (Figuras 13 e 14).



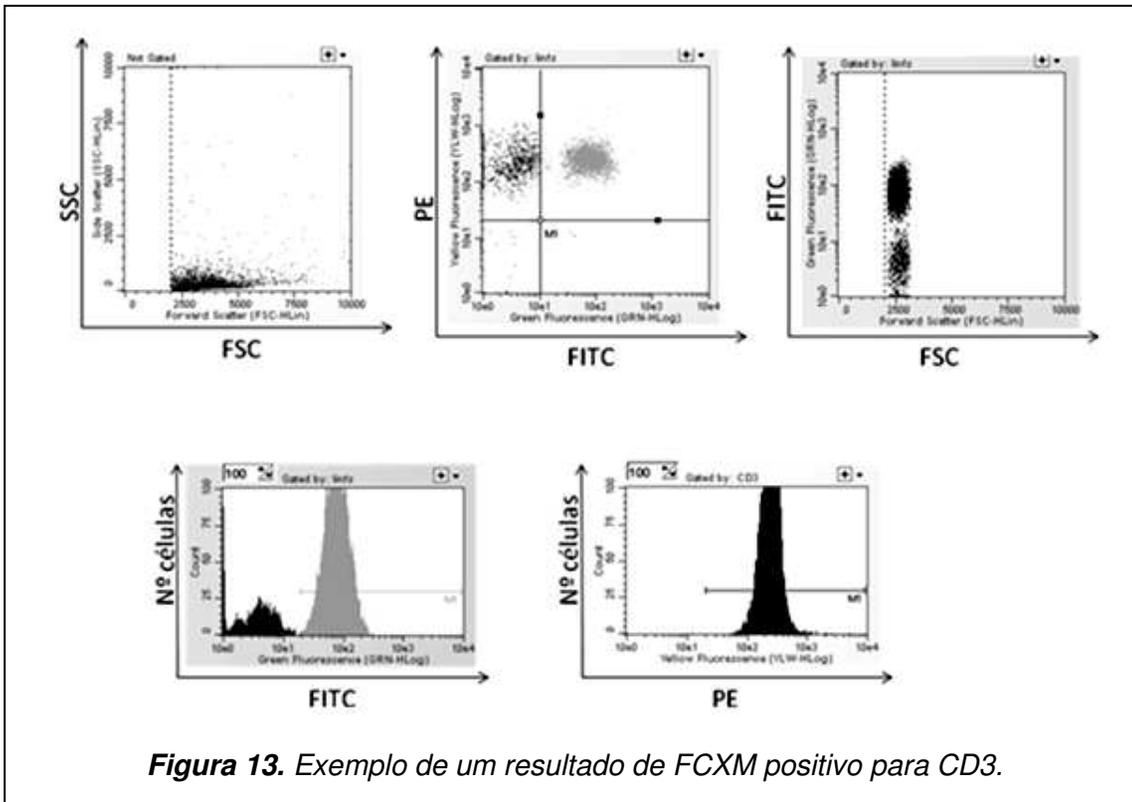


Figura 13. Exemplo de um resultado de FCXM positivo para CD3.

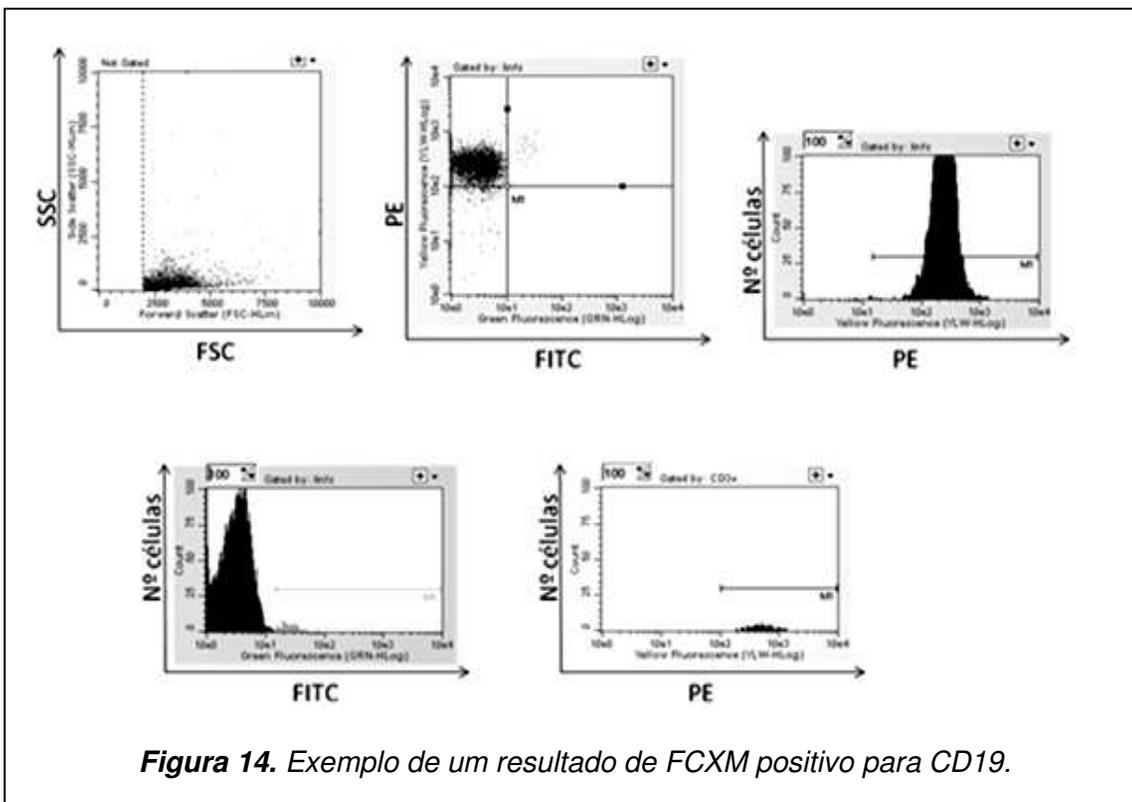


Figura 14. Exemplo de um resultado de FCXM positivo para CD19.

5. Discussão

A terapia de imunização com leucócitos paternos tem se apresentado como uma eficiente opção terapêutica para os casos de abortamento recorrente, tendo sido implantada em diferentes centros internacionais desde 1981. Considerando-se o desconhecimento do exato mecanismo determinante dos abortamentos espontâneos recorrentes, a terapia com linfócitos paternos têm sido considerada empírica. Diversos estudos demonstraram sua eficácia através da produção de anticorpos bloqueadores (APCA), anticorpos anti-idiotípicos (Ab2) e reação linfocitária de anticorpos bloqueadores (MLR-Bf) (29,30,33,37,39,40, 50,51,52). A resposta da mulher ao tratamento pode ser avaliada pela Prova Cruzada antes e após o tratamento. Se antes do tratamento ela não apresentava anticorpos contra os linfócitos do marido e passa a apresentá-los após o tratamento, esse é considerado “satisfatório”, pelo menos do ponto de vista imunológico.

Os resultados do presente estudo demonstraram que não houve associação entre a variação da razão da MIF e o resultado gestacional (prognóstico) na gestação subsequente ao tratamento. Sendo assim, essa variação (razão da MIF), não poderia ser usada como parâmetro laboratorial para avaliar o sucesso da ILP quanto ao resultado (“desfecho”) das gestações após o tratamento imunológico.

Lubinski et al. (54) utilizaram citômetro de duas cores para avaliar FCXM em mulheres com ERA, e também demonstraram que não houve relação entre títulos de FCMX e resultado gestacional. Entretanto, sua metodologia difere da deste estudo em relação à quantidade de anticorpo monoclonal utilizado e análise dos resultados. Neste estudo, os soros das mulheres foram coletados quatro semanas após a última dose de ILP. O FCXM foi realizado utilizando 10 µl de soro inativado dessas mulheres e 100 µl de linfócitos dos maridos. Para a marcação celular foi utilizado 10µl de anti IgG humana conjugada com FITC e 10 µl de anti CD3 e anti CD19 conjugado com PE. O resultado do FCXM foi representado por porcentagem, ao invés de MIF. Os FXCM que apresentaram porcentagem de CD3 ou CD19 maior que 50% foram considerados positivos. No presente estudo, foi observado que as mulheres obtiveram diferentes títulos de anticorpo para linfócito T, sendo que, uma paciente obteve título de 1:5 e outra obteve 1:160; e ambas tiveram sucesso gestacional após imunização com leucócitos paternos.

Em uma meta-análise, Lashley (59) selecionou 17 estudos e demonstrou que, apesar de grande heterogeneidade nas amostras e na seleção das mulheres, também não houve efeito significativo entre anticorpos HLA classe I e II e sucesso gestacional (59).

Com resultados diferentes dos acima discutidos, Matsubayashi et al. (49) demonstraram uma associação entre FCXM positivo pós-tratamento e sucesso gestacional. Das 86 pacientes do grupo de sucesso gestacional, 83 apresentaram FCXM pós-positivo e somente três pacientes possuíam FCXM pós-negativo (49). Nesse estudo, o soro da mulher inativado foi incubado com os linfócitos do

marido e incubados com anti IgG humana conjugada com FITC e anti CD3 conjugado com PE. O resultado do FCXM foi representado por MIF, onde a MIF da amostra foi subtraída da MIF do controle negativo (soro humano tipo AB).

Através dos resultados deste estudo, também foi observado que quanto maior a razão de linfócito T_{maior} a idade gestacional no momento do desfecho (parto). Esse dado pode indicar que quanto maior for o aumento das células TCD3, maiores as chances de se ter uma gestação a termo.

Atualmente, o método de FCXM vem sendo utilizado para auxílio do tratamento imunológico, o qual possui como critério somente liberar a paciente para nova tentativa de gravidez após resultado positivo do FCXM pós. Os resultados do presente estudo demonstram que, apesar de consideradas aptas para novas tentativas de gravidez após o tratamento ILP, a FCXM não pode ser utilizada como uma ferramenta para se predizer o desfecho dessa futura gestação. Entretanto, os resultados deste estudo não pretendem esgotar o assunto, dada a complexidade que o assunto envolve. A avaliação deste estudo não visa, tampouco, a mudar o tratamento clínico atualmente proposto para o abortamento espontâneo recorrente, não tendo sido avaliada a sua eficácia. Fica claro que novas investigações se fazem necessárias nesse assunto que parece inacabado.

6. Conclusões

Os resultados deste estudo demonstraram que não houve associação entre a variação da razão da MIF e o resultado gestacional (prognóstico) na gestação subsequente ao tratamento. Sendo assim, essa variação (razão da MIF), não poderia ser usada como parâmetro laboratorial para avaliar o sucesso da ILP quanto ao resultado (“desfecho”) das gestações após o tratamento imunológico.

7. Referências Bibliográficas

1. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher S. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med*. 2001;345(19):1400-8.
2. Veenstra van Nieuwenhoven AL, Heineman MJ, Faas MM. The immunology of successful pregnancy. *Hum Reprod Update*. 2003;9(4):347-57.
3. Medawar, PB. Some immunological and endocrinological problems raised by evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol*. 1953;7:320-8.
4. Rizzo R, Vercammen M, Van de Velde H, Horn PA, Rebmann V. The importance of HLA-G expression in embryos, trophoblast cells, and embryonic stem cells. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68:341-52.
5. Billington WD, The immunological problem of pregnancy: 50 years with the hope of progress. A tribute to Peter Medawar. *J Reprod Immunol*. 2003;60:1-11.
6. Michelon T, Silveira JG, Graudenz M, Neumann J. Imunologia da gestação. *AMRIGS*. 2006;50(2):145-51.
7. Perricone C, Carolis C, Perricone R. Pregnancy and autoimmunity: A common problem. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2012;26(1):47-60.
8. Parham P, Norman PJ, Abi-Rached L, Hilton HG, Guethlein LA. Review: Immunogenetics of human placentation. *Placenta*. 2012;26:71-80.

9. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest*. 2004;114(6):744-54.
10. Chen JZ, Sheehan PM, Brennecke SP, Keogh RJ. Vessel remodelling, pregnancy hormones and extravillous trophoblast function. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Feb 26;349(2):138-44.
11. Pandey MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet*. 2005;272(2):95-108.
12. Beer AE, Kwak JYH. Immunology of Normal Pregnancy. *Immunology and Allergy Clin North Am*. 1998;18:249-270.
13. Komlos L, Vardimon D, Notmann J, Ben-Rafael Z, Hart J, Klein T, Levinsky H, Halbrecht I. Mixed maternal lymphocyte cultures before and after immunotherapy for recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol*. 1996;35(1):30-3.
14. Barini R, Couto E, Ribeiro ST, Leiber SR, Batista SC, Silva JLP. Abortamento recorrente de causa imunológica: avaliação de um protocolo de investigação e tratamento. *RGBO*. 1998;20(2):83-89.
15. Ellis SA, Palmer MS, McMichael AJ. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. *J Immunol*. 1990;144(2):731-5.
16. Rajagopalan S, Bryceson YT, Kuppusamy SP, Geraghty DE, Van der Meer A, Joosten I et al. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol*. 2006;4(1):e9.
17. Rouas-Freiss N, Gonçalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(21):11520-5.

18. Brown D, Trowsdale J, Allen R. The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue Antigens*. 2004;64(3):215-25.
19. Pandey MK, Thakur S, Agrawal S. Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism in the maintenance of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet*. 2004;269(3):161-72.
20. Hadinedoushan H, Mirahmadian M, Aflatounian A. Increased natural killer cell cytotoxicity and Il-2 production in recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol*. 2007;58(5):409-14.
21. Alegre E, Díaz-Lagares A, Lemaoult J, López-Moratalla N, Carosella ED, González A. Maternal antigen presenting cells are a source of plasmatic HLA-G during pregnancy: longitudinal study during pregnancy. *Hum Immunol*. 2007;68(8):661-7.
22. Maejima MI, Fujii T, Kozuma S, Okay T, Shibata Y, Taketani Y. Presence of HLA-G-Expressing Cells Modulates the Ability of Peripheral Blood Mononuclear Cells to Release Cytokines. *Am J Reprod Immunol*. 1997; 38(2): 79-2.
23. Robertson SA, Clark DA. Immunology of The Reproductive Tract and Pregnancy. *The Immunologist*. 1999; 7: 38-1.
24. Mingari MC, Ponte M, Cantoni C, Moretta L. Natural Killer Cells in Pregnancy: How do They Avoid Attacking Fetal Tissues? *The Immunologist*. 1999; 7: 107-11.
25. Clark DA. Human Leukocyte Antigen-G: New Roles from Old ? *Am J Reprod Immunol*. 1999; 41: 117 – 20.
26. Kanai T, Fujii T, Unno N, Yamashita T, Hyodo H, Miki A et al. Human Leukocyte Antigen-G-expressing Cells Differently Modulate the Release of Cytokines from Mononuclear Cells Present in The Decidua versus Peripheral Blood. *Am J Reprod Immunol*. 2001; 45(2): 94-9.

27. Hunt JS, Jadhav L, Chu W, Geraghty DE, Ober C. Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183(3):682-8.
28. Saini V, Arora S, Yadav A, Bhattacharjee J. Cytokines in recurrent pregnancy loss. *Clin Chim Acta.* 2011;412(9-10):702-8.
29. Kheshtchin N, Gharagozloo M, Andalib A, Maracy MR, Rezaei A. The expression of Th1 and Th2 related chemokine receptors in women with recurrent miscarriage: the impact of lymphocyte immunotherapy. *Am J Reprod Immunol.* 2010;64(2):104-12.
30. Chaichian S, Shoae S, Saremi A, Pedar S, Firouzi F. Factors influencing success rate of leukocyte immunization and anti-paternal antibodies in spontaneous recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol.* 2007;57(3):169-76.
31. Bach JF, Herbelin A. On the Present Limitations of the Th1 / Th2 Paradigm. *The Immunologist.* 1999; 7: 12-3.
32. Piccinni MP, T-cell cytokines in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2002;47(5):289-94.
33. Beer AE, Quebbeman JF, Ayers JW, Haines RF. Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortions in human. *Am J Obstet Gynecol.* 1981;141(8):987-99.
34. Clark DA. Should paternal leukocyte immunization be used in RPL? *In* Recurrent pregnancy loss. Causes, controversies and treatment. Howard JA Carp (eds). London, UK, Informa Healthcare, 2007;179-83.
35. Dupont E, Moriaux M, Lambermont M, Englert Y. Reevaluation of immunomodulator treatment for recurrent abortion. *Rev Med Brux.* 1998;19(2):69-72.

36. Katano K, Ogasawara M, Aoyama J, Ozaki Y, Kajikura S, Aooki K. Clinical Trial of immuno-stimulation with a biological response modifier in unexplained recurrent spontaneous abortions. *J Clin Immunol*. 1997;17: 427-37.
37. Li D, Li C, Zhu Y. [Comparative study of the third party and paternal leukocyte immunization in recurrent spontaneous abortion of lowered maternal-fetal immunorecognition]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 1998; 33(10):597-00.
38. Ober C, Karrison T, Odem RR, Barnes RB, Branch DW, Stephenson MD et al. Mononuclear-cell immunization in prevention of recurrent miscarriages: a randomized trial. *Lancet*. 1999;354(9176):365-9.
39. Nonaka T, Takakuwa K, Ooki I, Akashi M, Yooko T, Kikuchi A et al. Results of immunotherapy for patients with unexplained primary recurrent abortions – prospective non-randomized cohort study. *Am J Reprod Immunol*. 2007;58(6):530-6.
40. Adachi H, Takakuwa K, Mitsui T, Ishii Keisuke, Tamura M, Tanaka K. Results of immunotherapy for patients with unexplained secondary recurrent abortions. *Clin Immunol*. 2003;106(3):175-80.
41. Rezaei A, Dabbagh A. T-helper (1) cytokines increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion. *Med Sci Monit*. 2002;8(8):CR607-10.
42. Beaman KD, Ntrivalas E, Mallery TM, Jaiswal MK, Kwak-Kim J, Gilman-Sachs A. Immune etiology of recurrent pregnancy loss and its diagnosis. *Am J Reprod Immunol*. 2012;67(4):319-25.
43. Kwak-Kim J, Park JC, Ahn HK, Kim JW, Gilman-Sachs A. Immunological modes of pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):611-23.
44. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2008;89(6):1603.

45. Salat-Baroux J. Recurrent spontaneous miscarriages. *Reprod Nutr Dev.* 1988;28(6B): 1555-68.
46. Balasch J. Antiphospholipid antibodies: a major advance in the management of recurrent abortion. *Autoimmun Rev.* 2004;(3):228-33.
47. Sollinger HW, Burlingham WJ, Sparks EM, Glass NR, Belzer FO. Donor-specific transfusions in unrelated and related HLA-mismatched donor-recipient combinations. *Transplantation.* 1984;38(6):612-5.
48. Perricone R, Di Muzio G, Perricone C, Giacomelli R, De Nardo D, Fontana L et al. High levels of peripheral blood NK cells in women suffering from recurrent spontaneous abortion are reverted from high-dose intravenous immunoglobulins. *Am J Reprod Immunol.* 2006;55(3):232-9.
49. Matsubayashi H, Maruyama T, Ozawa N, Izumi SI, Sugi T, Yoshikata K, et al. Anti-paternal antibodies by flow cytometry in the management of alloimmunization on recurrent miscarriages. *Am J Reprod Immunol.* 2000;44(5):284-8.
50. Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J, Beer AE, Beaman KD. Reproductive immunology: laboratory test for analysis of recurrent spontaneous abortion. *Clinical Immunology Newsletter.* 1995;15(2):23-26.
51. Blanck CE, Phelan DL, Adams PW, Regen LE, Kukuruga D, Noreen H et al. *Laboratory Manual.* American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. 2000;1(4):1-5.
52. Gilman-Sachs A, Luo SP, Beer AE, Beaman KD. Analysis of anti-lymphocyte antibodies by flow cytometry or microlymphocytotoxicity in women with recurrent spontaneous abortions immunized with paternal leukocytes. *J Clin Lab Immunol.* 1989;30(2):53-9.

53. Batal I, Zeevi A, Lunz JG III, Aggarwal N, Shapiro R, Randhawa P, et al. Antihuman leukocyte antigen-specific antibody strength determined by complement-dependent or solid-phase assays can predict positive donor-specific crossmatches. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(10):1534-40.
54. Lubinski J, Vrdoljak VJ, Beaman KD, Kwak JY, Beer AE, et al. Characterization of antibodies induced by paternal lymphocyte immunization in couples with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol.* 1993;24(2):81-96.
55. Saw CL, Bray RA, Gebel HM. Cytotoxicity and antibody binding by flow cytometry: a single assay to simultaneously assess two parameters. *Cytometry B Clin Cytom.* 2008;74(5):287-94.
56. Terasaki PI, McClelland JD, Park MS, McCurdy B. Microdroplet lymphocyte cytotoxicity test. *Manual of tissue typing techniques.* DHEW Publications (NIH) 74-545 U.S. Government Printing Office, Washington D.C., p.54.
57. Silva TL, Reis A, Hewitt C, Roseiro JC. Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia.* 2008;2:32-0.
58. Al-Hussein K, Al-Mukhalafi Z, Bertilsson PA, Jaroudi K, Shoukri M, Hollander J. Value of flow cytometric assay for the detection of antisperm antibodies in women with a history of recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol.* 2002;47(1):31-7.
59. Lashley EE, Meuleman T, Claas FH. Beneficial or harmful effect of antipaternal human leukocyte antibodies on pregnancy outcome? A systematic review and meta-analysis. *Am J Reprod Immunol.* 2013 Aug;70(2):87-103.

Complicações gestacionais: () Gemelar
 () Parto prematuro
 () Restrição de crescimento intra-uterino
 () Trombocitopenia neonatal
 () Malformações congênitas
 () Outras (citar): _____

Outras gestações (resultados de demais gestações após ILP): _____

NOME: _____

NÚMERO DE REGISTRO NA CLÍNICA: _____

DN: ____/____/____

ENDEREÇO: _____

TELEFONES: ____ - ____ ____ - ____

8.2. Anexo 2 – Protocolo Allovita



INFORMAÇÕES SOBRE A IMUNOTERAPIA COM LINFOCITOS

Este procedimento apenas deverá ser realizado quando solicitado e acompanhado por um médico. É obrigatório que a paciente compareça ao laboratório com o pedido médico.

1.- SOROLOGIA

Antes de iniciar o tratamento imunológico é **imprescindível** que:

- ✓ O casal faça a tipagem sanguínea. Em casos de mulheres Rh negativo com esposo Rh positivo pode ocorrer sensibilização anti-D. Neste caso é necessário o uso de imunoglobulina anti-D após as imunizações.
- ✓ O doador (o marido) faça rastreamento para doenças infecto-contagiosas transmissíveis por transfusão de hemoderivados: **HIV 1 e 2, Sífilis, HBsAg, Anti-HBc (total ou IgG e IgM), Anti-HCV, HTLV I e II, Doença de Chagas**. A apresentação dos resultados de todos os exames de sorologia, além de obrigatória perante as autoridades sanitárias, é uma garantia de qualidade para a própria paciente que recebe a imunização.

O agendamento da imunização somente será feito, após o envio dos resultados dos exames sorológicos do marido ou doador e a tipagem sanguínea do casal.

Estes resultados de exame podem ser enviados via Fax (19 33951005) ou e-mail (laboratorio@allovita.com.br). Após o recebimento, o laboratório irá conferir e autorizar, ou não, o agendamento da vacina.

Obs.1: A data da coleta dos exames sorológicos não deve ser superior a 01 mês da data programada para a primeira imunização, ou seja, a **sorologia precisa ser recente**.

Durante o tratamento imunológico, os exames sorológicos devem ser repetidos anualmente. A paciente será comunicada com antecedência de três meses.

2.- AMOSTRAS DE SANGUE PARA O PREPARO DA IMUNIZAÇÃO

2.1 - Coleta de Sangue

- **Marido:** 70 a 80 ml de sangue periférico em tubo com heparina sódica (20UI/ml) (a vácuo, tipo “Vacutainer”, 8 tubos de tampa verde);

Obs.1 - Não ingerir alimentos gordurosos (ex: leite e derivados, carnes, etc.) durante as últimas 12 horas que antecedem a coleta.

Obs.2 - As coletas são feitas assepticamente por punção venosa, através de coleta a vácuo.

2.2 - Critérios para Rejeição das Amostras de Sangue

- Amostras congeladas;
- Amostras coaguladas;
- Mais de 18 horas após a coleta;
- Amostras lipêmicas.

Obs.1 - O efeito imunoprotetor da terapia é dose dependente, sendo observados melhores resultados quando a concentração de linfócitos por imunização é de $100 - 200 \times 10^6$ células/ml. Concentrações abaixo de 80×10^6 ou acima de 500×10^6 desencadeiam baixo efeito protetor. Quanto maior o intervalo coleta-aplicação, maior o risco de contaminação da amostra e menor a concentração de CD200 (proteína na superfície do linfócito que tem participação no mecanismo imunomodulador do tratamento).

3. – IMUNIZAÇÃO

3.1 – Aplicação

Para alívio do desconforto no local da injeção das imunizações, é recomendado aplicar uma espessa camada de Emla (pomada anestésica) 3 horas antes do programado para o procedimento, mantendo a área protegida (esparadrapo micropore ou protetor que acompanha a apresentação da pomada).

Local da aplicação: face interna do antebraço esquerdo, quatro centímetros abaixo da prega do cotovelo. A assepsia do local é ampla e rigorosa.

Via de administração: intradérmica. As injeções são efetuadas em três pontos de 0,5 cm de diâmetros cada.

Obs. 1 - É recomendado não “coçar” o local da aplicação.

3.2 – Efeitos colaterais

- Reações no local da aplicação: hiperemia, prurido, edema, ardência e bolhas, são as mais freqüentes com uma duração média de 15 dias.
- Reações sistêmicas são raras, sendo os sintomas inespecíficos: elevação da temperatura, fadiga, cefaléia e náuseas.
- Sensibilização anti-D em casos de mulheres Rh negativo com esposo Rh positivo. É necessário o uso de imunoglobulina anti-D após as imunizações.

Obs.1 - É necessário que o casal faça a tipagem sanguínea antes de iniciar o tratamento.

4.- PROTOCOLO ALLOVITA

- Administrar 3 doses de imunizações com intervalos de 3 semanas.
- Repetir o crossmatch 3 a 4 semanas após a última dose.

Obs.1 - O critério usado para que o casal seja liberado para engravidar é o crossmatch positivo.

Obs.2 - É necessário manter os níveis de anticorpos bloqueadores elevados, portanto:

- Pacientes com teste pós-imunização positivo devem realizar imunizações de reforço a cada três meses, enquanto tentam engravidar.
- No período gestacional é recomendada a imunização mensal durante a primeira metade da gravidez (até a 16ª semana de gestação). Fundamental para manutenção da gravidez.

Nosso laboratório está comprometido com Normas Nacionais e Internacionais de Biosegurança. Todos os procedimentos são propostos e avaliados por nosso

Plano de Gestão da Qualidade Laboratorial.

8.3. Anexo 3 – Resumo das características clínicas e laboratoriais das 85 mulheres incluídas no estudo

Nº Cas o	PC Pré		1ª IMM		2ª IMM		3ª IMM		PC Pós	
	MIF CD3	MIF CD19	Data	[]	Data	[]	Data	[]	MIF CD3	MIF CD19
1	3,5	5,2	15/02/2012	143	29/02/2012	?	14/03/2012	83	47,4	120,9
2	7,2	1,0	23/03/2012	325	09/04/2012	315	27/04/2012	272	312,5	486,0
3	1,6	28,1	08/03/2012	338	24/03/2012	?	14/04/2012	?	138,4	452,2
4	5,1	21,5	05/03/2012	?	19/03/2012	153	02/04/2012	182	113,3	333,4
5	4,3	11,8	20/03/2012	115	05/04/2012	?	23/04/2012	183	21,0	153,4
6	2,4	14,8	21/05/2012	154	04/06/2012	206	23/06/2012	116	61,1	370,1
7	17,7	76,8	11/04/2012	?	25/04/2012	171	16/05/2012	151	69,4	87,9
8	39,8	45,2	12/07/2012	156	27/07/2012	116	-	-	26,0	38,5
9	5,2	24,8	17/05/2012	83	31/05/2012	160	14/06/2012	144	136,6	184,6
10	2,5	3,7	15/06/2012	198	05/07/2012	130	19/07/2012	66	95,0	220,9
11	4,0	9,1	01/06/2012	161	15/06/2012	119	02/07/2012	213	26,4	81,3
12	2,3	6,2	15/06/2012	244	29/06/2012	72	13/07/2012	111	68,7	187,6
13	1,7	2,9	16/11/2012	?	05/12/2012	202	20/12/2012	153	32,7	73,6
14	2,7	6,0	10/07/2012	97	28/07/2012	117	18/08/2012	88	64,4	129,0
15	1,0	4,3	03/08/2012	126	16/08/2012	168	05/09/2012	80	84,4	201,0
16	2,6	4,4	17/07/2012	90	03/08/2012	128	13/08/2012	120	44,9	118,5
17	2,7	8,1	11/07/2012	70	25/07/2012	153	15/08/2012	141	16,1	55,6
18	3,0	7,6	29/08/2012	71	14/09/2012	?	29/09/2012	158	129,0	271,5
19	1,8	14,5	21/09/2012	?	09/10/2012	207	29/10/2012	134	77,4	264,5
20	2,4	14,9	26/09/2012	133	10/10/2012	210	31/10/2012	170	49,0	129,6
21	1,0	4,1	24/08/2012	99	15/09/2012	?	29/09/2012	111	42,7	99,8
22	2,1	9,0	16/11/2012	?	03/12/2012	313	17/12/2012	111	70,6	95,3
23	2,4	5,6	06/10/2012	?	20/10/2012	123	10/11/2012	?	48,7	73,6
24	1,3	6,3	21/12/2012	193	07/01/2013	150	21/01/2013	167	52,1	113,2
25	2,9	7,5	05/11/2012	254	22/11/2012	126	10/12/2012	211	32,1	82,6
26	6,7	4,0	16/11/2012	?	03/12/2012	135	21/12/2012	280	51,5	132,8
27	3,8	17,2	27/12/2012	?	19/01/2013	?	16/02/2013	139	35,5	127,8
28	1,9	5,3	23/10/2012	209	17/11/2012	81	01/12/2012	?	171,7	421,7
29	3,3	7,2	07/12/2012	25	22/12/2012	77	05/01/2013	111	29,6	86,5
30	4,0	23,4	01/02/2013	321	22/02/2013	356	15/03/2013	285	241,6	805,4
31	2,9	4,7	25/02/2013	61	11/03/2013	106	25/03/2013	80	209,9	471,2
32	3,4	6,4	21/01/2013	181	06/02/2013	126	23/02/2013	233	10,2	33,4
33	1,9	1,0	04/02/2013	163	22/02/2013	142	11/03/2013	365	117,6	413,1
34	3,3	8,5	07/03/2013	172	22/03/2013	126	08/04/2013	?	36,6	360,0
35	1,8	2,3	08/04/2013	?	22/04/2013	?	06/05/2013	?	114,7	412,3
36	2,2	33,4	30/04/2013	105	15/05/2013	87	03/06/2013	135	146,3	592,0
37	3,8	9,7	24/05/2013	77	08/06/2013	197	28/06/2013	?	242,9	446,9
38	4,4	12,7	02/02/2011	52	23/02/2011	?	16/03/2011	?	40,6	55,0
39	6,6	5,6	23/02/2011	?	16/03/2011	?	06/04/2011	28	34,3	69,8
40	8,5	8,2	04/03/2011	101	17/03/2011	?	02/04/2011	150	13,0	13,4
41	5,3	6,2	08/10/2011	139	29/10/2011	118	12/11/2011	185	267,2	447,2
42	4,6	4,9	14/07/2011	?	09/08/2011	?	09/09/2011	150	47,2	67,8
43	6,2	3,6	02/05/2011	169	16/05/2011	271	30/05/2011	108	18	53,3

44	4,7	1,6	11/05/2011	181	25/08/2011	?	08/06/2011	181	22,1	56,2
45	6,3	3,2	29/07/2011	?	20/08/2011	?	10/09/2011	?	31,5	76,0
46	4,7	3,7	15/06/2011	?	30/06/2011	109	20/07/2011	57	55,9	123,5
47	4,8	3,3	07/06/2011	176	22/06/2011	?	09/07/2011	122	17,8	20,8
48	5,2	3,7	04/05/2011	80	18/05/2011	136	01/06/2011	161	39,0	69,7
49	4,5	1,7	03/05/2011	390	08/08/2011	97	-	-	19,3	22,4
50	4,4	7,4	14/06/2011	?	05/07/2011	88	20/07/2011	106	95,6	179,1
51	4,2	2,3	24/05/2011	63	01/06/2011	155	08/06/2011	181	27,4	21,2
52	5,5	5,7	06/06/2011	81	20/06/2011	?	04/07/2011	208	28,7	95,8
53	4,5	2,4	13/08/2011	124	27/08/2011	144	08/09/2011	?	28,1	51,9
54	8,4	27,2	23/07/2011	?	06/08/2011	181	22/08/2011	183	27,3	44,7
55	5,1	3,7	09/09/2011	106	29/09/2011	112	14/10/2011	90	109,2	152,3
56	9,9	8,6	26/08/2011	110	09/09/2011	162	23/09/2011	335	38,6	54,3
57	4,3	6,9	15/10/2011	90	29/10/2011	259	12/11/2011	212	123,2	425,9
58	11,2	8,0	30/11/2011	210	13/12/2011	105	27/12/2011	78	47,3	91,9
59	2,4	2,4	09/12/2011	?	30/12/2011	?	20/01/2012	319	166,7	388,7
60	2,2	2,8	03/12/2011	193	17/12/2011	320	29/12/2011	?	113,8	196,1
61	5,3	20,9	18/02/2012	?	03/03/2012	?	24/03/2012	?	244,3	504,8
62	5,2	12,8	28/01/2012	?	18/02/2012	?	10/03/2012	?	190,9	585,2
63	6,7	17,7	09/02/2012	137	23/02/2012	145	09/03/2012	?	282,4	436,7
64	2,7	2,4	27/05/2009	408	24/06/2009	169	-	-	188,5	355,3
65	3,2	1,1	27/01/2009	81	26/02/2009	260	-	-	39	72,7
66	2,3	1,9	27/11/2008	116	22/12/2008	88	-	-	52,6	73,6
67	3,2	2,4	28/02/2009	103	04/04/2009	173	-	-	3,2	2,4
68	3,7	4,7	03/02/2009	62	03/03/2009	187	-	-	5,6	14,7
69	3,9	18,2	14/07/2012	121	28/07/2012	77	11/08/2012	53	61,6	182,5
70	7,4	43,8	18/04/2012	?	03/05/2012	56	16/05/2012	201	107,0	204,1
71	4,1	3,5	24/08/2012	75	15/09/2012	?	29/09/2012	156	131,9	283,4
72	2,5	8,2	08/06/2012	?	29/06/2012	52	13/07/2012	186	33,1	90,8
73	2,8	13,7	19/10/2012	54	10/11/2012	?	24/11/2012	121	79,1	108,6
74	4,7	3,2	12/03/2011	119	02/04/2011	127	20/04/2011	110	30,6	52,5
75	5,8	4,2	02/02/2011	52	23/02/2011	?	16/03/2011	?	42,1	67,5
76	6,5	13,4	18/02/2011	?	05/03/2011	?	23/03/2011	?	34,9	85,3
77	4,7	3,2	12/07/2011	63	02/08/2011	77	23/08/2011	117	20,3	45,3
78	5,3	4,3	08/06/2011	238	29/06/2011	143	20/07/2011	142	28,9	38,6
79	5,7	2,6	14/07/2011	?	05/08/2011	69	26/08/2011	50	118,2	187,1
80	5,3	4,8	03/09/2011	87	17/09/2011	196	01/10/2011	167	39,9	47,3
81	6,1	5,0	11/10/2011	?	27/10/2011	?	10/11/2011	?	248,0	593,4
82	4,7	6,1	12/08/2011	?	02/09/2011	162	23/09/2011	117	28,25	36,9
83	6,7	3,1	15/03/2012	?	10/04/2012	?	02/05/2012	111	66,9	118,8
84	9,9	14	04/03/2010	?	05/04/2010	187	-	-	43,7	80,0
85	16,9	13,2	27/01/2009	97	27/02/2009	81	-	-	26,1	43,1

PC Pré = Prova Cruzada Pré

MIF CD3 = Mediana da Intensidade de Fluorescência CD3

MIF CD19 = Mediana da Intensidade de Fluorescência CD19

1ª ILP = 1ª dose da Imunização com linfócitos paternos

2ª ILP = 2ª dose da Imunização com linfócitos paternos

3ª ILP = 3ª dose da Imunização com linfócitos paternos

[] = Concentração celular da Imunização com linfócitos paternos

PC Pós = Prova Cruzada Pós

8.4. Anexo 4 – Resumo das características gestacionais e laboratoriais das 85 mulheres incluídas no estudo

o	Idade	AER	DUM	Doses	IG AER	IG Parto	Complicações
1	37	3	20/05/2012	4	0	39	1
2	25	2	22/05/2012	4	0	38,7	1
3	32	3	30/07/2012	4	0	0	1
4	32	2	01/07/2012	4	0	38	1
5	34	2	07/05/2012	5	0	34	PREMATURO
6	33	2	14/07/2012	4	0	40	1
7	38	4	?	3	0	0	1
8	32	2	29/09/2012	2	0	30	PREMATURO
9	34	3	06/10/2012	4	0	37	1
10	34	2	?	4	0	0	1
11	32	2	21/11/2012	4	0	38	1
12	38	3	02/08/2012	4	0	0	1
13	33	2	?	3	0	0	1
14	40	2	?	4	0	0	1
15	35	3	25/12/2012	3	0	0	1
16	27	2	28/10/2012	4	0	38	1
17	32	2	?	1	0	0	1
18	32	2	?	4	0	0	1
19	39	2	20/11/2012	4	0	37	1
20	28	4	18/02/2013	4	0	0	1
21	35	2	23/03/2013	4	0	0	1
22	27	2	?	3	0	0	1
23	32	2	?	4	0	0	1
24	30	3	23/05/2013	3	0	0	1
25	29	3	25/02/2013	4	0	0	1
26	30	3	20/02/2013	4	0	0	1
27	35	3	29/04/2013	4	0	0	1
28	37	3	07/04/2013	4	0	0	1
29	25	2	01/05/2013	3	0	0	1
30	31	3	22/02/2013	4	0	0	1
31	32	3	16/06/2013	2	0	0	1
32	31	3	20/03/2013	5	0	0	1
33	31	2	28/03/2013	3	0	0	1
34	38	2	14/04/2013	4	0	0	1
35	34	4	?	2	0	0	1
36	29	2	12/07/2013	2	0	0	1
37	35	2	23/07/2013	1	0	0	1
38	29	2	27/05/2011	4	0	39	1
39	34	3	30/07/2011	4	0	38	1
40	38	2	28/06/2011	4	0	38	1
41	34	3	12/12/2011	4	0	39	1
42	32	3	13/10/2011	2	0	24	PREMATURO
43	27	2	29/01/2012	4	0	0	1

44	35	3	15/01/2012	4	0	35,5	PREMATURO
45	39	2	10/05/2012	4	0	0	1
46	35	2	05/05/2012	4	0	38	1
47	42	3	31/07/2011	4	0	28	PREMATURO
48	42	4	?	3	0	32	PREMATURO
49	33	4	28/08/2010	0	0	35	PREMATURO
50	32	4	23/09/2011	4	0	38	1
51	29	2	08/08/2011	3	0	37,4	1
52	29	2	09/10/2011	3	0	35	PREMATURO
53	29	2	03/10/2011	3	0	38	1
54	40	3	24/10/2011	4	0	38	1
55	36	2	13/11/2011	3	0	39	1
56	30	3	14/10/2011	4	0	35	PREMATURO
57	34	2	15/01/2012	3	0	38	1
58	33	4	07/03/2012	3	0	37,5	1
59	32	3	18/04/2012	4	0	0	1
60	35	2	28/07/2012	4	0	0	1
61	28	3	?	4	0	0	1
62	36	3	09/06/2012	4	0	0	1
63	29	3	02/04/2012	4	0	0	1
64	34	3	10/10/2009	4	0	38	1
65	36	2	07/05/2009	4	0	38	1
66	31	3	25/01/2009	4	0	37	1
67	33	3	01/09/2009	4	0	38	1
68	33	2	?	4	0	38,5	1
69	34	2	03/06/2013	1	8	0	1
70	38	2	?	1	0	0	GENETICO TRISSOMIA DO CROMOSSOMO 8
71	41	2	04/06/2013	1	11	0	1
72	39	2	?	1	0	0	1
73	40	4	26/07/2013	1	0	0	1
74	28	3	?	1	5	0	1
75	32	3	?	1	5	0	1
76	31	2	?	1	5	0	1
77	32	2	22/04/2012	1	0	0	1
78	41	2	22/08/2011	1	5	0	1
79	30	2	?	1	0	0	1
80	33	2	?	1	8	0	1
81	37	4	13/11/2011	2	9	0	1
82	38	4	?	2	10	0	1
83	43	2	07/04/2012	1	6	0	1
84	36	3	?	2	6	0	1
85	29	3	25/03/2009	1	8	0	1

AER = Aborto espontâneo recorrente
Doses ILP = Doses de Imunização com leucócitos paternos durante a gestação
IG AER = Idade gestacional do aborto
IG Parto = Idade gestacional do parto

8.5. Anexo 5 – Parecer Consubstanciado do CEP

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

PROJETO DE PESQUISA

Título: Avaliação do índice de gravidez após imunização com linfócitos paternos em casais com aborto espontâneo de repetição

Área Temática:

Pesquisador: Michele Cintra Vicentini

Versão: 1

Instituição: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

CAAE: 04174612.7.0000.5404

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 62819

Data da Relatoria: 24/07/2012

Apresentação do Projeto:

Introdução: A gestação está totalmente envolvida com mecanismos aloimunes, sendo considerado como um aloenxerto bem sucedido: o feto alogênico, juntamente com a placenta e suas várias membranas, sobrevive por um período considerável em um hospedeiro imunocompetente sem ser rejeitado. Deficiências ou desequilíbrios nas diversas reações imunes envolvidas com o processo normal da gestação podem causar a morte precoce do feto. A imunização com linfócitos do parceiro têm se apresentado como uma eficiente opção terapêutica para os casos de abortamento recorrente e têm como objetivo suprimir a atividade das células NK, possibilitando um melhor prognóstico gestacional. Objetivo: O presente trabalho tem como objetivo avaliar o índice de gravidez e evolução da mesma após tratamento com imunização de linfócitos paternos em casais com histórico de aborto espontâneo de repetição. Pacientes/Métodos: Será realizado um estudo descritivo de corte transversal retrospectivo, no qual serão coletados os dados de 500 casais com histórico de 2 ou mais abortos espontâneos de repetição admitidos no Laboratório Allovita (localizado em Campinas/SP) para tratamento de imunização com linfócitos paternos, no período de 2007 a 2011. Serão avaliados o número de gestações (Beta hCG positivo ou visualização do embrião a ultrassonografia), partos (fetos > 500 gramas) e abortos (fetos 500 gramas) desses casais após o tratamento.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o índice de gravidez e evolução da mesma após tratamento com imunização de linfócitos paternos em casais com histórico de aborto espontâneo de repetição.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não se aplica

Benefícios: Sucesso Gestacional.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo retrospectivo descritivo, sendo os dados coletados diretamente dos prontuários médicos não havendo contato direto com os sujeitos, portanto não haverá necessidade do termo de consentimento livre esclarecido (TCLE), conforme consulta previa ao Comitê de Ética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Solicita dispensa do Termo Livre Esclarecido. Não foi apresentado orçamento, os custos serão da pesquisadora

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto apresenta-se bem redigido, com metodologia adequada. Os critérios de inclusão, exclusão e descontinuação dos sujeitos estão bem definidos; cálculo do tamanho amostral e análise estatística muito bem embasados por cálculos estatísticos. Os aspectos éticos estão bem discutidos no corpo do projeto Considero o projeto adequado a esse tipo de estudo.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme discussão em reunião do colegiado em 24/07/2012.

CAMPINAS, 30 de Julho de 2012

Assinado por:
Carlos Eduardo Steiner

8.6. Anexo 6 – Artigo

Flow cytometry crossmatch in women undergoing paternal lymphocyte immunization: correlation between fluorescence intensity and pregnancy outcome

Michele Cintra Vicentini¹, Simone Corte Batista de Souza Lima¹, Isabela Nelly Machado^{1,2}, Ricardo Barini^{1,2}

¹ *Allovita Laboratório de Imunologia da Reprodução*, Campinas, SP, Brazil

² University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

¹ michelevicentini@yahoo.com.br ; ¹ scbsl@uol.com.br;

^{1,2} bellanelly@ig.com.br ; ^{1,2} drbarini@gmail.com

Correspondence:

Ricardo Barini

Telephone: +5519-32945807

E-mail: drbarini@gmail.com

Abstract

Introduction: The success of a pregnancy depends on alloimmune mechanisms, with the allogeneic fetus being considered a successful allograft. Immunization with paternal lymphocytes has been shown to be an effective therapeutic option for cases of recurrent pregnancy loss (RPL). Currently, flow cytometry crossmatch (FCXM) is used to evaluate patients with RPL. **Objectives:** To evaluate the results of FCXM in women with a history of RPL who conceived following paternal lymphocyte immunization (PLI), and correlate them with pregnancy outcome. **Material and Methods:** Eighty-five patients were selected for the study based on the following inclusion criteria: ≥ 2 RPL, initial FCXM negative against the father, and women with primary RPL. The women were divided into two groups: 1) Successful pregnancy outcome and 2) Pregnancy loss. After an initial negative FCXM (baseline), the patients were immunized with doses of PLI and 30 days after the final PLI a second FCXM was performed. Median fluorescence intensity (MFI) was calculated at both moments and compared between the groups. **Results:** Evaluation of MFI ratio (following PLI / baseline) for T and B lymphocytes showed no statistically significant differences between the two groups ($p=0.119$ for T lymphocytes and $p=0.109$ for B lymphocytes). **Conclusion:** There was no difference between the two groups regarding median fluorescence intensity ratio (following PLI / baseline) for T and B lymphocytes. Therefore, median fluorescence intensity ratio for T and B lymphocytes cannot be used as a laboratory parameter for evaluating the success of PLI with respect to pregnancy outcome following immunotherapy.

Keywords: recurrent pregnancy loss; flow cytometry; fluorescence intensity; anti-paternal antibodies.

Introduction

Recurrent pregnancy loss occurs in approximately 1-3% of women of reproductive age. It is defined as two or more consecutive gestational losses, characterized by the vaginal elimination of a fetus weighing less than 500 grams and/or of less than 20 weeks gestational age, with or without vital signs. These events must be confirmed by a consistent clinical history, uterine curettage or anatomopathology (Komlos et al. 1996, Hadinedoushan et al. 2007, Saini et al. 2011, Kheshtchin et al. 2010). In 50% of cases, the etiology of recurrent pregnancy loss is unknown and various hypotheses have been proposed, the most common of these being: chromosomal abnormalities, uterine anomalies, endocrine disorders and prothrombotic states (Kheshtchin et al. 2010, Pandey et al. 2004). One of the proposed treatments for recurrent pregnancy loss is paternal lymphocyte immunization (PLI), which was first described in 1981 (Balasch 2004, Sollinger et al. 1984). Flow cytometry crossmatch (FCXM) has been a useful tool in the immunological treatment of recurrent pregnancy loss. It is used to investigate patients' serum for anti-lymphocyte antibodies, generally *anti-human leukocyte antigen* (HLA) *antibodies*, pre-formed against antigens present in the lymphocytes of the potential donor (in the case of PLI, the father) (Matsubayashi et al. 2000, Gilman-Sachs et al. 1995). Studies have shown that FCXM is highly sensitive for the detection of circulating antibodies and for the detection and differentiation of the various classes of immunoglobulins (IgA, IgG and IgM). Furthermore, it is important in the direct analysis of maternal antibodies against the T and B lymphocytes from the father (Matsubayashi et al. 2000, Gilman-Sachs et al. 1995, Gilman-Sachs et al. 1989, Batal et al. 2010, Saw et al. 2008, Al-Hussein et al. 2010). The present study evaluated the result of FCXM in

women with a history of recurrent pregnancy loss who conceived following paternal lymphocyte immunization, shown as a function of pregnancy outcome.

Material and Methods

Patient selection

A descriptive, cross-sectional study was conducted involving women with a history of recurrent pregnancy loss, whose crossmatch test against their partners was negative and were submitted to paternal lymphocyte immunization between January 2011 and July. In a second step, those women selected for the initial sample who went on to become pregnant following immunotherapy were then divided into two groups: those in whom pregnancy outcome was successful and those who miscarried. Women under 15 years of age and those with any malignant diseases were excluded from the study.

Flow cytometry crossmatch

Paternal lymphocytes were separated using Ficoll-Hypaque density-gradient centrifugation, adjusted for a concentration of 4×10^6 cells and incubated with 20 μ l of maternal serum at room temperature. Following incubation, the samples were washed twice in phosphate buffered saline (PBS). The cells were labeled with 1.0 μ l of R-phycoerythrin (RPE)-conjugated goat F(ab')₂ anti-human IgG (to detect maternal antibodies on the cell surface of the lymphocytes) and 2.0 μ l of FITC anti-human CD3 and CD19 (to specify the reactivity of the T and B cells). The samples were incubated in the dark under refrigeration. After washing twice, the cells were re-suspended in 200 μ l of PBS and analyzed using dual-color flow cytometry. The CytoSoft software

package, version 4.2, was used for data analysis. The positive control was prepared from a pool of serum from women with an antibody panel. Type AB normal male human serum without cytotoxicity was used as the negative control. The data were collected with logarithmic amplification, with median fluorescence intensity being presented on a 1024-channel linear scale. The CD3 and CD19 results with a fluorescence intensity <40 were considered negative, while those with fluorescence intensity >100 were considered positive, as established in the manual of the American Society of Histocompatibility and Immunogenetics (Blanck et al. 2000).

Paternal lymphocyte immunization

Paternal lymphocytes were separated using Ficoll-Hypaque density-gradient centrifugation. The cells were then washed twice in saline. After washing, the cells were re-suspended in 1 ml of saline, and this solution was administered intradermally into the woman's left forearm. Overall, 1-3 doses of paternal lymphocyte immunization were given at 15-day intervals.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the PASW Statistics software package, version 18, with a 95% confidence interval. P-values <0.05 were considered statistically significant. The ratio between the median fluorescence intensity at the FCXM following paternal lymphocyte immunization and at baseline was calculated and the ratio of CD3 and CD19 lymphocytes was compared using the Mann-Whitney test. A non-parametric analysis was conducted using Spearman's rank correlation coefficient [Spearman's rho (ρ)] for the variables: the woman's age, number of previous spontaneous pregnancy

losses, CD3 ratio, CD19 ratio, number of paternal lymphocyte immunizations between the initial and subsequent FCXM, number of paternal lymphocyte immunizations during pregnancy, and gestational age at delivery or miscarriage.

Results

The 85 women who became pregnant following paternal lymphocyte immunization were included in this study: 68 women in the successful pregnancy outcome group and 17 in the pregnancy loss group.

The mean age of the women in the successful outcome group was 33 years (range 25–42 years). The mean number of previous pregnancy losses in the women in this group was 2.6 (range 2-4). Mean gestational age at delivery was 36.5 weeks (range 24-40 weeks). Nine women (13%) delivered prior to 37 weeks of gestational age (prematurely), while the other 59 women (87%) delivered at term. Of the 9 premature infants, 8 survived and 1 died. The mean number of paternal lymphocyte immunizations between the first and second FCXM was 3.0 (range 2-3 doses). The mean number of paternal lymphocyte immunizations given during pregnancy to the women in this group was 3.5 (range 1-5). The mean interval between the final paternal lymphocyte immunization and the date of last menstruation was 3 months (range 1-9 months). The mean interval between post-treatment FCXM and the woman's last menstrual period was 2.7 months (range 1-8 months). The mean cell concentration of paternal lymphocyte immunization between the first and final FCXM was 266×10^6 (range 72–408) (Table 1).

The mean age of the women who miscarried was 35.4 years (range 28-43 years). The mean number of previous miscarriages was 2.6 (range 2-4). Mean gestational age at

the time of the present miscarriage was 7.1 weeks (range 5-11 weeks). In 16 of these women (16/17; 94%), karyotyping of the material from the miscarriage was not performed, while the remaining woman (6%) received a karyotyping result of chromosome 8 trisomy. The mean number of paternal lymphocyte immunizations between the baseline and final FCXM in this group was 2.8 (range 2-3 doses). The mean time between the final paternal lymphocyte immunization and the date of conception was 6.6 months (range 1-9 months). The mean interval between the final FCXM and the woman's last menstrual period was 7.0 months (range 6-8 months). Mean cell concentration of the paternal lymphocyte immunization between the baseline and final FCXM was 155×10^6 (range 69-238) (Table 1).

There was no statistically significant difference in age ($p=0.073$) or in the number of previous pregnancy losses ($p=0.765$) between the two study groups. The only variables for which a statistically significant difference was found between the groups were the interval in months between the final paternal lymphocyte immunization and the woman's last menstrual period ($p=0.037$) and the interval in months between the final FCXM and the woman's last menstrual period ($p=0.006$) (Table 1).

Analysis of the group of women in whom the outcome of pregnancy was successful ($n=68$) showed that the median fluorescence intensity for the CD3 lymphocytes at the baseline FCXM was 3.8 (range 1.0–39.8). At the post-treatment FCXM, median fluorescence intensity for CD3 lymphocytes was 50.2 (range 3.2–312.5). For the CD19 lymphocytes, median fluorescence intensity was 6.1 (range 1.0–76.8) at baseline FCXM and 122.2 (range 2.4–805.4) at the post-treatment FCXM (Table 2).

In the group of women who miscarried ($n=17$), median fluorescence intensity for the CD3 lymphocytes at FCXM was 5.3 (range 2.5–16.9) prior to treatment and 42.1

(range 20.3–248.0) following treatment. The median fluorescence intensity for the CD19 lymphocytes was 5.0 prior to treatment (range 2.6–43.8) and 85.3 following treatment (range 36.9–593.4) (Table 2).

There was no statistically significant difference in the median fluorescence intensity ratio (post-treatment value / pretreatment value) between the two groups for the T and B lymphocytes ($p=0.119$ for the T lymphocytes and $p=0.109$ for the B lymphocytes) (Table 2).

Analysis of the group of women in whom pregnancy outcome was successful showed a weak correlation coefficient between the median CD3 fluorescence intensity ratio and gestational age ($n=34$), with $\rho: 0.376$ and a p -value of 0.029; consequently, the difference between the two variables was statistically significant. There was also a statistically significant difference between the median fluorescence intensity ratio for CD3 and that for CD19 ($n=68$), with a p -value <0.001 , and a strong correlation coefficient, with $\rho: 0.735$ (Table 3).

In the pregnancy loss group ($n=17$), there was also a statistically significant difference between the median CD3 fluorescence intensity ratio and the median CD19 fluorescence intensity ratio, with $p=0.019$, and a moderate correlation coefficient, $\rho: 0.561$ (Table 3).

Discussion

Paternal lymphocyte immunization has been heralded as an effective treatment option for recurrent pregnancy loss and has been implanted in several different centers around the world since 1981. Bearing in mind that the exact mechanism that determines recurrent pregnancy loss is unknown, paternal lymphocyte immunization is considered

empirical. Various studies have shown its efficacy through the production of anti-paternal cytotoxic antibodies (APCA), anti-idiotypic antibodies (Ab2) and mixed lymphocyte reaction blocking antibodies (MLR-Bf) (Komlos et al. 1996, Kheshtchin et al. 2010, Gilman-Sachs et al. 1995, Gilman-Sachs et al. 1989, Chaichian et al. 2007, Beer et al. 1981, Nonaka et al. 2007, Adachi et al. 2003, Blanck et al. 2000). A woman's response to treatment can be evaluated by crossmatch prior to and following treatment. If she has no antibodies against the lymphocytes from her partner prior to treatment and goes on to develop them after treatment, then therapy is considered to have been satisfactory, at least from an immunological point of view.

The results of the present study show no association between the variation in the median fluorescence intensity ratio and the outcome (prognosis) of the post-treatment pregnancy. Therefore, this variation (median fluorescence intensity ratio) cannot be used as a laboratory parameter for evaluating the success of paternal lymphocyte immunization insofar as the outcome of the pregnancy following immunological treatment is concerned.

Lubinski et al. (1993) used dual-color flow cytometry to evaluate FCXM in women with recurrent spontaneous abortion and also found no relation between FCXM results and pregnancy outcome. Nevertheless, the methodology used in that study was different from that used in the present study with respect to the concentration of monoclonal antibody used and the data analysis. In that study, the serum from the women was collected four weeks after the final dose of paternal lymphocyte immunization. FCXM was performed using 10 µl of heat-inactivated serum from the women and 100 µl of lymphocytes from the father. As cell labeling, 10 µl of FITC-conjugated anti-human IgG and 10 µl of PE-conjugated anti-CD3 and anti-CD19 were

used. The result of FCXM was presented as a percentage rather than the median fluorescence intensity. FCXMs with a percentage of CD3 or CD19 >50% were considered positive. The results of that study showed that the antibody titers for T lymphocytes varied among the women, with one patient obtaining a titer of 1:5 and another of 1:160. In both cases, pregnancy outcome following paternal lymphocyte immunization was successful.

Lashley et al. (2013) conducted a meta-analysis of 17 studies and showed that, despite considerable differences between samples and in the process used to select the participating women, there was no significant association between HLA class I or II antibodies and the outcome of the pregnancy.

In contrast with the results discussed above, Matsubayashi et al. (2000) reported an association between positive post-treatment FCXM and successful pregnancy outcome. Of the 86 patients in the successful pregnancy outcome group, 83 tested positive at the post-treatment FCXM, with only 3 patients testing negative. In that study, the woman's heat-inactivated serum was incubated with the lymphocytes from the father and with FITC-conjugated anti-human IgG and PE-conjugated anti-CD3. The FCXM results were expressed as median fluorescence intensity, where the median fluorescence intensity of the sample was subtracted from the median fluorescence intensity of the negative control (human serum, type AB).

The present results also show that the higher the T lymphocyte ratio, the greater the gestational age at the time of pregnancy outcome (delivery). This finding may indicate that the greater the increase in T (CD3) cells, the greater the likelihood of achieving a term pregnancy.

Currently, FCXM has been used as a tool in immunological treatment, with the established criterion being that the patient is only allowed to attempt a further pregnancy after a positive post-treatment FCXM. The results of the present study show that, although FCXM results may indicate that a woman may go ahead and attempt another pregnancy following paternal lymphocyte immunization, FCXM cannot be used as a tool for predicting the outcome of that future pregnancy. Nevertheless, these results cannot be considered final, given the complexity of the subject matter. Furthermore, there is no intention to propose changes in the current clinical treatment for recurrent pregnancy loss based on the results of the present study, since the efficacy of treatment was not taken into consideration in this study. It is clear that further studies need to be conducted on this subject to clarify yet unanswered questions.

References

Adachi, H., Takakuwa, K., Mitsui, T., Ishii, K., Tamura, M. and Tanaka, K. (2003) "Results of immunotherapy for patients with unexplained secondary recurrent abortions," *Clinical Immunology*, 106 (3) 175-180.

Al-Hussein, K., Al-Mukhalafi, Z., Bertilsson, P. A., Jaroudi, K., Shoukri, M. and Hollander, J. (2002) "Value of flow cytometric assay for the detection of antisperm antibodies in women with a history of recurrent abortion," *American Journal of Reproductive Immunology*, 47 (1) 31-37.

Balash, J. (2004) "Antiphospholipid antibodies: a major advance in the management of recurrent abortion," *Autoimmunity Reviews*, 3 (3) 228-233.

Batal, I., Zeevi, A., Lunz, J. G. 3rd, Aggarwal, N., Shapiro, R., Randhawa, P. and Girnita, A. (2010) "Antihuman leukocyte antigen-specific antibody strength determined by complement-dependent or solid-phase assays can predict positive donor-specific crossmatches," *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 134 (10) 1534-1540.

Beer, A. E., Quebbeman, J. F., Ayers, J. W. and Haines, R. F. (1981) "Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortions in human," *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 141 (8) 987-999.

Blanck, C. E., Phelan, D. L., Adams, P. W., Regen, L. E., Kukuruga, D., Noreen, H. et al. (2000) "Laboratory Manual," *American Society for Histocompatibility and Immunogenetics*, 1 (4) 1-5.

Chaichian, S., Shoaee, S., Saremi, A., Pedar, S. and Firouzi, F. (2007) "Factors influencing success rate of leukocyte immunization and anti-paternal antibodies in spontaneous recurrent miscarriage," *American Journal of Reproductive Immunology*, 57 (3) 169-176.

Gilman-Sachs, A., Kwak-Kim, J., Beer, A. E. and Beaman, K. D. (1995) "Reproductive immunology: laboratory test for analysis of recurrent spontaneous abortion," *Clinical Immunology Newsletter*, 15 (2-3) 23-26.

Gilman-Sachs, A., Luo, S. P., Beer, A. E. and Beaman K. D. (1989) "Analysis of anti-lymphocyte antibodies by flow cytometry or microlymphocytotoxicity in women with recurrent spontaneous abortions immunized with paternal leukocytes," *Journal of Clinical & Laboratory Immunology*, 30 (2) 53-59.

Hadinedoushan, H., Mirahmadian, M. and Aflatounian, A. (2007) "Increased natural killer cell cytotoxicity and IL-2 production in recurrent spontaneous abortion," *American Journal of Reproductive Immunology*, 58 (5) 409-414.

Kheshtchin, N., Gharagozloo, M., Andalib, A., Ghahiri, A., Maracy, M. R. and Rezaei, A. (2010) "The expression of Th1- and Th2-related chemokine receptors in women with recurrent miscarriage: the impact of lymphocyte immunotherapy," *American Journal of Reproductive Immunology*, 64 (2) 104-112.

Komlos, L., Vardimon, D., Notmann, J., Ben-Rafael, Z., Hart, J., Klein, T., Levinsky, H. and Halbrecht, I. (1996) "Mixed maternal-paternal lymphocyte cultures before and after immunotherapy for recurrent spontaneous abortions," *American Journal of Reproductive Immunology*, 35 (1) 30-33.

Kwak-Kim, J., Park, J. C., Ahn, H. K., Kim, J. W. and Gilman-Sachs, A. (2010) "Immunological modes of pregnancy loss," *American Journal of Reproductive Immunology*, 63 (6) 611-623.

Lashley, E. E., Meuleman, T. and Claas, F. H. (2013) "Beneficial or harmful effect of antipaternal human leukocyte antibodies on pregnancy outcome? A systematic review and meta-analysis," *American Journal of Reproductive Immunology*, 70 (2) 87-103.

Lubinski, J., Vrdoljak, V. J., Beaman, K. D., Kwak, J. Y., Beer, A. E. and Gilman-Sachs, A. (1993) "Characterization of antibodies induced by paternal lymphocyte immunization in couples with recurrent spontaneous abortion," *Journal of Reproductive Immunology*, 24 (2) 81-96.

Matsubayashi, H., Maruyama, T., Ozawa, N., Izumi, S. I., Sugi, T., Yoshikata, K., Yoshimura, Y. and Makino, T. (2000) "Anti-paternal antibodies by flow cytometry in the management of alloimmunization on recurrent miscarriages," *American Journal of Reproductive Immunology*, 44 (5) 284-288.

Nonaka, T., Takakuwa, K., Ooki, I., Akashi, M., Yokoo, T., Kikuchi, A. and Tanaka, K. (2007) "Results of immunotherapy for patients with unexplained primary recurrent abortions – prospective non-randomized cohort study. *American Journal of Reproductive Immunology*, 58 (6) 530-536.

Pandey, M. K., Thakur, S. and Agrawal, S. (2004) "Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism in the maintenance of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion," *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 269 (3) 161-172.

Saini, V., Arora, S., Yadav, A. and Bhattacharjee, J. (2011) "Cytokines in recurrent pregnancy loss," *Clinica Chimica Acta*, 412 (9-10) 702-708.

Saw, C. L., Bray, R. A. and Gebel, H. M. (2008) "Cytotoxicity and antibody binding by flow cytometry: a single assay to simultaneously assess two parameters," *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 74 (5) 287-294.

Sollinger, H. W., Burlingham, W. J., Sparks, E. M., Glass, N. R. and Belzer, F. O. (1984) "Donor-specific transfusions in unrelated and related HLA-mismatched donor-recipient combinations," *Transplantation*, 38 (6) 612-615.

Table 1: Comparison of the successful pregnancy outcome group and the pregnancy loss group with respect to the interval in months between the final paternal lymphocyte immunization and the patient's last menstrual period and between the post-treatment FCXM and the woman's last menstrual period

Interval in months	Successful pregnancy outcome n=68	Miscarriage n=17	P-value
Between final paternal lymphocyte immunization and last menstrual period	3.0 ± 1.9	6.6 ± 3.2	0.037
Between post-treatment FCXM and last menstrual period	2.7 ± 2.2	7.0 ± 0.8	0.006

Mean ± standard deviation of the mean

Table 2: Ratio between median fluorescence intensity of CD3 and CD19 at FCXM in women with recurrent pregnancy loss, according to group: successful pregnancy outcome or pregnancy loss

Group	CD3 ratio	p-value	CD19 ratio	p-value
	Median (range)		Median (range)	
Successful pregnancy outcome	19.76 (0.6 – 90.3)	0.119	21.56 (0.85 – 486.0)	0.109
Pregnancy loss	7.53 (1.5 – 40.6)		10.0 (3.2 – 118.7)	

Table 3: Correlation between median fluorescence intensity ratio for CD3 and for CD19, according to group: successful pregnancy outcome or pregnancy loss

Correlation between CD3 and CD19 median fluorescence intensity ratio	Successful pregnancy outcome group	Pregnancy loss group
Correlation coefficient	0.735	0.561
Significance (two-tailed)	< 0.001	0.019
n	68	17