

Células *Natural Killer* Endometriais: Uma Caraterização por Citometria de Fluxo

(Versão Definitiva Após Defesa)

Alexandra Prioste Chambel

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2^o ciclo de estudos)

Orientador: Professor Doutor Luís Miguel Borrego
Co-orientadores: Professor Doutor Luís Taborda Barata
Professora Doutora Catarina Gregório Martins
Professor Doutor Jorge Lima

março de 2021

Elementos bibliográficos resultantes desta Dissertação

Abstract submetido ao Congresso SIC2021

Catarina Martins, Jorge Lima, Alexandra Chambel, Miguel Ângelo-Dias, Glória Nunes, Teresa Lopes, Luís Miguel Borrego. The Use of Flow Cytometry for the Characterization of Endometrial Immune Cells in Women with Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss. Submetido ao XVII Congresso da SIC (Iberian Society of Cytometry), 2021.

Agradecimentos

Mais uma etapa concluída no meu percurso académico, mais uma vitória para partilhar com todos os estiveram presentes até agora e sempre me demonstraram o seu apoio e carinho.

Em primeiro, começo por agradecer as meus orientadores Professor Doutor Miguel Borrego, Professor Doutor Luís Barata e Professor Doutor Jorge Lima por me terem proporcionado a oportunidade de trabalhar neste projeto, e em especial à Professora Doutora Catarina Martins que me acompanhou diariamente demonstrando sempre o seu carinho, suporte e dedicação.

Quero agradecer também a todos os que me receberam no laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, à Dra. Teresa, à Glória e à Filomena e em especial ao Miguel Dias que esteve sempre ao meu lado durante este percurso.

Aos meus amigos mais próximos, à Raquel, ao Nuno e à Paula que me acompanham desde criança, só espero continuar a aproveitar bons momentos e estar ao vosso lado nas vossas conquistas.

A toda a minha família agradeço com todo o meu coração, em especial aos meus pais, Luciana e José, que sempre me apoiaram e me deixaram seguir os meus sonhos, pelo amor incondicional e dedicação que me permitiu chegar onde estou hoje.

À minha irmã, Clara, que esteve sempre presente, desejo mais momentos de gargalhadas repletas de lágrimas de felicidade. Ao meu cunhado Bernardo, espero que a sua boa disposição continue a contagiar-nos a todos tornando todos os momentos mais leves e alegres.

Um agradecimento especial ao Igor, pelo amor, carinho e suporte, pelas memórias partilhadas, pelos sorrisos e por se manter sempre ao meu lado, acreditando em mim.

Resumo

As células do sistema imune presentes no endométrio parecem desempenhar um papel importante no processo de implantação e manutenção da gravidez. Neste ambiente imune uterino, as células NK parecem ser a população linfocitária prevalente. Estas células NK uterinas distinguem-se das células NK que circulam na periferia pelo seu fenótipo característico CD56^{bright}, apresentando uma menor capacidade citotóxica, uma maior capacidade de produção de citocinas e a expressão de um conjunto de recetores com capacidade para reconhecer moléculas expressas pelas células do trofoblasto. Porém, mulheres que sofrem de perdas gestacionais recorrentes parecem ter diferentes perfis imunes locais.

Existindo a necessidade de uma caracterização mais detalhada dos linfócitos presentes no endométrio, este estudo teve como objetivo primário a validação de uma estratégia detalhada de caracterização das populações de células NK e T em biópsias uterinas, através da análise multiparamétrica de imunofenotipagem por citometria de fluxo. Como objetivos secundários, pretendeu-se ainda estudar a possibilidade de implementar esta estratégia em mulheres com história de perdas gestacionais recorrentes de causa idiopática (PGRi) e identificar eventuais alterações no perfil imune, que se correlacionem com as diferentes características demográficas e obstétricas destas mulheres.

Foram assim recrutadas mulheres com PGRi, nas quais foi efetuada uma biópsia endometrial com o sistema *Pipelle*[®], entre os dias 7 e 10 após o pico de LH. Estas amostras foram depois divididas em replicados, processados em paralelo e analisados num citómetro de fluxo BD FACS Canto II. Para obter contagens absolutas de linfócitos endometriais foi utilizada uma estratégia de plataforma única com tubos *BD Trucount*[™] e, para a caracterização das populações linfocitárias T e NK, foi de seguida utilizado um painel de anticorpos monoclonais, que incluía: CD3, CD8, CD16, CD45, CD56, CD57, NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, 2B4 e PD-1.

Os resultados obtidos no estudo da reprodutibilidade da estratégia de contagens absolutas com tubos *BD Trucount*[™] demonstraram um coeficiente de variação médio de 7,61%. Estas amostras apontam para uma concentração de linfócitos uterinos entre 12,95 – 80,66 linfócitos/ μ L por centímetro de amostra em *Pipelle*. Através da análise imunofenotípica foram também identificadas as populações de linfócitos T, T CD8⁺, NK e NK CD56^{bright}. A percentagem destas populações em relação ao total de linfócitos apresentou um coeficiente de variação médio abaixo dos 15% entre replicados. A análise

mais detalhada das populações linfocitárias NK e T CD8⁺ permitiu identificar também boa reprodutibilidade (coeficientes de variação entre replicados inferiores a 14%) para a expressão de PD-1 e 2B4 em linfócitos T CD8⁺ e para a expressão de NKp46 e 2B4 em células NK.

Por outro lado, a imunofenotipagem permitiu identificar que, no grupo de mulheres recrutadas, a população endometrial mais prevalente eram os linfócitos T (34,75 – 76,88%), e dentro destes os linfócitos T CD8⁺ (39,33 – 67,81%). Quando se consideram as subpopulações de células T separadas, no entanto, as células NK são o compartimento mais prevalente na maioria das amostras. Nos linfócitos T CD8 observaram-se níveis de expressão de 2B4 e PD-1 entre 78,20 – 97,00% e 49,75 – 89,35%, respetivamente. As células NK evidenciaram ainda níveis de expressão de NKp46 e 2B4 entre 31,60 – 69,65% e 95,90 – 99,95%, respetivamente.

Foi ainda possível identificar uma correlação positiva entre a percentagem de células NK CD56^{bright} NKp46⁺ e o número de partos de termo e gestações anteriores, uma associação que se pretende explorar em estudos futuros. Finalmente, verificou-se também uma correlação positiva entre a percentagem de linfócitos T CD4⁺ uterinos e o IMC das mulheres estudadas, uma observação que deverá igualmente considerar-se em estudos futuros, reconhecendo até as crescentes interações que têm vindo a ser descritas entre o estado nutricional e as respostas imunes e inflamatórias.

A principal conclusão a retirar deste estudo é a aplicabilidade da citometria de fluxo na abordagem imunofenotípica de amostras endometriais. De facto, esta metodologia permite abordar com a reprodutibilidade necessária a quantificação celular, mas, sobretudo, permite uma caracterização multiparamétrica aprofundada dos perfis imunes uterinos. Esta técnica poderá assim assumir-se como uma ferramenta muito relevante a aplicar em contexto clínico no seguimento e tratamento de mulheres que sofrem de PGRI.

Palavras-chave

Células NK; Endométrio; Perda gestacional recorrente idiopática; Citometria de fluxo; Imunofenotipagem.

Abstract

The cells from the immune system present in the endometrium appear to have an important role in the implantation process and the maintenance of pregnancy. In this uterine immune environment, NK cells appear to be the prevalent immune population. These uterine NK cells are different from the NK cells that circulate in the periphery by their characteristic phenotype CD56^{bright}, lower cytotoxic capacity, higher production of cytokines and the expression of a set of receptors that recognize molecules expressed by trophoblastic cells. However, women suffering from recurrent pregnancy loss seem to have different local immune profiles.

Recognizing the need for a more detailed characterization of the lymphocytes present in the endometrium, this study aimed to validate a detailed strategy for the characterization of immune populations of NK and T cells in uterine biopsies using a multiparametric analysis of immunophenotyping by flow cytometry. Secondary objectives were the possibility to implement this strategy in women suffering from idiopathic recurrent pregnancy loss and to identify possible alterations in the immune profile that correlate with the demographic and obstetric characteristics of these women.

Women with idiopathic recurrent pregnancy loss were recruited, and a single endometrial biopsy was collected from each participant with the *Pipelle*[®] system, between days 7 and 10 after the LH peak. These samples were then divided in replicates, processed in parallel and analysed in a BD FACS Canto II flow cytometer. To obtain absolute counts of endometrial lymphocytes a single platform strategy was used with *BD Trucount*[™] tubes and, for the characterization of the immune populations of T and NK cells, the panel of monoclonal antibodies used afterwards included: CD3, CD8, CD16, CD45, CD56, CD57, NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, 2B4 e PD-1.

The results obtained in the reproducibility study for the absolute counts' strategy with *BD Trucount*[™] tubes revealed a mean coefficient of variation of 7,61%. These samples showed values of total lymphocytes between 12,95 – 80,66 lymphocytes/ μ L per centimetre of *Pipelle* sample. In the immunophenotypic analysis, the immune populations of T, T CD8⁺, NK and NK CD56^{bright} cells were identified. The percentages of these populations in total lymphocytes revealed a mean coefficient of variation below 15% between replicates. The more detailed analysis of the T and NK populations showed also good reproducibility (CV < 14% between replicates) for the expression of PD-1 and 2B4 in CD8⁺ T cells, and for the expression of NKp46 and 2B4 in NK cells.

Additionally, immunophenotyping identified T lymphocytes as the more prevalent immune population in the endometrium (34,75 – 76,88%), and within these, CD8⁺ T cells (39,33 – 67,81%). When considering the T cell subsets separated, however, NK cells were the more prevalent compartment in most samples. CD8⁺ T lymphocytes had levels of PD-1 and 2B4 expression around 49,75 – 89,35% and 78,20 – 97,00%, respectively. NK cells also showed levels of NKp46 and 2B4 expression around 31,60 – 69,65% and 95,90 – 99,95%, respectively.

Furthermore, a positive correlation was identified between the percentage of CD56^{bright} NKp46⁺ NK cells and the number of previous term deliveries and gestations, an association we intend to explore in future studies. Finally, a positive correlation between the percentage of CD4⁺ T lymphocytes and body mass index was also observed in these women, an observation that should be considered in future studies, also considering that increasing interactions have been recognized between the nutritional status and immune and inflammatory responses.

The main conclusion to be drawn from this study is the applicability of flow cytometry in the immunophenotypic approach of endometrial samples. In fact, this methodology allows the assessment of cell quantification with the necessary reproducibility, but above all, it allows for an in-depth multiparametric characterization of the uterine immune profiles. This technique can thus become a very relevant tool to be applied in the clinical context for the follow-up and treatment of women suffering from idiopathic recurrent pregnancy loss.

Keywords

NK cells; Endometrium; Idiopathic recurrent pregnancy loss; Flow cytometry; Immunophenotyping.

Índice

Lista de Figuras	xvi
Lista de Tabelas	xviii
Lista de Acrónimos	xx
Capítulo 1- Introdução.....	1
1.1. O Sistema Imune- Visão geral	1
1.1.1. Imunidade Inata.....	2
1.1.2. Apresentação de Antígenos.....	5
1.1.3. Imunidade Adaptativa	7
1.1.3.1. Células T	7
1.1.3.2. Células B	10
1.2. Células <i>Natural Killer</i> (NK)	11
1.2.1. Desenvolvimento e Expressão de Recetores das Células NK.....	11
1.2.2. Função das Células NK.....	15
1.3. O Sistema Imunológico e a Gravidez.....	17
1.4. Células Imunes Presentes no Endométrio e na Decídua Humana	20
1.5. Células <i>Natural Killer</i> Uterinas (uNK)	22
1.6. Células NK uterinas (uNK) e Perda Gestacional Recorrente Idiopática	24
Capítulo 2- Objetivos.....	27
Capítulo 3- Materiais e Métodos	29
3.1. População do estudo e aspetos éticos	29
3.2. Desenho do estudo	29
3.3. Citometria de fluxo	31
3.4. Protocolos Experimentais	34
3.4.1. Titulação dos Anticorpos Monoclonais e Compensações	34
3.4.2. Processamento das amostras	34
3.4.3. Obtenção de Contagens Absolutas de Linfócitos Endometriais	35
3.4.3. Imunofenotipagem das células NK e T endometriais	36
3.5. Estratégia de análise	37
3.6. Análise Estatística	41
Capítulo 4- Resultados e Discussão.....	43
4.1. Caracterização demográfica e obstétrica da população do estudo	43
4.2. Estudo da Reprodutibilidade das Contagens Absolutas dos Linfócitos Endometriais por Citometria de Fluxo.....	46

4.3. Estudo da Reprodutibilidade das Populações Linfocitárias Endometriais por Citometria de Fluxo.....	48
4.4. Populações Linfocitárias Endometriais em Mulheres com PGRI.....	51
Capítulo 5- Conclusões e Perspetivas Futuras	55
Referências Bibliográficas	57

Lista de Figuras

Figura 1- Interação entre as células dendríticas (DCs) e os linfócitos T naïve	6
Figura 2-Representação esquemática do desenvolvimento dos linfócitos T no timo.....	8
Figura 3- Hipótese <i>missing-self</i>	16
Figura 4- Estádios imunológicos durante a gravidez.....	20
Figura 5- Estratégia de análise para determinação de contagens absolutas.	37
Figura 6- Estratégia de análise para identificação de linfócitos e dobletes.	38
Figura 7- Estratégia de análise para identificação dos linfócitos T CD3 ⁺ , T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ , NK CD56 ⁺ e NK CD56 ^{bright}	39
Figura 8- Estratégia de análise para identificação dos marcadores 2B4, PD-1 e NKG2D nas células T CD8 ⁺	40
Figura 9- Estratégia de análise para identificação dos marcadores NKp44, NKp30, NKp46, 2B4 e NKG2D nas células NK.	40

Lista de Tabelas

Tabela 1- Anticorpos monoclonais usados para a caracterização de células NK e T.....	33
Tabela 2- Pannel de anticorpos monoclonais para imunofenotipagem das células NK e T.....	33
Tabela 3- Volume de monoclonais anticorpos usados no pannel de células NK e T.....	36
Tabela 4- Características demográficas e obstétricas do grupo de estudo de perda gestacional recorrente idiopática (PGRi).....	44
Tabela 5- Valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação relativos às contagens absolutas de linfócitos endometriais para cada amostra.....	47
Tabela 6- Valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação relativos às percentagens das populações linfocitárias T, T CD8 ⁺ , NK e NK CD56 ^{bright} caracterizadas em cada amostra.....	48
Tabela 7- Valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação relativos aos marcadores 2B4, PD-1 e NKG2D na população de linfócitos T CD8 ⁺ de cada amostra.....	49
Tabela 8- Valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação relativos aos marcadores NKp44, NKp30, NKp46 na população de células NK em cada amostra.....	50
Tabela 9- Valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação relativos aos marcadores 2B4 e NKG2D na população de células NK em cada amostra.....	51
Tabela 10- Populações linfocitárias endometriais em mulheres com PGRi.....	52

Lista de Acrónimos

μL	Microlitro
ADCC	Citotoxicidade Celular Mediada por Anticorpos
AICD	Morte Celular Induzida por Ativação
Ang	Angiopietina
APCs	Células Apresentadoras de Antígeno
BAFF	Fator de ativador de células B
BCR	Recetor das Células B
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
cDC	Células Dendríticas convencionais
CV	Coefficiente de Variação
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Lesões
DC	Célula Dendrítica
DIU	Dispositivo Intrauterino
DN	Timócitos Duplos Negativos
DNAM-1	Molécula acessória DNAX-1
dNK	Células NK decíduais
DP	Timócitos Duplos Positivos
ECP	Proteína Catiónica Eosinofílica
EDN	Neurotoxina Derivada de Eosinófilos
EPO	Peroxidase Eosinofílica
EVT	Trofoblasto Extraviloso
FADD	<i>Fas associated death domain</i>
FasL	Fas ligando
FcεRI	Recetor de alta afinidade para a IgE
G-CSF	Fator de Estimulação de Colónias Granulocíticas
GM-CSF	Fator de Estimulação de Colónias Granulocítico-magrofágicas
hCG	Gonadotrofina Coriónica humana
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN	Interferão
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ILCs	Células Linfóides Inatas

IMC	Índice de Massa Corporal
iNKT	Células <i>Natural Killer</i> T invariantes
ITAM	<i>Tirosine-based activating motifs</i>
ITIM	<i>Tyrosine-based inhibition motifs</i>
iTreg	Células T reguladoras induzidas
KIR	<i>Killer-cell immunoglobulin-like receptor</i>
LFA	<i>Lymphocyte-associated molecule</i>
LH	Hormona Luteinizante
LILR	<i>Leukocyte immunoglobulin-like receptor</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAC	Complexo de Ataque à Membrana
MBP	Proteína Básica Major
M-CSF	Fator de Estimulação de Colónias Macrofágicas
mg	Miligrama
MHC I	Complexo Major de Histocompatibilidade classe I
MHC II	Complexo Major de Histocompatibilidade classe II
MICA	<i>MHC class I-related protein A</i>
MICB	<i>MHC class I-related protein B</i>
mL	Mililitro
MO	Medula Óssea
NCRs	Recetores de Citotoxicidade Natural
NETs	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
NF-κB	Fator nuclear κB
NK	<i>Natural Killer</i>
NKT	<i>Natural Killer T</i>
nTreg	Células T reguladoras naturais
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patogénios
PD-1	<i>Programmed cell death 1</i>
pDCs	Células Dendríticas plasmocitóides
PD-L	<i>Programmed cell death ligand</i>
PGR	Perda Gestacional Recorrente
PGRi	Perda Gestacional Recorrente idiopática
PIFB	<i>Progesterone-induced blocking factor</i>
pNK	Células NK periféricas
PPRs	Recetores de Reconhecimento de Padrões
RIF	Falhas de Implantação Recorrentes
RORγt	<i>Retinoid Related Orphan Receptor</i>

rpm	rotações por minuto
SHP1	<i>Src-homology 1 domain</i>
SHP2	<i>Src-homology 2 domain</i>
SI	Sistema Imune
SP	Timócitos Simples Positivos
TAP	Transportador de péptidos- <i>Transporter associated with Antigen Processing</i>
TCR	Recetores das Células T
Tfh	Células T <i>helper</i> foliculares
TGF	Fator de Crescimento Tumoral
Th	Células T <i>helper</i>
TLR	Recetor <i>Toll-like</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Treg	Células T reguladoras
ULBP	<i>UL16-binding proteins</i>
uNK	Células NK uterinas
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Capítulo 1- Introdução

1.1. O Sistema Imune- Visão geral

Do sistema imune (SI) fazem parte uma grande variedade de células e moléculas que evoluíram ao longo do tempo para a proteção contra microrganismos patogénicos e células cancerígenas. O sistema imune divide-se em dois tipos principais de resposta: a resposta imune inata como primeira linha de defesa e a resposta imune adaptativa, que sendo ativada pela resposta imune inata vai complementar a sua ação inicial. Estas respostas diferem entre si em características como o tempo e a duração da resposta, o tipo de células efectoras, os seus recetores e a sua especificidade (1).

O sistema imune inato utiliza recetores de reconhecimento de padrões (PPRs- *Pattern Recognition Receptors*) para reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs- *Pathogen Associated Molecular Patterns*) e células lesadas (DAMPs- *Damage Associated Molecular Patterns*). A família mais caracterizada de PPRs é a família dos recetores *Toll-like* (TLRs) que se encontram distribuídos por uma variedade de células do SI (2). Nos humanos, estão identificados já cerca de dez TLRs (TLR1-TLR10), que se podem localizar na superfície celular ou em compartimentos intracelulares. Os recetores TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 são expressos na membrana plasmática e estão envolvidos sobretudo na deteção de produtos bacterianos no espaço extracelular, enquanto os recetores TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 estão incorporados em compartimentos endocíticos, onde podem reconhecer ácidos nucleicos de origem viral e bacteriana. O TLR1 forma heterodímeros funcionais com o TLR2, enquanto que o TLR2 pode formar heterodímeros também com o TLR6 e TLR10 (3). Não sendo exclusiva, a expressão destes recetores é muito importante nas células da resposta inata, como os neutrófilos e os macrófagos, ou mesmo nas células dendríticas que fazem depois a ligação com a resposta adaptativa.

As células especializadas do SI adaptativo, são os linfócitos T e B, que permitem o reconhecimento específico de antígenos e passam a responder por processos de amplificação clonal, diferenciação celular e produção de anticorpos específicos (4). A forma de reconhecimento da resposta adaptativa é diferente porque assenta em recetores específicos presentes nos linfócitos T (TCR) e nos linfócitos B (BCR). Enquanto os linfócitos B reconhecem antígeno na sua forma nativa e estão envolvidos na imunidade humoral através da produção de anticorpos, os linfócitos T reconhecem fragmentos do antígeno associado às proteínas do complexo major de histocompatibilidade (MHC) e são responsáveis pela imunidade celular e também desempenham funções reguladora (5).

Por outro lado, o sistema imune adaptativo tem ainda a capacidade de recordar contactos anteriores com agentes patogénicos (memória imunológica). Desta forma, num contacto posterior, os agentes patogénicos podem ser eliminados de forma mais rápida e eficaz (4).

1.1.1. Imunidade Inata

Nos humanos, a primeira linha de defesa contra agentes patogénicos é constituída pelas barreiras fisiológicas como a pele e as mucosas. Quando o SI encontra um agente patogénico, vai responder imediatamente para o tentar destruir ou remover do hospedeiro. Desta fase inicial da resposta fazem parte diferentes tipos celulares como os neutrófilos, os basófilos, os eosinófilos, os mastócitos, os macrófagos, as células dendríticas (DCs), as células linfóides inatas (ILCs) que se dividem em três grupos (ILC1, ILC2 e ILC3) onde estão incluídas as células *Natural Killer* (NK) e ainda o sistema do complemento. Os neutrófilos, os basófilos e os eosinófilos representam os granulócitos, que na fase inicial da infeção induzem inflamação e vasodilatação dos vasos sanguíneos, permitindo um rápido influxo de células imunes (6, 7).

Os neutrófilos representam cerca de 50% a 70% dos leucócitos circulantes, sendo gerados na medula óssea (MO) a partir dos seus precursores mielóides, processo este controlado pelo fator de estimulação de colónias granulocíticas (G-CSF) (8). Até serem recrutados para o local da inflamação, os neutrófilos podem circular livremente pelo sangue ou rolar ao longo do endotélio vascular. Os neutrófilos que são recrutados para os tecidos fagocitam os microrganismos através da emissão de pseudópodes (projeções da membrana citoplasmática) à volta da partícula que dão origem então a uma vesícula, o fagossoma. Esta estrutura funde-se com os grânulos citoplasmáticos do neutrófilo, formando um fagolisossoma. A morte dos organismos no interior do fagolisossoma ocorre pela combinação de dois mecanismos: uma resposta dependente de oxigénio, que envolve a redução do oxigénio pela NADPH oxidase, levando à produção de metabolitos de oxigénio tóxicos, e uma resposta independente de oxigénio, que utiliza proteínas catiónicas altamente citotóxicas e enzimas contidas nos grânulos (9). Para além destes mecanismos, os neutrófilos conseguem ainda expulsar os seus conteúdos nucleares (o ácido desoxirribonucleico (ADN) e histonas) num complexo com grânulos e proteínas citoplasmáticas para o espaço extracelular. Estas estruturas conhecidas como armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs- *Neutrophil Extracellular Traps*) têm a capacidade de conter diferentes tipos de microrganismos e partículas, incluindo vírus (10).

Os eosinófilos representam entre 1% a 3% dos leucócitos circulantes, e para a sua estimulação, diferenciação e maturação são essenciais a IL- 3, a IL-5 e o fator de estimulação de colónias granulocítico-magrofágicas (GM-CSF). Estas células contêm

grânulos com substâncias tóxicas como a proteína básica major-1 e -2 (MBP-1 e MBP-2), a peroxidase eosinofílica (EPO), a proteína catiónica eosinofílica (ECP) e a neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), cujo conteúdo é libertado quando a célula é ativada. Têm atividade antiparasitária contra helmintas, devido à elevada citotoxicidade da MBP contra estes (11).

Os basófilos representam menos de 1% dos leucócitos presentes no sangue periférico. Também originários de progenitores hematopoiéticos CD34⁺, os basófilos diferenciam-se e maturam na MO. A expressão de recetores de quimiocinas e integrinas permite-lhes infiltrar os tecidos inflamados. No citoplasma contêm grânulos basofílicos e na sua superfície celular expressam o recetor de alta afinidade para a imunoglobulina (Ig)E, o recetor FcεRI. A ligação de antígenos a moléculas de IgE ancoradas nos recetores dos basófilos, induz a sua desgranulação e libertação de IL-4, IL-13, histamina e leucotrienos, sendo a histamina o mediador encontrado em maior número nos grânulos destas células. Por isso, os basófilos têm um papel importante em processos alérgicos e também na defesa contra parasitas (12, 13).

Os mastócitos parecem ser também de origem hematopoiética e encontram-se principalmente em locais potenciais de entrada dos agentes patogénicos e de possível contacto com outras substâncias, como a pele, as mucosas do trato respiratório e do trato gastrointestinal. Ao contrário de outras células de origem hematopoiética, estas migram para a corrente sanguínea como células progenitoras imaturas e é aí que vão maturar (14). Estas células são de especial importância em reações de anafilaxia induzidas por antígenos e em respostas alérgicas, devido à expressão do recetor FcεRI na sua superfície. À imagem do que acontece com o basófilo, também o mastócito desgranula, após estimulação pela ligação de antígenos às IgEs ancoradas nos seus recetores. Nesta desgranulação são libertados para o espaço extracelular mediadores como a histamina, a serotonina, a triptase, a heparina e também citocinas e fatores de crescimento (15).

Os monócitos, com origem em progenitores na MO, entram na corrente sanguínea e posteriormente migram para os tecidos, onde se diferenciam em macrófagos sob a influência de fatores de crescimento, de citocinas pró-inflamatórias e de produtos microbianos. Os macrófagos fagocitam agentes patogénicos, *debris*, células mortas e infetadas, produzem citocinas, e têm também a capacidade de apresentar antígenos através das suas moléculas do MHC. Apesar destas células serem essenciais para a homeostasia e para o controlo de infeções, podem também contribuir para danos teciduais e para a fisiopatologia de doenças inflamatórias e infecciosas (16). A ontogenia dos macrófagos tem vindo a ser debatida, uma vez que tem sido sugerido que algumas populações poderão ter uma origem embrionária, no saco vitelino, anterior à formação das primeiras células estaminais hematopoiéticas, ficando as populações estabelecidas antes

do nascimento e mantendo-se durante toda a vida adulta (17). A polarização dos macrófagos nos diferentes fenótipos M1 e M2 depende dos estímulos que recebem, modulando as suas respostas. Enquanto os macrófagos M1, são classicamente classificados como tendo um fenótipo pró-inflamatório, os macrófagos M2 são considerados anti-inflamatórios. Os macrófagos M1 têm uma elevada atividade fagocítica e são caracterizados pelos marcadores CD64 e CD80. Produzem citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-23, fator de necrose tumoral (TNF)- α , interferão (IFN) de tipo I e quimiocinas. Já os macrófagos M2 estão particularmente envolvidos em infecções de fungos e helmintas, sendo induzidos pelo fator de estimulação de colónias macrofágicas (M-CSF), e pelas citocinas IL-4, IL-10 e IL-14. Estes macrófagos, além de outros fatores, produzem IL-8 para recrutarem neutrófilos, monócitos e linfócitos T conduzindo uma resposta anti-inflamatória. Os macrófagos têm efeitos moduladores, regulando negativamente citocinas pró-inflamatórias e induzindo a produção de mediadores anti-inflamatórios como a IL-4, a IL-10 e o fator de crescimento tumoral (TGF)- β (18).

As células dendríticas (DC) representam uma família heterogênea de células mieloides reconhecidas pelas suas funções como células apresentadoras de antígeno (APCs) e produtoras de citocinas, mas também com um subgrupo de células que derivam do progenitor linfóide, chamadas de células dendríticas plasmacitoides, com funções importantes na resposta anti-viral. As células dendríticas representam entre 2 a 4% do total de leucócitos presentes nos tecidos e estão divididas em diferentes subconjuntos de acordo com a sua localização, expressão de proteínas de superfície e funcionalidade. Tipicamente, as células dendríticas são então divididas em duas classes: DC plasmocitoides (pDC), que produzem grandes quantidades de IFN tipo I em resposta a infecções virais, e DC convencionais (cDC), que são fortes APCs, em particular para a ativação de células T naïve (19). Após o seu desenvolvimento na MO, as DC passam para a corrente sanguínea e para tecidos linfóides e não-linfóides como DC imaturas, com elevada capacidade endocítica e fagocítica. Migram para regiões inflamadas em resposta a quimiocinas, e aí conseguem reconhecer PAMPs através dos diferentes PRRs que expressam, incluindo a família dos recetores TLR. Para a aquisição do fenótipo de DC maduras, as DC perdem alguns recetores e passam a expressar níveis elevados de moléculas do complexo de histocompatibilidade major de classe II (MHC II) e de moléculas de co-estimulação, como o CD40, o CD80 e o CD86, sofrendo também modificações na sua morfologia (20).

Mais recentemente foram descritas as ILCs que parecem possuir funções semelhantes aos linfócitos T da resposta imune adaptativa. As ILCs dividem-se em três linhagens principais: ILC1, ILC2 e ILC3 de acordo com a sua capacidade para produzir citocinas tipo 1, tipo 2 e tipo 17, respetivamente. As células *Natural Killer* (NK) estão incluídas dentro das ILCs, representando cerca de 5 a 20% das células linfóides em circulação, são

reconhecidas pela mediação de respostas antitumorais e antivirais. Nos humanos, são caracterizadas pela expressão dos recetores CD16 e CD56, adquirindo funções citotóxicas idênticas às dos linfócitos T CD8⁺ (21).

O complemento é um sistema que engloba um grande número de proteínas presentes no plasma e nas superfícies celulares. Estas proteínas organizam-se em cascatas proteolíticas hierárquicas, iniciadas pela identificação de superfícies patogénicas. A partir da ativação desta cascata geram-se mediadores pró-inflamatórios (anafilotoxinas) e ainda o processo de opsonização das superfícies patogénicas, mediado por opsoninas como a C3b. O objetivo final é a lise da superfície patogénica através da formação do complexo de ataque à membrana (MAC). O sistema do complemento pode ser ativado por três vias: a via clássica, a via das lectinas e a via alternativa (22).

1.1.2. Apresentação de Antígenios

As APCs fazem a ligação entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa, podendo dividir-se em APCs profissionais e não profissionais. Dentro das APCs profissionais estão englobadas as DCs, os macrófagos e as células B. De especial importância são as DCs, que podem migrar para os gânglios linfáticos para promover a ativação de linfócitos T naïve (23).

Os antígenios intracelulares (de origem bacteriana, viral, de outros parasitas, ou mesmo antígenios tumorais) podem ser apresentados às células T CD8⁺ sob a forma de péptidos associados a moléculas de MHC I, expressas pelas células nucleadas. Para a apresentação através do MHC de classe I é necessária a degradação dos antígenios em péptidos no citosol através do proteossoma. Estes péptidos são depois transportados para o retículo endoplasmático, com o auxílio do transportador de péptidos (TAP), onde vão associar-se às moléculas de MHC I recentemente sintetizadas. Este complexo péptido/MHC I é transportado para a membrana plasmática para posterior apresentação aos linfócitos T CD8⁺ de modo a iniciar respostas citotóxicas específicas para o antígeno reconhecido através do complexo péptido/MHC I.

Já as moléculas do MHC II apresentam antígenios exógenos degradados através da via endocítica aos linfócitos T CD4⁺, sendo o IFN- γ a principal citocina responsável pela indução da expressão de MHC II. Depois de internalizados e processados nestes compartimentos, os antígenios degradados podem ser apresentados sob a forma de complexos péptido/ MHC II expostos na superfície de DCs, macrófagos e linfócitos B. Em determinadas circunstâncias, estes complexos podem também ser expressos em alguns tipos de células epiteliais e endoteliais. A ativação dos linfócitos T CD4⁺ vai por sua vez levar à produção de diferentes tipos de citocinas que conduzem à eliminação dos agentes

patogénicos previamente internalizados pelos macrófagos e também à produção de anticorpos específicos pelos linfócitos B (24).

As DCs possuem ainda a capacidade de apresentação de péptidos exógenos nas moléculas de MHC I aos linfócitos T CD8 num processo conhecido como apresentação cruzada. (25).

No entanto, para que ocorra uma resposta pelas células T, é necessário mais do que o reconhecimento dos complexos péptido/MHC, nomeadamente são necessários sinais adicionais como a secreção de citocinas e a sinalização através de moléculas co-estimuladoras (24). O sinal 1 é então a ligação do TCR ao complexo péptido/ MHC. No caso de o único sinal para a ativação do linfócito T naíve ser o sinal 1 o linfócito entra em anergia. O sinal 2 é o sinal co-estimulatório da ligação entre as moléculas CD28, expressas pelas células T e as moléculas CD80 e/ou CD86, expressas pelas APCs. Por último, o sinal 3 permite determinar qual a subpopulação de linfócitos T que se irá formar através da produção de citocinas específicas representativas de cada subpopulação (Figura 1) (26).

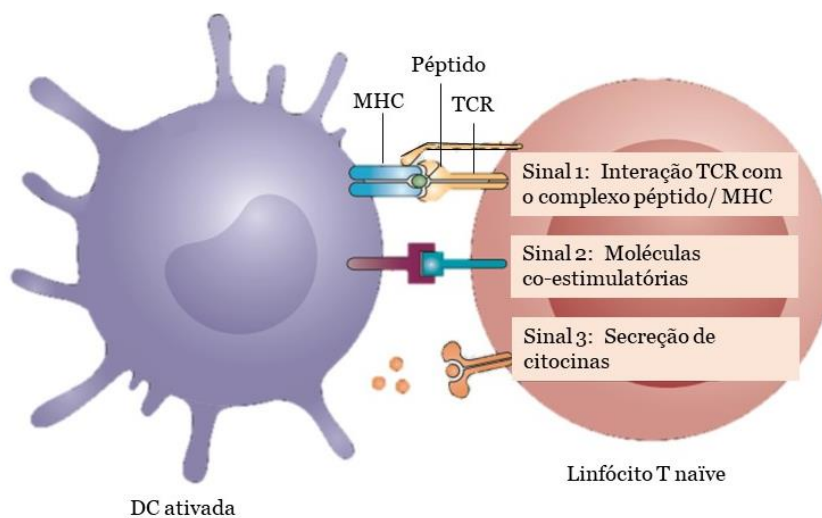


Figura 1- Interação entre as células dendríticas (DCs) e os linfócitos T naíve. Adaptado de Kambayashi T (23)

Dependendo da natureza da ativação, os linfócitos T podem diferenciar-se em subpopulações funcionais que incluem os linfócitos T CD8+ citotóxicos (CTLs) com capacidade para destruir células infetadas ou em stress, mas também as diversas subpopulações de linfócitos T CD4+ *helper* que se descrevem detalhadamente abaixo (27).

1.1.3. Imunidade Adaptativa

A resposta imune adaptativa desenvolveu-se ao longo do tempo, formando linfócitos T e B para melhorar o sistema de defesa imune. Estes linfócitos possuem recetores de superfície específicos, os recetores de células B ou imunoglobulinas (Igs) de superfície, nos linfócitos B e recetores de células T (TCRs) nos linfócitos T. Estes recetores de reconhecimento de antígenos, ao contrário dos recetores nas células da imunidade inata, apresentam elevada especificidade para os antígenos que reconhecem (28).

1.1.3.1. Células T

Os linfócitos T originam das células estaminais hematopoiéticas que migram para o timo, onde dependem dos sinais das células epiteliais tímicas e dos fibroblastos mesenquimais para se desenvolverem. Ao longo da sua diferenciação, os timócitos são caracterizados pela expressão das proteínas de superfície como o CD4, o CD8, o CD44 e o CD25. Os precursores que entram no timo não expressam CD4 nem CD8 e são por isso chamados de duplos negativos (DN). Estas células progenitoras entram no timo na zona cortico-medular e movimentam-se pelo córtex passando pelos estádios DN1 (CD44⁺ CD25⁻) e DN2 (CD44⁺ CD25⁺), e depois na zona subcapsular entram no estágio DN3 (CD44⁻ CD25⁺). É na passagem do estágio DN2 para DN3 que ocorre o rearranjo dos loci γ , δ e β do TCR, formando duas possíveis linhagens das células T: $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$.

As células T $\alpha\beta$ passam por um processo chamado de seleção β , em que os precursores $\alpha\beta$ que sofreram um correto rearranjo dos genes da cadeia β do TCR, formam o complexo pré-TCR (*T cell receptor*), composto pelo CD3, pela cadeia β do TCR e por uma cadeia pré-TCR α invariante. Quando este complexo do pré-TCR é funcional, os timócitos continuam o seu processo de maturação para o estágio DN4 (CD44⁻ CD25⁻) e iniciam o rearranjo do locus α após a sinalização pelo pré-TCR. Nesta fase, os timócitos DN4 começam a migrar para a zona medular e adquirem o fenótipo duplo positivo (DP), com co-expressão de CD4⁺ e CD8⁺. Após o rearranjo dos genes da cadeia alfa forma-se então um TCR $\alpha\beta$ à superfície do timócito DP. A especificidade e a força da ligação do TCR $\alpha\beta$ ao MHC determinam agora a sua sobrevivência e diferenciação celular. Os timócitos DP com afinidade intermédia a forte para os complexos péptido/MHC presentes nas células epiteliais corticais sofrem seleção positiva, e sobrevivem. A seleção positiva será também importante para a definição e seleção de linhagem dos timócitos, de modo a tornarem-se timócitos simples positivos (SP) CD4⁺ CD8⁻ ou CD4⁻ CD8⁺. Já na medula tímica os timócitos SP continuam a interação com os complexos péptido/MHC, mas agora os timócitos com elevada afinidade para os antígenos *self* sofrem seleção negativa e são destruídos por apoptose, de forma a que sejam eliminados do repertório linfócitos T autoreativos (Figura 2). Este mecanismo de seleção permite que apenas os linfócitos que

possuem um TCR funcional migrem para a periferia onde irão circular como linfócitos T maduros.

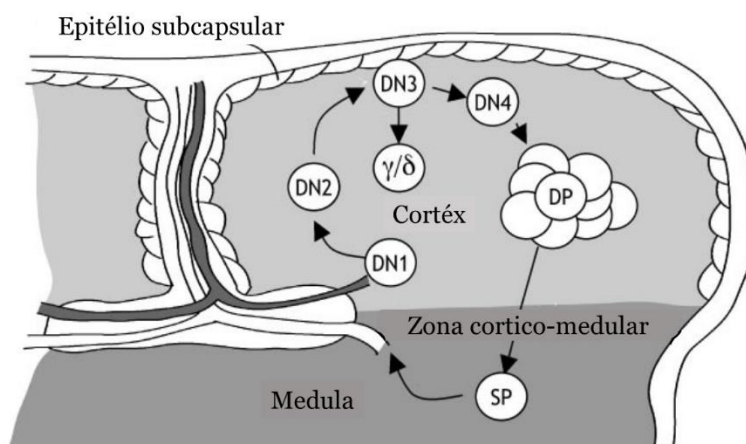


Figura 2-Representação esquemática do desenvolvimento dos linfócitos T no timo. Adaptado de Starr T. *et al.* (30).

No entanto, alguns linfócitos T autoreativos podem escapar aos mecanismos de tolerância central e migrar para a periferia. Por isso, existem ainda outros mecanismos para prevenção da autoimunidade, os mecanismos de tolerância periférica. Um dos mecanismos da tolerância periférica é a anergia, em que os linfócitos com capacidade para reconhecer antígenos do próprio deixam de conseguir responder funcionalmente. É um mecanismo que depende do estímulo recebido para a ativação dos linfócitos T, uma vez que os linfócitos entram em anergia caso a sinalização pelo TCR se encontre alterada ou na ausência do sinal co-estimulatório (29-31).

Neste mecanismo de regulação dos linfócitos T estão envolvidas moléculas como o CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4*) e o PD-1 (*programmed cell death protein 1*). Como já referido anteriormente, para a ativação dos linfócitos T são necessários sinais co-estimulatórios, em que as moléculas CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) presentes nas APCs se ligam às moléculas CD28 presentes nos linfócitos T. Esta sinalização permite a proliferação e sobrevivência dos linfócitos T à periferia. O CTLA-4 é um homólogo do CD28, com uma maior afinidade para se ligar aos recetores B7. Porém, a sua ligação não produz um sinal estimulador como acontece com a ligação do CD28. Pelo contrário, a ligação CTLA-4/B7 tem uma ação inibidora da ativação. A competição pela ligação das moléculas CD28 e CTLA-4 aos recetores B7 vai determinar se os linfócitos T sobrevivem ou entram em anergia (32). A ligação do CTLA-4 ao B7 diminui também a expressão dos recetores B7 nas APCs diminuindo a interação CD28-B7. O PD-1 é também um recetor

inibidor que ao ligar-se aos respetivos ligandos PD-L1 ou PD-L2 inibe a sinalização do TCR (31).

Após a apresentação de antígenos pelas APCs, as células T CD4⁺ naïve têm então capacidade para se diferenciarem numa variedade de células efetoras, onde se incluem as células Th1, Th2, Th17, Tfh e Treg. As células Th1 caracterizam-se pela produção de IFN- γ e estão envolvidas na imunidade celular contra microrganismos intracelulares. A sua diferenciação ocorre através dos fatores Stat4, Stat1 e T-bet. Já a diferenciação das células Th2 depende da ação dos fatores GATA3 e Stat6, sendo estas células produtoras de IL-4, IL-5 e IL-13. Atuando sobretudo na imunidade humoral contra helmintas e agentes patogénicos extracelulares. As células Th17 produzem IL-17A, IL-17F e IL-22 e são responsáveis pelas respostas a bactérias e fungos, em especial nas superfícies mucosas. Para a sua diferenciação é necessário o fator de transcrição ROR γ t (*retinoid related orphan receptor*). As células Tfh regulam as respostas das células B, e a sua diferenciação requer o fator de transcrição Bcl-6 e a citocina IL-21 que também segregam. Por fim, as células Treg regulam a manutenção da homeostase imune. São caracterizadas pela expressão do fator de transcrição Foxp3 e podem dividir-se em células Treg CD25⁺ CD4⁺ naturais (nTreg) que aparecem no timo ou em células Treg induzidas (iTreg) que resultam da interação das células T CD4⁺ com APCs, como as células dendríticas, e da presença de TGF- β na periferia. Ambos os conjuntos de células Treg participam na manutenção da tolerância periférica e na prevenção da autoimunidade (33).

Durante o decorrer da resposta imune adaptativa, os linfócitos T ficam suscetíveis a vários sinais apoptóticos de forma a manter a homeostase imune. Apenas uma pequena porção dos linfócitos T persistem como linfócitos T de memória (34). A eliminação de linfócitos ativados pode acontecer pelo processo conhecido como AICD (*activation-induced cell death*), que engloba os recetores de morte, nomeadamente o recetor Fas (CD95), membro da família dos recetores TNF. A ligação do Fas ligando (FasL) ao recetor Fas promove o recrutamento da proteína adaptadora FADD (*Fas associated death domain*) que por sua vez recruta a caspase 8, sendo esta a primeira de uma série de caspases responsáveis por um conjunto de alterações que levam à apoptose. Por outro lado, pode ser recrutado o inibidor do Fas, o FLIP, que irá promover a sobrevivência celular. No entanto, a apoptose pode ainda ser controlada pela família de proteínas Bcl-2. As funções anti-apoptóticas de moléculas como o Bcl2 podem ser inibidas por alguns dos seus homólogos (Bid, Bad, Bak, Bax), que assim provocam a disrupção da membrana mitocondrial libertando mediadores pró-apoptóticos (35).

Existe ainda uma população de células T que partilha características com as células NK, conhecidas como células *Natural Killer* T (NKT). Estas células podem expressar CD4 ou ser DN, produzem IL-4 e IFN- γ e o seu desenvolvimento é dependente da molécula

CD1d. As células NKT estão distribuídas pela maioria dos tecidos com características fenotípicas e funcionais distintas (36). As células NKT podem dividir-se em dois grupos: células tipo I ou NKT invariáveis (iNKT), e as células tipo II ou NKT não invariáveis (37).

1.1.3.2. Células B

As células B desenvolvem-se a partir das células hematopoiéticas na MO. Nos estádios iniciais do desenvolvimento destas células, as células pró-B, pré-B e células B imaturas são caracterizadas pela expressão de marcadores de superfície específicos e por sucessivos rearranjos nos segmentos genéticos das cadeias leves (L) e pesadas (P) das imunoglobulinas. As imunoglobulinas são compostas por duas cadeias pesadas (P) idênticas e duas cadeias leves (L) idênticas (κ ou λ), com uma região variável (V) e uma região constante (C). Nas cadeias pesadas das Igs sofrem rearranjo os segmentos genéticos V (Variável), D (Diversidade) e J (Junção), enquanto nas cadeias leves se apresentam apenas os segmentos V e J.

Os rearranjos bem-sucedidos das cadeias P nas células pré-B permitem a expressão do recetor das células pré-B (pré-BCR) composto pela cadeia μ e os componentes V-pré-B (CD179A), λ -5 (CD179B) e as subunidades $Ig\alpha$ (CD79A) e $Ig\beta$ (CD79B). A expressão do pré-BCR inicia a progressão para o estágio de célula pré-B e induz rearranjos na cadeia L. Após rearranjos produtivos da cadeia L κ ou da cadeia L λ , os precursores B atingem o estágio final de desenvolvimento independente de antigénio, expressando à sua superfície IgM . Uma vez que estas células podem ligar-se com elevada afinidade aos antígenos do próprio, é necessário que sejam testadas para a auto reatividade. Por isso, células que expressem o BCR com elevada auto reatividade são negativamente selecionadas e sofrem deleção clonal ou podem sofrer rearranjos secundários da cadeia L (*“receptor editing”*). As restantes células B, que passam a designar-se células B de transição, migram da MO para o baço onde vão completar a sua maturação (38, 39).

Podem ser consideradas três populações principais das células B: células B1, células B2 ou B foliculares e células B da zona marginal. As células B1 começam por aparecer numa fase muito inicial da linfopoiese no feto e apresentam características distintas de desenvolvimento, de fenótipo, da distribuição pelos tecidos e da funcionalidade em relação às células B2, que são produzidas em maior abundância no final da vida fetal e durante a vida adulta. Enquanto as células B1 têm um papel importante na imunidade inata, as células B2 estão convencionalmente envolvidas na imunidade humoral (40).

No caso das células B2 convencionais, as células B imaturas migram da MO para a periferia, podendo dividir-se em células B de transição T1 e T2. As células B T1 precedem as células B T2 que são consideradas os precursores das células naïve B maduras, que expressam à sua superfície os isótipos IgD e IgM . Para além de um BCR funcional, as

células B imaturas recebem sinais de sobrevivência através do fator ativador de células B, o BAFF (*B-cell activation factor*) para completarem a maturação. Antes ou após a interação das células B2 naïve com os antígenos, estas são atraídas até aos tecidos linfóides secundários onde com o auxílio de células T, as células B se diferenciam por uma de duas vias possíveis: a via folicular que origina os centros germinativos e uma via extrafolicular que origina plasmócitos de tempo de vida curto produtores de anticorpos. As células B que permanecem nos centros germinativos proliferam e diferenciam-se em células B de memória e em plasmócitos com um tempo de vida longo (41, 42).

Após a ativação, as células B sofrem *class switch* e modificam o isotipo do seu recetor de IgM e IgD para IgG, IgA ou IgE. Este processo acontece na diferenciação de células B de memória, mas também nos plasmócitos que passam a secretar estes anticorpos com diferentes papéis funcionais. A IgG, que se divide em diferentes subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), é o isotipo predominante no soro, seguida da IgA. A IgA é por sua vez a mais abundante nas mucosas. Já a IgE é o isotipo menos abundante com um tempo de semivida curto (42).

1.2. Células *Natural Killer* (NK)

1.2.1. Desenvolvimento e Expressão de Recetores das Células NK

Como já referido anteriormente, as ILCs dividem-se em três grupos, ILC1, ILC2 e ILC3. O grupo 1 integra células que expressam o fator de transcrição T-bet e produzem IFN- γ , das quais fazem parte as células NK. Estas parecem ser as únicas com capacidades citotóxicas dentro das ILCs, sendo diferenciadas das restantes ILC1 pela expressão do fator de transcrição Eomes. O desenvolvimento das NK pode ocorrer na medula óssea e nos tecidos linfóides secundários onde podem completar a maturação adquirindo diferentes marcadores de superfície ao longo do processo de desenvolvimento (43). As ILCs diferem das células T e B por não apresentarem recetores específicos (TCR/BCR) e, portanto, não sofrerem rearranjos somáticos. Contudo, as ILCs adquirem funções idênticas às células T, contribuindo nomeadamente para a defesa imune do hospedeiro e participando na organogénese linfóide e na remodelação de tecidos (44).

As células NK possuem vários recetores com funções ativadoras ou inibidoras que reconhecem moléculas de MHC classe I e outros ligandos. O fenótipo que define estas células linfóides é ausência de expressão de CD3 e a presença dos marcadores CD16

(FcγRIIIA) e CD56 (ou N-CAM - molécula de adesão celular neuronal). No entanto, não existe um marcador específico pan-NK.

No microambiente da MO, numa fase inicial as células progenitoras (CD34⁺) respondem a fatores de crescimento e desenvolvem-se como precursores das células NK com o fenótipo CD34⁺ IL-15R⁺. De especial importância é a IL-15 que induz estas células a desenvolverem-se em células NK mais maduras com o fenótipo CD56^{bright}, com capacidade de lesar células tumorais e produzir citocinas e quimiocinas imunoreguladoras após serem estimuladas. Estas células CD56^{bright} parecem ter a capacidade para se diferenciarem depois em células CD56^{dim}, tanto na medula óssea como no sangue periférico (45).

Apesar de originalmente se considerar que o desenvolvimento das células NK ocorre na MO, estas podem também desenvolver-se, até mesmo preferencialmente, nos órgãos linfoides secundários, onde podem ser considerados cinco estádios de desenvolvimento de acordo com a expressão diferencial de CD34, CD117 (c-kit), CD94 e CD16.

As células no estágio 1 não têm marcadores de outras linhagens e apresentam o seguinte fenótipo- CD34⁺ CD117⁻ CD94⁻ CD16⁻, não estando também expressa a cadeia beta do recetor da IL-2/IL-15 (IL-2/IL-15Rβ, CD122). Já no estágio 2 as células adquirem a expressão de CD117 e CD122, passando também a estar presente a cadeia alfa do recetor da IL-2 (IL-2Rα ou CD25). Nestes dois estádios iniciais as células são multipotentes com capacidade para se diferenciarem em células T, em células dendríticas ou em células NK. Quando passam ao estágio 3 perdem então a capacidade de se diferenciarem em células T e células dendríticas, perdem a expressão de CD34, mas não expressam os fatores T-bet e Eomes, não produzem IFN-γ e nem possuem capacidade citotóxica. Características que são detetadas nas células do estágio 4, classicamente com o fenótipo CD34⁻ CD117^{+/-} CD94⁺ CD16⁻ e nas células do estágio 5, com o fenótipo CD34⁻ CD117^{low/-} CD94^{+/-} CD16⁺. O estágio 5 pode-se distinguir então pela expressão do CD16, o recetor de baixa afinidade para a porção Fc da IgG, responsável pela citotoxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC) (46).

Podem ser distinguidas à periferia duas grandes subpopulações de células NK de acordo com a expressão do recetor CD56: CD56^{bright} ou CD56^{dim}. Enquanto a maioria das células NK no sangue periférico são identificadas como CD16⁺ CD56^{dim}, cerca de 10% das células NK têm uma elevada expressão de CD56 (CD3⁻ CD56^{bright}) e produzem elevadas quantidades de citocinas e quimiocinas, possuindo baixa capacidade citotóxica. A população de células NK CD56^{bright} é dominante nos tecidos linfoides secundários, sendo considerada uma população menos madura que as células CD56^{dim} (47).

Dentro dos recetores que caracterizam as células NK podemos ainda encontrar a família dos recetores KIR (*Killer-cell immunoglobulin-like receptor*) que se podem dividir em inibidores ou ativadores, nomeados com base no número de domínios Ig extracelulares

(2D ou 3D) e com base no comprimento da sua cauda citoplasmática (L para comprida e S para pequena). Estes recetores interagem com o domínio αI das moléculas de HLA (antígenos leucocitários humanos) de classe I. Os KIR podem ser distinguidas por dois haplótipos: A e B. Os KIR inibidores são caracterizados por possuírem uma cauda intracitoplasmática longa com recetores ITIM (*tyrosine-based inhibition motifs*) capazes de recrutar e ativar as fosfatases SHP1 (*Src-homology 1 domain*) e SHP2 (*Src-homology 2 domain*), enquanto os KIR ativadores são caracterizados por uma cauda intracitoplasmática curta e estão acoplados a polipéptidos DAP12. Os recetores KIR2DL1/2/3 são recetores inibidores para as moléculas de HLA-C, que podem ser divididas em dois grupos: HLA-C1 e HLA-C2. Enquanto o KIR2DL1 tem especificidade para o HLA-C2, o KIR2DL2/3, no geral, é específico para o HLA-C1 (48, 49).

Existe ainda uma família de recetores denominados de LILR (*leukocyte immunoglobulin-like receptor*), expressos pelas células NK, que podem dividir-se em recetores ativadores (LILRA) e recetores inibidores (LILRB). A sua função depende da presença de sequências ITIM para os LILRB e de sequências ITAM (*tyrosine-based activating motifs*) para os LILRA. Dentro dos LILRB podem distinguir-se ainda os recetores LILRB1 (ILT2) e o LILRB2 (ILT4) (50).

Ao contrário dos recetores KIR e LILR, que são membros da superfamília das imunoglobulinas, os heterodímeros CD96/NKG2 pertencem aos recetores das lectinas do tipo-C. Várias moléculas NKG2 dimerizam com o CD94, nomeadamente o NKG2A, o NKG2C e o NKG2E. Estes recetores CD94/NKG2 ligam-se ao HLA-E nos humanos. Enquanto as moléculas de NKG2A têm motivos ITIM nos seus domínios citoplasmáticos que ativam as fosfatases SHP-1 e SHP-2 resultando na inibição da citotoxicidade das células, os recetores CD94/NKG2C e CD94/NKG2E levam à ativação da função citotóxica das células NK (51).

O NKG2D é um membro da família NKG2, que, ao contrário dos outros membros da família não forma heterodímeros com o CD94. Para a ativação deste recetor é necessária a proteína adaptadora DAP10. O NKG2D interage com os seus ligandos MICA (*MHC class I-related protein A*), MICB (52) e ULBP (*UL16-binding proteins*), geralmente expressos em situações de *stress* celular, como no contexto de infeções ou na presença de células tumorais. A ativação do NKG2D por si só não consegue induzir a produção de citocinas nem a citotoxicidade das células NK em repouso, no entanto, quando em conjunto com outros recetores co-estimulatórios como o 2B4 ou o NKp46, pode induzir atividade citotóxica nas células NK. Contudo, quando as células NK são incubadas com IL-2 ou IL-15, parece não existir necessidade de um sinal co-estimulatório para iniciar a desgranulação e a produção de citocinas decorrente da ativação deste recetor (53).

Foram também descritos recetores de citotoxicidade natural (NCRs), dos quais fazem parte o NKp30, o NKp44 e o NK46, que são recetores ativadores envolvidos na lise de células tumorais (48). Todos os NCRs são proteínas transmembranares que pertencem à superfamília das Igs, e todos contêm um domínio extracelular para a ligação dos respetivos ligandos, um domínio transmembranar com capacidade para se associar com proteínas adaptadoras e um domínio citosólico. Todos os NCRs têm a capacidade de se ligar a glicosaminoglicanos do tipo da heparina, que se encontram sobre-regulados em células cancerígenas. Outro ligando comum a todos os NCRs é a hemaglutinina viral.

O NKp30 transmite sinais ativadores através da associação com a cadeia CD3 ζ e a cadeia γ do recetor Fc ϵ RI. O NKp30 pode ligar-se ao recetor B7-H6 presente em células tumorais, de forma idêntica ao reconhecimento dos recetores B7-1 e B7-2 (que são estruturalmente homólogos ao B7-H6) pelo CD28. No caso do recetor NKp44 este encontra-se acoplado à proteína DAP12, sendo que a expressão deste recetor é apenas detetada nas células NK que sofreram ativação. Alguns proteoglicanos presentes na parede celular de bactérias parecem ser ligandos do NKp44 que estimulam a resposta das células NK. Por fim o recetor NKp46 inicia a sinalização de forma idêntica ao recetor NKp30, através da associação com a cadeia CD3 ζ e a cadeia γ do recetor Fc ϵ RI. O NKp46 é o recetor mais específico das células NK descrito até agora (52, 54).

Nas células NK humanas, um outro recetor pode funcionar como recetor ativador, o 2B4, que estimula a citotoxicidade, a produção de IFN- γ e exocitose dos grânulos. Para além de funcionar como recetor ativador, pode também funcionar como co-estimulador, e nos estádios iniciais da diferenciação das células NK pode mesmo funcionar como um recetor inibidor. De facto, a interação entre o 2B4 (CD244) e o seu ligando CD48 modula a função das células T e NK (55, 56).

Dentro dos recetores caracterizados nas células NK encontra-se ainda o recetor ativador NKp80, a molécula acessória DNAX (DNAM)-1, os TLRs 2,3,7,8 e 9, e moléculas de adesão, incluindo LFA-1 (*lymphocyte-associated molecule-1* ou CD11a/ CD18), LFA-2 (CD2) e LFA-3 (CD58) importantes também para as suas funções citotóxicas (48).

O CD57 é um marcador de maturação expresso maioritariamente pelas células CD56^{dim} CD16⁺. O CD16 está fortemente relacionado com a maturação das células NK, estando por isso aumentado nas células CD57⁺. As células CD57⁺ CD56^{dim} CD16⁺, sendo aparentemente mais maduras, proliferam menos que as células CD57⁻, mas contêm mais perforina e granzima B, sendo mais sensíveis à ativação pelo CD16. As células NK CD57⁺ apresentam ainda uma expressão mais baixa dos recetores NKp46, NKp30, NKG2D e NKG2A do que as células CD57⁻ (57).

As respostas das células NK podem ser induzidas por diferentes combinações dos seus recetores. Como se referiu anteriormente, os recetores NKG2D, 2B4, DNAM-1 e CD2 não

conseguem ativar por si só a citotoxicidade ou a secreção de citocinas. No caso do CD16, porém, responsável pelos mecanismos de ADCC, a sua ativação parece ser aumentada por todos os recetores supracitados, com exceção do NKp46. Contudo, o NKp46 tem um efeito sinérgico com os restantes recetores NKG2D, 2B4, DNAM-1 e CD2. Já o 2B4 tem um efeito sinérgico com o NKp46, o NKG2D e o DNAM-1 e tanto o NKG2D como o DNAM-1 têm um efeito sinérgico com os recetores NKp46 e 2B4 (58).

Um estudo recente demonstrou que a percentagem de células NK circulantes varia ao longo do tempo para o mesmo indivíduo. Mais ainda, os autores observaram que as células NK CD56^{bright} expressam CD94, DNAM-1, NKG2D e NKp46 em maior quantidade, mas apresentam menos 2B4, do que as células NK CD56^{dim}. A expressão de NKp30 é semelhante em células NK CD56^{bright} e NK CD56^{dim}. Esta análise aponta para o que parece ser então uma variação fisiológica dos recetores das células NK e da sua distribuição em diferentes subpopulações celulares (59).

1.2.2. Função das Células NK

As funções efetoras das células NK incluem a citotoxicidade e a produção de uma grande variedade de citocinas após a sua ativação. A exocitose de grânulos, que contém granzimas e perforina, é o mecanismo principal utilizado pelas células NK para provocar a morte celular. A sua função é regulada por um balanço entre sinais negativos e positivos dos recetores expressos à superfície da célula. As células NK são inibidas pelos recetores que reconhecem moléculas MHC classe I, pelo que as células que expressam níveis normais de MHC I estão normalmente protegidas contra a lise mediada pelas células NK. No entanto, células infetadas por vírus ou células cancerígenas que expressam níveis reduzidos de MHC I ficam vulneráveis ao ataque das células NK (60). Este reconhecimento pelos recetores NK de moléculas MHC de classe I, expressas por todas as células nucleadas e pelas plaquetas, é conhecido como a hipótese do *missing-self* (Figura 3) (61).

Após o encontro com as células alvo, vários eventos moleculares levam à adesão, à polarização dos grânulos, à desgranulação e à produção de citocinas pelas células NK. A adesão das células NK proporciona um contacto estável com as células alvo através da interação das integrinas com os respetivos ligandos, e leva à formação de uma sinapse imune. A adesão é aumentada pela co-expressão dos ligandos de CD2, CD16 e 2B4 e é acompanhada pela polarização da actina do citoesqueleto, do complexo de Golgi e dos microtúbulos para a interface com a célula alvo. Por outro lado, a desgranulação pode ser avaliada pela análise da expressão de CD107a, que se distribui pela superfície celular quando os grânulos se fundem com a membrana plasmática (62).

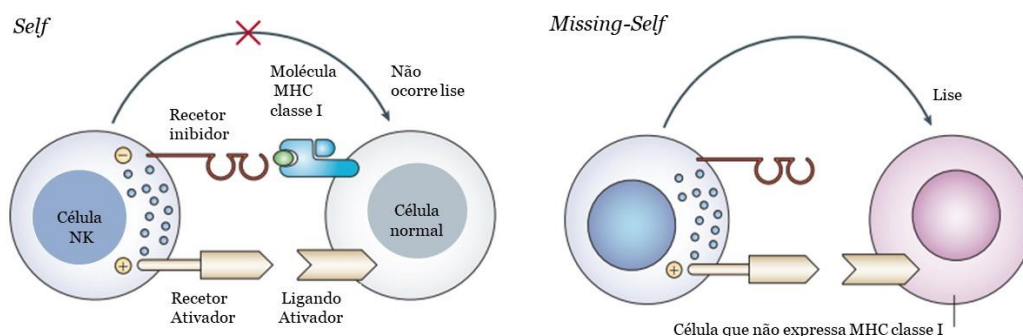


Figura 3- Hipótese *missing-self*. Adaptado de Kumar V. *et al* (61)

O CD16 é uma proteína transmembranar associada com as cadeias CD3 ζ e Fc ϵ RI γ , que promove fortes respostas efetoras, através da sua ligação à porção Fc da IgG. Esta ligação permite a ativação das vias de ativação *downstream* PI3K, ERK e do fator nuclear- κ B (NF- κ B). A sinalização através do CD16 leva as NK a desempenharem 3 grandes funções efetoras: a exocitose de grânulos citotóxicos, a ativação de receptores de morte da família TNF- α e a libertação de citocinas pró-inflamatórias como o IFN- γ e o TNF- α . As duas primeiras funções efetoras resultam na apoptose das células alvo, enquanto a última função influencia outras células imunes, fazendo por isso a ligação com as respostas imunes adaptativas (63, 64).

Dentro das células NK, a população CD56^{bright} é a fonte primária de citocinas imunoreguladoras. De facto, estas células apresentam maior capacidade de produção de IFN- γ , TNF- β , IL-10, IL-13 e GM-CSF do que as células NK CD56^{dim}.

Quando estimuladas com IL-18 e IL-12, as células NK CD56^{bright} produzem mais IFN- γ , enquanto que se forem estimuladas com IL-18 e IL-15, ou IL-1 β e IL-15, produzem níveis mais elevados de TNF- β . Porém a estimulação com IL-12 e IL-15 aumenta também a produção de IL-10 pela célula NK, havendo também uma maior produção de IL-13 quando as células são estimuladas com IL-15 juntamente com IL-18 ou IL-1 β (65).

Como se referiu anteriormente, a IL-15 é de especial importância para o desenvolvimento das células NK, induzindo a expressão de CD56 em células hematopoiéticas CD34⁺ e contribuindo para o desenvolvimento da morfologia típica destas células. Para além disso, em cultura celular, a IL-15 tem a capacidade de induzir a produção de IFN- γ , TNF- α e GM-CSF pelas células NK CD56^{bright} (66). Porém, a co-estimulação com IL-15 parece ser um requisito para a produção de citocinas tipo 2 (IL-10 e IL-13), sendo a co-estimulação com IL-12 essencial para a produção de IFN- γ , uma citocina de tipo 1. A co-cultura com macrófagos, demonstra ainda que o lipopolissacarídeo

(LPS), presente nas bactérias Gram negativas, e reconhecido pelas células efectoras do SI inato, induz nas células NK CD56^{bright} uma maior produção de IFN- γ (66).

Para além das células NK que se encontram em circulação, existem células NK residentes nos tecidos que parecem demonstrar características fenóticas únicas, das quais fazem parte as células NK tímicas, as células NK presentes no fígado e na pele, as células NK uterinas, as células NK da glândula submandibular e as células NK do rim (67). Nos nódulos linfáticos estão também presentes células NK predominante com fenótipo CD56^{bright}, que utilizam a IL-2 produzida pelas células T para co-estimular a produção de IFN- γ (68).

No fígado humano predominam as células NK CD56^{bright}, caracterizadas pela expressão de CD69, CXCR6 e CCR5 e pela ausência de expressão de CD62L e CCR7. Existem várias outras subpopulações de células NK residentes no fígado, que podem ser distinguidas das NK em circulação pela expressão de T-bet e Eomes. As NK com uma maior expressão de Eomes têm um tempo de vida mais longo e parecem reconhecer antígenos bacterianos. Podem também ser encontradas células NK CD49a⁺ que expressam moléculas efectoras citotóxicas e recetores para as moléculas MHC classe I, sugerindo que estas realizam a imunovigilância através do reconhecimento de hepatócitos infetados por vírus ou em processos cancerígenos. A expressão do recetor NKG2D pelas células CD49⁺ indica que estas possuem eventualmente propriedades de memória (69).

Também no rim se podem distinguir as células NK residentes distintas das que se encontram em circulação pela expressão de CD69. No rim, as células NK representam cerca de 25% dos linfócitos, podendo identificar-se a presença de ambos os fenótipos CD56^{bright} e CD56^{dim}. No entanto, células NK CD56^{bright} parecem ser as predominantes nos rins de indivíduos saudáveis (70).

1.3. O Sistema Imunológico e a Gravidez

Para a aceitação de um embrião no útero, é necessária a adaptação dos órgãos maternos. Como tal, existem várias etapas dependentes do sistema endócrino e do sistema imune para a implantação do embrião e a manutenção da gravidez. Dentro do sistema endócrino são de especial importância a progesterona e o estrogénio para a receptividade uterina. Por exemplo, o corpo lúteo utiliza a progesterona para promover a diferenciação do endométrio para receber o embrião. Após a ovulação, o endométrio torna-se receptivo ao embrião a meio da fase lútea, entre o sexto e o décimo dia após o pico da LH, e sofre mudanças significativas para se preparar para a implantação. Este período é definido como janela de implantação. Estas mudanças incluem também uma transformação celular do estroma uterino, processo este conhecido como decidualização.

Curiosamente, tanto a menstruação como a implantação do embrião partilham características do processo inflamatório como o edema e a infiltração de uma grande quantidade de células inflamatórias.

A cooperação entre os sistemas endócrino e imune permite que seja desenvolvido um processo de tolerância materno para que o feto não seja rejeitado. É reconhecida a ação da progesterona na regulação das funções do sistema imune. Mediadores como o PIFB (*progesterone-induced blocking factor*), induzidos por esta hormona, levam à produção de citocinas Th2 e da glicodelina A que protegem o embrião do sistema imune materno (71-73).

O fluido seminal contém também níveis elevados de TGF- β e de ligandos do TLR4, que provocam uma resposta inflamatória no trato reprodutivo feminino, induzindo as células dendríticas e os macrófagos a internalizarem antígenos paternos, que são apresentados às células T naïve maternas. Isto provoca um aumento da ativação das células T e uma expansão das células Treg. As Treg em circulação vão acumular-se no útero em resposta a várias citocinas secretadas pelas células epiteliais para induzirem um estado de tolerância aos antígenos paternos (74).

De especial importância para a promoção da tolerância é a indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), uma enzima citoplasmática que degrada o aminoácido essencial triptofano e atua como uma enzima imunomoduladora que inibe a ativação e proliferação das células T. Enquanto que em mulheres saudáveis, com gestações normais, a percentagem de Tregs Foxp3⁺ está significativamente correlacionada com os níveis de expressão de IDO, em mulheres que sofrem de perda gestacional recorrente podem observar-se níveis significativamente mais baixos de expressão de IDO, sugerindo a sua contribuição para a tolerância materna (75).

Considerando o desenvolvimento do embrião, observa-se também que durante a transição para blastocisto são estabelecidas diferentes linhas celulares. A partir da trofoectoderme tem origem o trofoblasto que forma o compartimento epitelial da placenta. As células do trofoblasto podem ser diferenciadas entre as vilosidades da placenta (trofoblasto viloso) e as células do trofoblasto extraviloso (EVT) que invadem a decídua. As células do trofoblasto extraviloso fazem a remodelação das artérias espiraladas uterinas de forma a garantir o fluxo sanguíneo para o feto. Nesta interface materno-fetal as células do trofoblasto entram em contacto com as células imunes maternas (76, 77). Porém, enquanto que as células do trofoblasto viloso não expressam antígenos leucocitários humanos (HLA), as células do EVT expressam o HLA-G, HLA-C e HLA-F (78, 79). E parecem expressar também o HLA-E mas apenas até à quinta semana de gestação (80). A ausência da expressão dos antígenos HLA classe I clássicos, HLA-A e HLA-B, assim como das moléculas HLA classe II, parece evitar o reconhecimento das células fetais pelas

células T maternas, prevenindo assim a sua rejeição citotóxica. As únicas moléculas polimórficas expressas pelo EVT são as moléculas de HLA-C (81).

Na gravidez podemos considerar diferentes estádios imunológicos. Inicialmente, ocorre a implantação que se caracteriza como um estágio pró-inflamatório, semelhante aos processos de lesões tecidulares com consequente reparação. Esta inflamação é caracterizada pela presença de IL-6, IL-8, IL-15, GM-CSF, CXCL1, CCL4, osteopontina e TNFs, citocinas derivadas de células estromais endometriais e células imunes. Este ambiente é essencial para a transferência de moléculas de adesão para a superfície celular das células epiteliais, para a expressão de novas moléculas de adesão e para a remoção de uma camada pré-existente de mucinas que impendem a adesão do blastocisto. São também importantes nesta fase para a remodelação do tecido e para a angiogénese as células dendríticas CD11c⁺. Em algumas mulheres com eventuais alterações no desenvolvimento deste passo inflamatório inicial, a realização de biópsias uterinas (*scratching* endometrial), que conduzem a inflamação local, parecem aumentar também a receptividade uterina (82, 83).

Após a implantação segue-se um processo de crescimento fetal com um ambiente predominantemente anti-inflamatório tipo Th2. Nesta fase os macrófagos com fenótipo M2 secretam citocinas anti-inflamatórias e fagocitam células mortas do trofoblasto impedindo a libertação de antigénios paternos que possam resultar numa resposta imune contra o feto. As células NK decíduais interagem com os macrófagos CD14⁺ e induzem a diferenciação de células Treg. Estas, por sua vez, contribuem para o estabelecimento do microambiente anti-inflamatório prevenindo respostas imunes efetoras contra os antigénios paternos. Estão também presentes células Th17 uterinas, reguladas pelas Treg, que garantem a proteção contra infeções.

Por fim, é necessária uma mudança para um estágio pró-inflamatório para posteriormente se poder dar início ao trabalho de parto. Nesta fase mais tardia, o influxo de células imunes para o miométrio promove a contração do útero. A ativação da via de sinalização do NF-κB ocorre como resultado da ativação do recetor *Toll-like 4* (TLR4) por ligandos como a proteína surfactante A, secretada pelos pulmões do feto no final da gravidez, desempenhando um papel crucial para o trabalho de parto (Figura 4) (82).

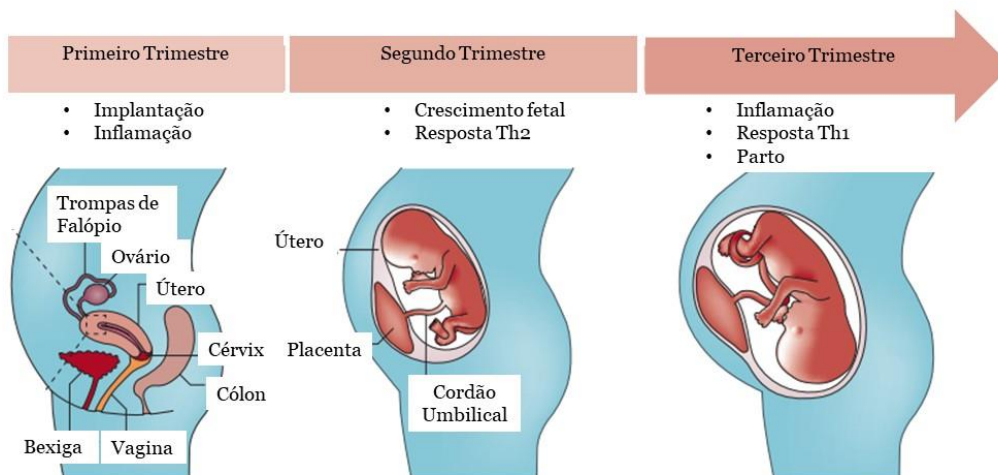


Figura 4- Estádios imunológicos durante a gravidez. Adaptado de Mor G. *et al* (82).

A desregulação da resposta imune na interface materno-fetal pode causar problemas reprodutivos como perda gestacional recorrente, falhas de implantação, partos prematuros, restrições de crescimento fetal intrauterino e pré-eclâmpsia. Os leucócitos são por isso constituintes importantes da decídua e do miométrio afetando o processo de implantação, a tolerância materna para com o feto, a defesa contra infecções e por fim a indução do trabalho de parto (84).

1.4. Células Imunes Presentes no Endométrio e na Decídua Humana

Há ainda muito por compreender e caracterizar em relação ao ambiente imune uterino. Porém um estudo recente de Marron e Harrity (85) abordou a contagem média de linfócitos endometriais, apontando para valores próximos de 10 562 células/mg, identificando as células uNK CD56^{bright} CD16⁺ como a maior população de linfócitos no endométrio (4 875 células/mg). Dentro da população de células T, as T CD8⁺ predominam, mas podem também ser identificados vários subconjuntos de linfócitos T CD4⁺. Dentro dos linfócitos CD4⁺, a população prevalente é a Th1, encontrando-se também linfócitos Treg, Th2 e Th17 em concentrações mais baixas (85). O rácio de células T CD4:CD8 está invertido no endométrio quando comparado com o sangue periférico (86).

Fu e colaboradores (87) demonstram também que dentro das células NK presentes na decídua (dNK) mais de 90% são células NK CD56^{bright}. No primeiro trimestre da gravidez, estas células NK expressam também o marcador CD27. As células NK CD56^{bright} CD27⁺ expressam menos receptores inibidores e mais receptores ativadores como o NKp44, o NKp46 e o NKG2C, e secretam mais IFN- γ do que as células CD27-. O IFN- γ produzido por estas células parece diminuir a expansão das células Th17 que também se encontram presentes no primeiro trimestre da gravidez. As células Th17 eventualmente contribuem para a inflamação decidual e relacionam-se com perdas gestacionais. As células NK parecem por isso prevenir a inflamação local e manter a tolerância materno-fetal suprimindo a indução de células Th17 (87).

Na decídua, as percentagens de células T CD8⁺ e NK são superiores às observadas na periferia, enquanto que a percentagem de células T CD4⁺ é inferior. A expressão do recetor PD-1 pelas células T CD8⁺, T CD4⁺ e NKT parece estar também aumentada, em comparação com a sua expressão na periferia. O recetor transmembranar PD-1, que pertence à família B7-CD28, após interagir com os seus ligandos PD-L1 e PD-L2 inibe células T e B autoreativas e células T efetoras, para induzir tolerância e regular a inflamação local. Ora, as células imunes deciduais têm ainda uma maior expressão do ligando PD-1. (88).

Dentro dos leucócitos mais abundantes na decídua no primeiro trimestre da gravidez (células NK, macrófagos e linfócitos T), parece existir uma interação particular entre as células NK e os macrófagos que permite manter o estado de tolerância. As células do trofoblasto começam por secretar a quimiocina CXCL16, que influencia a polarização dos macrófagos para o fenótipo M2 através da indução da expressão de IL-10. Os macrófagos M2 polarizados pela CXCL16 diminuem a expressão dos receptores CD16, NKp30, NKp44 e de TNF e INF- γ , e aumentam a expressão dos receptores inibitórios KIR2DL1 e KIR3DL1 nas células NK. Estes macrófagos M2 diminuem ainda a produção de IL-15, e esta diminuição reduz a capacidade citotóxica das células NK, fazendo com que seja possível manter a tolerância imune na interface materno-fetal (89).

Os linfócitos Treg contribuem também para a tolerância materna do feto através da produção de IL-10. Os linfócitos Treg inibem a produção de outras citocinas pelas células T CD4⁺ e T CD8⁺, inibem a atividade citotóxica das células NK e inibem também a maturação e função das DCs, resultando na supressão da inflamação local. A falta desta modulação pelos linfócitos Treg pode ter consequências reprodutivas (90).

1.5. Células *Natural Killer* Uterinas (uNK)

Vários estudos demonstram que a população linfocitária prevalente no endométrio são as células uNK, distinguidas das células NK periféricas (pNK) pelo seu fenótipo característico CD56^{bright} (85, 86, 91). Há um aumento progressivo das células uNK no endométrio durante o ciclo menstrual, com um aumento mais acentuado durante o meio da fase lútea, atingindo o pico máximo na fase inicial da gestação. Nesta fase as células uNK localizam-se na proximidade das células do trofoblasto (92, 93). As células uNK são especialmente relevantes para o desenvolvimento e manutenção da gestação, expressando uma variedade de recetores que podem responder a moléculas expressas pelas células do trofoblasto, nomeadamente moléculas MHC.

A origem destas células é ainda motivo de debate, podendo ser consideradas três possibilidades (44, 94):

- O recrutamento de células NK que circulam no sangue periférico para o útero, onde sofrem maturação;
- O recrutamento de células NK maduras que circulam no sangue periférico para o útero;
- A diferenciação de células hematopoiéticas CD34⁺ presentes na mucosa uterina.

No endométrio a presença da IL-15, cujos níveis são regulados pelas hormonais esteróides, parece desempenhar um papel importante no recrutamento e proliferação das uNK (95, 96). A IL-24, produzida pelas células estromais decíduais, também parece influenciar a diferenciação das células NK CD56^{dim} em células NK CD56^{bright} e a sua função. A administração de IL-24 exógena em cultura celular de células NK decíduais promove a expressão de TGF- β e inibe várias moléculas responsáveis pela citotoxicidade, como o CD16, a granzima B, a perforina e o IFN- γ , mantendo o fenótipo CD56^{bright} CD16⁻ para o estabelecimento e manutenção de uma gestação normal (97). As células uNK proliferam também em resposta à gonadotrofina coriónica humana (hCG), apesar de não possuírem recetor para a esta hormona nem o recetor para a hormona luteinizante (LH) (98). Estas células NK CD56⁺ CD3⁻ aparentam encontrar-se num estado de ativação superior, uma vez que exibem uma maior expressão do marcador CD69 (99).

Ao contrário das pNK, as células uNK CD56^{bright} têm uma menor capacidade citotóxica e produzem essencialmente citocinas e fatores de crescimento como o TNF- α , a IL-10, o GM-CSF, a IL-1 β , o TGF- β 1 e o INF- γ (100). De facto, uma das funções das células uNK parece ser a remodelação das artérias espiraladas uterinas, que nesta fase adquirem a expressão de vários recetores para fatores de crescimento angiogénicos, nomeadamente os recetores para a angiopoietina (Ang)-1, a Ang-2, o IFN- γ , o TGF- β 1, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)-A e o VEGF-C (101). As uNK em conjunto com os macrófagos

infiltram os vasos sanguíneos em remodelação e produzem as metaloproteinases de matriz (MMPs) 7 e 9. Estas MMPs por sua vez degradam a matriz extracelular vascular (102).

A interação entre as células uNK e as DCs decíduas também é revelante para a manutenção da gravidez. As uNK parecem regular a ativação das DCs presentes na decídua através do aumento da expressão de IL-10. Por sua vez, as DCs induzem a proliferação e sobrevivência das uNK através da IL-15 (103).

A análise dos NCRs (NKp44, NKp46 e NKp30) nas células NK presentes na decídua humana, permitiu identificar nas células NK CD56^{brigh} uma menor expressão do recetor NKp30, quando em comparação com as células NK CD56^{brigh} que circulam na periferia. Ainda dentro dos NCRs, a expressão do NKp44 nas células NK decíduas (dNK) parece estar ausente. O mesmo estudo referiu ainda que a expressão dos recetores NKG2D, 2B4 e CD94/NKG2A é idêntica para ambas as populações de células NK, periféricas e decíduas. É realçada a função do recetor 2B4 nas células dNK como inibidor da citotoxicidade e da produção de citocinas (104).

Ainda dentro dos NCRs, Fukui e colaboradores, apontam o recetor NKp46 como o recetor mais expresso pelas uNK, seguido do recetor NKp30 e por fim apenas uma pequena percentagem de células uNK expressam o recetor NKp44 (105).

De acordo com o já descrito acima, El Costa e colaboradores (106), demonstraram que a população de células dNK expressa níveis elevados de NKp46, NKG2D, 2B4 e CD2 e níveis baixos de NKp30, NKp44 e NKG2C. Todas as células que expressaram os marcadores NKp46 ou NKp30 foram positivas também para o marcador NKG2A. A expressão do CD69 e do NKp44 releva que as células dNK já sofreram ativação. A polarização da perforina e exocitose de grânulos é induzida pela ligação do recetor NKp46, que em combinação com o CD2 parece aumentar a atividade citotóxica das células dNK. Já o recetor NKp30 induz a secreção das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TFN- α , MIP1- α , MIP1- β e GM-CSF.

Outro estudo utilizou amostras de sangue periférico e de sangue menstrual e demonstrou que a expressão dos recetores das uNK não difere ao longo dos ciclos menstruais. No entanto em comparação com as pNK, e percentagem de células uNK que expressam os recetores NKG2A, LILIRB1, KIR2DL2/L3/L4 e KIR2DL1 é significativamente mais elevada nas células pNK (107).

Desta vez, fazendo o paralelismo entre células NK recolhidas do endométrio (uNK) e células NK recolhidas na decídua (dNK), demonstrou-se que todas as células uNK e dNK expressam os recetores ativadores NKG2D e NKp46. Em contraste, não foi identificada a expressão do NKp44 nem no endométrio nem na decídua. Já o marcador de ativação CD69 é menos expresso nas uNK do que nas dNK. A frequência de células NK positivas tanto para os marcadores KIR2DL1/S1 (específicos para o HLA-C2) como para os

KIR2DL2/L3/S2 (KIR2DL2 e KIR2DL3 reconhecem o HLA-C1) é mais elevada na decídua do que no sangue periférico (108).

Nas mulheres com um elevado índice de massa corporal (IMC) há uma redução da proporção de células uNK, que parece resultar do aumento da apoptose, sugerindo uma redução da remodelação das artérias uterinas no início da gestação, com todas as potenciais implicações que isso terá do ponto de vista gestacional (109).

1.6. Células NK uterinas (uNK) e Perda Gestacional Recorrente Idiopática

A perda gestacional recorrente (PGR) é definida pela *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) como duas ou mais perdas gestacionais consecutivas antes do feto atingir viabilidade até às 24 semanas de gestação (110). Este é um problema que afeta cerca de 1% dos casais, em que a idade materna é um dos fatores de risco, existindo um aumento do risco de perda fetal a partir dos 35 anos de idade. O histórico das mulheres é também importante, uma vez que mulheres grávidas pela primeira vez ou com história de nados-vivos têm risco mais baixo de abortar do que mulheres que tenham sofrido anteriormente um aborto (111). As causas de PGR podem ser de diferentes etiologias, das quais fazem parte os fatores genéticos, os fatores anatómicos, os fatores endócrinos, as infeções, os fatores imunológicos, as trombofilias e os fatores ambientais. No entanto, cerca de 50% destes casos são de etiologia não identificável (112).

Um estudo recente de Marron e colaboradores (86) sugere que as células NK encontradas no endométrio podem ser divididas em três populações, de acordo com o fenótipo que as caracteriza: células uNK (CD16⁻ CD56^{bright}), células pNK (CD3⁻ CD16⁺ CD56^{dim}) e células NKT (CD3⁺ CD16⁻ CD56^{dim}). A percentagem destas populações apresenta diferenças entre os grupos com problemas reprodutivos, tais como falhas recorrentes de implantação (RIF do inglês *repeated implantation failure*) e PGR.

As células com fenótipo pNK estão presentes em maior quantidade em mulheres com problemas reprodutivos, com uma elevada expressão do marcador de ativação CD69. Em particular na PGR há um aumento da percentagem de células pNK, células T CD4⁺ e de células B. Nos casos de RIF, foi descrito um aumento percentual das células uNK, NKT e T CD8⁺. Comum a ambos os grupos é a diminuição da percentagem de células Treg (86).

Os mesmos autores, desta vez utilizando como medida a concentração de células por miligrama, observaram ainda que pacientes que sofrem de PGR têm uma maior concentração uterina dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ quando comparado com o grupo controlo (85).

Alguns estudos imunohistoquímicos demonstram um aumento da presença de células CD16⁺ no endométrio de mulheres que sofrem de perda gestacional recorrente idiopática (PGRi ou iRPL, do inglês *idiopathic recurrent pregnancy loss*) (113, 114).

Dentro dos NCRs, enquanto um estudo imunohistoquímico demonstrou um aumento do rácio de células CD56⁺/NKp46⁺ (114), um estudo que recorreu à citometria de fluxo demonstrou que este rácio está diminuído nos casos de PGR em comparação com os controlos. Dentro dos restantes NCRs, NKp44 e NKp30, não foram encontradas diferenças. A avaliação do sangue periférico de mulheres grávidas com e sem histórico de PGR, demonstrou uma percentagem inferior de células CD56^{bright}/NKp46⁺ nas mulheres com histórico de PGR na 12^a e na 20^a semana de gestação (105).

Nas mulheres que sofrem de perda gestacional espontânea, a expressão do recetor NKp44 está aumentado nas células dNK CD56^{bright} CD16⁻. Sendo que no caso das dNK CD56^{dim} CD16⁺ há um aumento dos recetores NKp46 e NKp44 quando comparado com os controlos saudáveis. A presença do marcador NKp44 nas células dNK CD56^{bright} CD16⁻ e do marcador NKp46 nas células dNK CD56^{dim} CD16⁺ relaciona-se com a capacidade citotóxica das células dNK (115).

Às PGRi também se têm associado contagens superiores de células NK CD56⁺ junto aos vasos sanguíneos, onde formam agregados. O espessamento das artérias espiraladas é também menor nos casos de PGRi do que em controlos (116). Em concordância está também um outro estudo de caso controlo, que demonstra que o número de células CD56⁺ é superior em mulheres com perdas recorrentes em relação a mulheres saudáveis (117).

O trofoblasto extraviloso (EVT) interage indiretamente com as células endoteliais das artérias espiraladas para facilitar o recrutamento de células imunes decíduais para as paredes das artérias espiraladas nos estádios iniciais de remodelação. Quimiocinas como CCL14 e CXCL6 estão sobrerreguladas em resposta aos fatores secretados pelo EVT e têm capacidade para induzir a migração de células NK e macrófagos decíduais. As células uNK parecem expressar os recetores para estas quimiocinas (CXCR1, CXCR2, CCR1 e CCR5) em quantidades superiores do que as pNK em resposta ao microambiente decidual.

Em casos de perdas gestacionais espontâneas, os níveis de IL-6 e CXCL8 encontram-se reduzidos no EVT e existe uma menor expressão dos seus recetores pelas células endoteliais, que pode desregular a produção de quimiocinas pelas células endoteliais e reduzir o recrutamento de leucócitos (118).

Existe ainda um grupo de células NK caracterizadas pela produção de IL-22, as NK22. Nos casos de PGRi parece existir um aumento da porção destas células tanto no endométrio como no sangue periférico (119).

A memória imunológica na resposta inata tem vindo a ser proposta. Recentemente, Gamliel e colaboradores avaliaram a capacidade das células dNK adquirirem memória. O

estudo de um conjunto de recetores em mulheres múltiparas e mulheres grávidas pela primeira vez, demonstrou que nas mulheres múltiparas há um aumento da expressão dos recetores NKG2C e LILRB1. Estas células foram por isso chamadas de células dNK de memória, com capacidade para secretarem mais IFN- γ e VEGF α após a interação do NKG2C com o seu ligando HLA-E e do recetor LILRB1 com o seu ligando HLA-G. Estas células parecem estar também envolvidas no processo de vascularização essencial para a placentação (120).

A influência das células uNK na fertilidade é ainda um tópico em estudo, que poderá ter aplicação no acompanhamento terapêutico de casais que sofrem de problemas reprodutivos como PGR, pré-eclâmpsia e outras formas de infertilidade. Alguns tratamentos utilizados têm como objetivo a supressão das células NK, no entanto a ativação destas células, em níveis moderados, parece ser essencial para o progredir da gestação. Ou seja, uma vez que o grau de ativação NK parece ser um elemento relevante neste contexto, a maioria das terapêuticas são aplicadas de acordo com os resultados da avaliação NK em sangue periférico (avaliação quantitativa e funcional). No entanto, como sabemos, as células NK provenientes da periferia diferem fenotipicamente e funcionalmente das células uNK, o que pode limitar a aplicabilidade dos testes em sangue periférico, que podem não traduzir de forma adequada o ambiente uterino (94, 121).

Dentro dos possíveis tratamentos a utilizar para a PGR, existe a emulsão *Intralipid*, que contem óleo de soja, glicerina e fosfolípidos, sendo normalmente utilizada para a nutrição parentérica. Apesar do mecanismo pelo qual a *Intralipid* atua não ser ainda totalmente conhecido, esta parece inibir mediadores anti-inflamatórios e reduzir a citotoxicidade e o número de células NK (122, 123). Um outro tratamento utilizado é a administração de imunoglobulina intravenosa, que protege o embrião do SI materno. Este tratamento diminui a percentagem de células Th1 e as suas moléculas associadas IFN- γ e TNF- α e aumenta a percentagem de células Th2 e em especial a produção de IL-10 (124).

Dentro dos métodos utilizados para o estudo das células uNK destaca-se a imunohistoquímica e a citometria de fluxo. A citometria de fluxo apresenta vantagens como a possibilidade da deteção de vários marcadores de superfície numa única célula de forma rápida e reprodutível. Através da citometria de fluxo é ainda possível realizar ensaios de citotoxicidade e determinar as contagens de células uNK (125, 126).

Capítulo 2- Objetivos

As populações linfocitárias parecem adquirir características únicas no aparelho reprodutivo feminino, de modo a garantir a manutenção da gravidez. De facto, a população que parece ser a mais prevalente, tanto no endométrio durante a fase lútea como na decídua na fase inicial da gestação, é a população de células NK. Estas células aparentam ser fenotipicamente diferentes das células NK que circulam na periferia, estando implicadas em várias complicações reprodutivas como as PGRi. Tendo em conta a necessidade de uma caracterização mais detalhada dos linfócitos presentes no endométrio, este projeto apresenta os objetivos abaixo descritos.

- O objetivo primário compreende a validação de uma estratégia detalhada de caracterização da população de células NK e T em biópsias endometriais uterinas, usando a análise multiparamétrica de imunofenotipagem por citometria de fluxo.

- Como objetivos secundários estabelecem-se os seguintes:

- a possibilidade de implementar, na clínica, esta estratégia de caracterização em mulheres com critérios de perda gestacional recorrente de causa idiopática, de modo a permitir identificar alterações no padrão fenotípico das suas células uterinas NK e T em relação a mulheres saudáveis;

- a possibilidade de identificar eventuais marcadores de risco, ou alterações que se correlacionem com as diferentes características demográficas e obstétricas destas mulheres.

Capítulo 3- Materiais e Métodos

3.1. População do estudo e aspetos éticos

Para este estudo foram recrutadas mulheres durante o ano de 2020 no Centro da Mulher- Ginecologia e Obstetrícia no Hospital CUF Descobertas. As mulheres recrutadas foram divididas em dois grupos de estudo: um grupo controlo e um grupo com perdas gestacionais recorrentes idiopáticas.

Todas as participantes aceitaram de forma livre, não remunerada e voluntária a participação neste estudo e assinaram consentimentos informados, depois de esclarecidas sobre a finalidade do projeto, os seus métodos e potenciais incómodos que lhe possam estar associados. As participantes foram ainda informadas de que em qualquer altura podem revogar o consentimento sem represálias.

A confidencialidade dos dados foi assegurada através do uso restrito à informação, não existindo identificadores pessoais, utilizando-se em alternativa a atribuição de um código/número a cada participante.

O estudo foi aprovado pela comissão de ética Faculdade de Ciências Médicas| Nova Medical School da Universidade Nova de Lisboa (NMS|FCM-UNL) (Processo nº 130/2019/CEFCM) e também pela comissão de ética do Hospital CUF Descobertas (CE-020/19-JMS/is).

3.2. Desenho do estudo

Este é um estudo observacional prospetivo, que consiste na recolha de uma só biópsia endometrial a cada participante com critérios de elegibilidade. Todas as mulheres começaram a testar a urina a partir do 9º dia do ciclo menstrual para identificar o pico de LH (ovulação), que é utilizado para precisar o tempo para recolha das biópsias entre os dias 7 e 10 após o pico de LH. O tecido foi recolhido através da realização de uma biópsia aspirativa com o sistema *Pipelle*®. A *Pipelle*® permite de forma simples a recolha de amostras endometriais em quantidade e qualidade suficientes com poucas complicações, não sendo necessária a utilização de anestesia local, uma vez que se trata de um procedimento relativamente indolor para a paciente. Outra vantagem deste método é o facto de ser descartável e não haver necessidade de internamento. Uma das características da *Pipelle*® é a numeração externa que é utilizada para a realização da histerometria. Este sistema permite a recolha da amostra através de um sistema de vácuo, mais especificamente, o pistão interno após ser tracionado promove o vácuo no interior da

cânula permitindo a aspiração do endométrio por um orifício na extremidade distal da cânula. Este procedimento é realizado com a paciente em posição ginecológica utilizando um espéculo e tem uma duração de cerca de 30 segundos. É então recolhido um fragmento do endométrio com 1 centímetro, em duplicado, em alíquotas com 1 mL de soro fisiológico.

Preparação das amostras

As biópsias recolhidas foram mecanicamente desagregadas com o sistema *BD™ Medimachine II* com câmaras *Medicon* (50 µm) (Referência 340592) e filtros *Filcon* (50 µm) (Referência 340603). À suspensão de células obtida são adicionados os anticorpos monoclonais para o painel da população dos linfócitos NK e T. Foram ainda obtidos os valores percentuais e as contagens absolutas dos linfócitos utilizando uma estratégia com tubos *BD Trucount™* (Referência 340334).

As amostras foram adquiridas pelo citómetro BD FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), de 8 cores, e a análise de resultados foi realizada com recurso ao software *Infinicyt™* versão 2 (Cytognos, Salamanca, Spain) e ao software *FlowJo™* versão 10 (Ashland, OR: Becton, Dickinson and Company).

Para todas as participantes foram considerados os seguintes dados:

- Idade média em anos;
- Índice de massa corporal (IMC) Kg/m²;
- Número de partos de termo;
- Número de partos pré-termo;
- Número de abortos e gravidezes ectópicas;
- Número de filhos vivos;
- Número de gestações;
- Número de partos;
- Número de perdas embrionárias (<10^a semana);
- Número de perdas fetais (11-24 semanas).

As participantes foram divididas em dois grupos de acordo com os seguintes critérios:

- Grupo controlo: mulheres saudáveis assintomáticas com pelo menos uma gravidez bem-sucedida;
- Grupo estudo (PGRi): mulheres com perda consecutiva de duas ou mais gestações antes das 24 semanas de gestação e cuja investigação dos fatores etiológicos convencionais

para a PGR (fatores anatômicos e cromossômicos parentais, disfunções da tiróide e trombofilias adquiridas e herdadas) foi negativa.

Foram consideradas apenas as perdas gestacionais que foram confirmadas através de ecografia e/ou histologia.

Para o grupo controlo foram recrutadas as mulheres que reuniam os critérios de elegibilidade e que optaram pela introdução do dispositivo intrauterino (DIU) como método contraceptivo. Para a colocação deste dispositivo é necessária a histerometria que consiste na medição do comprimento do útero com um histerómetro. Neste caso, a *Pipelle*[®] é utilizada neste procedimento apresentando uma numeração externa que é utilizada para a histerometria, permitindo a realização da biópsia uterina depois da avaliação da histerometria e antes da introdução do DIU.

A inclusão das participantes em cada grupo foi feita de acordo com os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

- Critérios de inclusão:

- Mulheres com idade compreendida entre os 18 e os 40 anos;
- Com ciclo menstrual regular (25-35 dias);
- Com ecografia pélvica normal.

- Critérios de exclusão:

- A utilização de antibióticos, terapêutica hormonal com estrogénios ou progesterona, tratamento com esteróides ou a presença de um dispositivo intrauterino 2 meses antes da recolha da amostra;
- Ter comorbidades associadas, como asma, diabetes, hipertensão arterial ou doença autoimune;
- Ser fumadora nos 6 meses antecedentes à biópsia endometrial;
- Presença de hidrossalpinge, alterações estruturais uterinas e alterações cromossômicas;
- Última gravidez nos últimos 3 meses.

3.3. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que analisa células ou partículas, desde que estejam suspensas numa solução. Para a sua avaliação, o feixe de partículas em suspensão terá de atravessar um ou vários lasers.

Os citómetros de fluxo são equipamentos compostos por três sistemas: de fluídos, óptico e eletrónico. Do sistema de fluídos faz parte um fluído de revestimento, normalmente uma solução tampão, que é pressurizado para que a amostra intercete o

sistema de lasers com as partículas organizadas num feixe, uma a uma. O sistema ótico contém os lasers de excitação, os tubos fotomultiplicadores e fotodíodos que geram e recolhem os sinais de luz visível e fluorescente. Cada partícula é analisada pela dispersão da luz visível e por um ou mais parâmetros de fluorescência.

À passagem de cada partícula, a luz visível é dispersada em duas direções, em frente (*forward scatter*, FSC) ou lateralmente a 90° (*side scatter*, SSC). O FCS permite determinar o tamanho relativo das células enquanto o SSC indica a complexidade interna das células. Para além da luz dispersada, as células podem emitir luz fluorescente com um determinado comprimento de onda.

Por fim, o sistema eletrónico converte os sinais dos detetores em sinais digitais que podem ser lidos por softwares específicos nos computadores associados aos citómetros de fluxo.

Na área da imunologia esta técnica permite caracterizar conjuntos de populações celulares em suspensão, como amostras de sangue periférico, de sangue de medula óssea ou de tecidos que possam ser desagregados através de processos mecânicos ou de digestão enzimática. Na imunofenotipagem, as células são marcadas com anticorpos conjugados com fluorocromos que se ligam aos antígenos na superfície celular. A fluorescência de uma célula é lida como a quantidade de proteína/ antígeno (na superfície celular, no citoplasma ou no núcleo) a que o anticorpo se liga.

Os *Human Leukocyte Differentiation Workshops* permitiram definir uma nomenclatura comum para os anticorpos monoclonais utilizando a classificação de *cluster* de diferenciação (CD) seguido de um número. A maioria das células imunes podem ser divididas em diferentes populações de acordo com a sua especificidade para cada marcador CD. Como é o caso do CD3 que é utilizado para identificar a população linfocitária T, o CD19 para identificar os linfócitos B e o CD56 para identificar as células NK.

De facto, uma das vantagens da imunofenotipagem é a análise simultânea de várias populações em múltiplos parâmetros. A citometria de fluxo apresenta ainda a vantagem da aquisição de uma grande quantidade de eventos num intervalo de tempo curto possibilitando a caracterização individual de um grande número de células e de um grande número de parâmetros em cada célula (127, 128).

Para este projeto utilizou-se um citómetro de fluxo BD FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) de 8 cores.

Para a imunofenotipagem dos linfócitos NK e T foram utilizados os anticorpos monoclonais CD3, CD45, CD8, CD56, CD57, CD16, NKp44, NKp30, NKp46, 2B4, PD-1 e NKG2D conjugados com os fluorocromos Ficoeritrina (PE), PE Cianina 7 (PECy7) Isotiocianato de fluoresceína (FITC), Proteínas do complexo Peridina-Clorofila (PerCP),

Alofocianina (APC), APC fire, Pacific Blue (PacBlue) e Brilliant Violet 510 (BV510) de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1- Anticorpos monoclonais usados para a caracterização de células NK e T.

Anticorpo monoclonal	Clone	Fluorescência	Referência	Fabricante
CD16	3G8	BV510	302048	Biolegend
CD56	5.1H11	APC	362504	Biolegend
CD57	HNK-1	PacBlue	359608	Biolegend
CD3	SK7	FITC	345764	BD Biosciences
CD45	2D1	PerCP	345809	BD Biosciences
CD8	SK1	PECy7	345809	Biolegend
NKp44	P44-8	PE	325108	Biolegend
NKp46	9E2	APC fire	331934	Biolegend
NKp30	P30-15	APC fire	325226	Biolegend
NKG2D	1D11	APC fire	320834	Biolegend
2B4	C1-7	PE	329508	Biolegend
PD-1	A17188B	PE	621608	Biolegend

O painel de caracterização de células NK e T foi organizado em quatro tubos de acordo com a seguinte tabela:

Tabela 2- Painel de anticorpos monoclonais para imunofenotipagem das células NK e T.

Tubo 1								
Anticorpo monoclonal	CD3		CD45	CD8	CD56		CD57	CD16
Fluorescência	FITC		PerCP	PECy7	APC		PacBlue	BV510
Tubo 2								
Anticorpo monoclonal	CD3	NKp44	CD45	CD8	CD56	NKp30	CD57	CD16
Fluorescência	FITC	PE	PerCP	PECy7	APC	APC fire	PacBlue	BV510
Tubo 3								
Anticorpo monoclonal	CD3	2B4	CD45	CD8	CD56	NKp46	CD57	CD16
Fluorescência	FITC	PE	PerCP	PECy7	APC	APC fire	PacBlue	BV510
Tubo 4								
Anticorpo monoclonal	CD3	PD-1	CD45	CD8	CD56	NKG2D	CD57	CD16
Fluorescência	FITC	PE	PerCP	PECy7	APC	APC fire	PacBlue	BV510

3.4. Protocolos Experimentais

3.4.1. Titulação dos Anticorpos Monoclonais e Compensações

Para otimizar o volume a utilizar de cada anticorpo monoclonal no painel de caracterização de células NK e T foram feitas várias titulações com diferentes volumes de cada anticorpo em amostras de sangue periférico. Para isso, foram identificados tubos de citometria para cada diluição, com os respectivos volumes de cada anticorpo monoclonal. Foram seguidos os seguintes passos:

1. Em cada tubo colocou-se o respectivo volume de anticorpo monoclonal;
2. Adicionaram-se 100 µL de sangue periférico a cada tubo;
3. Após uma homogeneização em vortéx, procedeu-se à incubação no escuro durante 15 minutos, à temperatura ambiente;
4. Após a incubação adicionaram-se 2mL de *BD FACS™ Lysing* (BD Biosciences) em cada tubo e procedeu-se a nova homogeneização no vortéx, seguida de incubação no escuro durante 10 minutos à temperatura ambiente;
5. As suspensões foram então centrifugadas durante 5 minutos a 1200 rpm;
6. Rejeitou-se o sobrenadante e adicionaram-se 2mL de *BD FACSFlow™* (BD Biosciences);
7. Após homogeneização em vortéx, fez-se nova centrifugação durante 5 minutos a 1200 rpm;
8. Por fim, rejeitou-se o sobrenadante, adicionaram-se 0,3 mL de *BD CellFIX™* (BD Biosciences) e fez-se uma homogeneização em vortéx;
9. As amostras foram então adquiridas no citómetro BD FACS Canto II utilizando o software BD FACS Diva.

A titulação dos anticorpos monoclonais feita previamente, permitiu selecionar os volumes descritos na Tabela 3, comparando os valores percentuais e a Intensidade Média de Fluorescência (MFI), com o software *Infinicyt™* versão 2.0 (Cytognos, Salamanca, Spain) das populações de interesse, para cada volume de anticorpo testado.

Para evitar a sobreposição das fluorescências, sobretudo dos fluorocromos *tandem*, foram ainda efetuadas compensações no citómetro para todos os anticorpos monoclonais, incluindo compensações específicas para os anticorpos NKG2D APC fire, NKp46 APC fire, NKp30 APC fire e CD57 PacBlue, utilizando a respetiva titulação selecionada.

3.4.2. Processamento das amostras

O seguinte protocolo foi utilizado para o processamento das amostras.

O protocolo inicia-se com a lavagem do *Medicon* e a desagregação do tecido uterino seguindo os seguintes passos:

1. Pré-lavar o *Medicon* (50 μm) (Referência 340592) duas vezes com 1 mL de BD FACSFlow™ (Referência 342003);
2. Colocar o fragmento de tecido no *Medicon* e adicionar o volume (1 mL) do soro fisiológico no qual a amostra foi colocada inicialmente. Colocar o *Medicon* na unidade *BD™ Medimachine*;
3. Desagregar o tecido durante 60 segundos;
4. Remover a suspensão celular do *Medicon* com o auxílio de uma seringa de 10mL;
5. Filtrar a suspensão através do filtro *Filcon* (50 μ) (Referência 340603) para um tubo de 15mL graduado;
6. Lavar o *Medicon* com 1 mL de BD FACSFlow™ (Referência 342003) e filtrar a suspensão com o auxílio de uma seringa para o mesmo tubo com o filtro *Filcon* utilizado no passo anterior;
7. Repetir o passo 6 três vezes (volume final: \pm 4mL);
8. Centrifugar a suspensão durante 5 minutos a 1200 rpm;
9. Remover o sobrenadante com pipeta Pasteur;
10. Ressuspender o *pellet* em 1000 μL de BD FACSFlow™ (Referência 342003).

3.4.3. Obtenção de Contagens Absolutas de Linfócitos Endometriais

Para determinar as contagens absolutas de células por μL por centímetro de biópsia colhida em *Pipelle* (em 1 mL de tampão), utilizou-se uma estratégia de plataforma única com tubos *BD Trucount™* (BD Biosciences), seguindo-se o seguinte protocolo:

1. Adicionar 5 μL do anticorpo monoclonal CD45 PerCP no tubo *BD Trucount™*;
2. Adicionar 50 μL (quando possível adicionar 100 μL) da suspensão celular ao tubo *BD Trucount™* por pipetagem reversa. Homogeneizar no vortéx;
3. Incubar no escuro durante 20 minutos à temperatura ambiente no escuro;
4. Adicionar 450 μL de *BD FACS™ Lysing* (Referência 349202) e homogeneizar no vortéx;
5. Incubar no escuro durante 15 minutos à temperatura ambiente;
6. Adquirir a amostra, adquirindo sempre que possível o mínimo de 2500 eventos na região dos linfócitos, no citómetro BD FACS Canto II utilizando o software BD FACS Diva.

3.4.3. Imunofenotipagem das células NK e T endometriais

Para o painel de caracterização de células NK e T foram identificados quatro tubos de citometria e a cada tubo foram adicionados os anticorpos monoclonais de acordo com o esquema da Tabela 2 e os volumes da Tabela 3.

Tabela 3- Volume de monoclonais anticorpos usados no painel de células NK e T.

Anticorpo monoclonal e fluorocromo conjugado	Volume (µL)
CD3 FITC	2,5
CD45 PerCP	5
CD8 PECy7	2
CD56 APC	1
CD57 PacBlue	2,5
CD16 BV510	1
NKp44 PE	2,5
NKp30 APC fire	5
2B4 PE	1
NKp46 APC fire	1
PD-1 PE	2,5
NKG2D APC fire	2,5

Após a adição dos anticorpos aos quatro tubos de citometria foi seguido o seguinte protocolo:

11. Homogeneizar e incubar durante 20 minutos à temperatura ambiente no escuro.
12. Lisar (quando necessário);
 - 12.1. Adicionar 2 mL de *BD FACSTM Lysing* (Referência 349202) e homogeneizar;
 - 12.2. Incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente no escuro;
 - 12.3. Centrifugar durante 5 minutos a 1200 rpm;
 - 12.4. Remover o sobrenadante por inversão;
13. Adicionar 2 mL de *BD FACSTFlow™* (Referência 342003), homogeneizar e centrifugar durante 5 minutos a 1200 rpm;
14. Remover o sobrenadante por inversão;
15. Ressuspender o *pellet* em 300µL de *BD CellFIX™* (Referência 340181);
16. Analisar a amostra, adquirindo o volume total da amostra, no citômetro BD FACS Canto II utilizando o software BD FACS Diva.

3.5. Estratégia de análise

A análise das amostras foi dividida por dois softwares: para determinar as contagens absolutas (células/ μL) por centímetro de biópsia com tubos *Trucount™* foi utilizado o software *Infinicyt™* (Cytognos, Salamanca, Spain) e para a análise fenotípica dos quatro tubos do painel de células NK e T foi utilizado o software *FlowJo™* (Ashland, OR: Becton, Dickinson and Company).

No software *Infinicyt™*, a região de linfócitos foi identificada no *dot plot* com os parâmetros CD45 vs SSC-A (Figura 5A). Os dobletes nesta região foram depois eliminados com um novo *gate* no *dot plot* de FSC-H vs FSC-A. Para o cálculo das contagens absolutas foi ainda necessário identificar as esferas dos tubos *Trucount™* nas respectivas *gates* nos *dot plots* com os parâmetros FITC-A vs PE-A e FSC-H vs FSC-A (Figura 5B e 5C).

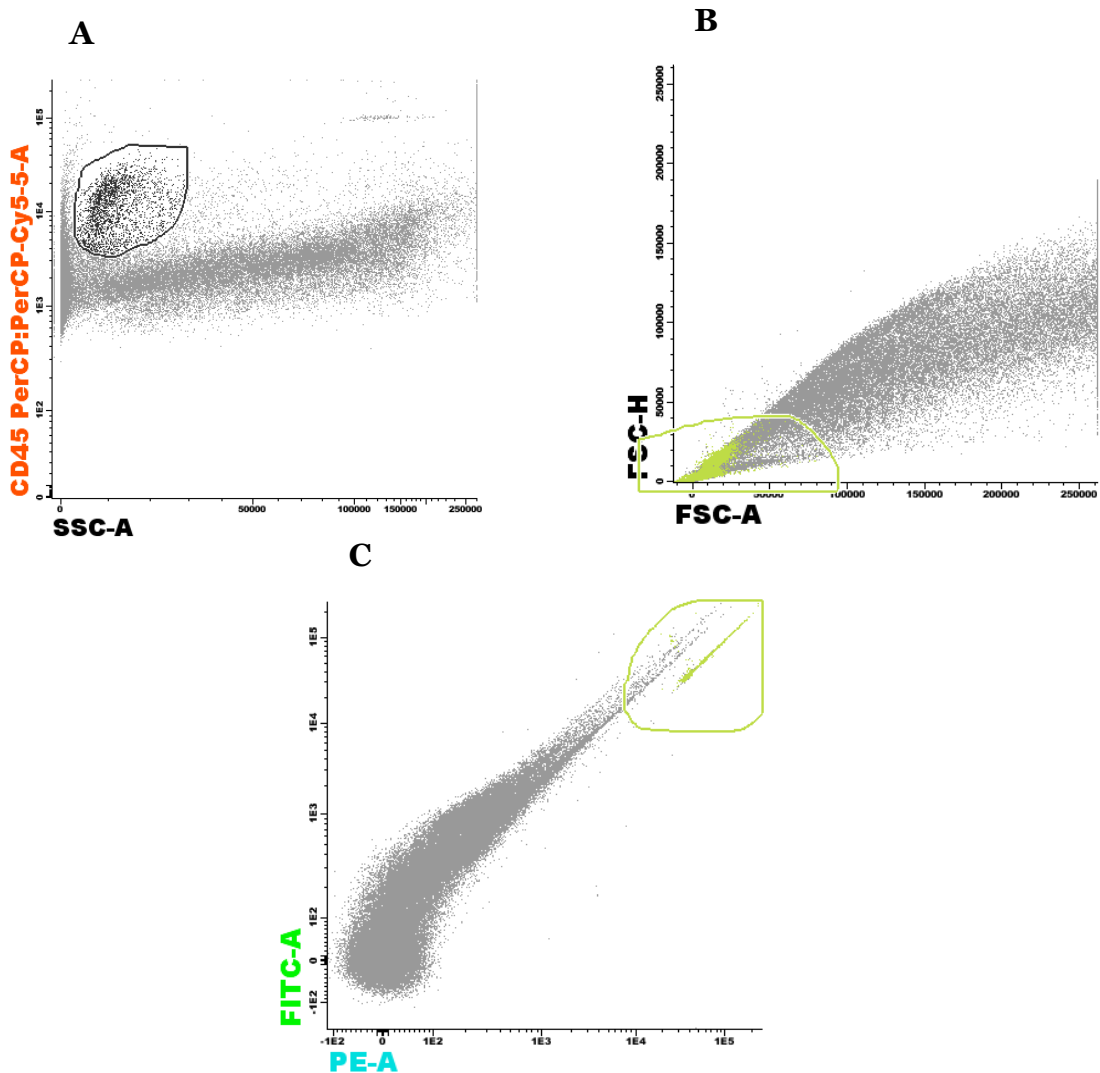


Figura 5- Estratégia de análise para determinação de contagens absolutas.

Para a identificação das células NK e T no software *FlowJo™*, em primeiro lugar foi selecionada a região de linfócitos novamente em *dot plot* de CD45 vs SSC-A, seguindo-se a avaliação em SSC-A vs FSC-A (Figura 6A e 6B). Os dobletes foram depois removidos utilizando os parâmetros FSC-H vs FSC-A num novo *gate* (Figura 6C).

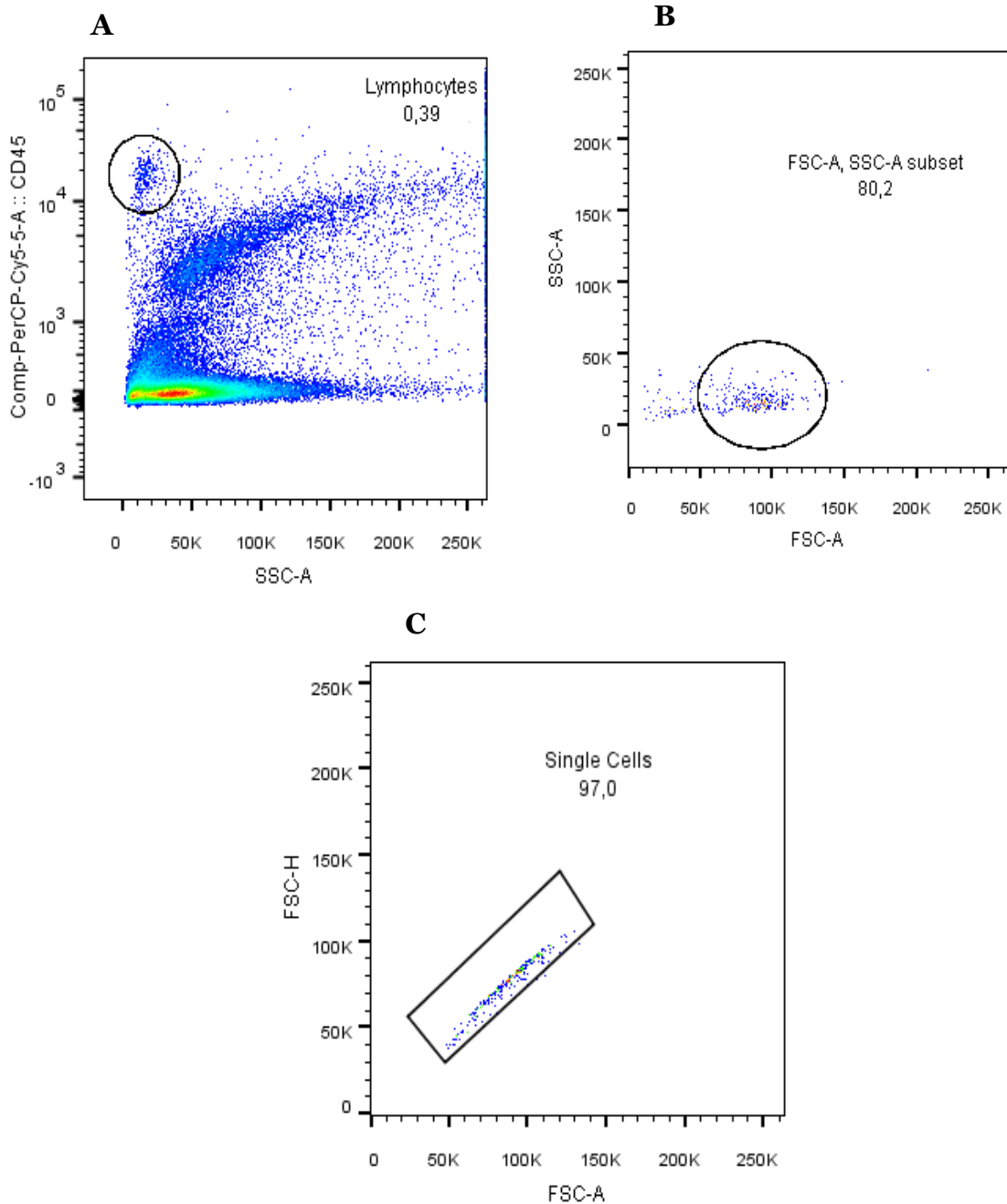


Figura 6- Estratégia de análise para identificação de linfócitos e doubletes.

Considerando já só a população de linfócitos, num *dot plot* de CD3 vs CD56, foram depois identificadas as células T através da expressão de CD3 (eventos CD3⁺), e de seguida dividiram-se em células T CD8⁺ e T CD8⁻ (maioritariamente T CD4⁺) (Figura 7A e 7C). As células NK (CD3⁻ CD56⁺) foram identificadas ainda no *dot plot* de CD3 vs CD56, como sendo os eventos CD56⁺ CD3⁻. Dentro das células NK foi ainda identificada a subpopulação com o fenótipo CD56^{bright}, com fraca expressão do recetor CD16 e a forte expressão do recetor CD56, entre 10⁴ e 10⁵ (Figura 7B). Dentro da população de linfócitos T CD8⁺ foram identificadas em cada tubo as respetivas percentagens de expressão dos marcadores 2B4, NKG2D e PD-1 (Figura 8). Dentro das populações de células NK foram identificadas em cada tubo as respetivas percentagens de expressão dos marcadores NKp44, NKp30, NKp46, 2B4, NKG2D e PD-1 (Figura 9).

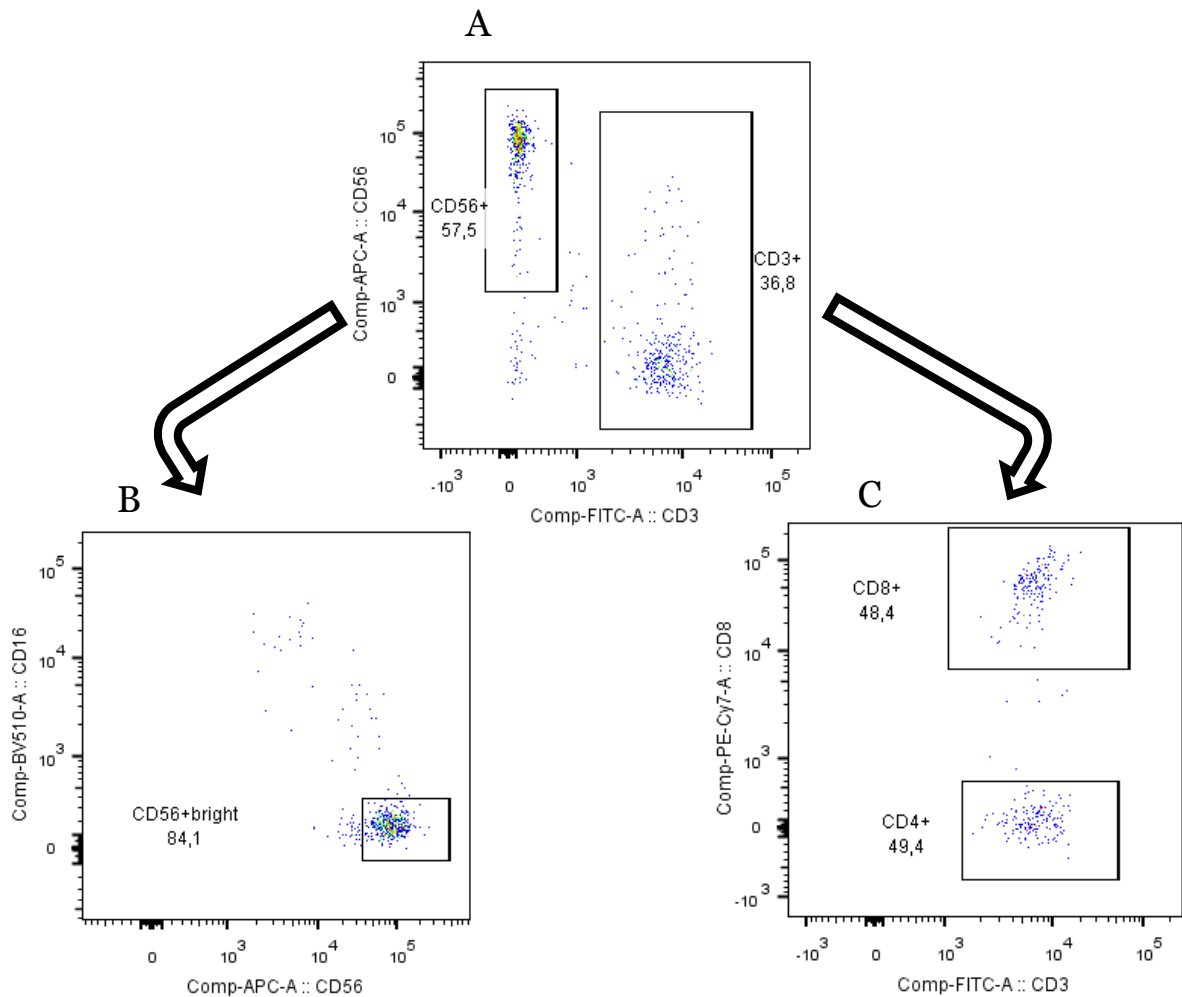
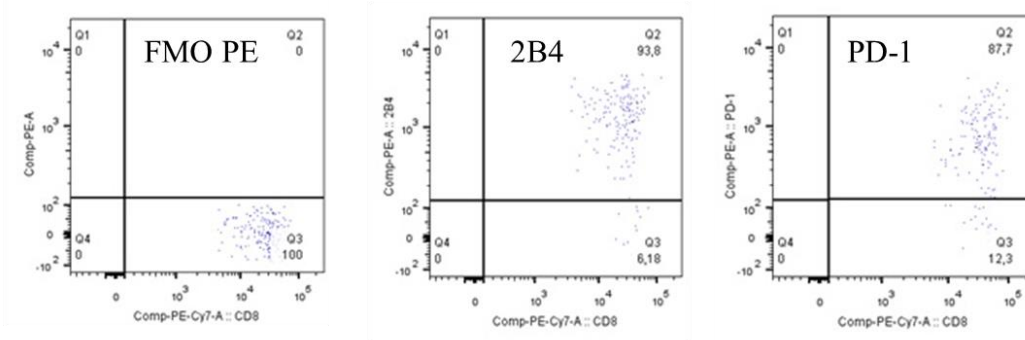


Figura 7- Estratégia de análise para identificação dos linfócitos T CD3⁺, T CD4⁺, T CD8⁺, NK CD56⁺ e NK CD56^{bright}.

A



B

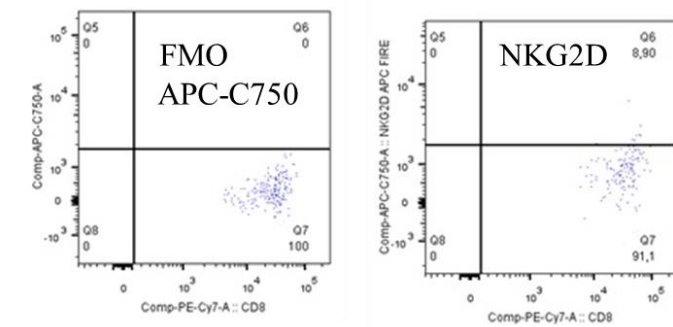
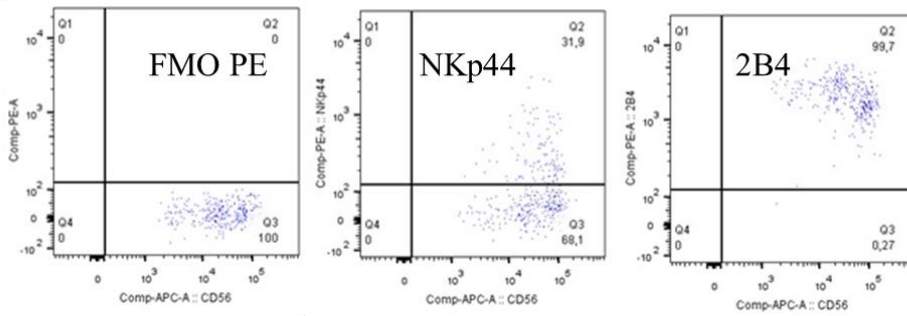


Figura 8- Estratégia de análise para identificação dos marcadores 2B4, PD-1 e NKG2D nas células T CD8⁺.
FMO – *Fluorescence-minus one*

A



B

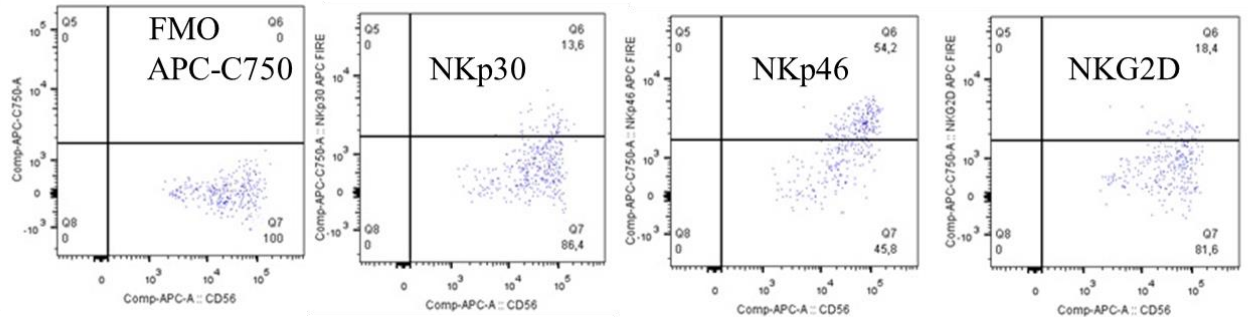


Figura 9- Estratégia de análise para identificação dos marcadores NKp44, NKp30, NKp46, 2B4 e NKG2D nas células NK.

FMO – *Fluorescence-minus one*

3.6. Análise Estatística

Neste estudo a análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism versão 9 (San Diego, California). Para as variáveis categóricas os resultados foram expressos por frequências absolutas e frequências relativas, enquanto para as variáveis contínuas os resultados foram apresentados como média e desvio padrão.

Para os testes estatísticos utilizados foi considerado o intervalo de confiança de 95%, definindo assim diferenças estatísticas significativas quando o *p-value* é inferior a 0,05. Foram realizados testes de normalidade com o teste D'Agostino-Pearson omnibus sempre que necessário.

Para testar a correlação entre os vários parâmetros avaliados foi utilizado o teste não paramétrico de Spearman.

As comparações efetuadas em relação a alguns subgrupos analisados utilizaram o teste não paramétrico de Mann-Whitney U para cálculo de diferenças.

Para a avaliação da reprodutibilidade das análises por citometria de fluxo foi considerado que o coeficiente de variação (CV) obtido para os valores das diferentes populações e contagens entre os replicados de cada amostra. Nesta avaliação foi considerado um valor de CV aceitável quando inferior a 15% (129).

Na abordagem final de eventuais valores de referência das populações linfocitárias em mulheres com PGRI, apesar do número total de amostras ser baixo, foram usados os valores dos percentis 2,5 e 97,5 para cada população.

Capítulo 4- Resultados e Discussão

4.1. Caracterização demográfica e obstétrica da população do estudo

Neste estudo foram incluídas 11 participantes de acordo com os critérios de inclusão e exclusão já referidos: 10 mulheres com história de PGRI e 1 controlo saudável. A restrição dos critérios de inclusão e exclusão, bem como a opção da colocação do DIU, não permitiram o recrutamento de um maior número de participantes para incluir no grupo controlo até à conclusão deste estudo piloto.

Para todas as participantes foram recolhidos os dados referentes às suas características demográficas e obstétricas, nomeadamente idade, índice de massa corporal (IMC), número de partos de termo, número de partos pré-termo, número de abortos e gravidezes ectópicas, número de filhos vivos, número de gestações, número de partos, número de perdas embrionárias (inferior a 10 semanas gestacionais) e número de perdas fetais (entre as 11 e as 24 semanas). Na tabela 4 são apresentados estes dados para as 10 mulheres incluídas no grupo de estudo PGRI.

Tabela 4- Características demográficas e obstétricas do grupo de estudo PGRI.

	PGRi (n=10)
Idade (anos), Média ± DP	35,1 ± 4,63
IMC (Kg/m²), Média ± DP	24,60 ± 5,74
Nº de Gestações anteriores, n (%)	
2-3	3 (30)
4-5	4 (40)
6-8	3 (30)
Partos com nados vivos, n (%)	
Não	4 (40)
Sim	6 (60)
Número	
1	2/6 (33,3)
≥2	4/6 (66,7)
Filhos Vivos, n (%)	
Não	4 (40)
Sim	6 (60)
Número	
1	2/6 (33,3)
≥2	4/6 (66,7)
Partos Termo, n (%)	
Não	4 (40)
Sim	6 (60)
Número	
1	2/6 (33,3)
≥ 2	4/6 (66,7)
Partos Pré-termo, n (%)	
Não	10 (100)
Sim	0 (0)
Nº de Abortos/ Gestações ectópicas, n (%)	
2	2 (20)
3	4 (40)
≥4	4 (40)
Perdas <10 semanas, n (%)	
Não	0 (0)
Sim	10 (100)
Número	
2	3 (30)
3	3 (30)
≥4	4 (40)
Perdas 11-24 semanas, n (%)	
Não	8 (80)
Sim	2 (20)
Número	
1	2/2 (100)

Legenda: DP- Desvio Padrão; IMC- Índice de massa corporal; PGRI- Perda gestacional recorrente idiopática.

A participante controlo é uma mulher com 37 anos de idade, com IMC de 21 Kg/m², um filho vivo. Teve apenas uma gestação com um parto de termo, não tendo sofrido nenhum aborto nem de gravidez ectópica.

A idade é um fator importante a considerar nas mulheres que sofrem de perdas gestacionais, uma vez que a sua incidência aumenta com a idade. Enquanto que para as mulheres com idade inferior a 35 anos o risco de perdas gestacionais no primeiro trimestre se situa entre 9% a 12%, nas mulheres a partir dos 40 anos este risco aumenta para 50% (130). De facto, um estudo realizado na população escocesa determinou que o risco de aborto aumenta consideravelmente para mulheres com idade superior a 30 anos independentemente do seu historial obstétrico (131).

Uma vez que a idade média das mulheres recrutadas para o nosso grupo de estudo PGRi é de 35,1 anos, pode ser necessário recrutar um maior número de mulheres com idade mais jovem, de forma a compreender melhor a relação entre a perda gestacional recorrente de causa idiopática e a idade.

Em relação ao IMC e à sua associação com a PGR, parece existir uma correlação positiva entre estas duas variáveis. Nomeadamente, as mulheres obesas que sofrem perdas gestacionais recorrentes têm um risco aumentado de perda gestacional numa futura gestação (132, 133). Os dados recolhidos para o grupo deste estudo demonstram que o IMC destas mulheres está na generalidade dentro dos valores normais de IMC, sendo que a Organização Mundial de Saúde considera um peso normal para o intervalo de valores do IMC entre 18,5 a 24,9 Kg/m² (134). Das 10 mulheres recrutadas, apenas uma sofre de obesidade de grau III e duas de excesso de peso, por isso, qualquer associação com a obesidade a ser estudada careceria, portanto, de um n maior.

Ticconi e colaboradores (135) também determinaram que as mulheres que sofrem de PGR têm risco aumentado de desenvolver outras complicações durante a gravidez. As mulheres que sofrem de PGR secundária, ou seja, mulheres que já têm filhos ou já tiveram gestações para além das 24 semanas, parecem exibir uma maior taxa de complicações durante a gravidez do que mulheres que sofrem de PGR primária, ou seja, mulheres que nunca atingiram uma gravidez viável além das 24 semanas. Já nos casos de PGRi, parece existir um risco aumentado para o desenvolvimento de pré-eclâmpsia.

O estudo retrospectivo de Roepke e colaboradores (136) também demonstrou que as mulheres que sofrem de PGR têm um risco aumentado para partos pré-termo e para o deslocamento prematuro da placenta normalmente inserida.

Um outro estudo de Ticconi e colaboradores (137), em que foram recrutadas 288 participantes com PGRi, demonstrou que a maioria das perdas gestacionais ocorrem antes das 12 semanas de gestação. A mesma tendência se observa à escala do nosso estudo, com todas as mulheres recrutadas a sofrerem de perdas gestacionais até às 10 semanas, e

destas 40% com 4 ou mais perdas. Apenas 2 das 10 mulheres recrutadas com PGR sofreram de perdas gestacionais entre as 11 e as 24 semanas.

A utilização de um teste não paramétrico de correlação de Spearman não permitiu encontrar correlações significativas entre os dados demográficos e obstétricos recolhidos. Com o teste não paramétrico de Mann-Whitney U foram também avaliadas eventuais diferenças entre mulheres com PGR nulíparas, e com história de partos anteriores, não se tendo encontrado diferenças com significância estatística nos dados demográficos e obstétricos.

4.2. Estudo da Reprodutibilidade das Contagens Absolutas dos Linfócitos Endometriais por Citometria de Fluxo

O presente estudo pretendeu aplicar uma estratégia de caracterização imunofenotípica de amostras endometriais por Citometria de Fluxo, incluindo uma abordagem com contagens absolutas. Para este efeito, a contagem absoluta de linfócitos endometriais recorreu a uma estratégia de plataforma única, com tubos *BD Trucount™* (BD Biosciences), avaliando replicados em cada amostra. A Tabela 5 apresenta os valores médios de linfócitos/ μL por centímetro de amostra em tubo *Pipelle*. Apresentam-se, igualmente, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) das réplicas para cada amostra.

Considerando o valor do CV entre cada replicado de cada amostra deve ser inferior a 15% (129) para que a técnica seja considerada reprodutível, obtivemos um CV médio abaixo dos 10%, o que sugere uma reprodutibilidade aceitável para a aplicação futura desta abordagem no acompanhamento de doentes. Porém, existem dois valores a destacar por apresentarem valores de CV superiores a 15%, nomeadamente as amostras PGRi5 (16,65%) e PGRi8 (28,05%).

Estas variações podem dever-se, contudo, a problemas técnicos na manipulação, ou até à baixa concentração de células (como se verificou na amostra PGRi5), que podem condicionar o desempenho do método. De facto, o número de amostras ensaiadas é ainda baixo, mas a continuação da implementação em rotina do protocolo aqui otimizado poderá promover uma melhoria ao nível da reprodutibilidade, ainda que no geral o CV das amostras apresente percentagens inferiores aos 15% propostos na literatura.

Por outro lado, esta variação dos CV pode estar relacionada com um menor número de eventos adquiridos, sobretudo em amostras com contagens celulares reduzidas. Como seria expectável as biópsias uterinas são muito menos ricas em linfócitos do que amostras de sangue periférico. Além disso, o próprio processamento destas amostras pode causar uma maior perda de células. Deste modo, e considerando eventuais

limitações em amostras com menor concentração celular, a realização de duplicados ou a utilização de volumes de amostra mais elevados nestas circunstâncias poderá ser também um ponto a considerar para assegurar a fiabilidade destas avaliações.

Tabela 5- Valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação relativos às contagens absolutas de linfócitos endometriais para cada amostra.

	Média (Linfócitos/μL)	DP	CV (%)
PGRi1	27,21	1,20	4,39
PGRi2	80,66	4,29	5,31
PGRi3	44,61	1,47	3,28
PGRi4	72,89	2,17	2,98
PGRi5	12,95	2,15	16,65
PGRi6	32,44	2,63	8,11
PGRi7	41,12	0,02	0,06
PGRi8	58,10	16,30	28,05
PGRi9	42,72	3,73	8,72
PGRi10	67,79	2,92	4,30
Controlo	121,87	2,21	1,81
CVm			7,61

Legenda: DP- Desvio Padrão; CV- Coeficiente de Variação; PGRi- Perda gestacional recorrente idiopática; CVm- Coeficiente de Variação médio.

Para que seja possível avaliar a repetibilidade e reprodutibilidade em citometria de fluxo há ainda outros fatores a considerar. A estabilidade da amostra é um destes fatores. No caso das amostras que não sejam avaliadas algumas horas após a sua recolha é importante considerar que alguns marcadores ou algumas populações celulares podem-se perder ou alterar durante o armazenamento e envio da amostra. Assim, é de todo recomendável o processamento das amostras até 4 / 6 horas após a colheita, como efetuado em todas as amostras deste grupo.

Por fim, para a utilização futura desta estratégia, é fundamental o estabelecimento de intervalos de referência, que devem basear-se num número de amostras significativo. Alguns autores recomendam um mínimo de 10 participantes em cada grupo para considerar a obtenção de valores de referência (138). Assim, os nossos dados, ainda que preliminares, apontam para uma concentração de linfócitos uterinos em mulheres com PGRi entre 12,95 – 80,66 linfócitos/ μ L por centímetro de amostra em tubo *Pipelle*, considerando a distribuição dentro dos percentis 2,5 e 97,5 da média. É fundamental para este efeito dar continuidade ao estudo, sobretudo com a inclusão de controlos sem PGRi, para comparação e obtenção dos respetivos intervalos de normalidade.

4.3. Estudo da Reprodutibilidade das Populações Linfocitárias Endometriais por Citometria de Fluxo

Procedeu-se de seguida à avaliação da estratégia para a caracterização de populações celulares endometriais. Desta forma, fez-se igualmente a avaliação da reprodutibilidade entre os replicados de cada amostra em relação às populações linfocitárias T, T CD8⁺, NK e NK CD56^{bright}.

Os valores que podemos encontrar na Tabela 6 mostram uma vez mais que o CV médio para cada população se encontra abaixo dos 15% definido na literatura, com as populações menos representadas a mostrarem valores mais elevados. Novamente se verifica que as amostras PGRi2 e PGRi8 apresentam valores de CV mais elevados o que parece apontar para alguma limitação destas amostras, ou de ordem técnica, relacionada com o seu processamento, ou eventualmente com a constituição efetiva dos replicados destas amostras.

Tabela 6- Valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação relativos às percentagens das populações linfocitárias T, T CD8⁺, NK e NK CD56^{bright} caracterizadas em cada amostra.

	Linfócitos T			Linfócitos T CD8 ⁺			Células NK			Células NK CD56 ^{bright}		
	Média (%)	DP	CV (%)	Média (%)	DP	CV (%)	Média (%)	DP	CV (%)	Média (%)	DP	CV (%)
PGRi1	67,26	2,07	3,08	57,26	2,39	4,27	21,29	1,60	7,56	39,21	8,43	22,08
PGRi2	60,88	24,52	40,24	41,28	17,23	42,09	32,70	13,26	41,02	21,43	10,93	47,87
PGRi3	34,75	1,36	3,86	56,98	3,35	6,03	59,59	1,45	2,42	85,10	0,81	0,95
PGRi4	55,34	2,77	5,02	57,76	2,50	4,33	40,34	2,93	7,23	61,30	1,24	2,03
PGRi5	76,88	2,42	3,14	39,33	2,52	6,41	20,68	2,14	11,73	30,80	5,16	16,66
PGRi6	73,20	1,21	2,57	40,78	2,28	7,70	13,48	1,10	10,56	41,84	3,29	10,76
PGRi7	43,00	2,36	5,65	43,51	1,81	4,11	40,29	3,64	9,04	50,66	3,81	7,65
PGRi8	48,94	11,78	22,48	49,14	2,87	5,81	47,54	11,78	26,43	30,81	7,19	27,27
PGRi9	57,96	1,79	3,08	46,45	1,96	4,17	39,81	1,64	4,13	41,58	4,02	9,66
PGRi10	47,68	2,74	5,75	67,81	2,15	3,20	47,99	2,99	6,25	55,86	3,35	6,05
Controlo	35,56	1,26	1,16	56,86	0,98	1,12	57,33	1,71	1,40	88,09	1,04	0,84
CVm			8,73			8,11			11,62			13,80

Legenda: CV- Coeficiente de Variação; PGRi- Perda gestacional recorrente idiopática; CVm- Coeficiente de Variação médio. Percentagens de células T e NK em relação ao total de linfócitos, percentagem de células T CD8 em relação ao total de células T e percentagem de células NK CD56^{bright} em relação ao total de células NK. Nota: Para o cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação destas populações linfocitárias foram considerados os valores médios obtidos de quatro tubos em cada replicado.

Tendo em vista a caracterização aprofundada das populações celulares acima referidas, foi ainda avaliada a reprodutibilidade da técnica para aferir a expressão de marcadores 2B4, PD-1 e NKG2D em linfócitos T CD8⁺ endometriais.

Na tabela 7 apresentam-se os valores referentes aos replicados de cada amostra para os marcadores referidos. Apesar de o marcador NKG2D apresentar alguns valores do CV, e mesmo o valor médio de CV, superiores aos 15%, a reprodutibilidade dos marcadores 2B4 e PD-1 é significativamente melhor, com um desempenho geral abaixo até dos 10%.

Tabela 7- Valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação relativos aos marcadores 2B4, PD-1 e NKG2D na população de linfócitos T CD8⁺ de cada amostra.

	Linfócitos T CD8 ⁺								
	2B4			PD-1			NKG2D		
	Média (%)	DP	CV (%)	Média (%)	DP	CV (%)	Média (%)	DP	CV (%)
PGRi1	94,70	2,50	2,64	59,25	0,85	1,43	28,50	11,10	38,95
PGRi2	78,20	18,20	23,27	49,75	6,25	12,56	50,15	30,61	30,61
PGRi3	96,00	0,80	0,83	68,40	3,30	4,82	17,75	5,25	29,58
PGRi4	94,70	0,50	0,53	89,35	0,05	0,06	33,35	7,05	21,14
PGRi5	94,15	4,45	4,73	58,75	6,75	11,49	52,20	5,80	11,11
PGRi6	97,00	0,50	0,52	77,80	3,40	4,37	24,45	0,65	2,55
PGRi7	95,10	1,30	1,37	88,25	0,55	0,62	8,64	0,27	3,07
PGRi8	98,80	0,20	0,21	71,20	1,10	1,54	41,30	0,50	1,21
PGRi9	93,35	0,75	0,80	73,60	0,90	1,22	79,85	7,95	9,96
PGRi10	97,17	0,53	0,55	60,80	4,88	8,03	65,77	4,61	7,01
Controlo	86,80	2,40	2,76	66,30	1,50	2,26	11,55	2,46	21,26
CVm	3,47			4,40			16,04		

Legenda: CV- Coeficiente de Variação; PGRi- Perda gestacional recorrente idiopática; CVm- Coeficiente de Variação Médio.

Por sua vez, dentro das células NK foram avaliadas as expressões dos NCRs, NKp44, NKp30 e NKp46 (Tabela 8) e ainda expressão dos marcadores 2B4e NKG2D (Tabela 9), cujas percentagens apresentaram, porém, valores de CV com pior desempenho. De todos os marcadores avaliados, podemos destacar o NKp46 e o 2B4 por serem os marcadores com valores mais reprodutíveis, em que no caso do 2B4 o valor médio do CV é mesmo próximo de zero, podendo ser justificado pelos níveis de expressão elevados deste marcador. Para os restantes marcadores (NKp44, NKp30 e NKG2D), os valores de CV entre réplicas são no geral bastante mais variáveis, demonstrando que a sua

utilização para a caracterização dos linfócitos NK pode estar mais limitada. Evidenciam-se aqui níveis de expressão mais baixos do recetor NKp30, reforçando a ideia de que a sensibilidade da técnica pode limitar a sua reprodutibilidade e, portanto, a sua aplicação em alguns marcadores. Obviamente que, sendo este um estudo piloto, inicial, a sua continuação, bem como a otimização da técnica e da própria estratégia de análise numa amostra de maiores dimensões, permitirá retirar conclusões definitivas em relação a esta abordagem enquanto estratégia auxiliar no diagnóstico e monitorização destas doentes, bem em relação aos marcadores a caracterizar.

Tabela 8- Valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação relativos aos marcadores NKp44, NKp30, NKp46 na população de células NK em cada amostra.

Células NK												
	NKp44			NKp30			NKp46			NKp46 em células NK CD56 ^{bright}		
	Média (%)	DP	CV (%)	Média (%)	DP	CV (%)	Média (%)	DP	CV (%)	Média (%)	DP	CV (%)
PGRi1	35,30	6,30	17,85	37,05	0,75	2,02	38,25	4,95	12,94	78,65	0,85	1,08
PGRi2	7,80	7,80	100,00	11,22	2,89	25,72	56,65	9,55	16,86	90,20	9,80	10,86
PGRi3	36,10	6,10	16,90	8,68	2,63	30,26	45,45	0,95	2,09	48,25	4,45	9,22
PGRi4	23,45	3,45	14,71	17,65	1,45	8,22	54,00	2,70	5,00	64,45	1,05	1,63
PGRi5	32,30	9,70	30,03	25,45	12,55	49,31	33,70	18,70	55,49	58,90	18,90	32,09
PGRi6	25,65	2,95	11,50	11,10	6,90	62,16	31,60	0,80	2,53	62,50	6,70	10,72
PGRi7	28,25	3,65	12,92	11,19	2,41	21,54	56,25	2,05	3,64	82,50	2,70	3,27
PGRi8	20,85	0,85	4,08	9,03	1,87	20,71	69,65	3,75	5,38	83,30	5,00	6,00
PGRi9	29,40	3,00	10,20	13,25	0,85	6,42	59,60	4,70	7,89	82,60	1,50	1,82
PGRi10	43,95	0,45	1,02	11,74	4,74	38,90	59,10	7,30	12,35	73,33	8,21	11,20
Controlo	26,60	13,90	14,66	1,83	0,01	0,55	28,25	6,95	24,60	32,90	3,60	10,94
CVm	21,26			24,16			13,52			8,99		

Legenda: CV- Coeficiente de Variação; PGRi- Perda gestacional recorrente idiopática; CVm- Coeficiente de Variação médio.

Tabela 9- Valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação relativos aos marcadores 2B4 e NKG2D na população de células NK em cada amostra.

	Células NK					
	2B4			NKG2D		
	Média (%)	DP	CV (%)	Média (%)	DP	CV (%)
PGRi1	97,60	2,40	2,46	29,35	14,65	49,91
PGRi2	99,95	0,05	0,05	31,85	8,15	25,59
PGRi3	99,80	0,20	0,20	3,31	1,23	37,07
PGRi4	98,35	0,05	0,05	24,45	5,35	21,88
PGRi5	98,15	1,85	1,88	15,45	0,45	2,91
PGRi6	95,90	2,70	2,82	19,65	3,25	16,54
PGRi7	99,05	0,65	0,66	15,85	2,55	16,09
PGRi8	99,85	0,05	0,05	6,62	0,45	6,80
PGRi9	99,50	0,50	0,50	23,45	5,95	23,37
PGRi10	98,85	0,55	0,56	17,60	8,51	48,34
Controlo 1	99,15	0,15	0,15	0,74	0,20	26,53
CVm			0,85			25,00

Legenda: CV- Coeficiente de Variação; PGRi- Perda gestacional recorrente idiopática; CVm- Coeficiente de Variação médio.

Todas as amostras mostraram a expressão de 2B4 na totalidade das células NK CD56^{bright}. As amostras PGRi apresentam também uma elevada expressão do recetor Nkp46 nas células NK CD56^{bright}, com um valor médio de CV entre replicados de 8,99%, o que sugere um bom nível de reprodutibilidade da técnica para este marcador.

4.4. Populações Linfocitárias Endometriais em Mulheres com PGRi

Na tabela 10 apresentam-se os valores obtidos para as várias populações em estudo na amostra de doentes com PGRi estudadas. As populações de linfócitos T e NK foram avaliadas dentro do gate dos linfócitos CD45⁺, e por isso as percentagens aqui apresentadas para estas populações são referentes à percentagem em relação ao total de linfócitos (CD45⁺ SSC^{low}). A percentagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ foi avaliada dentro da população T CD3⁺ e por isso as suas percentagens são avaliadas em relação ao total de linfócitos T. Por fim, a percentagem de linfócitos NK CD56^{bright} é apresentada como a percentagem em relação ao total de linfócitos NK CD56⁺. As percentagens dos restantes marcadores são sempre apresentadas em função do total da respetiva população mãe em que estão a ser avaliados.

Tabela 10- Populações linfocitárias endometriais em mulheres com PGRI.

	PGRI (n=10)		
	Média (%)	DP	Percentil 95
Linfócitos T CD3⁺ (%)	56,59	13,43	34,75 – 76,88
Linfócitos T CD4⁺ (%)	44,93	8,75	29,21 – 56,65
Linfócitos T CD8⁺ (%)	50,03	9,48	39,33 – 67,81
2B4 ⁺ (%)	93,69	5,58	78,20 – 97,00
PD-1 ⁺ (%)	69,44	13,24	49,75 – 89,35
NKG2D ⁺ (%)	39,98	21,66	8,64 – 79,85
Linfócitos NK CD56⁺ (%)	36,37	14,35	13,48 – 59,59
NKp30 ⁺ (%)	15,64	9,02	8,68 – 37,05
NKp44 ⁺ (%)	28,31	9,88	7,80 – 43,95
NKp46 ⁺ (%)	50,43	12,57	31,60 – 69,65
2B4 ⁺ (%)	98,70	1,26	95,90 – 99,95
NKG2D ⁺ (%)	18,66	9,05	3,31 – 31,85
Linfócitos NK CD56^{bright} (%)	45,86	18,35	21,43 – 85,10
NKp46 ⁺ (%)	72,49	13,37	48,25 – 90,20
2B4 ⁺ (%)	100,00	0,00	-

Estes resultados permitem de algum modo fazer uma caracterização das populações linfocitárias endometriais em mulheres com PGRI, destacando-se como população predominante os linfócitos T, e dentro destes, os linfócitos T CD8⁺. Dentro dos vários marcadores estudados, o marcador mais expresso por todas as populações linfocitárias aqui descritas é o 2B4. No entanto, nos linfócitos T CD8⁺ podem ainda observar-se níveis elevados da expressão de PD-1.

Na população de células NK CD56⁺ destaca-se também a expressão do NKp46, sendo o marcador mais expresso logo a seguir ao 2B4. As células NK CD56^{bright} expressam níveis ainda mais elevados de NKp46 e de 2B4. É de notar que o marcador NKG2D tem uma maior expressão em linfócitos T CD8⁺ do que em células NK.

De acordo com o estudo de Marron e colaboradores (86), as células NK CD56^{bright} são os linfócitos uterinos mais abundantes tanto em controlos saudáveis como nos casos de PGR. De facto, considerando os dados globais deste estudo verificamos que os linfócitos T são mais abundantes na generalidade das amostras, quando considerados conjuntamente, mas a avaliação em separado de células T CD4 e células T CD8 corrobora as observações de Marron uma vez que as células NK serão no geral mais prevalentes quer em relação aos linfócitos T CD4, quer em relação aos linfócitos T CD8 (Células T CD4 26,19±10,30% do total de linfócitos; Células T CD8 28,01±6,78% em relação ao total de linfócitos). Porém, destacam-se na população do nosso estudo algumas amostras com

notória redução da presença de células NK em relação ao compartimento T (vejam-se as amostras PGRi5 e PGRi6). Estes dados, que subtendem perfis imunes distintos em mulheres com PGRi, reforçam a necessidade de um estudo individualizado e aprofundado em cada doente.

Foi também descrito por estes autores que é possível um rácio de linfócitos T CD4: CD8 invertido, bem com um aumento dos linfócitos T CD8⁺ nos casos de perdas gestacionais recorrentes. Tal como reportado por Marron, também neste estudo se observou uma tendência para maior presença uterina de linfócitos T CD8⁺ do que linfócitos T CD4⁺. A reforçar esta ideia, salienta-se que a estratégia aqui usada infere a população de células T CD4 pela ausência de expressão de CD8, o que pode sobrevalorizar o seu número ao incluir outras populações como células T TCR gama delta (CD4⁻ e CD8⁻).

Utilizando a citometria de fluxo, Fukui e colaboradores (105), avaliaram a expressão dos NCRs nos linfócitos NK endometriais e demonstraram que a percentagem de linfócitos CD56⁺/NKp46⁺ é significativamente mais baixa em mulheres que sofrem de PGR do que nos controlos. Em relação à expressão dos recetores NKp44 e NKp30 nas células NK não encontraram diferenças. No entanto, o estudo imunohistoquímico de Giuliani e colaboradores (114) reportou um maior rácio de células NKp46⁺: CD56⁺ nas mulheres que sofrem de PGRi em relação ao observado em mulheres férteis, sugerindo assim que a expressão de NKp46 pode ter influência nos casos de PGR. Em consonância, o nosso estudo documenta também níveis mais elevados de expressão de NKp46 nas células NK de mulheres com PGRi, em comparação com os níveis de expressão de outros recetores como o NKp30 e o NKp44.

Ainda dentro dos recetores expressos pelos linfócitos endometriais, o PD-1 parecer ser um recetor relevante na imunotolerância materna. Meggyes e colaboradores (88) realizaram um estudo em amostras de sangue periférico e amostras decíduais, em que também demonstraram um aumento da população de linfócitos T CD8⁺ na decídua em comparação com o sangue periférico. A avaliação da expressão do recetor PD-1 nestes linfócitos T CD8⁺ demonstrou uma maior expressão deste recetor na decídua. O mesmo estudo demonstrou ainda que os linfócitos T CD8⁺ PD-1⁺ expressam níveis mais elevados do recetor NKG2D na decídua do que na periferia, sendo que estas células duplas positivas T CD8⁺ PD-1⁺ NKG2D⁺ exibem uma reduzida capacidade citotóxica em comparação com a periferia. Para avaliar a relevância deste marcador em problemas reprodutivos, são ainda necessários mais estudos, no entanto o nosso estudo demonstrou uma elevada expressão do marcador PD-1 nos linfócitos T CD8⁺ nas mulheres que sofrem de PGRi.

Foi ainda avaliada a possível correlação dos parâmetros imunes entre si, bem com as características demográficas e obstétricas das mulheres estudadas. A partir desta análise, identificou-se uma correlação positiva entre a percentagem de células NK CD56⁺

NKp46⁺ e células NK CD56⁺ 2B4⁺ (Teste de Spearman, $r=0,74$, $p=0,017$), o que traduzirá alguma associação dos recetores.

A avaliação da correlação com os dados demográficos permitiu identificar uma correlação positiva entre a percentagem de linfócitos CD56^{bright} NKp46⁺ e o número de partos de termo (Teste de Spearman, $r=0,69$, $p=0,032$) e o número de gestações ($r= 0,71$, $p=0,025$). Ainda que muito preliminar, esta associação de valores mais baixos de NKp46 com menor número de partos ou gestações deverá ser explorada na continuação do estudo, sugerindo o eventual papel deste recetor na fisiopatologia da PGRi.

Por outro lado, foi encontrada ainda uma correlação positiva entre a percentagem de linfócitos T CD4⁺ e o IMC ($r= 0,65$, $p=0,049$). É por isso, importante salientar as interações entre os processos imunes e o estado nutricional a obesidade. Tradicionalmente a obesidade é caracterizada por um estado de inflamação crónica, com uma elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, em que os linfócitos T parecem desempenhar um papel crucial no processo inflamatório. Mulheres obesas têm uma maior probabilidade de desenvolverem complicações durante a gravidez, nomeadamente diabetes gestacional, pré-eclâmpsia e partos pré-termo (139). As mulheres com excesso de peso e obesidade têm também um risco aumentado de perdas gestacionais (140). A nutrição é essencial durante a gravidez para garantir o fornecimento de nutrientes ao feto em desenvolvimento. No entanto, a nutrição no período antes da conceção parece também influenciar o desfecho da gravidez (141). Na continuidade do estudo será então relevante incluir um maior número de participantes de forma a estratificar o impacto das várias categorias do IMC na perda gestacional recorrente de causa idiopática.

A avaliação individual de cada doente e da respetiva caracterização celular uterina pode permitir a seleção de uma terapêutica imunomoduladora mais direcionada para cada perfil imunológico endometrial. Dentro das imunoterapias atualmente utilizadas para o tratamento dos casos de PGR podemos encontrar a imunização com antigénios paternos, a imunoglobulina intravenosa (IVIg), a emulsão *Intralipid* e também o uso de fatores de crescimento como o G-CSF. No caso da IVIg e da *Intralipid* são métodos direcionados para a inibição da atividade citotóxica dos linfócitos NK. No entanto, se considerarmos o grupo de mulheres com PGR como um grupo homogéneo, estas imunoterapias podem não ser eficazes para todos os casos, especialmente se esta abordagem tiver em conta apenas a quantificação grosseira das células NK, como vimos neste estudo, com perfis de recetores tão distintos. Existe, por isso, a necessidade de uma caracterização mais detalhada dos linfócitos NK uterinos, com a possível identificação de biomarcadores para PGR (142). Como este estudo piloto demonstra, a citometria de fluxo pode ser uma metodologia muito útil permitindo uma abordagem terapêutica individualizada das mulheres com perda gestacional recorrente idiopática.

Capítulo 5- Conclusões e Perspetivas Futuras

A principal conclusão a retirar deste estudo é a possibilidade da utilização da citometria de fluxo na abordagem imunofenotípica de amostras endometriais. De facto, esta metodologia permite abordar com a reprodutibilidade necessária a quantificação celular, mas sobretudo uma caracterização multiparamétrica aprofundada, sendo evidente por exemplo a capacidade de caracterização de marcadores específicos em linfócitos T CD8⁺ (2B4 e PD-1) e células NK (NKp46 e 2B4).

Este estudo piloto de aplicação da imunofenotipagem por citometria de fluxo a amostras uterinas também permitiu identificar os linfócitos T como a população linfocitária predominante no ambiente uterino em mulheres com PGRi, em concreto, os linfócitos T CD8⁺. No entanto, quando se consideram as subpopulações de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ em separado, em relação ao total de linfócitos, as células NK destacam-se como a população linfocitária mais prevalente na generalidade das amostras. Foi ainda possível identificar uma associação do recetor NKp46 com gestações anteriores, que poderá vir a ser explorado no futuro.

Apesar deste estudo demonstrar que a citometria de fluxo é uma técnica válida a utilizar na análise de amostras endometriais, é ainda necessário a inclusão de um maior número de participantes para se retirem mais conclusões em relação à sua reprodutibilidade, bem como para avançar para possíveis comparações entre grupos. De facto, o estudo das populações linfocitárias uterinas é ainda um tópico que carece de mais investigação, nomeadamente no estabelecimento de intervalos de referência para as diferentes populações que podemos encontrar neste ambiente em condições normais e em diferentes patologias.

Para uma melhor caracterização das células NK uterinas, também poderá ser de interesse a realização complementar de ensaios de citotoxicidade, assim como uma possível avaliação das populações linfocitárias no sangue periférico em paralelo com a avaliação das biópsias uterinas para comparação e estabelecimento de possíveis diferenças.

Em suma, podemos concluir que a imunofenotipagem em biópsias endometriais é uma técnica precisa que pode ser relevante na aplicação em contexto clínico, para auxiliar no seguimento e tratamento de mulheres que sofrem de PGRi.

Referências Bibliográficas

1. Tomar N, De RK. A brief outline of the immune system. *Methods in molecular biology*. 2014;1184:3-12.
2. Tartey S, Takeuchi O. Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. *International reviews of immunology*. 2017;36(2):57-73.
3. Dowling JK, Dellacasagrande J. Toll-Like Receptors: Ligands, Cell-Based Models, and Readouts for Receptor Action. *Methods in molecular biology*. 2016;1390:3-27.
4. Cooper MD, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems. *Cell*. 2006;124(4):815-22.
5. Danilova N. The evolution of adaptive immunity. *Advances in experimental medicine and biology*. 2012;738:218-35.
6. McComb S, Thiriot A, Krishnan L, Stark F. Introduction to the immune system. *Methods in molecular biology*. 2013;1061:1-20.
7. Annunziato F, Romagnani C, Romagnani S. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;135(3):626-35.
8. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(3):159-75.
9. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001;357(9270):1777-89.
10. Wang J, Arase H. Regulation of immune responses by neutrophils. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014;1319:66-81.
11. Chusid MJ. Eosinophils: Friends or Foes? *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. 2018;6(5):1439-44.
12. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S73-80.
13. Nakashima C, Otsuka A, Kabashima K. Recent advancement in the mechanism of basophil activation. *Journal of dermatological science*. 2018;91(1):3-8.
14. da Silva EZ, Jamur MC, Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2014;62(10):698-738.
15. Marichal T, Tsai M, Galli SJ. Mast cells: potential positive and negative roles in tumor biology. *Cancer immunology research*. 2013;1(5):269-79.
16. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(9):6425-40.

17. Ginhoux F, Williams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*. 2016;44(3):439-49.
18. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(6).
19. Waisman A, Lukas D, Clausen BE, Yogev N. Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. *Seminars in immunopathology*. 2017;39(2):153-63.
20. Sato K, Fujita S. Dendritic cells: nature and classification. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. 2007;56(3):183-91.
21. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1869.
22. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell research*. 2010;20(1):34-50.
23. Kambayashi T, Laufer TM. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nature reviews Immunology*. 2014;14(11):719-30.
24. Kotsias F, Cebrian I, Alloatti A. Antigen processing and presentation. *International review of cell and molecular biology*. 2019;348:69-121.
25. Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(8):607-18.
26. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(6):476-83.
27. Eisenbarth SC. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nature reviews Immunology*. 2019;19(2):89-103.
28. Yatim KM, Lakkis FG. A brief journey through the immune system. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2015;10(7):1274-81.
29. Koch U, Radtke F. Mechanisms of T cell development and transformation. *Annual review of cell and developmental biology*. 2011;27:539-62.
30. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annual review of immunology*. 2003;21:139-76.
31. Khan U, Ghazanfar H. T Lymphocytes and Autoimmunity. *International review of cell and molecular biology*. 2018;341:125-68.
32. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *American journal of clinical oncology*. 2016;39(1):98-106.
33. Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*. 2009;30(5):646-55.
34. Voss K, Larsen SE, Snow AL. Metabolic reprogramming and apoptosis sensitivity: Defining the contours of a T cell response. *Cancer letters*. 2017;408:190-6.

35. Budd RC. Activation-induced cell death. *Current opinion in immunology*. 2001;13(3):356-62.
36. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunology today*. 2000;21(11):573-83.
37. Dhodapkar MV, Kumar V. Type II NKT Cells and Their Emerging Role in Health and Disease. *Journal of immunology*. 2017;198(3):1015-21.
38. Eibel H, Kraus H, Sic H, Kienzler AK, Rizzi M. B cell biology: an overview. *Current allergy and asthma reports*. 2014;14(5):434.
39. Wang Y, Liu J, Burrows PD, Wang JY. B Cell Development and Maturation. *Advances in experimental medicine and biology*. 2020;1254:1-22.
40. Prieto JMB, Felipe MJB. Development, phenotype, and function of non-conventional B cells. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2017;54:38-44.
41. Kurosaki T, Shinohara H, Baba Y. B cell signaling and fate decision. *Annual review of immunology*. 2010;28:21-55.
42. Cyster JG, Allen CDC. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell*. 2019;177(3):524-40.
43. Bonanni V, Sciume G, Santoni A, Bernardini G. Bone Marrow NK Cells: Origin, Distinctive Features, and Requirements for Tissue Localization. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1569.
44. Vacca P, Chiossone L, Mingari MC, Moretta L. Heterogeneity of NK Cells and Other Innate Lymphoid Cells in Human and Murine Decidua. *Frontiers in immunology*. 2019;10:170.
45. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001;22(11):633-40.
46. Scoville SD, Freud AG, Caligiuri MA. Modeling Human Natural Killer Cell Development in the Era of Innate Lymphoid Cells. *Frontiers in immunology*. 2017;8:360.
47. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008;112(3):461-9.
48. Montaldo E, Del Zotto G, Della Chiesa M, Mingari MC, Moretta A, De Maria A, et al. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2013;83(8):702-13.
49. Chazara O, Xiong S, Moffett A. Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance. *J Leukoc Biol*. 2011;90(4):703-16.
50. Nowak I, Wilczynska K, Wilczynski JR, Malinowski A, Radwan P, Radwan M, et al. KIR, LILRB and their Ligands' Genes as Potential Biomarkers in Recurrent Implantation Failure. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017;65(5):391-9.
51. Gunturi A, Berg RE, Forman J. The role of CD94/NKG2 in innate and adaptive immunity. *Immunologic research*. 2004;30(1):29-34.

52. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology*. 2001;19:197-223.
53. Lanier LL. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer immunology research*. 2015;3(6):575-82.
54. Koch J, Steinle A, Watzl C, Mandelboim O. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol*. 2013;34(4):182-91.
55. Vaidya SV, Mathew PA. Of mice and men: different functions of the murine and human 2B4 (CD244) receptor on NK cells. *Immunology letters*. 2006;105(2):180-4.
56. Eissmann P, Beauchamp L, Wooters J, Tilton JC, Long EO, Watzl C. Molecular basis for positive and negative signaling by the natural killer cell receptor 2B4 (CD244). *Blood*. 2005;105(12):4722-9.
57. Lopez-Verges S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood*. 2010;116(19):3865-74.
58. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*. 2006;107(1):159-66.
59. Angelo LS, Banerjee PP, Monaco-Shawver L, Rosen JB, Makedonas G, Forbes LR, et al. Practical NK cell phenotyping and variability in healthy adults. *Immunologic research*. 2015;62(3):341-56.
60. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular immunology*. 2005;42(4):501-10.
61. Kumar V, McNerney ME. A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(5):363-74.
62. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunological reviews*. 2006;214:73-91.
63. Cruz-Munoz ME, Valenzuela-Vazquez L, Sanchez-Herrera J, Santa-Olalla Tapia J. From the "missing self" hypothesis to adaptive NK cells: Insights of NK cell-mediated effector functions in immune surveillance. *J Leukoc Biol*. 2019;105(5):955-71.
64. Romee R, Foley B, Lenvik T, Wang Y, Zhang B, Ankarlo D, et al. NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood*. 2013;121(18):3599-608.
65. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*. 2001;97(10):3146-51.

66. Mrozek E, Anderson P, Caligiuri MA. Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1996;87(7):2632-40.
67. Erick TK, Brossay L. Phenotype and functions of conventional and non-conventional NK cells. *Current opinion in immunology*. 2016;38:67-74.
68. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*. 2003;101(8):3052-7.
69. Wang Y, Zhang C. The Roles of Liver-Resident Lymphocytes in Liver Diseases. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1582.
70. Turner JE, Rickassel C, Healy H, Kassianos AJ. Natural Killer Cells in Kidney Health and Disease. *Frontiers in immunology*. 2019;10:587.
71. Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, Wang H, et al. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Aspects Med*. 2013;34(5):939-80.
72. Fujiwara H, Araki Y, Imakawa K, Saito S, Daikoku T, Shigeta M, et al. Dual Positive Regulation of Embryo Implantation by Endocrine and Immune Systems--Step-by-Step Maternal Recognition of the Developing Embryo. *American journal of reproductive immunology*. 2016;75(3):281-9.
73. Yang X, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. Ovarian and endometrial immunity during the ovarian cycle. *Journal of reproductive immunology*. 2019;133:7-14.
74. Robertson SA, Care AS, Moldenhauer LM. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. *The Journal of clinical investigation*. 2018;128(10):4224-35.
75. Wei H, Liu S, Lian R, Huang C, Li Y, Chen L, et al. Abnormal Expression of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase in Human Recurrent Miscarriage. *Reprod Sci*. 2019;1933719119833788.
76. Velicky P, Knofler M, Pollheimer J. Function and control of human invasive trophoblast subtypes: Intrinsic vs. maternal control. *Cell adhesion & migration*. 2016;10(1-2):154-62.
77. Solano ME. Decidual immune cells: Guardians of human pregnancies. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2019;60:3-16.
78. Proll J, Blaschitz A, Hutter H, Dohr G. First trimester human endovascular trophoblast cells express both HLA-C and HLA-G. *American journal of reproductive immunology*. 1999;42(1):30-6.
79. Apps R, Murphy SP, Fernando R, Gardner L, Ahad T, Moffett A. Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies. *Immunology*. 2009;127(1):26-39.

80. Hackmon R, Pinnaduwege L, Zhang J, Lye SJ, Geraghty DE, Dunk CE. Definitive class I human leukocyte antigen expression in gestational placentation: HLA-F, HLA-E, HLA-C, and HLA-G in extravillous trophoblast invasion on placentation, pregnancy, and parturition. *American journal of reproductive immunology*. 2017;77(6).
81. Moffett A, Colucci F. Co-evolution of NK receptors and HLA ligands in humans is driven by reproduction. *Immunological reviews*. 2015;267(1):283-97.
82. Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nature reviews Immunology*. 2017;17(8):469-82.
83. Gnainsky Y, Granot I, Aldo P, Barash A, Or Y, Mor G, et al. Biopsy-induced inflammatory conditions improve endometrial receptivity: the mechanism of action. *Reproduction*. 2015;149(1):75-85.
84. Ghaebi M, Nouri M, Ghasemzadeh A, Farzadi L, Jadidi-Niaragh F, Ahmadi M, et al. Immune regulatory network in successful pregnancy and reproductive failures. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017;88:61-73.
85. Marron K, Harrity C. Endometrial lymphocyte concentrations in adverse reproductive outcome populations. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(5):837-46.
86. Marron K, Walsh D, Harrity C. Detailed endometrial immune assessment of both normal and adverse reproductive outcome populations. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(2):199-210.
87. Fu B, Li X, Sun R, Tong X, Ling B, Tian Z, et al. Natural killer cells promote immune tolerance by regulating inflammatory TH17 cells at the human maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(3):E231-40.
88. Meggyes M, Miko E, Szigeti B, Farkas N, Szereday L. The importance of the PD-1/PD-L1 pathway at the maternal-fetal interface. *BMC pregnancy and childbirth*. 2019;19(1):74.
89. Wang XQ, Zhou WJ, Hou XX, Fu Q, Li DJ. Trophoblast-derived CXCL16 induces M2 macrophage polarization that in turn inactivates NK cells at the maternal-fetal interface. *Cell Mol Immunol*. 2018;15(12):1038-46.
90. Mori M, Bogdan A, Balassa T, Csabai T, Szekeres-Bartho J. The decidua-the maternal bed embracing the embryo-maintains the pregnancy. *Seminars in immunopathology*. 2016;38(6):635-49.
91. Fukui K, Yoshimoto I, Matsubara K, Hori R, Ochi H, Ito M. Leukocyte function-associated antigen-1 expression on decidual natural killer cells in patients with early pregnancy loss. *Molecular human reproduction*. 1999;5(11):1083-8.
92. Ticconi C, Pietropolli A, Di Simone N, Piccione E, Fazleabas A. Endometrial Immune Dysfunction in Recurrent Pregnancy Loss. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(21).

93. Bulmer JN, Lash GE. The Role of Uterine NK Cells in Normal Reproduction and Reproductive Disorders. *Advances in experimental medicine and biology*. 2015;868:95-126.
94. Moffett A, Colucci F. Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(5):1872-9.
95. Okada S, Okada H, Sanezumi M, Nakajima T, Yasuda K, Kanzaki H. Expression of interleukin-15 in human endometrium and decidua. *Molecular human reproduction*. 2000;6(1):75-80.
96. Wira CR, Rodriguez-Garcia M, Patel MV. The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(4):217-30.
97. Yang HL, Zhou WJ, Lu H, Lei ST, Ha SY, Lai ZZ, et al. Decidual stromal cells promote the differentiation of CD56(bright) CD16(-) NK cells by secreting IL-24 in early pregnancy. *American journal of reproductive immunology*. 2019;81(6):e13110.
98. Kane N, Kelly R, Saunders PT, Critchley HO. Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor. *Endocrinology*. 2009;150(6):2882-8.
99. Chernyshov VP, Dons'koi BV, Sudoma IO, Goncharova YO. Comparison of T and NK lymphocyte subsets between human endometrial tissue and peripheral blood. *Central-European journal of immunology*. 2019;44(3):316-21.
100. Bulmer JN, Lash GE. Human uterine natural killer cells: a reappraisal. *Molecular immunology*. 2005;42(4):511-21.
101. Robson A, Lash GE, Innes BA, Zhang JY, Robson SC, Bulmer JN. Uterine spiral artery muscle dedifferentiation. *Human reproduction*. 2019;34(8):1428-38.
102. Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, Harris LK, Jones RL. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *The American journal of pathology*. 2009;174(5):1959-71.
103. Blois SM, Freitag N, Tirado-Gonzalez I, Cheng SB, Heimesaat MM, Bereswill S, et al. NK cell-derived IL-10 is critical for DC-NK cell dialogue at the maternal-fetal interface. *Scientific reports*. 2017;7(1):2189.
104. Vacca P, Pietra G, Falco M, Romeo E, Bottino C, Bellora F, et al. Analysis of natural killer cells isolated from human decidua: Evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK-cell function. *Blood*. 2006;108(13):4078-85.
105. Fukui A, Funamizu A, Fukuhara R, Shibahara H. Expression of natural cytotoxicity receptors and cytokine production on endometrial natural killer cells in women with recurrent pregnancy loss or implantation failure, and the expression of natural cytotoxicity receptors on peripheral blood natural killer cells in pregnant women with a

- history of recurrent pregnancy loss. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 2017;43(11):1678-86.
106. El Costa H, Casemayou A, Aguerre-Girr M, Rabot M, Berrebi A, Parant O, et al. Critical and differential roles of NKp46- and NKp30-activating receptors expressed by uterine NK cells in early pregnancy. *Journal of immunology*. 2008;181(5):3009-17.
107. Feyaerts D, Kuret T, van Cranenbroek B, van der Zeeuw-Hingrez S, van der Heijden OWH, van der Meer A, et al. Endometrial natural killer (NK) cells reveal a tissue-specific receptor repertoire. *Human reproduction*. 2018;33(3):441-51.
108. Male V, Sharkey A, Masters L, Kennedy PR, Farrell LE, Moffett A. The effect of pregnancy on the uterine NK cell KIR repertoire. *European journal of immunology*. 2011;41(10):3017-27.
109. Perdu S, Castellana B, Kim Y, Chan K, DeLuca L, Beristain AG. Maternal obesity drives functional alterations in uterine NK cells. *JCI Insight*. 2016;1(11):e85560.
110. ESHRE. Early Pregnancy Guideline Development Group. Recurrent Pregnancy Loss 2017. [Acesso em 12 jan 2021] Disponível em: <https://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/Guidelines/Recurrent-pregnancy-loss>.
111. Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet*. 2006;368(9535):601-11.
112. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Reviews in obstetrics & gynecology*. 2009;2(2):76-83.
113. Chiokadze M, Bar C, Pastushek J, Dons'koi BV, Khazhlyenko KG, Schleussner E, et al. Beyond Uterine Natural Killer Cell Numbers in Unexplained Recurrent Pregnancy Loss: Combined Analysis of CD45, CD56, CD16, CD57, and CD138. *Diagnostics*. 2020;10(9).
114. Giuliani E, Parkin KL, Lessey BA, Young SL, Fazleabas AT. Characterization of uterine NK cells in women with infertility or recurrent pregnancy loss and associated endometriosis. *American journal of reproductive immunology*. 2014;72(3):262-9.
115. Zhang Y, Zhao A, Wang X, Shi G, Jin H, Lin Q. Expressions of natural cytotoxicity receptors and NKG2D on decidual natural killer cells in patients having spontaneous abortions. *Fertility and sterility*. 2008;90(5):1931-7.
116. El-Azzamy H, Dambaeva SV, Katukurundage D, Salazar Garcia MD, Skariah A, Hussein Y, et al. Dysregulated uterine natural killer cells and vascular remodeling in women with recurrent pregnancy losses. *American journal of reproductive immunology*. 2018;80(4):e13024.
117. Clifford K, Flanagan AM, Regan L. Endometrial CD56+ natural killer cells in women with recurrent miscarriage: a histomorphometric study. *Human reproduction*. 1999;14(11):2727-30.
118. Choudhury RH, Dunk CE, Lye SJ, Aplin JD, Harris LK, Jones RL. Extravillous Trophoblast and Endothelial Cell Crosstalk Mediates Leukocyte Infiltration to the Early

- Remodeling Decidual Spiral Arteriole Wall. *Journal of immunology*. 2017;198(10):4115-28.
119. Kamoi M, Fukui A, Kwak-Kim J, Fuchinoue K, Funamizu A, Chiba H, et al. NK22 Cells in the Uterine Mid-Secretory Endometrium and Peripheral Blood of Women with Recurrent Pregnancy Loss and Unexplained Infertility. *American journal of reproductive immunology*. 2015;73(6):557-67.
120. Gamliel M, Goldman-Wohl D, Isaacson B, Gur C, Stein N, Yamin R, et al. Trained Memory of Human Uterine NK Cells Enhances Their Function in Subsequent Pregnancies. *Immunity*. 2018;48(5):951-62 e5.
121. Moffett A, Shreeve N. First do no harm: uterine natural killer (NK) cells in assisted reproduction. *Human reproduction*. 2015;30(7):1519-25.
122. Dakhly DM, Bayoumi YA, Sharkawy M, Gad Allah SH, Hassan MA, Gouda HM, et al. Intralipid supplementation in women with recurrent spontaneous abortion and elevated levels of natural killer cells. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2016;135(3):324-7.
123. Meng L, Lin J, Chen L, Wang Z, Liu M, Liu Y, et al. Effectiveness and potential mechanisms of intralipid in treating unexplained recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet*. 2016;294(1):29-39.
124. Ahmadi M, Abdolmohammadi-Vahid S, Ghaebi M, Aghebati-Maleki L, Afkham A, Danaii S, et al. Effect of Intravenous immunoglobulin on Th1 and Th2 lymphocytes and improvement of pregnancy outcome in recurrent pregnancy loss (RPL). *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017;92:1095-102.
125. Diener KR, Robertson SA, Hayball JD, Lousberg EL. Multi-parameter flow cytometric analysis of uterine immune cell fluctuations over the murine estrous cycle. *Journal of reproductive immunology*. 2016;113:61-7.
126. Seshadri S, Sunkara SK. Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2014;20(3):429-38.
127. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology*. 2018;120:5.1-5.11.
128. Givan AL. Flow cytometry: an introduction. *Methods in molecular biology*. 2011;699:1-29.
129. Salimetrics. Calculating Inter- and Intra-Assay Coefficients of Variability [Acesso em 28 out 2020]. Disponível em: <https://salimetrics.com/calculating-inter-and-intra-assay-coefficients-of-variability/>.
130. Shahine L, Lathi R. Recurrent pregnancy loss: evaluation and treatment. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*. 2015;42(1):117-34.

131. Bhattacharya S, Townend J, Bhattacharya S. Recurrent miscarriage: Are three miscarriages one too many? Analysis of a Scottish population-based database of 151,021 pregnancies. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2010;150(1):24-7.
132. Cavalcante MB, Sarno M, Peixoto AB, Araujo Junior E, Barini R. Obesity and recurrent miscarriage: A systematic review and meta-analysis. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 2019;45(1):30-8.
133. Sugiura-Ogasawara M. Recurrent pregnancy loss and obesity. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2015;29(4):489-97.
134. WHO Europe. Body mass index - BMI [Acesso em 22 jan 2021]. Disponível em: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi>.
135. Ticconi C, Pietropolli A, Specchia M, Nicastri E, Chiaramonte C, Piccione E, et al. Pregnancy-Related Complications in Women with Recurrent Pregnancy Loss: A Prospective Cohort Study. *Journal of clinical medicine*. 2020;9(9).
136. Rasmark Roepke E, Christiansen OB, Kallen K, Hansson SR. Women with a History of Recurrent Pregnancy Loss Are a High-Risk Population for Adverse Obstetrical Outcome: A Retrospective Cohort Study. *Journal of clinical medicine*. 2021;10(2).
137. Ticconi C, Giuliani E, Sorge R, Patrizi L, Piccione E, Pietropolli A. Gestational age of pregnancy loss in women with unexplained recurrent miscarriage. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 2016;42(3):239-45.
138. Selliah N, Eck S, Green C, Oldaker T, Stewart J, Vitaliti A, et al. Flow Cytometry Method Validation Protocols. *Current protocols in cytometry*. 2019;87(1):e53.
139. St-Germain LE, Castellana B, Baltayeva J, Beristain AG. Maternal Obesity and the Uterine Immune Cell Landscape: The Shaping Role of Inflammation. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(11).
140. Catalano PM, Shankar K. Obesity and pregnancy: mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child. *Bmj*. 2017;356:j1.
141. Ramakrishnan U, Grant F, Goldenberg T, Zongrone A, Martorell R. Effect of women's nutrition before and during early pregnancy on maternal and infant outcomes: a systematic review. *Paediatric and perinatal epidemiology*. 2012;26 Suppl 1:285-301.
142. Carp H. Immunotherapy for recurrent pregnancy loss. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2019;60:77-86.