

**RAQUEL THIANA MACIEL**

**PROTOCOLOS DE IMUNOTERAPIA PARA ABORTAMENTO ESPONTÂNEO  
RECORRENTE DE ETIOLOGIA DESCONHECIDA**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas de Universidade Federal do Paraná como parte das exigências para obtenção do grau de Bacharel.

Orientador(a): Prof.<sup>a</sup> Maria da Graça Bicalho

**Curitiba  
2006**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
2.1 ABORTO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO.....	5
2.2 IMUNOLOGIA DO INSUCESSO GESTACIONAL.....	6
2.2.1.HLA.....	6
2.2.2 HLA-G.....	7
2.2.3 Respostas Imunológicas.....	8
2.3 EXAMES SUGERIDOS PARA DETECÇÃO DA CAUSA DE ABORTOS.....	9
2.4 INFUSÃO DE IMUNOGLOBULINA INTRAVENOSA (IVIg).....	10
2.5 INFUSÃO DE LEUCÓCITOS (OU ALOIMUNIZAÇÃO DE LINFÓCITOS) PATERNOS PARA AER PRIMÁRIO.....	10
2.6 OUTRAS TERAPIAS.....	11
<b>3. PROTOCOLOS</b> .....	12
3.1 PROTOCOLO I: OBER et al, 1999.....	13
3.2 PROTOCOLO II: STRICKER et al, 2000.....	14
3.3 PROTOCOLO III: CLARK et al, 2001.....	15
3.4 PROTOCOLO IV: STRICKER et al, 2002.....	16
3.5 PROTOCOLO V: MORIKAWA et al, 2003.....	18
3.6 PROTOCOLO VI: CHRISTIANSEN et al, 2004.....	19
3.7 PROTOCOLO VII: YOKOO et al, 2006.....	21
<b>4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO</b> .....	23
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28

## 1. INTRODUÇÃO

O abortamento espontâneo ocorre quando existe interrupção da gestação com perda do embrião antes da vigésima semana, estando o mesmo sem condições de sobreviver fora do útero materno (WHO, 1992). Grande parte dos abortos espontâneos ocorrem durante o primeiro trimestre de gestação (TAKESHITA, 2004).

Dos casais em idade reprodutiva, o abortamento espontâneo recorrente (AER) atinge cerca de 0,5 a 1% (OBER, 1999). As causas desse tipo de aborto são diversas, merecendo destaque as de etiologia de origem genética, imunológica, infecciosa, disfunção hormonal e anatômica, e traumas psicológicos (BARINI, 2000). As causas genéticas são responsáveis por 5% dos casos com abortamento espontâneo recorrente, enquanto que 10 a 15% são causados por anormalidades uterinas, de 3 a 15% são causados pela síndrome antifosfolípidios, e 50 a 75% causados por mecanismos ainda desconhecidos (ASRM, 2005).

O diagnóstico e a classificação clínica do AER fundamentam-se na ocorrência de três ou mais abortos espontâneos sucessivos e pode ser diferenciado em duas categorias: o abortamento primário, e o secundário. O primário ocorre quando nenhuma gestação anterior chegou a atingir a vigésima semana, e o secundário é quando pode ter ocorrido uma gestação anterior bem sucedida que ultrapassou a vigésima semana de gestação, com feto vivo viável (ADACHI, 2003; BARINI, 2000).

O feto é considerado, para o organismo materno, como sendo um “semi-enxerto”, com metade de seu material genético oriundo da mãe, e outra metade oriunda do pai, e por isso seria considerado estranho. Nessas circunstâncias, o sistema imune materno acionaria mecanismos de reconhecimento imunológico similares àqueles que ocorrem quando há o reconhecimento de algo estranho ou não-próprio (MATTAR, 2003). Dessa forma, para que não ocorra a rejeição, o sistema imune materno desenvolve mecanismos de tolerância para reconhecer o feto e aceitá-lo no organismo. Quando o reconhecimento do feto não é bem sucedido, o sistema imune materno promove uma resposta de rejeição ao feto, e o aborto acontece (TAKESHITA, 2004).

A identidade de cada indivíduo é conferida principalmente por moléculas de superfície celular, conhecidas como antígenos leucocitários humanos (HLA), produtos moleculares do sistema gênico HLA, cujos componentes apresentam como singularidade alto grau de polimorfismo e polialelismo. Os antígenos HLA são estrutural e funcionalmente classificados em dois grupos: HLA classe I e HLA classe II. As moléculas HLA classe I podem ser clássicas (HLA-A, -B, -C) ou não clássicas (-G, -E). Moléculas HLA classe II são HLA-DP, -DQ, e -DR (ABBAS, 2005).

As pesquisas relacionadas ao AER têm progresso lento, devido principalmente ao fato de que é uma área complexa, envolvendo informações de subáreas como ginecologia, genética, epidemiologia, terapia ocupacional, imunologia, hematologia, e endocrinologia, e são poucos pesquisadores que dominam integralmente esses assuntos. O resultado de várias investigações usando imunoterapias é focalizado em uma subárea, não existindo a integração dos assuntos. Isso dificulta a comparação dos protocolos utilizados por diferentes grupos de pesquisa (CHRISTIANSEN, 2005).

Uma das terapias utilizada em vários centros médicos do Brasil e do mundo tem sido a infusão de leucócitos, e mais recentemente aloimunização de linfócitos do parceiro para AER primário. Outro tratamento alternativo é a terapia por infusão de imunoglobulina intravenosa, que se aplica principalmente aos casais AER secundário. No meio científico e clínico existem controvérsias quanto ao uso da terapia por aloimunização de linfócitos como tratamento para abortos recorrentes espontâneos de etiologia desconhecida (TAKESHITA, 2004).

A proposta terapêutica imunológica para casos de abortos recorrentes sugere que a administração intravenosa de leucócitos paternos reduza a atividade das células NK decíduais, promova o aparecimento de anticorpos bloqueadores, e convertam a resposta Th1 em resposta Th2, diminuindo a incidência de abortos (CLARK, 2004).

Para o aperfeiçoamento e padronização das técnicas imunoterápicas é fundamental o entendimento dos mecanismos imunogenéticos envolvidos no processo de rejeição fetal, assim como o desenvolvimento de protocolos de imunização para abortos recorrentes.

Uma atualização dos protocolos já existentes, reunião e análise comparativa dos protocolos imunoterápicos utilizados, através de análise técnica dos trabalhos

produzidos pelos centros de pesquisa em imunologia da reprodução, permitirá uma melhor compreensão e aplicação das técnicas, facilitando o alcance dos resultados esperados com o tratamento.

A escolha do tema de pesquisa teve como justificativa focalizar quatro aspectos importantes: 1) O enquadramento ou definição dos casais candidatos a imunoterapia; 2) O benefício real da imunização para mulheres que sofrem com o abortamento recorrente; 3) O valor terapêutico, benefícios do tratamento; 4) Os escassos estudos sobre a situação atual de alternativas para o tratamento do abortamento recorrente.

A pesquisa tem como objetivo reunir e avaliar diferentes protocolos de imunoterapia propostos para AER, quanto aos itens relacionados acima.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Atualmente o abortamento é definido como perda gestacional, interrupção da gravidez por morte do embrião ou do feto, que pode ser espontânea ou provocada, ocorrida entre a vigésima e a vigésima segunda semana de gestação, que remete a um peso fetal de 500 gramas ou menos (WHO, 2006). O processo é também chamado aborto, embora em termos científicos esta palavra designe apenas o resultado da ação, isto é: o embrião ou feto expulso do ventre materno.

O abortamento que acontece antes de 4 semanas de gestação é denominado subclínico, entre 4 e 12 semanas precoce e após 12 semanas tardio.

As anomalias cromossômicas são as causas mais comuns de abortamento no primeiro trimestre da gestação, geralmente com a morte do zigoto antecedendo a sua expulsão (TAKESHITA, 2004). Pode ser causada por trissomias, triploidias, tetraploidias. As anormalidades autossômicas estruturais, como as deleções, os reagrupamentos, as inversões e as translocações, também podem evoluir para o abortamento (BARINI, 2000).

Malformações congênitas também contribuem para o abortamento. Estima-se que mais de 20% das gestações que apresentam malformação fetal terminam em abortamento espontâneo. Os 80% restantes irão nascer (vivos ou mortos) com alguma anomalia congênita, resultando em 3-5% de recém-nascidos com malformações congênitas. Estas representam cerca de 20% das mortes no período pós-natal (AMORIM, 2006).

Outras causas de abortamento são as doenças ginecológicas (alterações do endométrio, miomas uterinos); anomalias de óvulo, embrião e feto, e anexos; incompetência istmocervical; doenças maternas graves como desnutrição grave, anemias graves, grandes obesidades, diabete melito muito descompensado, hipertensão arterial grave, cardiopatias descompensadas e infecções. Os microorganismos e situações clínicas freqüentemente relacionados ao abortamento espontâneo são: rubéola, varíola, malária, *Salmonella typhi*, Citomegalovirus, *Brucella*, *Toxoplasma gondii*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis* e *Ureaplasma urealyticum* (BARINI, 2000).

A maioria das perdas embrionárias é causada por disfunções imunológicas, causas auto-ímmunes bem como alo-ímmunes, que incluem anticorpos maternos

antileucócitos paternos (APLA), presença de anticorpos antifosfolípidios (APA), e anticorpos antinucleares (ANA) (CLARK, 2004).

Outros anticorpos associados ao insucesso gestacional são: anticardiolipina, anticoagulante lúpico, antifosfatidilserina, anti ácido fosfatídico, antifosfatidilinositol, antifosfatidilcolina e antifosfatidiletanolamina (CHRISTIANSEN, 2005).

Do ponto de vista imunológico uma gestação bem sucedida requer um reconhecimento imunológico por parte da mãe, sendo assim a histoincompatibilidade materno-fetal seria um fator para o sucesso gestacional. Logo, uma das causas que contribuem para o insucesso gestacional poderia ser atribuída à compatibilidade entre os pais ou similaridade HLA (MATTAR, 2003).

É indiscutível que o sistema imunológico materno apresenta mecanismos para reconhecimento de um feto com informação genética diferente e conseqüentemente expressão de aloantígenos e, desenvolve mecanismos de tolerância que consiga protegê-lo contra a destruição. Acredita-se que a tolerância materna ao alo-enxerto fetal envolva mecanismos complexos seja mediada por anticorpos bloqueadores e outras interações entre componentes da resposta imune inata e adaptativa. Este processo se dá pela produção de anticorpos bloqueadores que protegeriam o embrião recém-implantado no útero. Entretanto, quando há ausência de variabilidade genética entre o casal, os anticorpos bloqueadores não são produzidos, deixando o embrião suscetível ao ataque pelo sistema imune materno, induzindo uma resposta de rejeição por parte materna (MATTAR, 2003).

Traçando um paralelo entre transplantes e o processo reprodutivo, onde o embrião semi-alogênico é freqüentemente visto como um transplante natural, nos transplantes clínicos a probabilidade de rejeição diminui quanto maior for a similaridade HLA entre doador e receptor, já no contexto de reprodução pesquisas indicam o contrário.

## **2.1 Aborto primário e secundário**

Casais com histórico de aborto espontâneo recorrente têm sido classificados em duas populações de pacientes distintas: o grupo de aborto primário, e o de aborto secundário. Denomina-se aborto primário quando todas as gestações anteriores com o mesmo parceiro resultaram em ausência de feto viável. O aborto

secundário é caracterizado pela presença de feto vivo viável de uma gestação bem sucedida precedendo a seqüência de abortos (ADACHI, 2003). Esta distinção torna-se importante, tendo em vista que estes dois grupos parecem apresentar comportamentos epidemiológico e imunológico distintos. Do ponto de vista imunológico, o aborto primário apresenta maior compartilhamento de antígenos HLA entre os parceiros, hiporreatividade na cultura mista de linfócitos, ausência de anticorpos bloqueadores e dirigidos contra antígenos paternos enquanto que o secundário apresenta compartilhamento de antígenos HLA e cultura mista de linfócitos normais, presença de anticorpos bloqueadores e de anticorpos contra antígenos paternos (SOUZA, 1997).

## **2.2 Imunologia do insucesso gestacional**

### **2.2.1 HLA**

Os antígenos HLA são conhecidos, entre outros fatores, por conferir uma identidade biológica e são encontrados na superfície da grande maioria das células de organismo humano. Sua função biológica é participar da resposta imune, auxiliando os linfócitos T a diferenciar componentes próprios dos não-próprios (ABBAS, 2005). Os antígenos HLA classificam-se em moléculas HLA de classe I e moléculas HLA de classe II. HLA-A, HLA-B e HLA-C são consideradas clássicas, e HLA-G, e HLA-E são as moléculas não clássicas. Moléculas HLA classe II são: HLA-DP, -DQ e -DR (CHRISTIANSEN, 2005). As moléculas classe I estão presentes em todas as células nucleadas e plaquetas. As moléculas classe II apresentam uma distribuição mais restrita, sendo encontradas apenas em linfócitos B, macrófagos, monócitos, células de Langerhans, células dendríticas, células endoteliais e linfócitos T quando ativadas (ABBAS, 2005).

Os antígenos HLA são glicoproteínas de superfície celular, expressas pelas células nucleadas, envolvidas na regulação da resposta imune. São o produto molecular do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) ou sistema gênico HLA, situados em 6p213 e caracterizados por serem altamente polimórficos e polialélicos, diferindo entre indivíduos e grupos populacionais (ABBAS, 2005).



## 2.2.2 HLA-G

HLA-G é um antígeno codificado pelo gene *HLA-G* que faz parte do sistema de proteção fetal (UROSEVIC, 2002). A proteína HLA-G apresenta a estrutura clássica das moléculas HLA de classe I, ou seja, uma cadeia pesada com os domínios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , e  $\alpha 3$ , associados covalentemente com a  $\beta 2$ -microglobulina (UROSEVIC, 2002). Uma das funções atribuídas ao antígeno HLA -G é diminuir ou prevenir que o sistema aloimune materno reconheça os aloantígenos de origem paterna. O HLA-G tem ação inibidora da resposta antigênica específica do linfócito citotóxico e diminui a função das células NK, e é considerada uma molécula tolerogênica (ABBAS, 2005).

Um dos mais interessantes atributos de HLA-G é a sua distribuição tecidual. HLA-G está presente nas extravilosidades do trofoblasto fetal e macrófagos placentários. Na forma solúvel pode ser encontrado no líquido amniótico. As células do trofoblasto são células neutras, ou seja, em sua superfície não são expressas moléculas HLA de classe I e HLA de classe II, exceto HLA-C. Normalmente, células que não apresentam moléculas HLA não são reconhecidas e são destruídas (UROSEVIC, 2002).

O reconhecimento de epítomos presentes nas moléculas HLA-G por receptores KIR presentes nas células NK uterinas promove uma resposta imune favorável ao sucesso gestacional (UROSEVIC, 2002). Acredita-se que casais que apresentam compatibilidade HLA geram fetos com moléculas HLA-G semelhantes às moléculas HLA da mãe, fazendo com que as células NK não reconheçam esses epítomos relevantes ao processo tolerogênico. O papel do HLA-G consistiria em inibir a atividade das células NK presentes em abundância na decídua materna, protegendo deste modo as células do trofoblasto que seriam potencialmente destruídas por sua atividade de lisar células que não expressam os antígenos HLA-A, -B, -C clássicos (TAKESHITA, 2004).

### 2.2.3 Respostas Imunológicas

A resposta imunológica do linfócito T helper (TCD4+) pode ser dividida em resposta Th1 e resposta Th2. A resposta Th1 tem como produto interleucinas IL-2,  $INF\gamma$ , e  $TNF\alpha$ . A resposta Th2 é responsável pela síntese de IL-4, IL-5, e IL-10 (ABBAS, 2005). Acredita-se que o equilíbrio entre as respostas Th1/Th2, que controla a atividade das células NK, seria responsável pelo sucesso da implantação embrionária. Vários fatores controlam o balanço entre as respostas Th1/Th2, destacando-se o tipo de antígeno, o perfil de citocinas do meio, a dose antigênica, e a atividade hormonal. Nessas circunstâncias a interação resultante entre epítopos presentes nas moléculas HLA-G expressas pelo trofoblasto e os receptores presentes em células NK não resultariam em resposta tolerogênica.

Contudo, pacientes com falhas de implantação ou com história de abortos repetidos apresentam um desvio desse mecanismo, predominando a resposta Th1, que induz a hiperatividade das células NK (TAKESHITA, 2004).

No início da gestação normal, são observados anticorpos maternos anti-leucócitos paternos. Esses anticorpos são conhecidos como anticorpos bloqueadores, cuja função seria diminuir a atividade imunológica e reduzir a ação de células NK (ADASHI, 2003). Em gestantes que apresentam abortamento recorrente, a atividade das células NK é aumentada devido à ausência de anticorpos bloqueadores. A falha na produção desses anticorpos provavelmente se deve a uma maior compatibilidade e similaridade HLA entre o casal (CLARK, 2004).

As células NK compõem cerca de 15 % dos linfócitos do sangue, e são caracterizadas por não apresentar receptores específicos para reconhecimento de antígenos, como aqueles presentes em linfócitos T ou B. Geralmente, as células NK são ativadas por outras células que não expressam moléculas HLA clássicas, como células cancerígenas ou infectadas por alguns tipos de vírus. A elevação do número de células NK e uma relação aumentada de citocinas Th1 em relação as Th2 têm sido observado em mulheres que apresentam abortamento recorrente (CLARK, 2006). As células NK são encontradas na circulação periférica e no útero, e apresentam como característica induzir a morte quando ativadas. Dentre os tipos celulares encontrados na decídua e endométrio humano, as células NK uterinas são as que apresentam maior alteração em número de células ao longo do ciclo

menstrual e na gestação incipiente. Durante a fase proliferativa, seu número é quase igual ao dos linfócitos T. Entretanto, na fase lútea média, corresponde a 70% dos leucócitos endometriais, número que aumenta ainda mais no início da gestação.

Conforme comentado anteriormente, o distúrbio na interação entre moléculas HLA-G e células NK é considerado prejudicial ao processo reprodutivo. A ativação das células NK será a consequência deste não reconhecimento, e promoverá uma resposta imune inadequada, uma resposta imune Th1.

É importante ressaltar que as citocinas da resposta Th1 promovem a rejeição, comprometendo a gestação. No entanto, se houver níveis de citocinas da resposta Th2 capazes de sobrepor os níveis de Th1 inibindo sua resposta, a implantação embrionária terá sucesso. O sucesso na gestação é um fenômeno mediado por citocinas Th2. A resposta Th2 promove uma resposta imune favorável ao sucesso gestacional pelo reconhecimento das moléculas HLA-G pelas células uterinas. A visão atual sobre as respostas Th1 e Th2 evidencia um balanço entre as duas respostas para o sucesso gestacional.

### **2.3 Exames sugeridos para detecção da causa dos abortos**

Os exames sugeridos para o casal na investigação de abortos recorrentes, segundo BARINI (2000): prova cruzada; tipagem sanguínea ABO e Rh; cariótipo de sangue periférico com bandas; sorologias para HIV I e II, HTLV I e II; sorologia para doença de chagas e sífilis. Para a paciente, são recomendados os seguintes exames: pesquisa de anticardiolipina e anticoagulante lúpico; fator antinúcleo (FAN); antiperoxidase e tireoideana e antitireoglobulina; pesquisa de *Mycoplasma* e *Chlamydia* no colo uterino; pesquisa de *Streptococcus* beta hemolítico no colo uterino e na secreção vaginal; sorologia para toxoplasmose e citomegalovírus; prolactina sérica, glicemia de jejum e pós-prandial; TSH e T4 livre; teste de Coombs indireto; dosagens de antitrombina III e das proteínas C e S; dosagens das células NK (CD-3, +16, +56); pesquisa da mutação do gene do fator V de Leiden; pesquisa da mutação *G20210A* do gene da protrombina; e pesquisa da mutação *C677T* do gene da metileno tetrahidrofolato redutase.

## **2.4 Infusão de Imunoglobulina Intravenosa (IVIg)**

A IVIg, infusão de imunoglobulina intravenosa é uma solução de globulina que contém anticorpos normalmente presentes no sangue humano adulto, e é um tratamento proposto aos casais com ERA secundário.

Cada infusão de imunoglobulina é composta de plasma humano derivado de 3.000 a 10.000 doadores diferentes, dependendo do fabricante (CLARK, 2006). Como esse produto é desenvolvido a partir de amostra de sangue de doadores, teoricamente é possível que viroses ou bactérias possam ser transmitidas. Entretanto, desde 1985 todos os produtos celulares são testados para detecção de HIV e hepatite.

Para evitar desagradáveis reações adversas, como náusea, dor de cabeça e nas costas, febre, e irritação cutânea, a infusão é aplicada de maneira lenta.

O custo da terapia com imunoglobulina intravenosa tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Dependendo da linha de tratamento, pode exceder US\$ 10.000. Como resultado, nem todas as pacientes podem pagar pelo tratamento.

## **2.5 Infusão de Leucócitos (ou aloimunização de linfócitos) Paternos para AER primário**

É utilizado o sangue total extraído do marido/parceiro da paciente. A amostra de sangue é submetida à centrifugação. As células mononucleares (leucócitos) são removidas do gradiente, lavadas, e suspensas em solução salina. As pacientes são imunizadas pela terapia e encorajadas a conceber em um período curto após a imunização. Assim como a IVIg, esta terapia também é passível de transmissão de viroses. O custo estimado da terapia é mais baixo que a IVIg, já que o produto da terapia é desenvolvido com compostos sanguíneos de apenas um doador.

## 2.6 Outras terapias

Diversas imunoterapias têm sido propostas por diferentes grupos de pesquisa visando o tratamento de casais cuja etiologia dos abortos recorrentes é desconhecida. Entretanto, a eficácia desses tratamentos ainda não está totalmente clara e gera controvérsias (OBER, 1999).

O uso do Ácido Acetilsalicílico, também conhecido como Aspirina, como indicação para abortamentos recorrentes é devido à sua capacidade de melhorar a receptividade endometrial através do aumento do fluxo sanguíneo uterino. Seu efeito é conhecido como sendo anti-agregante placentário. Corticóides como a Prednisona também são indicados, devido à sua atividade imunossupressora, principalmente para pacientes com autoimunidade alterada, presença de fator antinúcleo, ou outros anticorpos. Contudo, esse medicamento pode causar diabetes gestacional. O uso de prednisona em pacientes com falha de implantação é limitado às primeiras semanas gestacionais. A progesterona é indicada porque bloqueia respostas inflamatórias prejudiciais à estrutura da placenta, bloqueia também linfócitos T e B que rejeitam a placenta, diminui a atividade das células NK, desencadeia uma resposta imune Th2, e aumenta a produção de  $\beta$ -HCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) pela placenta. A Heparina tem efeito anticoagulante, e é indicada para pacientes com anticorpos antifosfolípidos e outras trombofilias hereditárias.

### 3. PROTOCOLOS

Neste estudo serão apresentados os protocolos de imunoterapia disponíveis para casais com abortamento espontâneo recorrente, publicados a partir de 1999, conforme detalhado na Tabela 1.

REFERÊNCIA	TIPO DE PESQUISA	Nº DE PACIENTES	CRITÉRIO DE INCLUSÃO	ABORT. PRIMÁRIO / SECUNDÁRIO	TRAT.	DOSE E FREQUÊNCIA	FABRICANT.
OBER et al (1999)	Triagem aleatória	86 tratado; 85 placebo; 72 engravidaram	3 ou + abortos; não necessariamente consecutivos; máximo de uma gravidez viável; idade máxima 40 anos	Não especificou	Infusão leucócitos paternos	3ml intravenosa; 0,5ml 2x antebraço subcutânea; 0,5ml 2x antebraço intradérmica	-
STRICKER et al (2000)	Triagem clínica	47 total; 42% engravidaram	3 ou + abortos; Idade superior a 28 anos	Primário e secundário	IVIg	0,2 g/kg 2 semanas antes da gestação e 4 semanas após (26ª a 30ª semana gestacional)	Venoglobulina-S Therapeutic Corporation LA, CA
CLARK et al (2001)	Triagem aleatória controlada	1753 total	3 ou+ abortos após 6ª semana gestacional; cariótipo normal	Não especificou	Infusão de leucócitos paternos	Imunização única de 200x10 <sup>6</sup> células	-
STRICKER et al (2002)	Não informou	83 total; 40 engravidaram	3 abortos; idade entre 28 a 49; Inclusão de mulheres com anormalidades cromossômicas	Primário e secundário	IVIg	200mg/kg; 1 dose antes, após mensalmente até o final do 2º trimestre	Não informou
MORIKAWA et al (2003)	Não informou	216 total; 110 AER; 51% engravidaram	3 ou + abortos; idade entre 19 a 43;	Primário e secundário	Infusão leucócitos paternos; + aspirina; + suporte lúteral; e MIVIg	20g/kg por 5 dias durante a 4ª a 7ª semanas gestacionais	Gloverina -I Nichiyaku Tokyo
CHRISTIANSEN et al (2004)	Meta análise; triagem controlada	Não informou	3 ou + abortos; cariótipo normal		IVIg e infusão de leucócitos de doador	Leucócitos de doador: 150ml via intravenosa (dois doadores). Não são aplicadas transfusões durante a gravidez  IVIg 0,5g/kg semanalmente até a 8ª semana gestacional, e após, com intervalo de 15 dias entre as aplicações, até 34ª semana gestacional.	Não informou
YOKOO et al (2006)	Não informou	52 total; 34 engravidaram	3 ou + abortos; idade de 23 -45	primário	Infusão leucócitos paternos	100ml sangue periférico heparinizado + 1ml sç salina; 1 aplicação antes de engravidar, seguida de 2 ou + com intervalo de 1 mês cada	-

Legenda: ABORT. PRIMÁRIO/SECUNDÁRIO = Abortamento Primário/Secundário; TRAT. = Tratamento; FABRICANT. = Fabricante.

**Tabela 1:** Detalhes dos estudos imunoterápicos de diferentes grupos referentes ao tratamento de abortamento recorrente publicados a partir de 1999.

### 3.1 PROTOCOLO I: OBER et al 1999 (Infusão de leucócitos paternos)

Pacientes recrutadas em seis centros diferentes entre julho de 1992 e dezembro de 1997 foram selecionadas para o presente estudo. Os critérios para inclusão foram os seguintes: três ou mais abortos prévios não necessariamente consecutivos; ausência de anormalidades cromossômicas; com no máximo uma gravidez viável; idade máxima de quarenta anos; todos abortos com o mesmo parceiro; não estar grávida no momento do tratamento; ausência de anticorpos anti-HLA; não ter contra indicações para a imunização com células mononucleares paternas e nenhuma causa identificada para os abortos recorrentes.

Foram removidas as células mononucleares do sangue total dos parceiros utilizando o gradiente de ficoll-hypaque. As amostras foram armazenadas a temperatura de  $1 -6^{\circ}$  C durante a noite. Foram preparados 5 ml de células mononucleares, das quais 3 ml foram administrados via intravenosa, e 0,5ml administrados via subcutânea em dois locais no antebraço, e mais 0,5ml em dois outros locais no antebraço via intradérmica. A solução placebo foi constituída de 5ml de solução salina estéril administrada da mesma forma citada acima. A imunização ocorreu durante as duas primeiras semanas do ciclo menstrual em todas as pacientes (incluindo o tratamento com placebo). Aquelas que não haviam engravidado dentro de seis meses foram reimunizadas seguindo o mesmo protocolo inicial.

Oitenta e seis (86) pacientes do grupo tratado e 85 do grupo placebo completaram o tratamento, observando-se que 36% das mulheres do grupo tratado tiveram gestação bem sucedida e em 64% o tratamento não resultou na resposta esperada, ou seja, a paciente não engravidou ou abortou antes da 28ª semana de gestação. No grupo placebo 48% tiveram gestação bem sucedida e em 52% o tratamento falhou.

Uma outra análise incluindo apenas as pacientes que engravidaram durante o tratamento mostrou que a taxa de sucesso no grupo tratado foi de 46% (31/68) e no grupo placebo 65% (41/63). Portanto o tratamento não foi o esperado em 54% e 35% das pacientes de cada grupo, respectivamente.

A taxa de sucesso foi maior no grupo placebo e não houve evidência de associação entre desenvolvimento de anticorpos anti-HLA após a imunização e

sucesso gestacional, já que 31% e 30% das pacientes com e sem anticorpos anti-HLA tiveram gestação bem sucedidas.

Não há diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e o grupo placebo. Estes resultados sugerem que a imunização com células mononucleares paternas não traria benefício para pacientes com abortamento espontâneo recorrente e portanto não deveria ser oferecida como tratamento.

### 3.2 PROTOCOLO II: STRICKER et al, 2000 (Infusão IVIg)

O estudo designou como amostra 47 pacientes com histórico de pelo menos três abortos recorrentes de etiologia desconhecida, e de idade superior à 28 anos. Não foi delimitada uma idade máxima para participação no estudo, porém, a idade média das pacientes era 37 anos. Mulheres usando técnicas naturais de fertilização, bem como técnicas de fertilização *in vitro*, foram incluídas no estudo. Causas anatômicas, infecciosas, e endócrinas foram excluídas como sendo responsáveis pelos abortos. Foram feitos diversos exames laboratoriais incluindo busca por anticorpo antifosfolípido, anticorpo antimicrosomal, anticorpo anti-tireoglobulina, níveis de Ig no soro. A citometria de fluxo foi utilizada para contagem de células CD4 /CD8 e células CD3-/CD56+. Anormalidades detectadas em algum dos exames foram consideradas motivo para desligamento do estudo. Mulheres diagnosticadas com endometriose foram incluídas no estudo depois do devido tratamento. A imunoglobulina usada no tratamento foi a Venoglobulina –S, fabricada pela Therapeutic Corporation, Los Angeles, CA.

A terapia foi iniciada duas semanas antes de concepção. A dose utilizada foi de 0.2g/kg por tratamento, e o limite da infusão não ultrapassou 75mL/h. Após a concepção, foram aplicadas injeções de imunoglobulina intravenosa a cada quatro semanas até a 26º - 30º semana de gestação. Em média, sete aplicações foram feitas durante a gravidez. O monitoramento das pacientes foi seguido em todos os casos.

Dentre as pacientes submetidas ao tratamento, 83% eram abortadoras primárias, enquanto que 17% eram abortadoras secundárias. Dez mulheres (21%) utilizaram métodos naturais de fertilização, e 37 (79%) utilizaram técnicas de fertilização *in vitro*. A anormalidade imunológica mais comum dentre as pacientes foi



a presença de anticorpo antitireoideano (53%), seguido do aumento de células NK em mais de 12% do total de linfócitos (40%), anticorpo anti-fosfolipídio (32%), anticorpo antinucleares (28%), aumento nos níveis de IgM (28%), aumento da reação de células CD4/CD8 (15%), e anticorpo antiovariano (2%). Em 31 das 47 pacientes (66%) mais de uma anormalidade foi detectada. Trinta e seis das 47 mulheres aceitaram o tratamento, enquanto que 11 recusaram o tratamento. De 36, apenas 24 engravidaram. Das 24 grávidas, 20 receberam tratamento durante a 26<sup>o</sup>-30<sup>o</sup> semana gestacional. Dessas pacientes, apenas uma abortou na oitava semana gestacional. O cariótipo dessa paciente não foi determinado.

Quatro pacientes interromperam o tratamento após a 10<sup>o</sup>-12<sup>o</sup> semana gestacional, e três dessas quatro pacientes tiveram gestação bem sucedida. O cariótipo da paciente que abortou era normal. Das 11 pacientes que recusaram o tratamento, sete engravidaram e as pacientes restantes abortaram no primeiro trimestre. O sucesso de gestação do tratamento com imunoglobulina intravenosa (IVIg) foi considerado estatisticamente significante ( $p=0.001$ ). Os efeitos colaterais observados foram os seguintes: enxaqueca, trabalho de parto pré-maturo, e gravidez ectópica.

### **3.3 PROTOCOLO III: CLARK et al., 2001 (infusão de leucócitos paternos)**

Mulheres clinicamente diagnosticadas por abortamento recorrente com embriões com cariótipo normal foram designadas para este estudo. O histórico da paciente devia conter três ou mais abortos prévios, o abortamento deveria ter ocorrido após a 6<sup>o</sup> semana de gestação, e as mulheres não poderiam apresentar evidências de autoimunidade.

Com a colaboração internacional do RMITG – Miscarriage Immunotherapy Trialists Group, 1753 casos de pacientes em artigos publicados e não publicados foram submetidos à análise estatística por dois grupos independentes.

Nenhum benefício significativo foi observado na imunização de mulheres que já haviam engravidado com sucesso com o mesmo parceiro, ou nos casos da paciente que já possuía anticorpos HLA antiparental.

Os trabalhos publicados analisados mostraram que a gravidez não ocorria antes de três meses de uma única imunização utilizando 200x10<sup>6</sup> células.

A análise demonstrou que 9 – 10% dos casais submetidos ao tratamento por triagem aleatória controlada obtiveram sucesso gestacional.

### **3.4 PROTOCOLO IV: STRICKER et al, 2002 (Infusão IVIg)**

Neste programa de imunoterapia foram caracterizadas como pacientes 83 mulheres com pelo menos três abortos, podendo chegar até 12 abortos. A idade média das pacientes era de 37, variando de 28 a 49 anos. 83% das pacientes nunca obtiveram sucesso gestacional (abortamento primário), e 17% tiveram pelo menos uma gestação bem sucedida (abortamento secundário). Das 83 mulheres, 22 (27%) usaram métodos naturais de fertilização, enquanto que 61 (73%) usaram técnicas de fertilização *in vitro*.

A anormalidade imunológica mais comum era a presença de anticorpos antitireoideanos (53%), seguido de anticorpos antifosfolípidios (36%), aumento de células NK em 12% do total de linfócitos (35%), anticorpos antinucleares (25%), aumento no nível de IgM (25%), desequilíbrio na relação de células CD4/CD8 (14%), anticorpos antiovarianos (25%). Uma deficiência de IgA foi identificada em duas pacientes, e sete pacientes apresentavam endometriose. Nas pacientes com desequilíbrio de células CD4/CD8, as células CD4 estavam em níveis normais, mas as CD8 estavam abaixo do nível normal.

Em 70% das pacientes foi identificada mais de uma anormalidade imunológica. Porém, nenhuma das mulheres apresentava doenças clínicas associadas com as anormalidades imunológicas.

O tratamento consistiu em 200 mg/kg de imunoglobulina aplicada via intravenosa (IVIg) para pacientes com aborto natural ou induzido.

O tratamento foi dividido em duas fases: a pré concepção e a pós concepção. Na fase pré concepção, foi aplicada uma dose única previamente à concepção. Na fase pós concepção, foram aplicadas injeções em intervalos mensais no final do segundo trimestre.

Das 83 pacientes, 61 aceitaram o tratamento, e 22 recusaram o tratamento, mas continuaram sendo monitoradas. Das 61 tratadas, 40 engravidaram e o sucesso gestacional foi verificado. Não houve diferenças quanto à idade média da paciente, o número de abortos prévios, o uso de terapia de fertilização *in vitro*, ou quanto ao tipo

de anormalidade imunológica, no que refere as mulheres que engravidaram e as que não engravidaram.

Das 40 que vieram a engravidar, 35 fizeram uso da terapia com imunoglobulina por um período de 20 a 30 semanas. Dessas 35 pacientes, 31 (89%) engravidaram e deram à luz, enquanto que quatro abortaram durante o primeiro trimestre. O cariótipo dessas pacientes que abortaram não foi determinado.

Cinco pacientes solicitaram interrompimento do tratamento após 10-12 semanas de gestação. Apenas uma dessas mulheres abortou, durante a 15ª semana de gestação. Seu cariótipo era normal.

Das 22 pacientes que recusaram tratamento imunoterápico, 15 engravidaram e 13 (87%) abortaram no primeiro trimestre.

As reações adversas da aplicação da terapia foram a náusea, vômitos e calafrios em 10% das pacientes. O autor sugere que a mudança da empresa fabricante da imunoglobulina poderia evitar as reações adversas. Nenhuma paciente descontinuou o tratamento pelos efeitos adversos. Não foi observado uma toxicidade significativa para a mãe ou feto.

Altas doses de imunoterapia com imunoglobulina mostraram associação com insuficiência renal (doses de 1,2 a 2,0 gms/kg por 3-5 dias).

O estudo confirmou que baixas doses de terapia com Ig seria seguro e efetivo para mulheres com abortos de causa imunológica. O estudo também sugere que a terapia seja prolongada além do primeiro trimestre, pois muitas pacientes abortam depois do primeiro trimestre.

Os fatores identificados como associados ao sucesso da terapia são:

- Idade média das pacientes era mais avançada comparando com outros estudos;
- inclusão de mulheres com anormalidades imunológicas;
- início da terapia antes da concepção, e repetição da terapia durante intervalos fisiológicos da gravidez;

Seguindo esses parâmetros, a terapia que utiliza imunoglobulina intravenosa se mostra segura e mais eficiente, segundo STICKER, 2002.

### 3.5 PROTOCOLO V: MORIKAWA et al, 2003 (Infusão IVIg)

329 pacientes japonesas com histórico de aborto espontâneo recorrente que procuravam tratamento na Clínica de Infertilidade do Hokkaido University Hospital, entre maio de 1993 e maio de 2001.

Deste total, 216 mulheres foram recrutadas para o estudo. Anteriormente à concepção, todas se submeteram à exameção por ultra-som e histerosalpingografia, para detecção de anormalidades anatômicas no trato genital.

Foram analisadas a fase inicial folicular FSH, LH, e fase "midluterar". Foram feitas biópsias do endométrio, análises sanguíneas buscando anticorpos para sífilis, anticorpos antinucleares, anticorpos anti-DNA, anticoagulante lúpico, anticorpos anti-cardiolipina,  $\beta$ 2-glicoproteína I dependente de anticorpo anti-cardiolipina, marcadores moleculares hemostáticos como tempo de ativação parcial de tromboplastina, atividade da proteína C, e antitrombina III. Se houvesse a presença de anticorpos antinucleares ou anticorpos anti-DNA, novos testes sorológicos seriam realizados, como teste LE, fator reumatóide, anticorpo anti-SSA(B), anticorpo anti-RNP (anti-ribonucleoproteína), e anticorpo anti-Sm (antígeno de Smith). Foram feitos os cariótipos dos casais e exames que detectam agentes infecciosos.

Cento e dez mulheres foram classificadas como tendo abortamento recorrente de etiologia desconhecida. A terapia designada para as pacientes foi de baixa dose de aspirina, mais suporte lúteo, e vacinação com linfócitos paternos.

A terapia que utiliza linfócitos paternos foi utilizada de maio de 1993 a dezembro de 1995. Após esta data não foi mais utilizada esta terapia devido a severos efeitos adversos, como doenças autoimunes e pneumonite intersticial aguda.

A linha de terapia seguida a partir desta data foi somente a terapia com imunoglobulina intravenosa massiva (MIVIg). Mulheres apresentando quatro ou mais abortos consecutivos de etiologia desconhecida foram submetidas à terapia de janeiro de 1993 a maio de 2001. Durante cinco dias consecutivos foram aplicadas 20g/dia de imunoglobulina "glovenin-I, Nichiyaku, Tokyo" durante a quarta e a sétima semana de gestação. Não foi aplicado qualquer tipo de medicação que não fosse à terapia. Dezesete pacientes não receberam a terapia, pois quando procuraram a

clínica de fertilização já estavam em torno da sétima semana gestacional e não corriam mais o risco de perda gestacional no primeiro trimestre.

Como resultado, considerando as 110 pacientes em que seus abortos foram caracterizadas como sendo de etiologia desconhecida, cerca de 77% obtiveram gravidez que resultou em nascimento de criança saudável.

O número de nascimentos entre as 110 pacientes que somente se submeteram a terapia com imunoglobulina intravenosa massiva (MIVIg) se mostrou superior às outras terapias utilizadas (100%,  $p < 0,01$ ). A terapia MIVIg aplicada juntamente com doses baixas de aspirina resultou em 57,1% das pacientes grávidas. Já a terapia MIVIg com suporte lúteo resultou em 67,3% de sucesso gestacional.

### **3.6 PROTOCOLO VI: CHRISTIANSEN et al, 2004 (Infusão IVIg e Infusão de leucócitos paternos)**

Este grupo considera aborto recorrente de etiologia desconhecida pacientes com pelo menos três abortos considerados inexplicáveis após o diagnóstico médico, eliminando causas como anormalidades cariotípicas e da cavidade uterina. Não foi informado o número total de pacientes que se submeteram a terapia.

Os protocolos deste grupo de pesquisa divergem da maioria, especialmente no que diz respeito à quantidade de células alogênicas por infusão (IVIg), e no número de abortos prévios das pacientes.

As pacientes foram divididas de acordo com o número de abortos, as características dos abortos, e o tempo de gestação antes do aborto. E a partir destes dados selecionaram a melhor técnica de imunoterapia para cada paciente.

Foram usados dois tipos de terapia, a com leucócitos de doador, e com IVIg. Na terapia com leucócitos de doador as pacientes deveriam apresentar pelo menos 3 abortos prévios consecutivos, cavidade uterina normal, cariótipo e endocrinologia normal. As pacientes tinham que ser negativas para anticorpos linfócito T citotóxico, anticoagulante lúpico; tinham de ter baixas concentrações de auto-anticorpos. As aplicações eram feitas antes da concepção, duas vezes, com intervalos de um mês. Após cada transfusão, 200ml de sangue de cada paciente eram recolhidos; e após

uma hora, a paciente recebia via intravenosa 150ml de *buffy coat* de dois doadores. Não são aplicadas transfusões durante a gravidez.

As pacientes escolhidas para esta técnica de imunização apresentavam aborto recorrente primário, com as perdas no primeiro trimestre de gestação; com quatro ou mais perdas; baixas concentrações de auto-anticorpos; e sem problemas para conceber. Ou, apresentavam aborto recorrente primário com as perdas no primeiro trimestre; com três perdas; apresentavam problemas de concepção; e com baixas concentrações de auto-anticorpos.

O efeito do tratamento foi significativo (38%) em pacientes com aborto recorrente primário; e o mesmo tratamento não apresentou efeito algum em pacientes com aborto recorrente secundário.

Não houve diferença significativa na proporção de pacientes alcançando o sucesso gestacional dentre as tratadas pela terapia com leucócitos de doador e as tratadas por placebo. O tempo até na concepção foi igual em ambos os grupos.

Na segunda terapia utilizada neste estudo, a IVIg, foram selecionadas pacientes com pelo menos três abortos recorrentes de etiologia desconhecida, mesmo após investigações médicas não-imunológicas. As pacientes deveriam ter sofrido aborto recorrente de causa desconhecida, incluindo pelo menos uma perda após o segundo trimestre gestacional.

Não há exclusão ou inclusão com base no histórico imunológico (com exceção de deficiência de IgA). As infusões começam assim que se tem notícia da gravidez (quinta semana gestacional). Aproximadamente 0,5g/kg de massa corporal é aplicado semanalmente até a oitava semana gestacional, e após, com intervalo de 15 dias entre as aplicações, até a trigésima quarta semana gestacional.

No segundo grupo de controle para IVIg, houve diferença no critério de inclusão pelo menos quatro abortos prévios, mas não houve exigência de perda no segundo trimestre, ou insucesso gestacional prévio.

As infusões eram iniciadas na quinta semana gestacional até a décima, semanalmente, na quantidade de 0,8g/kg de massa corporal; e após a décima semana gestacional, quinzenalmente até a vigésima segunda semana. Não houve terapias concomitantes.

O tratamento se mostrou significativo ( $P < 0.02$ ) em 34% das pacientes com aborto secundário, enquanto que não foi estabelecido o efeito do tratamento em abortamento primário.

### **3.7 PROTOCOLO VII: YOKOO et al, 2006 (Infusão de leucócitos paternos)**

Designaram-se como pacientes com abortamento espontâneo recorrente (AER) 52 mulheres com três ou mais abortos consecutivos no primeiro trimestre de gestação, todos os abortos confirmados e com o mesmo parceiro. A idade das pacientes variou de 23 a 45 anos de idade (32,0 em média). Nenhuma das pacientes apresentava limitação genética, anormalidade mulleriana, deficiência hormonal, doença infecciosa, desordem metabólica, ou anormalidades autoimunes, como anticorpos antifosfolípidios positivos ou anticoagulante lúpico. Exames laboratoriais, como teste para detectar atividade da proteína C e S, complexo trombina-anti-trombina III, foram frequentemente exigidos das pacientes. Todas as pacientes possuíam resultado negativo para anticorpos bloqueadores, identificados pela reação de cultura mista de linfócitos com respectivos soros. A intervenção foi realizada da seguinte maneira: em cada paciente foi injetada uma infusão contendo células mononucleares dos parceiros. Antes e após a utilização da imunoterapia, os dados referentes à porcentagem de células CD4 positivas, células Th1, e células Th2, assim como a relação Th1/Th2, foram obtidos de todas as pacientes, cuja gravidez continuou com sucesso após a imunoterapia, e das pacientes que obtiveram novamente insucesso gestacional.

O procedimento de imunoterapia utilizando as células mononucleares do parceiro seguiu da seguinte maneira: uma amostra de células mononucleares contidas em 100 mL de sangue periférico heparinizado do parceiro foi obtida e irradiada com cinza 30 de raios X para prevenir a doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD) em 1 mL de solução salina. A solução restante foi injetada nas pacientes após obter o consentimento. A paciente somente é permitida de engravidar após o aparecimento da reação da cultura mista de linfócitos-anticorpos bloqueadores (MLR-Babs) no soro da paciente, seguindo uma série de duas ou mais injeções com intervalo de um mês cada.

Após o último aborto, no que constituiu os testes pré-imunoterapia, foram analisadas as células CD4 positivas, células Th1 e Th2. Estas análises foram repetidas quatro semanas após a última injeção, no que constituiu os testes pós-imunoterapia.

Para análise das células CD4 positivas, foram coletados 100 µL de sangue total das pacientes e incubados com 10 µL de isotiocianato de fluoresceína titulado (FITC).

A intervenção foi realizada de modo que em cada paciente foi injetada uma infusão contendo células mononucleares dos parceiros. Logo após o procedimento foram obtidas amostras de sangue periférico destes pacientes para análise.

Os resultados obtidos foram os seguintes: 42 das 52 pacientes tornaram-se grávidas, e oito novamente abortaram. O percentual de células Th2 aumentou significativamente no total da população de pacientes, enquanto que a relação Th1/Th2 diminuiu significativamente na população total de pacientes.

Quarenta e duas das 52 pacientes engravidaram. Das 42 grávidas, 34 (81,0%) continuaram a gravidez e deram a luz bebês, enquanto que as oito restantes abortaram.

A diferença de porcentagem de células CD4+ e Th1 não foi significativa considerando as populações destas células antes e depois da terapia.

Foi possível concluir que imunoterapia usando células mononucleares dos parceiros, para tratamento em casos de abortamento recorrente de causa desconhecida, induz um estado de predominância de células Th2 nas pacientes, o que é benéfico para a manutenção da gestação.



#### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Nos tratamentos baseados em transfusões de leucócitos paternos (protocolos I, V, VI, e VII), e na IVIg (protocolos II, IV, VI), os resultados dos protocolos II, IV, V, e VII mostraram-se eficientes, ou seja, a maior parte das mulheres tratadas obteve gestações bem sucedidas.

Os protocolos I, III, e VI mostraram resultados conflitantes no que diz respeito à eficiência do tratamento. O protocolo VI, no qual foram analisadas ambas as técnicas de imunoterapia, apenas o tratamento com leucócitos paternos aplicados para abortamento secundário se mostrou significativo.

Pesquisadores e profissionais da área médica que acompanham o progresso das pesquisas imunoterápicas para AER muitas vezes ficam confusos e sem posição quanto às terapias propostas. Isso ocorre devido aos dados contraditórios e as mudanças contínuas de opiniões sobre a terapia por infusão de leucócitos paternos, especificamente.

Um razão importante para tanta controvérsia nesta área da medicina é a aparente falta de valorização das dificuldades metodológicas que ameaçam as pesquisas válidas na área de AER.

Chaouat propõe que a terapia seja descartada baseada principalmente em um trabalho de colaboração internacional onde a meta-análise mostrou que apenas 1/11 das pacientes se beneficiaram com o tratamento. Segundo Chaouat, o fator psicológico causou efeito aparente (86%) nas pacientes administradas com placebo; As teorias no que diz respeito ao abortamento espontâneo recorrente e seu tratamento não levaram ao aprimoramento dos protocolos de imunoterapia. Devido à preocupação com a transmissão de viroses pela infusão de leucócitos paternos, Chaouat acredita que outras terapias devem ser consideradas como substitutas para a infusão de leucócitos paternos, como a administração de heparina e aspirina, e IVIg.

Outras considerações de Chaouat para o descarte da infusão de leucócitos paternos como terapia para abortamento espontâneo recorrente são: o paradigma das respostas Th1/Th2 foi útil no passado, mas não é mais válido, e as células NK não são meramente abortifacientes; A terapia é pouco provável que funcione por defeitos específicos, segundo Chaouat. Chaouat conclui que o paradigma das

respostas Th1/Th2, na qual a imunoterapia com linfócitos paternos se baseia, não é mais suficiente como justificativa para o tratamento. O paradigma é insuficiente para explicar o processo de implantação, que envolve moléculas inflamatórias e que não se ajusta ao esquema. Isso evidencia que a terapia não possui princípios suficientes para justificar o tratamento da implantação humana como um todo.

Novas descobertas no que diz respeito ao envolvimento de citocinas e células NK no processo de implantação mostraram que a terapia com linfócitos paternos não é um tratamento apropriado para mulheres com falhas na implantação, podendo piorar sua condição em alguns casos. (CHAOUAT, 2003).

A importância do efeito placebo gera controvérsias. Chaouat cita os resultados atingidos por Stray Pedersen pela utilização de psicoterapia como placebo, e que geraram resultados impressionantes e melhores que muitos protocolos de imunoterapia.

Os efeitos colaterais registrados como retardo do crescimento intrauterino sugerem uma terapia alternativa como a IVIg. O tratamento com aspirina e heparina também provou sua eficiência em vários trabalhos publicados. (CHAOUAT, 2003).

Chaouat sugere que as análises para cada tratamento devem ter uma razão e base de inclusão de pacientes no estudo. Os critérios de exclusão devem ser definidos rigorosamente, e o diagnóstico deve ser preciso.

Segundo Clark, um importante ponto a ser reavaliado é a real importância do tratamento baseado somente no conhecimento científico dos mecanismos das doenças, proposto por Chaouat.(2003). Dependendo do que a linha de pesquisa quer afirmar, a tendência de utilizar artigos como suporte para o que se quer provar é grande, desconsiderando as análises críticas como um todo (CLARK, 2004). Ele afirma que é preciso que se façam mais estudos do tipo "duplo-cego", onde é determinado como amostra um grupo de pacientes da mesma faixa etária, com o mesmo número de abortos e que recebeu a vacina, e um outro grupo com as mesmas características que utilizou apenas soro fisiológico, para que se possa comparar o desempenho de cada grupo. Clark acredita que é apropriado reavaliar a posição dos médicos em relação à terapia no momento em que novas pesquisas estiverem disponíveis. Segundo Clark, Chaouat examinou duas áreas distintas em seu artigo. No entanto, Clark afirma que a análise dos protocolos deve ser feita separadamente.

O tratamento de pacientes baseado no entendimento científico dos mecanismos das doenças pode ser mais prejudicial do que benéfico. Nestes casos, as pesquisas demonstram que triagens aleatórias com intervenção causaram mais prejuízos. (CLARK, 2004).

No entanto, o 'EBMIC' (Evidence-based medicine industrial complex) afirma que apenas dados empíricos de uma triagem propriamente aleatória controlada podem ser confiados (CLARK, 2004).

Clark afirma que Chaouat desconsiderou em sua análise o fato de que a porcentagem de sucesso de pacientes tratados era 77% contra 66% do controle, resultando em 11% de diferença, fazendo com que para cada gestação resultante em feto viável, nove pacientes devem ser tratadas.

No que se trata de defeitos adversos da terapia com leucócitos paternos, existem sim efeitos desagradáveis, entretanto, muitos podem ser prevenidos. Os efeitos colaterais atingem cerca de 2% das mulheres tratadas, sendo febre o mais comum (CLARK, 2004). Outro problema observado por Clark em algumas triagens é a administração inadequada da dose de células.

A ocorrência de abortamento recorrente aumentou em 2,06% desde a proibição do uso da terapia de leucócitos paternos nos Estados Unidos ( $P < 0.00079$ ). (CLARK, 2004).

Após análise dos protocolos de imunoterapia para abortamento espontâneo recorrente, e das linhas de pensamento de Clark e Chaouat, concluiu-se que devem ser revistas algumas particularidades das metodologias estudadas.

- Diagnóstico de AER errado: Mulheres que erroneamente são diagnosticadas como sendo AER e participam das pesquisas podem causar resultados desfavoráveis aos resultados da pesquisa;

- Grupo de controle: A qualidade do grupo de controle é importante para desenvolvimento da pesquisa. Fatores como idade das pacientes e motivo pelo qual procuraram à clínica deve ser observado. De acordo com Christiansen et al (2005) são selecionadas pessoas que buscam a clínica por outros problemas gestacionais que não são ERA. Christiansen alerta que deve ser observado o contato do grupo de controle com substâncias teratogênicas, como o cigarro.

- Averiguação do grupo: Ocorre quando a paciente procura certa clínica ou grupo de estudo com interesse baseado nas características do grupo de estudo ou

resultados obtidos por ela. Essa amostra de pacientes não pode ser considerada aleatória dentro da população AER, e, portanto não representa bem esta população.

- Procedimento de testes laboratoriais: Os testes laboratoriais são feitos geralmente durante ou logo após o aborto. O aborto pode induzir uma reação inflamatória e mudanças hormonais, que podem afetar as variáveis imunológicas (como citocinas e anticorpos) de forma sistêmica ou local (CHRISTIANSEN, 2005). Portanto, anormalidades descobertas após o aborto pode ser o resultado do aborto, e não sua causa.

- Aleatoriedade da amostra: É importante assegurar a aleatoriedade do grupo de estudo.

- Definição de aborto: O termo aborto pode ser descrito com falha gestacional que resulta em morte e expulsão do embrião ou feto (WHO, 1992). Por definição é estipulado que o embrião ou feto deve pesar  $\leq 500$  gr, correspondente à  $\leq 20^{\text{a}}$  semana gestacional (SOUZA, 1997). Contudo, essa "regra" não é seguida por todos os grupos de pesquisa. Muitos classificam perdas gestacionais superiores a 500 gr e 20 semanas gestacionais como sendo aborto (CHRISTIANSEN, 2005).

- Padronização dos critérios de inclusão: Os critérios de inclusão das pacientes devem ser padronizados, de maneira que as pacientes não recebam tratamento inadequado para sua condição. Deve ser padronizado o número de abortos prévios. Quanto à classificação dos abortos, é provável que as causas do abortamento primário sejam diferentes do abortamento secundário. Portanto, a avaliação do desempenho dos tipos de abortamento deve ser feita independentemente. Dados de triagens que não diferem o tipo de abortamento podem levar a uma interpretação errônea dos resultados.

- Análise dos dados: Os resultados de triagens aleatórias controladas são os de maior credibilidade. Deve haver uma preocupação estatística com a análise dos dados numéricos. Um delineamento de técnicas deve ser proposto. A análise deve ser mostrada nos trabalhos publicados. O número de pacientes participantes dos trabalhos deve ser suficiente para que não haja interferência na análise estatística.

Acredito que a imunoterapia com linfócitos paternos deve ser usada como tratamento de abortamento primário desde que haja uma preocupação com os dados relacionados acima.

Com relação à IVIg, acredito que também deve haver um controle das pacientes submetidas ao tratamento, assim como rigidez nos critérios de inclusão, e padronização dos protocolos.

## REFERÊNCIAS

ADACHI, H.; TAKAKUWA, K.; MITSUI, T.; ISHII, K.; TAMUKA, M.; TANAKA, K. Results of immunotherapy for patients with unexplained secondary recurrent abortions. **Clinical Immunology**, v. 106, p. 175-180, 2003.

AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Patient's fact sheet: Recurrent pregnancy loss. On line. Disponível: [www.asrm.org/Patients/mainpati.html](http://www.asrm.org/Patients/mainpati.html) Acessado em 21/Ago/2006.

BARINI, R.; COUTO, E.; MOTTA, M. M.; SANTOS, C. T. M.; LEIBER, S. R.; BATISTA, S. C. Fatores associados ao aborto espontâneo recorrente. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v.22, n.4, 2, p. 217-223, 2000.

CLARK, D. A. Author's reply. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 52, p. 340-343, 2004.

CLARK, D. A. Shall we properly re-examine the status of allogeneic lymphocyte therapy for recurrent early pregnancy failure? **American Journal of Reproductive Immunology**, v.51, p.7-15, 2004.

CLARK, D. A.; COULAM, C. B.; DAYA, S.; CHAOUAT, G. Unexplained sporadic and recurrent miscarriage in the new millennium: a critical analysis of immune mechanisms and treatments. **Human Reproduction Update**, v.7, p. 501-511, 2001.

CLARK, D. A.; COULAM, C. B.; STRICKER, R. B. Is intravenous immunoglobulins (IVIg) efficacious in early pregnancy failure? A critical review and meta-analysis for patients who fail in vitro fertilization and embryo transfer (IVF). **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.7, 2006.

CHAOUAT, G. Should we re-examine the status of lymphocyte alloimmunization therapy for recurrent spontaneous abortion? **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 50, p. 433-438, 2003.

CHRISTIANSEN, O. B.; ANDERSEN, A. M. N.; BOSCH, E.; DAYA, S.; DELVES, P. J.; HVIID, T. V.; KUTTEH, W. H.; LAIRD, S. M.; LI, T. C.; VANDERVEN, K. Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss. **Fertility and Sterility**, v.83, p. 821- 839, 2005.

CHRISTIANSEN, O. B.; NIELSEN, H. S.; PEDERSEN, B. Active or passive immunization in unexplained recurrent miscarriage. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 62, p.41-52, 2004.

CHONG, P. J.; MATZNER, W. L.; CHING, W. T. W. Immunology of recurrent spontaneous abortion. **The Female Patient**, v. 20, p. 1-4, 1995.

DAYA, S.; GUNBY, J.; PORTER, F.; SCOTT, J.; CLARK, D. A. Critical analysis of intravenous immunoglobulin therapy for recurrent miscarriage. **Human Reproduction Update**, v.5, p. 475-482, 1999.

MASUKO-HONGO, K.; HAYASHI, K.; YONAMINE, K.; TOKUYAWA, M.; NISHIOKA, K.; KATO, T. Disappearance of clonally expanded T cells after allogeneic leukocyte immunotherapy in peripheral blood of patients with habitual abortion. **Human Immunology**, v.63, p. 1111-1121, 2001.

MORIKAWA, M.; YAMADA, H.; KATO, E. H.; SHIMADA, S.; SAKURAGI, N.; FUJIMOTO, S.; MINAKAMI, H. Live birth rate varies with gestacional history and etiology in women experiencing recurrent sponatneous abortion. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 109, p. 21-26, 2003.

NTRIVALAS, E. I.; KWAK-KIM, J. Y. H.; GILMAN-SACHS, A.; CHUNG-BANG, H.; NG, S. C.; BEAMAN, K. D.; MANTOUVALOS, H. P.; BEER, A. E. Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology. **Human Reproduction**, v. 16, p. 855-661, 2001.

OBER, C.; KARRISON, T.; ODEM, R. R.; BARNES, R. B.; BRANCH, W.; STEPHENSON, M. D.; BARON, B.; WALKER, M. A.; SCOTT, J. R.; SCHEIBER, J. R. Mononuclear cell immunization in prevention of recurrent miscarriages: a randomized trial. **The Lancet**, v.354, p. 365-369, 1999.

SOUZA, S. S.; VOLTARELLI, J. C.; FERRIANI, R. A. Imunologia da reprodução humana. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 30, p. 277-288, 1997.

STRICKER, R. B.; STEINLEITNER, A.; BOOKOFF, C. N.; WECKSTEIN, L. N.; WINGER, E. E. Successful treatment of immunologic abortion with low dose intravenous immunoglobulin. **Fertility and Sterility**, v.73, p.536-540, 2000.

STRICKER, R. B.; STEINLEITNER, A.; WINGER, E. E. Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy for immunologic abortion. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v.2, p. 187-199, 2002.

TAKESHITA, T. Diagnosis and treatment of recurrent miscarriage associated with immunologic disorders: is parental lymphocyte immunization a relic of the past?. **J. Nippon Med. Sch.**, v.71, p. 308-313, 2004.

YOKOO, T.; TAKAKUWA, K.; OOKI, I.; KIKUCHI, A.; TAMURA, M.; TANAKA, K. Alteration of Th1 and Th2 cells by intracellular cytokine detection in patients with unexplained recurrent abortion – before and after immunotherapy – with the husband's mononuclear cells. **Fertility and Sterility**, v. 85, p. 1452-1458, 2006.

KWAK, J. Y. H.; QUILTY, E. A.; GILMAN-SACHS, A.; BEAMAN, K. D.; BEER, A. E. Intravenous immunoglobulin infusion therapy in women with recurrent spontaneous abortions of immune etiologies. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 28, p.175-188, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Glossary, on line. Disponível: [www.who.int/reproductive-health/infertility/3.pdf](http://www.who.int/reproductive-health/infertility/3.pdf) . Acessado em 17/jul/2006.