



Yvonne Klimesch

**Avaliação da imunoterapia com leucócitos
paternos em casais com falhas de implantação
após Fertilização *in vitro***

***Evaluation of immunotherapy with paternal
leukocytes in couples with implantation failure
after IVF***

**Campinas
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

Yvonne Klimesch

**Avaliação da imunoterapia com leucócitos
paternos em casais com falhas de implantação
após Fertilização *in vitro***

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Barini

COORIENTADOR: Prof^a Dr^a Isabela Nelly Machado

***Evaluation of immunotherapy with paternal
leukocytes in couples with implantation failure
after IVF***

Dissertação de Mestrado apresentada a Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, para obtenção de Título de Mestra em Ciências da Saúde, área de concentração em saúde materna e perinatal.

Master's dissertation presented to the Obstetrics and Gynecology Graduate Program of the School of Medical Sciences, University of Campinas, to obtain the MSc grade in Health Science, in the Concentration Area of Maternal and Perinatal Health.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA YVONNE
KLIMESCH E ORIENTADA PELO PROF. DR. RICARDO BARINI

Assinatura do Orientador

Campinas
2014



Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

K683a Klimesch, Yvonne, 1978-
Avaliação da imunoterapia com leucócitos paternos em casais com falhas de implantação após fertilização *in vitro* / Yvonne Klimesch. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Ricardo Barini.
Coorientador : Isabela Nelly Machado.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Infertilidade. 2. Falhas de implantação repetida. 3. *in vitro* Fertilização. I. Barini, Ricardo, 1955-. II. Machado, Isabela Nelly. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of immunotherapy with paternal leukocytes in couples with implantation failure after IVF

Palavras-chave em inglês:

Infertility

Implantation failure

Fertilization *in vitro*

Área de concentração: Saúde Materna e Perinatal

Titulação: Mestra em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Ricardo Barini [Orientador]

Edward Araújo Junior

Renato Passini Junior

Data de defesa: 29-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: YVONNE KLIMESCH

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Barini

Coorientador: Profa. Dra. Isabela Nelly Machado

Membros:

1. Ricardo Barini

2. Edward Araújo Jr

3. Renato Passini Jr

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

Data: 29/08/14

Dedico este trabalho...

...aos meus exemplos de vida, Horst e Ivanete que sempre me estimularam a dar este grande passo. Estas duas pessoas com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por serem meus pais, fonte de inspiração, apoio e ensino diário.

Ao meu marido Andrey e ao meu filho Lucas pela paciência, amor e compreensão nos momentos de ausência.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer de maneira especial e sincera:

Ao professor Dr. Ricardo Barini pela oportunidade;

À Dra Isabela Nelly Machado pelo tempo desprendido em
me ajudar.

À todos meus familiares, principalmente minha querida irmã
Andrea por ter ficado com meu filho nas minhas ausências.

Às meninas do laboratório ALLOVITA e da Clínica Dr.
Ricardo Barini.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer).

Sumário

RESUMO.....	XIV
SUMMARY.....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS	27
2.1. OBJETIVO GERAL	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3. SUJEITOS E MÉTODO	28
3.1 DESENHO DO ESTUDO	28
3.2 TAMANHO AMOSTRAL	28
3.3 SELEÇÃO DE SUJEITOS.....	28
3.3.1 Critérios de exclusão	29
3.3.2 Critérios de inclusão.....	29
3.4 VARIÁVEIS E CONCEITOS	29
3.5 TÉCNICAS, TESTES E EXAMES.....	31
3.5.1 Imunização com leucócitos paternos	31
3.5.2 Prova cruzada por Citometria de Fluxo.....	33
3.6 INSTRUMENTOS PARA COLETA DE DADOS	35
3.7 COLETA DE DADOS.....	36
3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	36
3.9 CONTROLE DE QUALIDADE	37
3.10 ASPECTOS ÉTICOS.....	37
4. RESULTADOS	39
5. DISCUSSÃO	59

6. CONCLUSÕES.....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
8. ANEXOS.....	72
8.1. ANEXO 1 – FICHA CLÍNICA.....	72
8.2. ANEXO 2 – PARECER CONSUBSTANCIADO	73

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

- APCA** – Anticorpos bloqueadores
- CD** – Cluster of differentiation
- D+3** – Terceiro dia de desenvolvimento embrionário
- ESCA** – Esterilidade sem causa aparente
- FIV** – Fertilização *in vitro*
- FDA** – Food and Drug administration
- HLA** – Antígeno leucocitário humano
- ICSI** – Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
- IgG** – Imunoglobulina da classe G
- IUI** – Inseminação intrauterina
- ILP** – Imunoterapia com leucócitos paternos
- IL** – Interleucina
- INF γ** – Interferon gama
- MHC** – Complexo maior de histocompatibilidade
- NK** – Natural killer
- NKp** – Natural killer periférica
- NKu** – Natural killer uterina

OMS – Organização Mundial da Saúde

Tc – Linfócito T citotóxico

Th – T helper

Th1 – T helper 1

Th2 – T helper 2

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

TE – Transferência embrionária

Resumo

Introdução: As altas taxas de falha de implantação embrionária vêm sendo uma das principais causas no insucesso dos ciclos de fertilização *in vitro*. A interação entre o embrião e a decídua materna pode ocorrer em ambiente com aumento de citocinas do tipo Th, prejudiciais à implantação. A imunoterapia com leucócitos paternos surge como tratamento adjuvante para estimular um predomínio do tipo Th2 e favorece a tolerância imunológica, permitindo a implantação e desenvolvimento gestacional em ciclos de FIV/ICSI. **Objetivos:** Avaliar o tratamento de imunização com leucócitos paternos, os resultados maternos, fetais e perinatais dos casais que tiveram falhas de implantação em ciclos de fertilização *in vitro* (FIV/ICSI). **Materiais e métodos:** Foram selecionados 115 casais e foram incluídos no estudo 52 casais que apresentavam pelo menos duas falhas nos ciclos de fertilização previamente à imunoterapia. A imunização com leucócitos paternos foi administrada via intradérmica a cada 21 dias, totalizando 3 doses. Após 3 semanas da última dose realizou-se o teste de crossmatch que avaliou o estado de sensibilização da paciente com antígenos de histocompatibilidade do esposo. **Resultados:** Dos 52 casais incluídos, 32 casais engravidou e 20 casais não. No grupo que engravidou, a taxa de gravidez clínica foi de 61,5% (32/52) e a taxa de gravidez viável foi de 57,7% (30/52). Das 32 gestações, 30 evoluíram para parto e duas para aborto de primeiro trimestre. A taxa de prematuridade foi de 53%. **Conclusão:** A imunoterapia com leucócitos paternos pode aumentar as taxas de gestação em mulheres que tiveram falhas prévias nos ciclos de fertilização assistida.

Palavras chaves: infertilidade, fertilização *in vitro*, falhas de implantação, imunoterapia com leucócitos paternos

Summary

Introduction : Implantation failures in *in vitro* fertilization (IVF) cycles remain a concern, with pregnancy rates at around 34%. Immunological incompatibility between embryo and maternal decidua leads to ineffective production of blocking antibodies, inducing Th1-type predominance, which is detrimental to pregnancy. Paternal leukocyte immunization (PLI) can lead to a shift towards Th2-type predominance, enabling immunological tolerance, thus permitting implantation and pregnancy. **Method of study:** Fifty-two couples with at least two failed IVF cycles were included in the study. Three doses of PLI were administered intradermally at 21-day intervals. Three weeks later, crossmatch was performed to evaluate the patient's state of sensitization to paternal histocompatibility antigens. **Results:** Pregnancy occurred in 32/52 couples, with 30 resulting in live births and 2 in first-trimester miscarriages. Clinical pregnancy rate was 61.5% and viable pregnancy rate 57.7%. Prematurity rate was 53%. **Conclusion:** PLI can increase pregnancy rates in women with repeated implantation failure in IVF cycles.

Keywords: infertility, in vitro fertilization, implantation failures, immunotherapy with leukocytes patern.

1. Introdução

A reprodução humana é considerada extremamente ineficiente quando comparada as outras espécies. A taxa de fertilidade mensal em casais normais está em torno de 20% (1) e a acumulada é de aproximadamente 57% após 3 meses, 72% após 6 meses e de 85% após um ano (2). Uma vez que para casais normais a taxa cumulativa de gestação num período de um ano chega a 85%, são definidos como 'inférteis' todos os casais que não engravidam após um ano de tentativas. Entre os inúmeros fatores para essa baixa taxa de fecundidade, a idade materna é a principal, pois a fecundidade começa a diminuir significativamente no início dos trinta anos, e com um declínio mais rápido por volta do 37 anos (3), chegando a quase 0% em torno dos 45 anos (4).

A infertilidade tem sido reconhecida como um problema de saúde pública em todo o mundo pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e com base na população mundial estima-se que 72,4 milhões de pessoas são inférteis (5). De acordo com o Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine a infertilidade é definida como a incapacidade de conseguir uma gestação após um ano de relações sexuais frequentes sem o uso de anticoncepcionais para mulheres até 35 anos e até seis meses para mulheres com mais de 35 anos (6).

A busca da causa de infertilidade constitui um caminho de estudos e investigação do casal pelos médicos ginecologistas e os requisitos mínimos avaliados são: a presença de ciclos ovulatórios (análise hormonal), análise seminal através do espermograma, histerosalpingografia para evidenciar a permeabilidade tubária e a ecografia transvaginal para avaliar a cavidade uterina, e resumindo ao máximo podemos classifica-los em fatores femininos, fatores masculinos, masculinos e femininos associados e os que não apresentam uma causa aparente (ESCA) (7).

As causas femininas são responsáveis por 35 a 40 %, em 40% são causas masculinas, 20% ambos possuem alterações e de 5 a 10 % são causadas por fatores ESCA. Dentre as causas femininas destacam-se endometriose, fator hormonal, fator ovariano, fator anatômico. Entre as masculinas destacam-se alteração hormonal, alteração no espermograma, varicocele (8).

Foi a partir de 1978 com o nascimento de Louise Brown o primeiro bebê nascido de uma fertilização extracorpórea (*in vitro*) que possibilitou aos casais inférteis conseguir uma gestação. Esse evento abriu as portas para que vários pesquisadores começassem a estudar e a entender mais sobre a fisiologia reprodutiva, fertilização e crescimento embrionário, desenvolvendo e aperfeiçoando também novas técnicas de reprodução assistida (9).

Todos os procedimentos que envolvem manipulação de gametas e ou embriões humanos *in vitro*, com o objetivo de aumentar a fecundabilidade, são consideradas técnicas de Reprodução Assistida (TRA), Tendo a fertilização *in vitro* clássica (FIV) e a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) como exemplos (10).

A fertilização in vitro clássica (FIV) envolve a cultura (in vitro) em uma placa de oocitos com espermatozoides móveis processados em laboratório. Incubam-se em torno de 100 mil espermatozoides para cada oócito.

Foi inicialmente indicada por Steptoe e Edwards aos casais que apresentavam patologias tubárias, e a partir dos anos 80 estendeu-se essa indicação para as mulheres que eram anovulatórias, para as que apresentavam endometriose, fator masculino, fator imunológico e para os casais que não conseguiram a gestação por procedimentos mais simples como o coito programado e a inseminação intrauterina (IIU) (7).

A técnica de ICSI consiste em introduzir um único espermatozoide no interior do citoplasma do oócito. Em 1992 Palermo e cols. publicaram os primeiros êxitos da técnica que ajudariam em muito a aumentar as chances de gestação naqueles casais que possuíam fatores masculinos severos como, por exemplo, a astenozoospermia total e a oligozoospermia (11,12). Vinte e dois anos após os primeiros resultados favoráveis a ICSI é a técnica mais utilizada nos centros de reprodução humana assistida, sendo responsável por pelo nascimento de milhões de crianças ao redor do mundo.

Após ambas as técnicas a comprovação da fertilização é observada pela presença de dois pronúcleos. A etapa final é a transferência embrionária (TE) para o útero materno (10).

O tratamento e o sucesso da fertilização assistida não envolvem só demandas médicas e laboratoriais, envolve também o custo financeiro, a alteração da rotina do casal e o lado emocional. Apesar dos avanços técnicos e científicos na área de reprodução humana assistida, estima-se que apenas 30 a 34% dos casais que iniciam um tratamento de infertilidade conseguem um resultado de sucesso, com uma gestação

em curso (13, 14, 15, 16, 17) . Muitos casais ainda continuam após o tratamento de FIV a não conseguir a gestação desencadeando o grande desafio atual da reprodução que são as falhas nos ciclos de reprodução assistida.

A definição de falhas de implantação embrionária nos ciclos de Fertilização assistida (FIV) ainda é controversa na literatura. Polanski *et al.* (2014) publicou uma revisão sistemática com o intuito de avaliar as definições de falhas de implantação nos artigos selecionados pelo MEDLINE, Embase e Cochrane Library. As definições mais frequentes encontradas foram: “três ou mais ciclos de FIV sem gestação” ou “dois ou mais ciclos de FIV sem gestação”, combinados ou não com o número de embriões transferidos. A conclusão do estudo foi que as falhas de implantação devem ser definidas como a ausência de implantação após dois ciclos consecutivos de fertilização *in vitro*, ICSI ou ciclos de que utilizaram embriões congelados, onde o número acumulado de embriões transferidos foi maior do que quatro embriões no estágio de clivagem (D+3), mais que dois para transferência de blastocistos, e tanto os embriões quanto os blastocistos devem possuir boa qualidade e desenvolvimento adequado para o dia de desenvolvimento (18).

Entretanto o assunto ainda não é unanime e, recentemente, um grupo de pesquisadores definiu a falha de implantação como a ausência de gestação clínica após a transferência de pelo menos quatro embriões de boa qualidade em no mínimo três ciclos de FIV e ciclos de embriões congelados em mulheres com idade abaixo de 40 anos (17).

Por outro lado a definição de boa qualidade está bem estabelecida sendo considerado aquele que contem entre 7 e 8 células, <10% de fragmentação celular e ausência de blastômeros multinucleados e irregulares no dia da transferência (19,20). Existem diversas causas e /ou fatores investigados para as falhas de implantação que

contribuem para o insucesso da reprodução assistida. Dentre as causas podemos citar a qualidade embrionária, fatores anatômicos, estilo de vida, presença de trombofilia, idade materna e paterna, alterações metabólicas e as disfunções imunológicas, principalmente no aspecto da receptividade endometrial (21, 22, 23, 24). Esses estudos abriram um novo campo na medicina reprodutiva, a Imunologia da Reprodução (25).

Em 1953, Medawar foi o primeiro a propor o conceito de que o embrião se comportaria como um enxerto semi alogênico uma vez que expressa antígenos maternos e paternos. Ele sugeriu que esse embrião fosse capaz de sobreviver porque a interação imunológica entre ele e a mãe seria suprimida pela ausência de expressão do antígeno fetal, resultante de uma separação anatômica entre eles, ou a partir de uma supressão funcional dos linfócitos maternos (26).

Atualmente as teorias propostas inicialmente por ele já não são mais válidas, pois já se sabe que não existe essa separação anatômica entre mãe e feto uma vez que as células do trofoblasto fetais estão em contato com as células maternas e com isso não há estimulação do sistema imune materno, pois o trofoblasto não expressa as moléculas do complexo maior de Histocompatibilidade (MHC) os quais são responsáveis pela rejeição de aloenxertos. Não existe uma supressão geral dos linfócitos, pois ela muda durante a gravidez tornando a hipótese de Medawar verdadeira (27,24).

A implantação embrionária é controlada por uma sofisticada interação entre embrião e o endométrio que começa a ficar receptivo para o blastocisto de seis a oito dias após ovulação permanecendo receptivo por 4 dias (dias 20 – 24 ciclo menstrual) e passa pelos seguintes estágios: orientação, aposição, adesão e invasão endometrial (28,29,17). Morfologicamente o blastocisto pode ser dividido nesta fase do desenvolvimento em massa celular interna e trofoblasto. O trofoblasto vai se

desenvolvendo e se diferenciando em: 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, e última população formada pelo citotrofoblasto não viloso, cujas células irão se proliferar e migrar para a decídua e miométrio entrando em contato direto com o sistema imune materno através das artérias espiraladas, das células amnióticas e vilosidades coriônicas (27).

O trofoblasto dará origem à placenta e terá papel importante na interface materno fetal. A placenta atua como uma barreira imunológica e, como não há continuidade vascular entre mãe e filho, apresenta papel importante na tolerância fetal.

Outro importante tecido que se forma é a decídua que é a parte materna da placenta e que esta em contato mais próximo entre as células maternas e fetais e contém uma população diversa de células, incluindo as células do estroma, linfócitos, células *Natural killer* uterinas (NKu), monócitos e células epiteliais. Estes leucócitos encontram-se em grande número e densidade, e desenvolvem importante papel no direcionamento de uma resposta citotóxica ou supressora (27,30,31).

As células *Natural Killer* (NK) fazem parte do sistema imune inato e compõe aproximadamente de 15 % da população de linfócitos com a conhecida função na atividade citotóxica. Em sua superfície, as células NK expressam antígenos que as caracterizam em NK periféricas (pNK) e NK uterinas (uNK); CD56+CD16- e CD56+CD16+, respectivamente. As duas populações celulares expressam na superfície antígenos CD56. O antígeno CD16 caracteriza-se como um receptor de baixa afinidade para anticorpos IgG, e possui função de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (32).

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. Células pNK (CD56^{dim}) exercem funções importantes na atividade citotóxica contra antiviral e anti-neoplásico enquanto as células uNK têm pouca atividade citotóxica, mas são uma rica fonte de citocinas, particularmente os angiogênicos, com possíveis papéis na regulação da invasão do trofoblasto e angiogênese (33,34,32,35,36). Uma das funções das células uNK é a de produzir citocinas que influenciam positivamente e negativamente a placentação. A produção de fator estimulador de colônias granulocíticas (G-CSF), fator de estimulação de colônia granulocítica de macrófago (GM-CSF) e leucemia inhibitory factor (LIF) estimulam a proliferação e diferenciação do trofoblasto; já a citocina do tipo Th1 (TNF α e IFN γ) produzirão o efeito negativo na implantação e invasão (27).

Durante os três primeiros meses de gestação 70 % dos leucócitos presentes na decídua são as uNK e 10 a 20 % são as células apresentadoras de antígenos (37).

As moléculas do complexo maior de Histocompatibilidade (MHC), que nos humanos recebe o nome de Antígeno Leucocitário Humano (HLA), são encontradas na superfície da maioria das células do organismo humano e diferenciam o “próprio” do “não próprio” (Dahl e Hviid, 2012)(38). Esse complexo está localizado no braço curto do cromossomo 6, com a principal função de 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 (38,39,40). O MHC de classe I é expresso por células nucleadas que estão envolvidas na apresentação de antígenos para linfócitos citotóxicos (Tc) e possui seis proteínas diferentes divididas em clássicas: HLA - A, - B e - C altamente polimórficas com função

central de processar e apresentar antígenos, e não clássicas: HLA – E, - F e - G fracamente polimórficas e com função reduzida. O MHC de classe II é expresso somente pelos linfócitos B, células apresentadoras de antígenos, células epiteliais e macrófagos, estando envolvido com o imuno reconhecimento (41,39,42,38,37).

Em 1986, Ellis et al identificou que o grupo Ib da moléculas do MHC da classe I possuía expressão no citotrofoblasto não viloso, sendo denominada como HLA – G (43).

Na gestação o papel da molécula do HLA – G é a de promover uma proteção imunológica do feto contra a citotoxicidade das células *natural killer* uterinas (NKu) através de receptores inibitórios (KIR2DL4), que se ligam ao HLA – G do trofoblasto inibindo a atividade citotóxica das células uNK (27,44,39,25,45,37).

Ligada à membrana da molécula HLA-G há uma parte solúvel denominada sHLA-G que pode ser detectada no plasma sanguíneo, líquido amniótico e também nos meios de culturas dos embriões de Fertilização in vitro, estando diretamente ligada ao sucesso nos tratamentos de FIV e com o sucesso na implantação do embrião (46,38). A presença dessa molécula induz a produção e a modulação de citocinas que irão controlar a invasão do trofoblasto, mantendo o local em um estado imunologicamente favorável para o desenvolvimento da gestação (39). Em 1958, van Rood et al (1958)(47) e Payne et al.(1958)(48) foram os primeiros pesquisadores a descrever a presença dos anticorpos bloqueadores (APCA), e estão presentes em 10 a 30% nas mulheres saudáveis durante a gestação e a incidência é maior após a 28^a semana de gestação (49).

Quando o sistema imune materno reconhece como diferente o HLA paterno, há a formação dos anticorpos bloqueadores. Esses anticorpos irão proteger o feto contra a citotoxicidade materna, sendo detectados desde o início da gestação e permanecendo por

tempo indeterminado na corrente sanguínea materna induzindo uma memória imunológica específica no caso de uma nova gestação com o mesmo parceiro (50, 51, 52,30).

Caso esse reconhecimento não aconteça, ocorre compartilhamento entre o HLA materno e paterno, não havendo a produção dos anticorpos bloqueadores resultando em ativação das células NK e formação de uma resposta imune do tipo T helper 1 (Th1) produzindo determinadas citocinas que irão promover ações deletérias ao trofoblasto.

Dessa forma, o reconhecimento da molécula do HLA- G pelas células NK, determina a formação de uma resposta imunológica T helper 2 (Th2) (24,29) . Foi a partir desse reconhecimento e compartilhamento das moléculas HLA do casal (disparidade antigênica) que surgiu a hipótese imunológica da aloimunidade (51).

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 os linfócitos T citotóxicos (Tc), que destroem células infectadas e/ou patógenos. Podemos dividir os linfócitos T helper (Th) de acordo com a produção de citocinas; 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 uma resposta pró-inflamatória (53). Os linfócitos Th2 promovem a resposta imune humoral, anti-inflamatória e produzem interleucina 4 (IL-4), interleucinas 5 (IL-5), interleucina 9 (IL-9), interleucina 13 (IL-13) e interleucina 10 (IL10) (54,27,55,56,53). Vários estudos demonstram que o sucesso gestacional está associado a um predomínio de uma resposta responsáveis pela produção de interleucinas (IL -) IL - 3, IL - 4, IL - 5, IL - 6, IL - 10 e IL - 13 promoverão a produção de anticorpos bloqueadores mantendo a atividade das células NK inibidas (27,55,56,57,24). Os linfócitos T reguladores (Treg) também apresentam funções importantes na regulação do sistema imune, pois são potentes supressores da

autoimunidade, rejeição de aloenxertos e na infertilidade sem causa aparente quando essas apresentam deficiências numéricas e funcionais (58).

Além dessas alterações imunológicas o hormônio progesterona produzido na fase secretória do ciclo menstrual tem um papel importante na aceitação do embrião e também nas mudanças associadas à produção de citocinas, mediadores de inflamação, as moléculas pró e anti-inflamatórias como a IL- 1 e o fator de necrose tumoral (44, 42,59). Acredita-se que esse efeito imunorregulatório esteja relacionado com a sua ação sobre os linfócitos T, que sobre o efeito alogênico passa a expressar também receptores para progesterona que em altas concentrações passam a produzir uma proteína imunorreguladora a PIBF que ira inibir a liberação do ácido araquidônico inibindo a atividade das células NK e modifica o balanço das citocinas (60).

Existem evidências na literatura da participação de fatores imunológicos nos casais com repetidas falhas nos ciclos de FIV/ICSI (54,61,55). Hill (1987) foi o primeiro a relacionar a uma mudança no perfil das citocinas com predomínio de Th1 nas pacientes com aborto recorrente e com falhas de implantação (62).

Os mecanismos imunológicos envolvidos com as falhas de implantação de FIV/ICSI descritos são um aumento no número de células *Natural Killer* (NK) e uma alteração no balanço das citocinas Th1 e Th2, com predominância de resposta Th1(54,63,64, 65,66,35). A resposta Th1 prevalente leva a um aumento da liberação de IL- 2, IL – 12, interferon gama (INF γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α), estes levam a um aumento nas células NK induzindo a imunidade celular e a apoptose no trofoblasto , culminando com a morte embrionário precoce (63,42,24,67).

Baseados nesses fatores imunológicos descritos, alguns tratamentos imunológicos foram propostos para os casos de falhas de implantação nos ciclos de FIV/ICSI.

Nos anos 80, a partir das pesquisas realizadas pela equipe do Dr. Alan Beer, a imunoterapia com linfócitos paternos (IPL) começou a ser utilizada em casais com aborto recorrente (68, 69, 70,71). A função da imunoterapia é a de suprimir a atividade das células *NK*, favorecendo a formação dos anticorpos bloqueadores (HLA do marido) e uma resposta predominantemente Th2 (51,61,70,72). Considerando este efeito do IPL em promover uma resposta imunológica adequada para a progressão da gestação, postulou-se que essa opção terapêutica poderia ser utilizada também como adjuvante na reprodução assistida (73,74,69).

O papel da IPL nos casos de falhas de implantação foi avaliado em um estudo prospectivo (n= 37 casais) que encontrou um índice de gravidez clínica de 70,3% e de gravidez viável de 51,3% para o grupo tratado (IPL), enquanto no grupo – controle (sem IPL) os resultados foram 45,9% de gravidez clínica e 16,2% de gravidez viável respectivamente, demonstrando que a imunoterapia pode ampliar as chances de gravidez até o termo, melhorando os resultados das FIV/ICSI com transferência de embriões (74).

A imunoterapia com linfócitos paternos apresenta-se como uma promissora terapia adjuvante para o sucesso dos tratamentos de FIV/ICSI.

Em virtude das transformações físicas, do transtorno psicológico e do gasto financeiro que as falhas nos ciclos de Fertilização *in vitro* geram na vida pessoal e conjugal de casais e motivado por estudos prévios onde demonstram que uso da imunoterapia com linfócitos paternos pode melhorar as taxas de gestação dessas pacientes, questionamos se a IPL teve influencia positiva nos resultados de gestações das pacientes com indicação de Fertilização *in vitro* atendida na CLÍNICA DR. RICARDO BARINI e no laboratório ALLOVITA.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o tratamento de imunização com leucócitos paternos, os resultados maternos, fetais e perinatais dos casais que tiveram falhas de implantação em ciclos de fertilização in vitro (FIV/ICSI).

2.2. Objetivos específicos

- Descrever a frequência de gestações clínicas após imunoterapia com linfócitos paternos em casais falhas de FIV/ICSI.
- Descrever o resultado materno fetal e as características perinatais dos recém-nascidos, após imunoterapia com linfócitos paternos em casais que se submeteram a FIV/ICSI.

3. Sujeitos e Método

3.1 Desenho do estudo

Estudo descritivo de corte transversal retrospectivo

3.2 Tamanho amostral

Foi utilizada uma amostra de conveniência de 115 casos, incluindo todos os casos atendidos na clínica do Dr Ricardo Barini e no laboratório Allovita entre Janeiro de 2007 a Dezembro de 2012.

3.3 Seleção de sujeitos

Foram selecionadas mulheres que preencheram os critérios de inclusão e exclusão, encaminhadas para receberem imunização com linfócitos paternos no Laboratório Allovita situado na cidade de Campinas – SP, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2012.

Como as mulheres foram encaminhadas para clínica e para o laboratório, toda a avaliação do diagnóstico da infertilidade e/ou das falhas de FIV foi realizada pelos respectivos médicos Ginecologistas e /ou Esterileutas.

3.3.1 Critérios de exclusão

Foram excluídas deste estudo mulheres com presença de doenças malignas (câncer), casal com translocação balanceada no cariótipo de sangue periférico, mulheres que apresentavam gestação prévia e ou aborto antes do tratamento de Fertilização assistida e mulheres que não passaram por atendimento na clínica Dr Ricardo Barini.

3.3.2 Critérios de inclusão

Foram incluídas neste estudo as mulheres com história de pelo menos 2 ciclos de FIV/ICSI sem sucesso em obterem gravidez e com teste de Crossmatch negativo.

3.4 Variáveis e conceitos

Idade - número de anos completos decorridos a partir da data de nascimento até a data da imunização.

Número de ciclos prévios – número de ciclos de FIV/ICSI com transferência embrionária anteriores ao tratamento de imunoterapia.

Insucesso de fertilização in vitro (FIV): insucesso em conseguir uma gestação comprovada laboratorialmente por β hCG negativo, após a transferência de embriões de boa qualidade (possuem entre 7 e 8 células, <10% de fragmentação celular e ausência de blastômeros multinucleados).

Gestação laboratorialmente comprovada: positividade na dosagem sérica do β hCG.

Crossmatch: exame para detecção de anticorpos da mulher contra antígenos do parceiro previamente e posteriormente ao tratamento.

Número de gestações: número total de gestações prévias ao tratamento.

Número de partos: número total de partos prévio ao tratamento.

Número de abortos espontâneos prévios: número de perdas gestacionais ocorridas de forma espontânea de feto com peso inferior a 500 gramas e/ ou idade gestacional inferior a 20 semanas previamente ao tratamento.

Desfecho do tratamento: essa variável será dividida em quatro categorias definidas abaixo:

- **Gravidez clínica**: resultado da dosagem da fração beta da gonadotrofina coriônica humana (Beta hCG) no sangue da mulher considerado positivo e com visualização de saco gestacional pelo Ultrassom
- **Ausência de gravidez**: Beta hCG negativo ou não visualização de saco gestacional pelo ultrassom.
- **Gravidez sem sucesso**: gravidez seguida de aborto (eliminação por via vaginal de feto com peso inferior a 500 gramas e/ou idade gestacional inferior a 20 semanas) ou seguida de parto de feto morto.
- **Gravidez com sucesso (viável)**: gravidez seguida de feto viável: parto de feto vivo maior que 500 gramas.

Idade gestacional – é calculada em semanas a partir da data da fertilização embrionária menos 14 dias, para os casos de transferência de embriões frescos. Em se tratando de embriões congelados, a idade gestacional é calculada a partir da data da transferência embrionária para a paciente, menos 14 dias e o número de dias de vida embrionária pós-fertilização e permanência no laboratório. Por

exemplo: um embrião congelado em D+2 e transferido em D+5 teria o cálculo da idade gestacional a partir do dia da transferência menos 19 dias.

Peso ao nascer - É a primeira medida de peso (em gramas) do recém-nascido obtido logo após o nascimento.

Pré-termo - \leq de 37 semanas completas de gestação.

Termo - De 37 semanas a menos de 42 semanas completas de gestação.

Pós-termo - \geq 42 semanas completas ou mais de gestação.

Saco gestacional: uma estrutura cheia de líquido associada ao início de gestação, identificada ao exame de ultrassom que pode estar localizado dentro ou fora do útero (em caso de uma gravidez ectópica).

Implantação embrionária – aposição com subsequente invasão do trofoblasto no endométrio materno que começa de 5 a 7 dias após a fertilização.

Transferência embrionária – processo em que um ou mais embriões são transferidos por cateter dentro da cavidade uterina.

Taxa de gravidez clínica – número de gravidez clínica dividido pelo total de pacientes.

Taxa de gravidez viável – número de gravidez viável dividido pelo total de pacientes.

3.5 Técnicas, testes e exames

3.5.1 Imunização com leucócitos paternos

No dia programado para o começo do tratamento de imunização, os maridos foram encaminhados para coleta em jejum de pelo menos oito horas. O sangue foi coletado por punção venosa. 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.

Após a coleta, o sangue 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 ressuspenso 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 1ml. 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

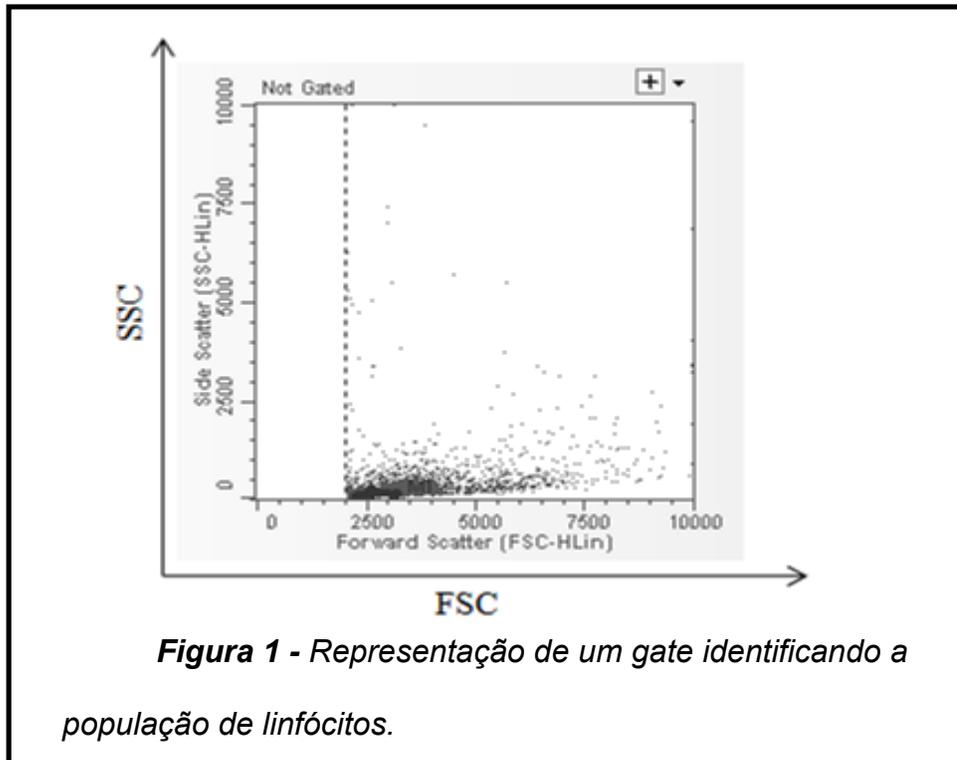
esquerdo da mulher. Os resultados da imunização foram verificados por Prova Cruzada após 30 a 40 dias da última dose.

3.5.2 Prova cruzada por Citometria de Fluxo

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. 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* ressuspendido 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 1)



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. Após essa positividade, o casal poderá iniciar um novo ciclo de Fertilização assistida. Reforços da vacina são feitos a cada seis meses. Caso a mulher engravide após a Fertilização assistida são feitos os reforços de gestação mensalmente até a 16ª semana de gestação.

3.6 Instrumentos para coleta de dados

Uma ficha clínica, contendo idade da paciente e do marido, histórico gestacional, fator de infertilidade, resultado do crossmatch prévio, número de ciclos de FIV, número de doses de reforço da imunoterapia com linfócitos paternos, resultado do crossmatch pós imunoterapia, números de ciclos de FIV realizados após a imunoterapia, número de embriões transferidos, resultado de gestações, abortos, tipo de parto, idade gestacional,

peso as nascimento, APGAR e complicações pós-parto, foi especialmente desenhada para este estudo (ANEXO1). 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.

3.7 Coleta de dados

Depois de completada a ficha clínica, os dados coletados foram digitados em uma planilha do programa Excel 2010. Após foi realizada a análise estatística desses dados.

3.8 Processamento e análise dos dados

Concluída e revisada a digitação de todos os dados por dois revisores, a saber, o pesquisador e o estatístico, em planilha do programa Excel 2010 para Windows (Microsoft® Corporation, Redmond, WA, EUA).

A análise foi feita através de médias e desvios padrão para as variáveis quantitativas e, através de frequências e percentuais para as variáveis categóricas. Os testes estatísticos utilizados para analisar as variáveis quantitativas foram o teste t (variáveis com distribuição normal) e teste de Mann-Whitney (variáveis sem distribuição normal). Os testes estatísticos utilizados para analisar as variáveis categóricas foram o teste qui-quadrado, teste exato de Fisher e teste de Mantel-Haenszel (teste de tendência). A significância considerada foi de 5% para o erro do tipo 1.

3.9 Controle de qualidade

O controle de qualidade é realizado através de kits de controles positivos e negativos do fabricante do citômetro de fluxo (Guava Technologies Inc; Califórnia, EUA).

Os controles de produção da vacina são realizados semanalmente através de aplicação de placas culturas para avaliar a esterilidade do fluxo laminar (Veco; São Paulo, Brasil), e obrigatoriamente todos os materiais utilizados para a produção da vacina são estéreis. A vacina só é produzida e administrada nas mulheres após a verificação da sorologia do marido. Se todos os testes (dosagens dos anticorpos específicos) para as principais doenças infecto contagiosas (hepatites, AIDS etc) estiverem negativas, o marido está liberado para a coleta de sangue.

O controle de todos os casos selecionados a partir dos critérios de inclusão foi 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.

3.10 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.

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 das normas da Resolução 196/96 e da Resolução nº 466/12 do Ministério da Saúde.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) FCM-UNICAMP (parecer número 139.712).

4. Resultados

From: <editor.ajri@yale.edu>
Date: 2014-07-28 12:43 GMT-03:00
Subject: American Journal of Reproductive Immunology - Manuscript ID AJRI-07-14-185
To: ricardo@barini.med.br

28-Jul-2014

Dear Prof. Barini:

Your manuscript entitled "Effect of paternal leukocyte immunization on pregnancy rates in couples with recurrent implantation failure following in vitro fertilization" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the American Journal of Reproductive Immunology.

Your manuscript ID is AJRI-07-14-185.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/ajri> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/ajri>.

Thank you for submitting your manuscript to the American Journal of Reproductive Immunology.

Sincerely,
American Journal of Reproductive Immunology Editorial Office

Effect of paternal leukocyte immunization on pregnancy rates in couples with recurrent implantation failure following in vitro fertilization

Yvonne Klimesch BSc¹, Isabela Nelly Machado MD, PhD^{1,2}, Ricardo Barini MD, PhD^{1,2},
Simone Corte Batista de Souza Lima MSc²

¹ University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

² *Allovita Reproductive Immunology Laboratories*, Campinas, SP, Brazil

(Artigo submetido para publicação)

Correspondence:

Ricardo Barini

Av. Alexander Fleming 101

Campinas CEP 13083-081

SP Brazil

Telephone: +55 19 3521-9304

Fax: +55 19 3521-9304

E-mail: drbarini@gmail.com

Running head: Paternal leukocyte immunization

Abstract

Problem: Implantation failures in *in vitro* fertilization (IVF) cycles remain a concern, with pregnancy rates at around 34%. Immunological incompatibility between embryo and maternal decidua leads to ineffective production of blocking antibodies, inducing Th1-type predominance, which is detrimental to pregnancy. Paternal leukocyte immunization (PLI) can lead to a shift towards Th2-type predominance, enabling immunological tolerance, thus permitting implantation and pregnancy. **Method of study:** Fifty-two couples with at least two failed IVF cycles were included in the study. Three doses of PLI were administered intradermally at 21-day intervals. Three weeks later, crossmatch was performed to evaluate the patient's state of sensitization to paternal histocompatibility antigens. **Results:** Pregnancy occurred in 32/52 couples, with 30 resulting in live births and 2 in first-trimester miscarriages. Clinical pregnancy rate was 61.5% and viable pregnancy rate 57.7%. Prematurity rate was 53%. **Conclusion:** PLI can increase pregnancy rates in women with repeated implantation failure in IVF cycles.

Key words: immunotherapy, implantation failure, infertility.

Introduction

Current advances in the field of assisted human reproduction have enabled thousands of couples diagnosed with some form of infertility to achieve their dream of pregnancy. Nevertheless, the success rate of these treatments ranges from 30% to 34% at each attempt¹⁻⁵, making implantation failures in *in vitro* fertilization procedures the greatest challenge nowadays in reproductive medicine. Some of the factors that contribute towards failure in assisted reproduction include the quality of the embryo, anatomical factors, lifestyle, the presence of thrombophilia, maternal and paternal age, metabolic abnormalities and immunological dysfunctions, principally with respect to endometrial receptivity⁶⁻⁹.

Embryonic implantation is a crucial step for the development and maintenance of pregnancy. It is during this phase that the maternal immune system recognizes the embryo as “foreign”, since it expresses paternal major histocompatibility complex (MHC) genes and a maternal immune network is formed to attack this embryo. In normal pregnancies this does not happen, since the trophoblast does not express human leukocyte antigen (HLA) molecules; therefore, rejection does not occur¹⁰. On the other hand, the cells of the non-villous cytotrophoblasts that will migrate to the decidua and endometrium express a group of MHC class Ib molecules known as HLA-G. These molecules will provide the embryo with immunological protection against the cytotoxicity of the uterine natural killer (uNK) cells through inhibitory receptors (KIR2DL4) that bind to HLA-G from the trophoblast, inhibiting this cytotoxic activity¹⁰⁻¹². This recognition of

HLA-G by the uNK cells generates the formation of blocking antibodies, inducing an anti-inflammatory immunological response, with a predominance of the T helper type 2 (Th2) immune response and production of interleukins (IL) 4 (IL-4), 5 (IL-5) and 10 (IL-10), which favor pregnancy^{9,10,12-14}. If HLA-G is not recognized, the uNK cells will be activated and a T helper type 1 (Th1) response will be formed, producing IL-2, interferon- γ (INF- γ) and tumor necrosis factor α (TNF- α), resulting in a local inflammatory response that will have a deleterious effect on the trophoblast and attack the embryo¹⁰⁻¹². There is evidence in the literature of the participation of immunological factors in couples who have suffered recurrent failures in *in vitro* fertilization (IVF) / intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles^{13,15,16}. Hill et al.¹⁷ were the first to report a change in the cytokine profile, with a predominance of Th1, in patients who had suffered recurrent miscarriages and implantation failure. The immunological mechanisms involved in the IVF/ICSI implantation failures described above are an increase in the number of natural killer (NK) cells and a shift in the Th1/Th2 cytokine balance, with a predominance of Th1 response¹⁸⁻²¹. Based on the aforementioned immune factors, some immunological treatments have been proposed for cases of implantation failure in IVF/ICSI cycles.

Paternal leukocyte immunization (PLI) was first introduced by Beer et al.²² in the 1980s for the treatment of patients with recurrent miscarriages. Since the immunological dysfunctions described for cases of recurrent miscarriage have also been described for cases of failed embryo transfer attempts in IVF/ICSI programs, PLI has been suggested for cases of implantation failures²²⁻²⁵

Immunotherapy is able to suppress NK cell activity, leading to the formation of blocking antibodies (paternal HLA) and a predominantly Th2 response,^{16,24,26,27} contributing to the success of embryo implantation. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the pregnancy rate following paternal leukocyte immunization (PLI) in couples that had experienced at least two failed assisted fertilization cycles. The progression of pregnancy and the perinatal outcomes were also evaluated.

Material and Methods

Patient Selection

A retrospective, cross-sectional descriptive study was conducted by reviewing the medical records of couples with a diagnosis of at least two failed pregnancy attempts in assisted fertilization cycles, who were referred for paternal leukocyte immunization at the Allovita Laboratory in the city of Campinas, São Paulo, Brazil between January 2007 and January 2012. These couples had already been diagnosed as infertile by their respective gynecologists and/or fertility specialists, and were following treatment protocols. All the couples included in the study had presented a negative crossmatch test prior to undergoing PLI. Women with cancer and couples in whom karyotype analysis of peripheral blood revealed a balanced translocation were excluded from the study.

Immunotherapy

An 8-ml blood sample was obtained by peripheral venous puncture into heparin Vacutainer tubes from each male partner. Next, peripheral mononuclear white blood cells (WBC) were separated aseptically in a laminar flow cabinet using Ficoll-Hypaque

density gradient centrifugation. The WBC were washed in saline, and then resuspended in 1.0 ml of saline solution. Between 60 and 100 million cells were then injected subcutaneously at three different sites on the woman's forearm. Immunizations were carried out on three different days, following the same routine, with an interval of three weeks between the shots. Three weeks after the last immunization, a flow cytometry crossmatch was performed to confirm the production of antibodies to paternal T- and B-cell antigens. The procedure was repeated until a positive crossmatch was obtained. Cross-matching was considered positive when antibodies were detected on the surfaces of at least 75% of T and/or B cells. Patients were advised to undergo booster immunization shots every three months while attempting pregnancy and once every four weeks after receiving a positive pregnancy test.

Statistical analysis

Data were expressed as means and standard deviations in the case of quantitative variables and by frequencies and percentages in the case of categorical variables. The statistical tests used to analyze the quantitative variables were the t-test for variables with normal distribution and the Mann-Whitney test for variables whose distribution was not normal. The statistical tests used to analyze the categorical variables were the chi-square test, Fisher's exact test and the Mantel-Haenszel test for trend. Significance was defined as 5% for a type I error.

Results

A total of 115 couples referred for evaluation due to implantation failures were selected for inclusion. Of this group, 10 couples who had undergone only one IVF cycle were excluded from the study, as well as 34 couples who had already conceived previously and 19 couples for whom no data were available on their charts regarding their previous fertility. Therefore, 52 couples were included in the study. The mean age of the women was 35.7 years (range 26-48 years) compared to 38.8 years (range 28-58 years) for the men. There was a statistically significant difference in the mean age of the group of women who became pregnant (34.7 years) compared to those who did not become pregnant (37.2 years) ($p = 0.0108$; t-test). There was no statistically significant difference between the mean age of the men in those two groups ($p = 0.0708$; Mann-Whitney test).

The mean number of previous IVF/ICSI cycles was 2.9 (range 2-9). No association was found between the number of previous IVF/ICSI cycles and the occurrence of pregnancy following PLI (Table I).

Table I: Relationship between the number of previous IVF/ICSI cycles and the occurrence of pregnancy following paternal leukocyte immunization (PLI)

Pregnancy following PLI	Number of previous IVF/ICSI cycles											
	2		3		4		5		9		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
No	10	30.3	7	53.9	1	50.0	1	50.0	0	0.0	20	38.5
Yes	23	69.7	6	46.2	1	50.0	1	50.0	1	100.0	32	61.5
Total	33	100.0	13	100.0	2	100.0	2	100.0	1	100.0	52	100.0

P-value = 0.3707 (Fisher's exact test); P-value = 0.1341 (Test for trend)

Comparing the group in which pregnancy occurred with the group in which pregnancy did not occur, there was no statistically significant difference in the type of infertility factor affecting the couples (Table II).

Table II: Association between the infertility factor and the occurrence of pregnancy

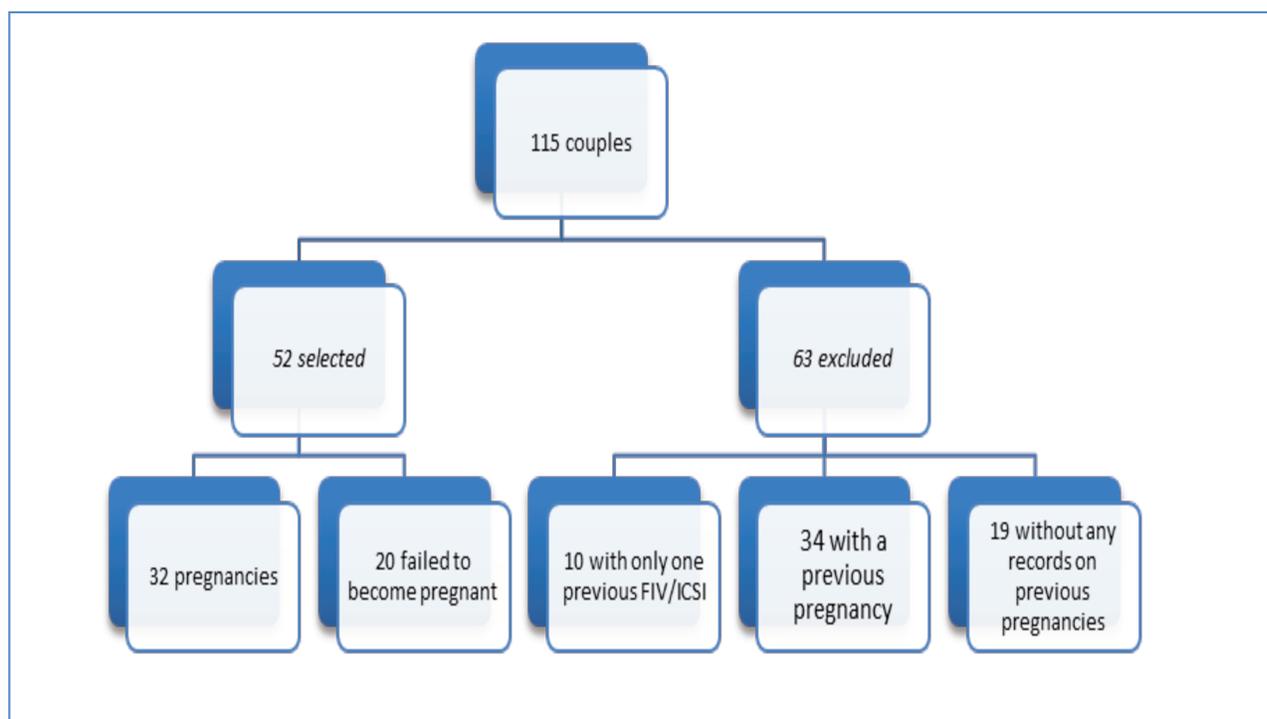
Pregnancy	SWAC	Female Factor	Male Factor	Male and Female Factor	Total
No (n)	3	12	4	1	20
%	15.0	60.0	20.0	5.0	100.0
Yes (n)	2	16	9	5	32
%	6.3	50.0	28.1	15.6	100.0
Total (n)	5	28	13	6	52
%	9.6	53.9	25.0	11.5	100.0

P-value = 0.46 (Fisher's exact test); SWAC: Sterility without apparent cause

Of the 52 women included in the study, 32 became pregnant following PLI, while 20 failed to do so. The clinical pregnancy rate was 61.5% (32/52). Nine of these

pregnancies (28.1%) were natural pregnancies, while 23 occurred following IVF/ICSI. Of the 32 pregnancies, two resulted in first trimester miscarriages. The viable pregnancy rate was 57.7% (30/52) (Figure 1).

Figure 1: Flowchart showing the results of IVF/ICSI following paternal leukocyte immunization.



Of the 30 pregnancies that progressed to a live birth, there were 5 cases of twins and 1 case of triplets. Mean gestational age at delivery was 35.2 weeks (range 24-39 weeks). The most prevalent mode of delivery was Cesarean section (22/25 cases, 73.3%), as evaluated in 25 cases for which this information was recorded in the charts. The rate of term deliveries (≥ 37 weeks) was 30% (9 deliveries), while another 13 patients (43.3%) were delivered at 32-36 weeks. Of the three deliveries that occurred prior to 32 weeks of gestational age (10%), one consisted of a twin pregnancy in which delivery occurred

at 30 weeks, one consisted of triplets delivered at 30 weeks, and in the other case placental abruption occurred at 24 weeks (Table III).

Table III: Childbirth data.

Mean GA	Term (>37 weeks)	Premature (32-36 weeks)	Extremely Premature (<32 weeks)	Not reported
	A	B	C	D
35.2	9	13	3	5

GA: gestational age

There was no correlation between the patient's age and gestational age at delivery ($p = 0.181$). The 30 pregnancies that progressed to delivery resulted in 36 liveborn infants (including 13 sets of twins) and 1 stillborn infant. The liveborn pregnancy rate was 96.6% (29/30). Mean birthweight was 2,465 grams, with a median of 2,490 grams.

Gestational complications recorded included one case of chorioangioma, one case of trisomy 21, 1 case of placental abruption and one case of cleft lip.

Discussion

Considerable advances have been made in the field of reproductive medicine since the birth of the first test-tube baby in 1978 and the resulting technologies have helped thousands of couples worldwide. Nevertheless, the success rate in assisted reproduction remains at around 34% and may be as low as 10% in more severe cases of infertility^{4,5}.

There is a worldwide trend for women to delay motherhood either as a personal choice or as a function of their professional life. A study conducted by Klipstein et al. in 2005²⁸ showed that the number of pregnancies in women of 40-44 years of age almost doubled between 1990 and 2002. As age increases, natural fecundity and pregnancy rates decline, a phenomenon that is also seen in assisted reproduction.

Although it is not the only factor, the quality of the embryo has been cited as an important cause of implantation failure, both in a normal reproductive cycle and in assisted fertilization cycles. Other additional causes include female anatomy, sperm quality, zona pellucida thickness of oocytes and immunological causes.

Comparison between pregnancy rates following different laboratory techniques used to treat couples with implantation failure has shown higher success rates following PLI. Magli et al.²⁹ reported a success rate of 36% for couples who underwent assisted hatching in embryo transfer versus 17% for couples not submitted to this technique. Gianroli et al.³⁰ compared the use of preimplantational genetic diagnosis (PGD) with a control group and reported a success rate of 22.5% for the PGD group versus 10.2% for the control group not submitted to PGD.

PLI has been described as an empirical treatment. Various studies have been published associating the use of PLI with a possible increase in pregnancy rates following *in vitro* fertilization^{23,24,25} and also with the formation of blocking antibodies^{16,26,27}. The results

of this study suggest that PLI contributes towards increasing pregnancy rates in assisted fertilization cycles.

The pregnancy rates described in the literature of 70.3%³¹ and 75%²³ following PLI in couples with failed implantation are comparable to the findings of the present study. Check et al.³¹ evaluated a group of 37 couples and reported a clinical pregnancy rate of 70.3% and a viable pregnancy rate of 51.3% for the treated group (PLI) compared to a clinical pregnancy rate of 45.9% and a viable pregnancy rate of 16.2% for the control group not submitted to PLI. These results are in agreement with the findings of the present study with respect to the viable pregnancy rate. In addition, the samples are similar, although the present study was merely descriptive. Since the present study did not include a control group, the effect of age versus the effect of PLI cannot be evaluated, which constitutes a limitation of the study and prevents any definitive conclusion to be made in this respect.

Wegener et al.²³ reported a clinical pregnancy rate of 75% in a group of 16 couples evaluated. In that study, 25% of the pregnancies resulted in miscarriage. The rate of miscarriage in the present study was lower (6%) and within the figures recorded for miscarriage in the general population. The study conducted by Check et al.³¹ failed to report the number of miscarriages. Since the sample size evaluated in the study carried out by Wegener et al. was smaller than that evaluated by Check et al. and smaller than that of the present study, this may have created a negative selection bias in their group. Another possibility that should be considered is that PLI was initially described as a

treatment for recurrent miscarriage and its effects may have played a protective role in avoiding possible losses related to immunological events.

The natural pregnancy rate without fertility treatment following PLI was 28% in the present study. Cahill et al. reported a natural pregnancy rate of 18% in fertility patients up to three years following IVF treatment.³² There have been no reports in the literature with respect to couples with implantation failures who were submitted to PLI. Nevertheless, it cannot be affirmed that PLI increases the occurrence of natural pregnancy following implantation failures, since no control group was included and this was not one of the objectives of the present study. Furthermore, the spontaneous pregnancy rate in other untreated groups is similar to that of around 20% reported by Cahill et al.³² for their previously treated patients^{33,34}. It must be emphasized that PLI should not be seen as an alternative to fertility treatment and that these pregnancies may have occurred by chance, as has been shown by other authors.

In the present study, there was a statistically significant difference between the mean age of the women who became pregnant and the mean age of those who did not, with the women in the latter group being significantly older (37.2 years), showing that age affects the success of fertility treatments. This finding was unsurprising, since maternal age is already known to be an important factor and its negative effect on treatment outcome has been widely discussed in the literature. With reference to the two studies that are comparable to the present one, the mean age of the women in the study conducted by Wegener et al.²³ was 33.7 years compared to 34.9 years in the study

conducted by Check et al.³¹ and 35.7 years in the present study. Nevertheless, those authors did not discuss the effect of age on the outcome of treatment in these studies.

Prematurity was the principal perinatal complication in this group (53%), with a rate of extreme prematurity (< 32 weeks of pregnancy) of 10%. Graner et al.³⁵ published a study in which prematurity was the principal maternal complication found in the pregnancies of women submitted to assisted fertilization treatments, with a rate of 65.5% (n = 22,065 deliveries). Other authors have reported similar figures, raising the hypothesis that women submitted to infertility treatment may include a sub-group of individuals with other factors that could increase rates of prematurity, either lifestyle-related factors, environmental factors or even an association of maternal pathologies.³⁶

The results obtained in this study and in other studies are encouraging and indicate a need to carry out a multicenter, randomized study to validate PLI, enabling it to be offered as a valid, rather than empirical, treatment to help couples undergoing assisted fertility treatment.

The route followed by couples requiring fertility treatment is long and arduous, exhausting and replete with frustrations; hence it is vital to continue the search for auxiliary treatments to increase the likelihood of success, investigating possibilities to evaluate whether or not they can be incorporated into the arsenal of therapeutic options.

References

- 1 Haggarty P, Mc Callum H, McBain H, Andrews K, Duthie S, Mc Neil G, Templeton A, Haites N, Campbell D, Bhattacharya S: Effect of B vitamins and genetics on success of in-vitro fertilisation: prospective cohort study. *Lancet* 2006; 367:1513-1519.
- 2 Qublan HS, Eid SS, Ababneh HA, Amarin ZO, Smadi AZ, Al- Khafaji FF, Khader YS: Acquired and inherited thrombophilia: implication in recurrent IVF and embryo transfer failure. *Hum Reprod* 2006; 21:2694-2698.
- 3 Volgsten H, Svanberg AS, Olsson P: Unresolved grief in women and men in Sweden three years after undergoing unsuccessful in vitro fertilization treatment. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2010; 89:1290-1297.
- 4 Toth B, Würfel W, Germeyer A, Hirv K, Makrigiannakis A, Strowitzki T: Disorders of implantation – are there diagnostic and therapeutic options? *J Reprod Immunol* 2011; 90:117-123.
- 5 Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demirel A, Gurgan T, Cutting R, Ong K, Sallam H, Li TC: Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online* 2014; 28:14-38.
- 6 Urman B, Yakin K, Balaban B: Recurrent implantation failure in assisted reproduction: how to counsel and manage. B. Treatment options that have not been proven to benefit the couple. *Reprod Biomed Online* 2005; 11:382-391.
- 7 Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S, Biagiotti R, Pellegrini S, Menicucci A, Baricordi OR: Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod* 2005; 20:138-146.

- 8 Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T: Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF- ET. *Hum Reprod* 2006; 21:3036-3043.
- 9 Makrigiannakis A, Petsas G, Toth B, Relakis K, Jeschke U: Recent advances in understanding immunology of reproductive failure. *J Reprod Immunol* 2011; 90:96-104.
- 10 Veenstra van Nieuwenhoven AL, Heineman MJ, Faas MM: The immunology of successful pregnancy. *Hum Reprod Update* 2003; 9:347-357.
- 11 Roussev RG, Coulam CB: HLA-G and its role in implantation (review). *J Assist Reprod Genet* 2007; 24:288-295.
- 12 Miko E, Manfai Z, Meggyes M, Barakonyi A, Wilhelm F, Varnagy A, Bodis J, Illes Z, Szekeres-Bartho J, Szereday L: Possible role of natural killer and natural killer T-like cells in implantation failure after IVF. *Reprod Biomed Online* 2010; 21:750-756.
- 13 Kalu E, Bhaskaran S, Thum MY, Vishwanatha R, Croucher C, Sherriff E, Ford B, Bansal AS: Serial estimation of Th1:Th2 cytokines profile in women undergoing in-vitro fertilization-embryo transfer. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59:206-211.
- 14 Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M: Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63:601-610.
- 15 Ng SC, Gilman-Sachs A, Thaker P, Beaman KD, Beer AE, Kwak-Kim J: Expression of intracellular Th1 and Th2 cytokines in women with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2002; 48:77-86.

- 16 Yokoo T, Takakuwa K, Ooki I, Kikuchi A, Tamura M, Tanaka K: Alteration of Th1 and Th2 cells by intracellular cytokine detection in patients with unexplained recurrent abortion before and after immunotherapy with the husband's mononuclear cells. *Fertil Steril* 2006; 85:1452-1458.
- 17 Hill JA, Polgar K, Anderson DJ: T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *JAMA* 1995; 273:1933-1936.
- 18 Chernyshov VP, Sudoma IO, Dons'koi BV, Kostyuchyuk AA, Masliy YV: Elevated NK cell cytotoxicity, CD158a expression in NK Cells and activated T lymphocytes in peripheral blood of women with IVF failures. *Am J Reprod Immunol* 2010; 64:58-67.
- 19 Yang KM, Ntrivalas E, Cho HJ, Kim NY, Beaman K, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J: Women with multiple implantation failures and recurrent pregnancy losses have increased peripheral blood T cell activation. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63:370-378.
- 20 Kwak-Kim J, Park JC, Ahn HK, Kim JW, Gilman-Sachs A: Immunological modes of pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63:611-623.
- 21 Coulam CB, Acacio B: Does immunotherapy for treatment of reproductive failure enhance live births? *Am J Reprod Immunol* 2012; 67:296-304.
- 22 Beer AE, Quebbeman JF, Ayers JW, Haines RF: Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortions in humans. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 141:987-999.
- 23 Wegener S, Schnurstein K, Hansch S, Briese V, Sudik R, Wegener R, Busecke A, Müller H: Immunotherapy with paternal lymphocytes for recurrent miscarriages and unsuccessful IVF treatment. *Transfus Med Hemother* 2006; 33:501-507.

- 24 Kling C, Steinmann J, Westphal E, Magez J, Kabelitz D: Adverse effects of intradermal allogeneic lymphocyte immunotherapy: acute reactions and role of autoimmunity. *Hum Reprod* 2006; 21:429-435.
- 25 Kling C, Steinmann J, Flesh B, Westphal E, Kabelitz D: Transfusion-related risks of intradermal allogeneic lymphocyte immunotherapy: single cases in a large cohort and review of the literature. *Am J Reprod Immunol* 2006; 56:157-171.
- 26 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; 296:161-172.
- 27 Wilczyński JR, Randwan P, Tchórzewski H, Banasik M: Immunotherapy of patients with recurrent spontaneous miscarriage and idiopathic infertility: does the immunization-dependent Th2 cytokine overbalance really matter? *Arch Immunol Ther Exp* 2012; 60:151-160.
- 28 Klipstein S, Regan M, Ryley DA, Goldman MB, Alper MM, Reindollar RH: One last chance for pregnancy: a review of 2,705 in vitro fertilization cycles initiated in women age 40 years and above. *Fertil Steril* 2005; 84:435-445.
- 29 Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Fortini D, Aicardi G, Montanaro N: Rescue of implantation potential in embryos with poor prognosis by assisted zona hatching. *Hum Reprod* 1998; 13:1331-1335.
- 30 Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munné S: Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fert Steril* 1999; 72:837-844.

- 31 Check JH, Liss JR, Check ML, Diantonio A, Duroseau M: Lymphocyte immunotherapy can improve pregnancy outcome following embryo transfer (ET) in patients falling to conceive after two previous ET. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2005; 32:21-22.
- 32 Cahill DJ, Meadowcroft J, Akande VA, Corrigan E: Likelihood of natural conception following treatment by IVF. *J Assist Reprod Genet* 2005; 22:401-405.
- 33 Collins JA, Burrows EA, Wilan AR: The prognosis for live birth among untreated infertile couples. *Fert Steril* 1995; 64:22-28.
- 34 Smeenk JM, Braat DD, Stolwijk AM, Kremer JA: Pregnancy is predictable: a large-scale prospective external validation of the prediction of spontaneous pregnancy in subfertile couples. *Hum Reprod* 2007; 22:2344-2345.
- 35 Graner VR, Barros SM: [Maternal complications and neonatal events associated to multiple pregnancies resulting from assisted reproduction techniques]. *Rev Enf USP* 2009; 43:103-109.
- 36 Epelboin S. [Children born of ICSI]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2007; 36 Suppl 3:S109-13.

5. Discussão

Os avanços na área da Medicina Reprodutiva evoluíram muito desde o nascimento do primeiro bebê de proveta em 1978, e ajudaram milhares de casais no mundo. Entretanto, a taxa de sucesso dos tratamentos de reprodução assistida gira em torno de 34%, podendo chegar a 10% em casos mais graves de infertilidade (16,17). Existe uma tendência mundial entre as mulheres de retardar a maternidade quer por escolhas próprias ou em função da vida profissional. Um estudo realizado por Klipstein et al., 2005 (75) demonstrou que o número de gestações entre as mulheres de 40 e 44 anos quase duplicou entre 1990 e 2002. Com o aumento da idade, a fecundidade natural e as taxas de gestação declinam fato observado também em procedimentos de reprodução assistida.

Existem vários fatores que juntos podem causar às falhas de implantação nos tratamentos de fertilização in vitro. Os mais citados e conhecidos na literatura médica são: a idade materna, qualidade embrionária, alterações anatômicas femininas, qualidade dos espermatozoides, e as causas imunológicas relativas a receptividade endometrial.

Para tentar corrigir as causas imunológicas, a ILP vem sendo recomendada por inúmeros centros do mundo para melhorar as taxas de sucesso nos tratamentos de fertilização in vitro (69,70,71), e também na formação de anticorpos (51,61,72). Até Dezembro de 2001 o tratamento imunológico com leucócitos paternos foi realizado sem nenhum problema ou restrição no mundo para tratar aborto recorrente e falhas de implantação nos tratamentos de FIV/ICS; Mas em 2001 um estudo realizado por Scott

(2001) e publicado na Cochrane Database questionando eficácia da imunoterapia, o FDA exigiu a partir de uma carta publicada em 2002 (Anexo 4) que os grupos que realizavam o tratamento nos Estados Unidos validassem a técnica através de projetos de pesquisas (76). Isso não foi feito por várias questões e a partir disso a terapia com leucócitos paternos foi interrompida. Apesar da polêmica gerada pela Cochrane, nos países da Europa e da Ásia não existe essa proibição ou exigência específica e a terapia é realizada e recomendada como forma de tratamento de abortamento recorrente de causa aloimune e em pacientes com falhas de fertilização in vitro. No Japão uma revisão recente revelou que 70% dos hospitais universitários e 80% das clínicas de reprodução humana prescrevem imunoterapia com leucócitos (77).

No Brasil, a terapia com leucócitos paternos foi introduzida por vários grupos na década de 90 e amplamente difundida. De acordo com o Conselho Regional de Medicina do estado de São Paulo (CREMSP - SP), Câmara Técnica de Reprodução Humana e Técnicas de Reprodução Assistida, a imunoterapia com linfócitos paternos não apresenta comprovação científica nos vários consensos internacionais sobre o tema. Desta forma, deve ser abordado como método experimental, devendo ter aprovação prévia em Comitê de Ética em Pesquisa/CONEP e ter o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Em Janeiro de 2012, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), seguindo esse parecer exigiu que a terapia com leucócitos paternos realizada no Laboratório Allovita fosse aplicada como parte de projetos de pesquisa. Portanto, os casais que iniciaram o tratamento a partir de fevereiro de 2012, o fizeram assinando consentimentos específicos para os projetos de pesquisa.

Até o momento, podemos afirmar que a ILP pode ser considerada uma boa opção terapêutica adjuvante nos casos de falhas de implantação em ciclos de FIV/ICSI.

6. Conclusões

- Em casais com pelo menos duas falhas de implantação em ciclos de FIV/ICSI após ILP a taxa de gravidez clínica foi de 61,5%, e a taxa de gestação viável foi 57,7%.
- A taxa de abortamento foi de 6%, portanto dentro dos limites de frequência de aborto espontâneo para a população geral.
- A prematuridade foi a principal complicação perinatal deste grupo (53%), sendo que a prematuridade extrema (menos 32 semanas) teve uma frequência de 10%.A taxa de gravidez com nascidos vivos foi de 96,6%.

7. Referências Bibliográficas

1. Mariani P, Schwartz D. Sterility and Fecundability estimation. 1983. J theor Biol 105:211-223.
2. Guttmacher AF. Factors affecting normal expectancy of conception. J Am Med Assoc. 1956 ;161(9):855-60
3. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. Hum Reprod 1992; 7:1342-6.
4. Armstrong S, Akande V. What the best treatment option for infertility women aged 40 and over? J Assist Repro Genet. 2013;30:667-671
5. Boivin J, Bunting L, Collins AJ, Nygren GK. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. Human Reproduction. 2007; 22(6): 1506–1512.
6. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine in collaboration with the Society for Reproductive Endocrinology and Infertility. Optimizing natural fertility. Fertil Steril 2008; 90(5): 60.
7. Scheffer BB, Scheffer BCFR, Scheffer BJ, Corona J. Fecundação in vitro. In: Scheffer B, Remohí J, Garcia-Velasco J, Pellicer A, Simón C. Reprodução humana assistida. São Paulo, Atheneu 2003.

8. Al-Moushaly A. Recent acquisitions in the medical treatment of infertility caused by Chlamydia Trachomatis. *J Medicine and Life*. 2013; 6(2):168-170.
9. Kim HM. Current Trends in Human IVF and other Assisted reproductive technologies. *Yonsei Medical journal*. 1990; 31(2).
10. Dzik A, Donadio FN, Esteves S, Nagy PZ. Reprodução Assistida/ Indicações e Tratamentos. In: Dzik A, Donadio FN, Esteves S, Nagy PZ. Atlas de reprodução humana. São Paulo, Segmento farma, 2012.
11. Kruger TF, Van der Merwe JP, Odendaal HJ, Stander FS, Grobler GM, Hulme VA, Erasmus EL, Coetzee K, Windt ML, Swart Y. The in vitro fertilisation programme at Tygerberg Hospital and the University of Stellenbosch. Five years' experience, April 1983 - January 1988. *S Afr Med J*. 1990; 77(12):634-6.
12. Ashrafi M, Rashidi M, Ghasemi A, Arabipour A, Daghighi S, Poursaghari P, Zolfaghari Z. The Role of Infertility Etiology in Success Rate of Intrauterine Insemination Cycles: An Evaluation of Predictive Factors for Pregnancy Rate. 2013 *International Journal of Fertility and Sterility*, 7 (2):580 – 88.
13. Haggarty P, Mc Callum H, McBain H, Andrews K, Duthie S, Mc Neil G et al. Effect of B vitamins and genetics on success of in vitro fertilization: prospective cohort study. *Lancet* 2006; 367: 1513 - 9.
14. Qublan HS, Eid SS, Ababneh HÁ, Amarin ZO, Smadi AZ, Al- Khafaji FF, Khader YS. Acquired and inherited thrombophilia: implication in recurrent IVF and embryo transfer failure. *Hum Reprod* 2006; 21(10): 2694-8.
15. Volgsten H, Svanberg AS, Olsson P. Unresolved grief in women and men in Sweden three years after undergoing unsuccessful in vitro fertilization treatment. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2010; 89 (10):1290-7.

16. Toth B, Würfel W, Germeyer A, Hirv K, Makrigiannakis A, Strowitzki T. Disorders of implantation--are there diagnostic and therapeutic options? *J Reprod Immunol*. 2011; 90 (1): 117-23.
17. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demirel A, Gurgan T, Cutting R, Ong K, Sallam H, Li TC. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online*. 2014; 28(1):14-38.
18. Polanski LT, Baumgarten MN, Quenby S, Brosens J, Campbell BK, Raine-Fenning NJ. What exactly do we mean by 'recurrent implantation failure'? A systematic review and opinion. *Reprod Biomed Online*. 2014; 28 (4): 409-23
19. Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable Blastocysts: a feasible proposition for Human IVF? *Hum Reprod Update* 1997; 3 (4):367-82.
20. Feil D, Henshaw RC, Lane M. Day 4 embryo selection is equal to Day 5 using a new embryo scoring system validated in single embryo transfers. *Hum Reprod* 2008; 23 (7):1505 – 10.
21. Urman B, Yakin K, Balaban B. Recurrent implantation failure in assisted reproduction: how to counsel and manage. B. Treatment options that have not been proven to benefit the couple. *Reprod Biomed Online*. 2005; 11(3):382-91.
22. Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S et al. Embryonic soluble HLA – G as a marker of development potential in embryos. *Hum Reprod* 2005; 20(1): 138 – 46.
23. Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T. Mini Review – Developments in Reproductive Medicine. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF- ET. *Hum Reprod* 2006; 21 (12): 3036 – 43.

24. Makrigiannakis A, Petsas G, Toth B, Relakis K. Recent advances in understanding immunology of reproductive failure. *J Reprod Immunol* 2011; 90: 96 – 104.
25. Guleria I, Sayegh MH. Maternal acceptance of the fetus: true human tolerance. *J Immunol* 2007; 178: 3345 – 51.
26. Medawar, PB. Some immunological and endocrinological problems raised by evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol.* 1953;7: 320-8.
27. Veenstra van Nieuwenhoven AL, Heineman MJ, Faas MM. The immunology of successful pregnancy. *Hum Reprod Update.* 2003; 9(4):347-57.
28. Diedrich K, Fauser BC, Devroey P, Griesinger G; Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update.* 2007; 13(4):365-77.
29. Singh M, Chaudhry P, Asselin E. Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones cytokines, and growth factors. *J Endocrinol.* 2011; 210 (1): 5 – 14.
30. Rizzo R, Vercammen M, Van de Velde H, Horn PA, Rebmann V. The importance of HLA-G expression in embryos, trophoblast cells, and embryonic sem cells. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68: 341-52.
31. Parham P, Norman PJ, Abi-Rached L, Hilton HG, Guethlein LA. Review: Immunogenetics of human placentation. *Placenta.* 2012; 26:71-80
32. Tang AW, Alfirevic Z, Quenby S. Natural killer cells and pregnancy outcomes in women with recurrent miscarriage and infertility: a systematic review. 2011. *Hum Reprod.*26(8):1971-80.

33. Quenby S, Nik H, Innes B, Lash G, Turner M, Drury J, Bulmer J. Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure. *Hum Reprod.* 2009, 24(1): 45-54.
34. Tuckerman E, Mariee N, Prakash A, Li TC, Laird S. Uterine natural killer cells in peri implantation endometrium from women with repeated implantation failure after IVF. *J Reprod Immunol.* 2010, 87 (1-(2):60-6.
35. Mariee N, Li TC, Laird SM Expression of leukaemia inhibitory factor and interleukin 15 in endometrium of women with recurrent implantation failure after IVF; correlation with the number of endometrial natural killer cells. *Hum Reprod.* 2012, 27 (7):1946-54.
36. Ivarsson MA, Loh L, Marquardt N, Kekäläinen E, Berglin L, Björkström NK, Westgren M, Nixon DF, Michaëlsson J. Differentiation and functional regulation of human fetal NK cells. *J Clin Invest.* 2013. 123 (9): 3889-901
37. Amodio G, Mugione A, Sanchez AM, Viganò P, Candiani M, Somigliana E, Roncarolo MG, Panina-Bordignon P, Gregori S. HLA- expressing DC – 10 and CD4 (+) T cells accumulate in human decidua during pregnancy. *Hum Immunol.* 2013; 74 (4):406-11
38. Dahl M, Hviid TV. Human leucocyte antigen class Ib molecules in pregnancy success and early pregnancy loss. *Hum Reprod Update.* 2012; 18 (1):92-109
39. Roussev RG, Coulam BC. HLA-G and its role in implantation (review). *J Assist Reprod Fert* 2007; 24: 288 – 295.
40. Vercammen MJ, Verloes A, Van de Velde H, and Haentjens P. Accuracy of soluble human leukocyte antigen-G for predicting pregnancy among women undergoing infertility treatment: Meta-analysis. *Hum Reprod update* 2008; 14 (3): 209-18.

41. Ghoudhury SR, Knapp LA. Human Reproductive failure I: Immunological factors. *Hum Reprod Update* 2000; 7 (2): 113- 34.
42. Van Mourik MSM, Macklon NS, Heijnen CJ. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *J Leukoc Biol* 2009; 85.
43. Ellis SA, Sargent IL; Redman CW, McMichel AJ. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. 1986. *Immunol*, 59,595-601.
44. Castro-Rendón WA, Castro – Álvarez JF, Guzmán – Martínez C, Bueno – Sanchez JC. Blastocyst – endometrium interaction: intertwining a cytokine network. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 1373 – 85.
45. Porcu – Buisson G, Lambert M, Lyonnet L, Loundou A, Gamberre M, Camoin-Jau L et al. Soluble MHC Class I chain-related molecule serum levels are predictive markers of implantation failure and successful term pregnancies following IVF. *Hum Reprod* 2007; 22 (8): 2261 – 6.
46. Clark DA, Chaouat G, Wong K, Gorczynski RM, Kinsky R. Tolerance mechanisms in pregnancy: a reappraisal of the role of class I paternal MHC antigens. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010, 63 (2): 93-103.
47. van Rood JJ, Eernisse JG, van Leeuwen A: Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature.* 1958; 181:1735–1736.
48. Payne R, Rolfs MR: Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J Clin Invest.* 1958; 37: 1756–1763.

49. Lashley OLEE, Meuleman T, Claas JHF. Beneficial or Harmful Effect of Antipaternal Human Leukocyte Antibodies on Pregnancy Outcome? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2013; 70:87–103.
50. 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. *RGOB*.1998; 20(2):83-89.
51. 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; 296:161 - 72.
52. Pandey MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet.* 2005; 272(2):95-108.
53. Lee JY, Lee M, Lee SK. role of endometrial immune cells in implantation. *Clin Exp Reprod Med.* 2011, 38 (3):119-25.
54. Ng SC, Gilman – Sachs A, Thaker P, Beaman KD, Beer AE, Kwak-Kim J. Expression of intracellular Th1 and Th2 cytokines in women with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2002; 48: 77 – 86.
55. Kalu E, Bhaskaran S, Thum MY, Vishwanatha R, Croucher C, Sherriff E et al. Serial Estimation of Th1:Th2 cytokines profile in Women undergoing *In – Vitro* fertilization – embryo transfer. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59: 206 – 11.
56. Miko E, Manfai Z, Meggyes M, Barakonyi A, Wilhelm F, Varnagy A, Bodis J, Illes Z, Szekeres-Bartho J, Szereday L. Possible role of natural killer and natural killer T-like cells in implantation failure after IVF. *Reprod Biomed Online.* 2010, 21(6):750-6.

57. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 601- 10.
58. Guerin RL, Prins RJ, Robertson AS. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Hum Reprod* 2009;15(5):517 – 535
59. Oreshkova T, Dimitrov R, Mourdjeva M. A cross-talk of decidual stromal cells, trophoblast, and immune cells: a prerequisite for the success of pregnancy. 2012. *Am J Reprod Immunol.* 68 (5): 366-73.
60. Szekeres-Bartho J, Polgar B. PIBF: the double edged sword. Pregnancy and tumor. *Am J Reprod Immunol.* 2010. 64 (2): 77-86.
61. Yokoo T, Takakuwa K, Ooki I, Kikuchi A, Tamura M, Tanaka K. Alteration of Th1 and Th2 cells by intracellular cytokine detection in patients with unexplained recurrent abortion before and after immunotherapy with husband's mononuclear cells. *Fertil Steril* 2006; 85 (5): 1452 – 8.
62. Hill JA, Polgar K, Anderson DJ. T-helper 1- type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. 1995. *JAMA.* 273(24):1933-6.
63. Kwak-Kim JYH, Chung-Bang HS, Ng SC, Ntrivalas EI, Mangubat CP, Beaman KD et al. Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with multiple implantation failures after IVF. *Hum Reprod* 2003; 18 (4):767 – 73.
64. Chernyshov P V, Sudoma O I, Dons'koi V B, Kostyuchyuk A A, Masliy V Y. Elevated NK Cell Cytotoxicity, CD 158a Expression in NK Cells and Activated T Lymphocytes in Peripheral Blood of Women with IVF Failures. *Am J Reprod Immunol* 2010; 64:58- 67.
65. Kwak-Kim J, Park CJ, Ahn KH, Kim WJ, Gilman-Sachs A, Immunological modes of Pregnancy Loss. *Am J Reprod Immunol.* 2010; 63:611-623.

66. Coulam CB, Acacio B. Does immunotherapy for treatment of reproductive failure enhance live births? *Am J of Reprod Immunol* 2012; 67: 296-303.
67. Kwak-Kim J, Han AR, Gilman-Sachs A, Fishel S, Leong M, Shoham Z. Current trends of reproductive immunology practices in in vitro fertilization (IVF) - a first world survey using IVF- Worldwide.com. *Am J Reprod Immunol*. 2013; 69(1):12-20.
68. 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.
69. Wegener S, Schnurstein K, Hansch S, Bolz M, Briese V, Sudik R et al. Immunotherapy with paternal lymphocytes for recurrent miscarriages and unsuccessful in vitro fertilization treatment. *Transfus Med Hemother* 2006; 33: 501 – 507.
70. Kling C, Steinmann J, Westphal E, Magez J, Kabelitz D. Adverse effects of intradermal allogenic lymphocyte immunotherapy: acute reactions and role of autoimmunity. *Hum Reprod* 2006; 21(2):429-35.
71. Kling C, Steinmann J, Flesh B, Westphal E, Kabelitz D. Transfusion – Related Risks of intradermal Allogeneic Lymphocyte Immunotherapy: single cases in a large Cohort and Review of the literature. *Am J Reprod Immunol* 2006; 56: 157-71.
72. Wilczyński JR, Randwan P, Tchórzewski H, Banasik M; Immunotherapy of Patients with Recurrent Spontaneous Miscarriage and idiopathic infertility: Does the immunotherapy – dependent Th2 cytokine overbalance really matter? *Arch. Immunol. Ther Exp*. 2012; 60: 151 - 60.
73. Würfel W, Fiedler K, Krüsmann G, Smolka B, von Hertwig I. Improving treatment outcome by LeukoNorm Cytochemia in patients with multiple, failed IVF or ICSI treatment cycles. *Zentralbl Gynakol*. 2001; 123(6):361-5.

74. Check JH, Liss ML, Check BA; Diantino A, Choe JK; Graziano BA. Leukocyte immunotherapy improves live delivery rates following embryo transfer in women with at least two previous failures: A retrospective review. *Clin Exp Obst & Gyn* 2005; 32 (2):85-8
75. Klipstein S, Regan M, Ryley DA, Goldman MB, Alper MM, Reindollar RH. One last chance for pregnancy: a review of 2,705 in vitro fertilization cycles initiated in women age 40 years and above. *Fertil Steril*. 2005; 84(2):435-45.
76. Scott JR. Immunotherapy for recurrent miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000; (2).
77. Takeshira T. Diagnosis and treatment of recurrent miscarriage associated with immunologic disorders: is paternal lymphocyte immunization a relief of the past? *J Nippon Méd Sch* 2004. 71: 308-13.

8. Anexos

8.1. Anexo 1 – FICHA CLÍNICA

FICHA DE COLETA DE DADOS

“Avaliação da imunoterapia com linfócitos paternos em casais com falhas de implantação após Fertilização *in vitro*”

HISTÓRICO À ÉPOCA DA ILP:

CASO n °: _____

Idade (Casal) ♀: _____ anos. ♂: _____ anos.

G _____ P _____ AE _____ AP _____ PRE _____ FV _____

Fator de Infertilidade: () Feminino: _____
() Masculino: _____
() Ambos: _____
() Sem causa conhecida.

Tratamentos prévios: () Inseminação: _____ ciclos
() FIV: _____ ciclos
() Outros: _____

IMUNOTERAPIA COM LINFÓCITOS PATERNOS:

Cross pré: CD3 (linf T) _____ % CD19 (linf B) _____ %

Número total de doses da ILP (para positivar o cross): _____

Cross pós: CD3 (linf T) _____ % CD19 (linf B) _____ %

FERTILIZAÇÃO IN VITRO APÓS IMUNOTERAPIA COM LINFÓCITOS PATERNOS:

Número de FIVs realizadas após a ILP: _____

Número e qualidade de embriões transferidos: _____

Gravidez: () Sim (após _____ ciclos de FIV) () Não

() Abortamento

() Parto: () normal () cesárea IG: _____ semanas

Peso ao nascimento: _____ g Apgar _____ / _____

Complicações pós-parto: () Não () Sim:

Nome: _____

DN: _____ / _____ / _____ REGISTRO: _____ CASO n °: _____

ENDEREÇO: _____

TELEFONES: () _____ () _____

8.2. Anexo 2 – PARECER CONSUBSTANCIADO

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do índice de gestações após imunoterapia com linfócitos paternos em casais que tiveram pelo menos duas falhas de implantação nos ciclos de Fertilização in vitro.

Pesquisador: Yvonne Klimesch

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 06085012.5.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP (Campus Campinas)

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 139.712

Data da Relatoria: 23/10/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa busca investigar o impacto da imunoterapia com linfócitos paternos sobre os resultados da fertilização in vitro (FIV) em mulheres que sofreram aborto após duas tentativas FIV.

Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa tem como objetivo avaliar o índice e a evolução das gestações após imunização com linfócitos paternos em casais com pelo menos duas falhas de implantação em ciclos de fertilização in vitro.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá risco para os sujeitos dado que a pesquisa utilizará os prontuários dos mesmos. E os benefícios estão relacionados as possibilidades de maior eficiência no processo de fertilização in vitro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O processo é de relevância na área da saúde, buscando encontrar soluções mais eficientes para o processo de fertilização in vitro. Apresenta metodologia pertinente, caracterizando-se como um estudo descritivo de corte transversal retrospectivo. Serão, então, levantados os prontuários de 50 pacientes da clínica Dr. Ricardo Barini com pelo menos dois ciclos de fertilização in vitro sem sucesso e que foram submetidas à imunoterapia antes de nova tentativa. Para a análise estatística

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



será utilizado o teste de regressão de Poisson e 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.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Uma vez que os sujeitos da pesquisa e seus prontuários pertencem a clínica do orientador da pesquisa, seria importante que a assinatura de consentimento de realização da mesma fosse de um outro médico também responsável (ou colaborador) pelo laboratório.

Recomendações:

Vale ressaltar ainda que na metodologia, por ser um estudo descritivo transversal seria importante colocar o período (tempo de quantos anos) de coleta dos dados, ou seja, especificar o tempo em anos dos prontuários a serem consultados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado pelo CEP em reunião realizada em 23 de outubro de 2012.

CAMPINAS, 06 de Novembro de 2012

Assinador por:
Carlos Eduardo Steiner
(Coordenador)

7.3 Anexo 3 - 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: **HIV1 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 – 200x10⁶ células/ml. Concentrações abaixo de 80x10⁶ ou acima de 500x10⁶ 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 frequentes 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 16^a 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.

7.4 - ANEXO 4 - CARTA DO FDA SOBRE O USO DA ILP

Lymphocyte Immune Therapy (LIT) Letter

**** Note: the correct CBER contact telephone number is 301-827-5102.**

Department of Health and Human Services
Public Health Service
Food and Drug Administration
1401 Rockville Pike
Rockville, MD 20852-1448

CERTIFIED MAIL
RETURN RECEIPT REQUESTED

January 30, 2002

Dear Colleague:

It has come to the attention of the United States Food and Drug Administration (FDA) that you may be administering allogeneic human cells as a therapy for recurrent miscarriage. This treatment is often referred to as lymphocyte immune therapy (LIT). We want to advise you that the FDA has jurisdiction over such cellular products, and to inform you regarding the FDA regulatory process governing such products. These products are regulated as biological products subject to licensing under Section 351 of the Public Health Service Act (PHS Act). These products also meet the definition of "drug" and are subject to the requirements of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FD&C Act). Therefore, until such time as there is an approved Biologics License Application for the product, administration of such cells or cellular products in humans can only be performed as part of clinical investigations, and then only if there is an Investigational New Drug application (IND) in effect.

Prior to authorizing investigations under an IND, FDA reviews manufacturing processes, preclinical and clinical data regarding the safety and efficacy of such cells, and measures to ensure the protection of human participants. Specific concerns regarding LIT therapy include the following:

- A report in the literature (THE LANCET Vol. 354, July 31, 1999, 365) indicates that women who have received LIT may have a higher incidence of subsequent miscarriage than women who did not receive such cellular products.
- Whether LIT uses cells/cellular products from the woman's partner or from other donors, the manufacturing/preparation and administration of such cells/cellular products presents risks to the recipient (e.g., administration of non-sterile cellular products, transmission of communicable diseases).

The regulations describing the submission and review of an IND, informed consent, and institutional review board requirements are found in Title 21 of the Code of Federal Regulations (CFR), Parts 50, 56, and 312. FDA has previously announced that these

requirements apply to cellular and tissue-based products in many public forums and in various documents available at <http://www.fda.gov/cber/>, including the following:

- A Federal Register (FR) notice describing FDA's regulatory approaches to cell and gene therapy products ("Application of Current Statutory Authorities to Human Somatic Cell Therapy Products and Gene Therapy Products," October 14, 1993, 58 FR 53248).
- A comprehensive regulatory program for the regulation of human cellular and tissue-based products ("A Proposed Approach to the Regulation of Cellular and Tissue-Based Products," February 28, 1997).
- A final rule describing requirements for the regulation of human cells, tissues, and cellular and tissue-based products, including reproductive cells and tissues (Final Rule: Establishment Registration and Listing for Manufacturers of Human Cellular and Tissue-Based Products, January 19, 2001, 66 FR 5447).

The FDA recognizes that some physicians and others involved in the administration of allogeneic cells or cellular products for prevention of miscarriages remain unaware that such activities require an IND. We remind all institutions, reproductive centers, and physicians with active programs of allogeneic cells or cellular products for treatments of miscarriages that you should refrain from performing any administration of such cells until an IND has been submitted and reviewed by the FDA's Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Such clinical research may proceed only when an IND is in effect.

An IND is to be submitted in triplicate to the following address:

Center for Biologics Evaluation and Research
Attn: Office of Therapeutics Research and Review
HFM-99, Room 200N
1401 Rockville Pike
Rockville, MD 20852-1448

The specific information required in an IND will depend upon the experimental system and the phase of study. Forms, regulations, guidances, and CBER Standard Operating Procedures and Policies (SOPPs) for INDs are available on our internet page at <http://www.fda.gov/cber/ind/ind.htm>. For assistance in preparing an IND submission, please contact Dr. Joyce Frey-Vasconcells at 301-817-5102.

Please advise Dr. Frey-Vasconcells (address as above) within 30 days whether or not you plan to submit an IND, and whether or not you plan to continue LIT in the absence of an IND.

Sincerely,

---- signature ----

Jay P. Siegel, M.D.
Director
Office of Therapeutics Research and Review
Center for Biologics Evaluation and Research