



2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

ESTUDO DA EXPRESSÃO DE UM RECETOR DA PROGESTERONA NAS POPULAÇÕES *MAJOR* LINFOCITÁRIAS

Ana Rita Vaz Ambrósio

2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

ESTUDO DA EXPRESSÃO DE UM RECETOR DA PROGESTERONA NAS POPULAÇÕES *MAJOR* LINFOCITÁRIAS

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Anabela Mota Pinto (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e do orientador interno, Professora Doutora Paula Cristina Veríssimo Pires (Faculdade e Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra).

Ana Rita Vaz Ambrósio

2014

“Assim, organizar a nossa vida que ela seja para os outros um mistério, que quem melhor nos conheça, apenas nos desconheça de mais perto que os outros. Eu assim talhei a minha vida, quase que sem pensar nisso, mas tanta arte instintiva pus em fazê-lo que para mim próprio me tornei uma não de todo clara e nítida individualidade minha.”

Fernando Pessoa, Livro do Desassossego

AGRADECIMENTOS

Como qualquer estudante de mestrado à procura de tema para tese, não sabia ao certo que tema e que laboratório haveria de escolher. Depois de vários contatos e rejeições devido à quantidade de alunos já existentes em certos laboratórios, houve uma equipa que tinha um tema bastante desafiante e um espacinho para esta aluna desamparada.

Fui recebida nesse laboratório, por três BELAS Senhoras todas muito afáveis, se me é permitido dizer. Estas três Senhoras deram-me um tema completamente novo na minha área, pois as bases que tinha de Imunologia eram apenas de 12º ano, dando-me todas as ferramentas necessárias para consolidar todos os conhecimentos indispensáveis à minha aprendizagem, esse apoio incondicional e acima de tudo a exigência, foram determinantes para o meu crescimento pessoal e académico. Estas três indispensáveis Senhoras foram, nomeadamente, a Professora Doutora Anabela Pinto, Mestre Sofia Pereira e a Doutora Ana Areia. De salientar que todo o meu conhecimento de técnicas laboratoriais nesta área foi devido ao árduo esforço, paciência e disponibilidade da sorridente, Mestre Sofia Pereira. Neste laboratório também, faziam parte a quem igualmente agradeço, a Senhora Leonor Salguinho, pela alegre companhia e disponibilidade a 100%. Permitir-me-ei individualizar a Doutora Mariana Freitas por todo o interesse, sugestões/críticas construtivas, disponibilidade e incentivo, apesar de não pertencer ao grupo de trabalho.

A várias pessoas tenho de agradecer o suporte técnico que possibilitou a realização de muitos trabalhos experimentais, caso do Professor Doutor Paulo Santos e Verinha, para além da disponibilidade e paciência em esclarecer esta aluna em fase de aprendizagem.

O estímulo é como os alicerces de uma casa, indispensável para quando temos de enfrentar a dificuldade de descortinar sobre o (pouco) que fizemos. De várias pessoas recebi incentivo que se traduziu em conselhos, ideias, gestos ou na palavra amiga, sendo essas pessoas a minha família, pais e irmã e o meu amoroso Nelson. E, *the last but not the least*, salientarei a Cláudia Maio pela amizade e ajuda, e essencialmente por ser o meu *back up* no laboratório. A amizade não se agradece, retribuiu-se, sempre que possível com muitas especiarias e sem sal.

RESUMO

O interesse pelo estudo dos mecanismos biológicos que estão na base de uma gravidez surge do conhecimento da presença de uma tolerância imunológica entre o feto e a mãe durante a gestação e que se designa por 'paradoxo imunológico'. O feto é considerado um semienxerto por possuir antígenos de origem materna e paterna e teoricamente dever-se-ia verificar uma resposta de rejeição, como ocorre normalmente em tecidos transplantados entre indivíduos geneticamente diferentes (Sarafana & Coelho 2007)(Christiansen 2013). Esta não rejeição, poderá estar relacionada com três fatores importantes para o normal desenvolvimento da gravidez: separação anatômica entre feto e mãe, imaturidade antigénica do feto e, modulação da resposta imunológica por parte da mãe, o que leva à aceitação do feto (Erlebacher 2013)(Sarafana & Coelho 2007)(Arosa et al. 2012). Existe assim, uma lacuna nos mecanismos que operam na tolerância fetomaterna durante a gravidez (Hemberger 2013)(Lashley et al. 2011)(Mendelson 2009)(Kobayashi 2012).

Durante a gravidez parece também haver uma diminuição da resposta imunitária celular, o que se traduz habitualmente pelo aumento da suscetibilidade da mãe a infeções. Esta modificação do sistema imunitário materno, também pode estar relacionada com a apresentação local de antígenos paternos por moléculas apresentadoras de antígenos e imunização sistémica devido à fuga de células fetais para a corrente sanguínea materna (microquimerismo) (Hemberger 2013)(Lashley et al. 2011)(Mendelson 2009)(Kobayashi 2012).

Relativamente ao trabalho de parto, que é caracterizado pelo amadurecimento cervical; rotura de membranas; contrações uterinas e subsequente expulsão do feto, é atualmente aceite a intervenção da resposta inflamatória (Romero et al. 2006) (A Pařízek et al. 2013)(Norman et al. 2007). Esta explicação assenta em dados científicos como o aumento da concentração de citocinas proinflamatórias e de células do sistema imunitário em diversos componentes do sistema reprodutivo: líquido amniótico, miométrio, cérvix e membranas fetais (Byrns 2013)(Mendelson 2009). Por sua vez a quiescência uterina

durante a maior parte da gravidez parece ser mantida por ações anti-inflamatórias, como a progesterona através dos seus recetores e indução de citocinas igualmente anti-inflamatórias (Hemberger 2013)(Norman et al. 2007). Todavia, todo o mecanismo está ainda por esclarecer.

A progesterona tem um papel fundamental para a manutenção da gravidez mantendo assim a quiescência uterina.

Descobertas recentes mostram que, a progesterona não só exerce efeitos genomicamente através da sua ligação a recetores nucleares da progesterona (nPR), mas também exerce os seus efeitos por vias não genómicas, ligando-se a recetores membranares (mPRs), que parecem encontrar-se na superfície celular (Zachariades et al. 2012)(Mesiano et al. 2011)(Kelder et al. 2010)(Fernandes et al. 2005).

Este estudo pretende clarificar alguns fatores que estão envolvidos na manutenção da gravidez e também no desencadear do trabalho de parto, e avaliar a expressão de um tipo de receptor membranar em células do sistema imune, e que estará sob a influência da ação molecular da progesterona, em mulheres grávidas.

Neste sentido, tem-se como objetivos principais: (1) caracterizar fenotipicamente as populações linfocitárias major e subpopulações na gravidez normal no segundo, terceiro trimestre e parto, através da avaliação da variação destas populações ao longo da gravidez e dia do parto e (2) avaliar a expressão do recetor mPR- α nestas populações linfocitárias e estudar a sua variação ao longo da gravidez e dia do parto.

Com a realização deste estudo pode-se concluir que, (1) todas as células do sistema imunológico sofrem alterações na gravidez na tentativa de criar um ambiente imuno-tolerante, permitindo a quiescência uterina e assim aceitação do feto; (2) inovador pelo facto de demonstrar que existe expressão do recetor mPR- α nas populações major linfocitárias de sangue periférico, e não só nos linfócitos T; (3) existe uma imunomodulação da expressão do recetor mPR- α ao longo da gravidez, estando assim dependente das células do sistema imunitário e das hormonas libertadas durante a gravidez, mais propriamente, a progesterona e; (4) poderá vir a ser uma mais-valia à compreensão dos processos envolvidos durante a gravidez e em processos patológicos decorrentes de uma gravidez.

Palavras-chave: Linfócitos
Imunomodulação
Gravidez
Progesterona
mPR- α

ABSTRACT

Interest in the immunology of pregnancy was originally inspired by the realization that expression of paternal histocompatibility antigens by the fetus and placenta should provoke the same kind of tissue rejection response seen following organ transplantation named by “immunological paradox of pregnancy” (Erlebacher 2013).

It is still not elucidated how the fetus considered a semiallogenic graft in most instances avoids rejection by the maternal immune system. There are several mechanisms to explain this: one of his explanations is based on a diminished maternal responsiveness to pregnancy, leading to acceptance of the foreign fetus (Erlebacher 2013)(Sarafana & Coelho 2007)(Arosa et al. 2012). Indeed, the cellular immune response seems to be decreased during pregnancy, reflected by the increased susceptibility to viral infections and specific intracellular pathogens(Hemberger 2013)(Lashley et al. 2011)(Mendelson 2009)(Kobayashi 2012).

Parturition is widely accepted to be an inflammatory event, as it is largely driven by inflammatory cytokine and prostaglandin signaling. Inflammatory pathways stimulate the various events that lead to parturition, such as cervical ripening, rupture of membranes, and uterine contractions (Romero et al. 2006)(A Pařízek et al. 2013)(Norman et al. 2007) and inflammation and activation of proinflammatory cytokines has been implicated in the mechanisms responsible for term parturition. However, all this mechanisms are yet unknown (Byrns 2013)(Mendelson 2009).

Progesterone plays a central role in the establishment and maintenance of human pregnancy, and many rapid effects of this hormone have been observed. These results demonstrate that progesterone can exert effects in a nongenomic manner and not only in a genomic manner, binding to membrane receptors. This genomic manner was recognised by the progesterone binding to nuclear progesterone receptors, which is relatively slow than genomic pathway, where progesterone binds to membrane receptors (Zachariades et al. 2012)(Mesiano et al. 2011)(Kelder et al. 2010)(Fernandes et al. 2005).

The main idea of this study is to understand the mechanism behind maintenance of pregnancy, and what induce the process of parturition. Moreover, we had study the relationship between immune system cells and the expression of the new membrane progesterone receptor on these cells, on pregnant women.

So the main goals of this study were: (1) immunophenotyping the major immune system cells during pregnancy (second and third trimester and delivery day); (2) immunophenotyping the expression of membrane progesterone receptor alpha (mPR- α) on the major immune system cells also during pregnancy.

In conclusion, we were capable to see: (1) changes on the immune system cells profile during the pregnancy, to maintain an immune tolerance; (2) the expression of membrane progesterone receptor alpha (mPR- α) on the immune system cells and his relationship with and; (3) an immune modulation between membrane progesterone receptor alpha (mPR- α) and immune system cells and progesterone.

To this end, a comprehensive and detailed understanding of the mechanisms involved in pregnancy, not only to develop more effective therapies for treatment of pregnancy complications and prevention of this pathologies, but also to elucidate the complex process behind the pregnancy.

Keywords: Lymphocytes
Immune modulation
Pregnancy
Progesterone
mPR- α

ÍNDICE

Abreviaturas	ix
INTRODUÇÃO	1
1. O SISTEMA IMUNITÁRIO	1
1.1. RESPOSTA IMUNOLÓGICA INATA.....	6
1.2. RESPOSTA IMUNOLÓGICA ADAPTATIVA	7
1.3. CÉLULAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA IMUNITÁRIA.....	8
1.3. COMPLEXO MAJOR DE HISTOCOMPATIBILIDADE	17
1.4. MEDIADORES SOLÚVEIS DA RESPOSTA IMUNOINFLAMATÓRIA	19
2. RESPOSTA IMUNOINFLAMATÓRIA NA GRAVIDEZ E PARTO.....	23
2.1. IMUNOFISIOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO.....	23
2.2. GRAVIDEZ.....	24
2.3. MECANISMOS DE MANUTENÇÃO DA QUIESCÊNCIA UTERINA DURANTE A GRAVIDEZ	28
3. PROGESTERONA COMO HORMONA IMUNOMODELADORA DA GRAVIDEZ E PARTO	31
3.1. MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA SINALIZAÇÃO DA PROGESTERONA DURANTE A GRAVIDEZ	32
MATERIAIS E MÉTODOS	38
IMUNOFENOTIPAGEM DAS POPULAÇÕES MAJOR LINFOCITÁRIAS E EXPRESSÃO DO RECETOR mPR- α NESTAS POPULAÇÕES.....	39
1. Protocolo de imunofenotipagem de células do sangue periférico	39
2. Estratégia de gating dos linfócitos	40
3. Análise de dados e tratamento estatístico	43
RESULTADOS.....	44
1. IMUNOFENOTIPAGEM DAS POPULAÇÕES MAJOR LINFOCITÁRIAS E EXPRESSÃO DO RECETOR mPR- α NESTAS POPULAÇÕES	44
1.1. PERCENTAGEM DAS POPULAÇÕES MAJOR LINFOCITÁRIAS (T, B E NK), DURANTE A GRAVIDEZ	45
1.2. EXPRESSÃO DO RECETOR MPR-A, MEDIDA ATRAVÉS DA MÉDIA DE CANAL DE FLUORESCÊNCIA DAS POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS (T, B E NK), DURANTE A GRAVIDEZ	48
1.3. PERCENTAGEM DAS POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS (T, B E NK) QUE EXPRESSAM O RECETOR MPR-A DURANTE A GRAVIDEZ.....	51
1.4. PERCENTAGEM DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS T (CD4+CD8+, CD4+CD8-, CD4-CD8+, CD4-CD8-) E DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NK (CD56+CD8+, CD56+CD8-), DURANTE A GRAVIDEZ.....	54
1.1.1. EXPRESSÃO DO RECETOR MPR-A, MEDIDA ATRAVÉS DA MÉDIA DE CANAL DE FLUORESCÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS T (CD4+CD8+, CD4+CD8-, CD4-CD8+, CD4-CD8-) E DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NK (CD56+CD8+, CD56+CD8-), DURANTE A GRAVIDEZ	60

1.1.2. PERCENTAGEM DA EXPRESSÃO DO RECETOR MPR-A NAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS T (CD4+CD8+, CD4+CD8-, CD4-CD8+, CD4-CD8-) E NAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NK (CD56+CD8+, CD56+CD8-), DURANTE A GRAVIDEZ	66
DISCUSSÃO	74
CONCLUSÃO	79
Referências Bibliográficas.....	81

ABREVIATURAS

PMN - Polimorfonucleares

PAF – Fator de ativação plaquetária

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular

VCAM-1 – Molécula de adesão vascular

NK – Células Natural Killer

MLCK – Proteína cinase das cadeias leves da miosina

MC – Mastócitos

PAMP – *Pathogen Associated Molecular Patterns*

PRR – *Pathern Recognition Recetor*

TLR – Recetores *Toll Like*

APC – Células apresentadoras de antígenos

MHC – Complexo Major de Histocompatibilidade

IL – interleucinas

CD- *Cluster of differentiation*

T_h – Linfócito T *helper*

BCR – Recetor dos linfócitos B

mIg – Imunoglobulina membranar

ADCC – *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*

LB – Linfócitos B

TGF – Fator transformador do crescimento

TNF – Fator de necrose tumoral

IFN- γ – Interferão - γ

Ig – Imunoglobulina

F_c – *Constant fragment*

LT – Linfócito T

T_c – Linfócito T citotóxico

T_{reg} / T_s – Linfócito T reguladores / supressores

TCR – T cell recetor

Pré-T – Percursos dos linfócitos T

KIR – *Killer cell immunoglobulin-like receptor*

HLA – *Human leucocyte antigen*

LPS – Lipopolissacarídeo

LIF – *Leucemia inhibitory factor*

CNTF – *Ciliary neurotrophic factor*

OSM – Oncostatina-M

FSH – Hormonas foliculoestimudante

LH – Hormonas luteinizante

NKT – Linfócito T-natural killer

Ca²⁺ – Cálcio

CAPs – Proteínas associadas à contração

MLCK – Proteína cinase das cadeias leves da miosina

CRH – Hormona libertadora de corticotrofina

ACTH – Hormona adrenocorticotrófica

MMP – Metaloproteínases da matriz

nPR- Recetores nucleares da progesterona

mPR – Receptor membranar da progesterona

PAQR – *Transmembrane progesterone adipo Q receptor*

GPCRs – *G protein-coupled receptors*

PR – progesterona

PBMCs – Células mononucleares de sangue periférico

PBS – Tampão de fosfato salino

FBS – Soro de bovino fetal

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

PE – Ficoeritrina

PECy5 – Ficoeritrina – cianina 5 tandem

APC – Aloficocianina

MIF – Média de intensidade de fluorescência

FSC – Forward scatter characteristics

SSC – side scatter characteristics

INTRODUÇÃO

1. O SISTEMA IMUNITÁRIO

O termo imunidade derivado da palavra do latim, *immunitas* significa, proteção contra doenças. O sistema imunológico é fundamental na defesa e sobrevivência do organismo humano, o seu envolvimento passa por exemplo, pela proteção contra a ameaça de doença causada por organismos infecciosos (agentes patogénicos), células neoplásicas sendo igualmente responsável pela rejeição de transplantes.

Desencadeia-se desta forma um processo denominado de resposta imunológica, que é mediado por células e também por moléculas. Nas células (Figura 1) podemos destacar os glóbulos brancos ou leucócitos polimorfonucleares (PMN) ou granulócitos (neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e basófilos) e leucócitos mononucleares (linfócitos T, B, NK e monócitos).

Centramo-nos nos leucócitos, que derivam de um precursor comum, a célula estaminal hematopoética, e se caracteriza por expressar a proteína CD34. Esta célula estaminal possui diversas propriedades: capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares; autorrenovação e capacidade de se dividir indefinidamente. A célula estaminal hematopoética, também é responsável pela hematopoiese, pois dá origem a dois tipos de células estaminais com maior especialização: o progenitor linfoide que origina os linfócitos T, B e NK e o progenitor mielóide que origina outros tipos de leucócitos, como os eritroblastos e os megacariócitos.

Os linfócitos têm um papel fundamental nas respostas imunológicas. Estas células amadurecem nos órgãos linfoides primários (locais de produção de linfócitos a partir do progenitor linfoide – linfopoiese); sendo na medula óssea para os linfócitos B e no timo para os linfócitos T e migrando posteriormente para os órgãos linfoides secundários (gânglios linfáticos, baço, tecido linfoide associado à mucosa, etc.). Nestes locais são retidos os anticorpos (solúveis ou transportados pelas células dendríticas provenientes dos diversos locais do corpo), proporcionando assim o encontro eficiente e específico dos

linfócitos *naïve* com as células apresentadoras de antígenos. Este encontro leva à diferenciação/ativação dos linfócitos em células efetoras, que são capazes de efetuar e participar na resposta imunológica específica (humoral ou celular) ou em células de memória que, circulam pelos tecidos linfoides secundários e outros tecidos à procura de um novo contato com o antígeno, pelo qual são específicos. Após a ativação pelo antígeno, migram dos órgãos linfoides secundários para os focos inflamatórios, através da corrente sanguínea (Abbas et al. 2007) (Wood 2006)(Arosa et al. 2012).

Uma vez que o sistema imunitário é essencial à sobrevivência do ser humano é importante que a sua resposta seja eficaz e fisiológica. No entanto, há alterações à resposta considerada normal do sistema imunitário e surgem patologias como as hipersensibilidades, imunodeficiências, patologia autoimune e síndromes imunoproliferativas (Wood 2006).

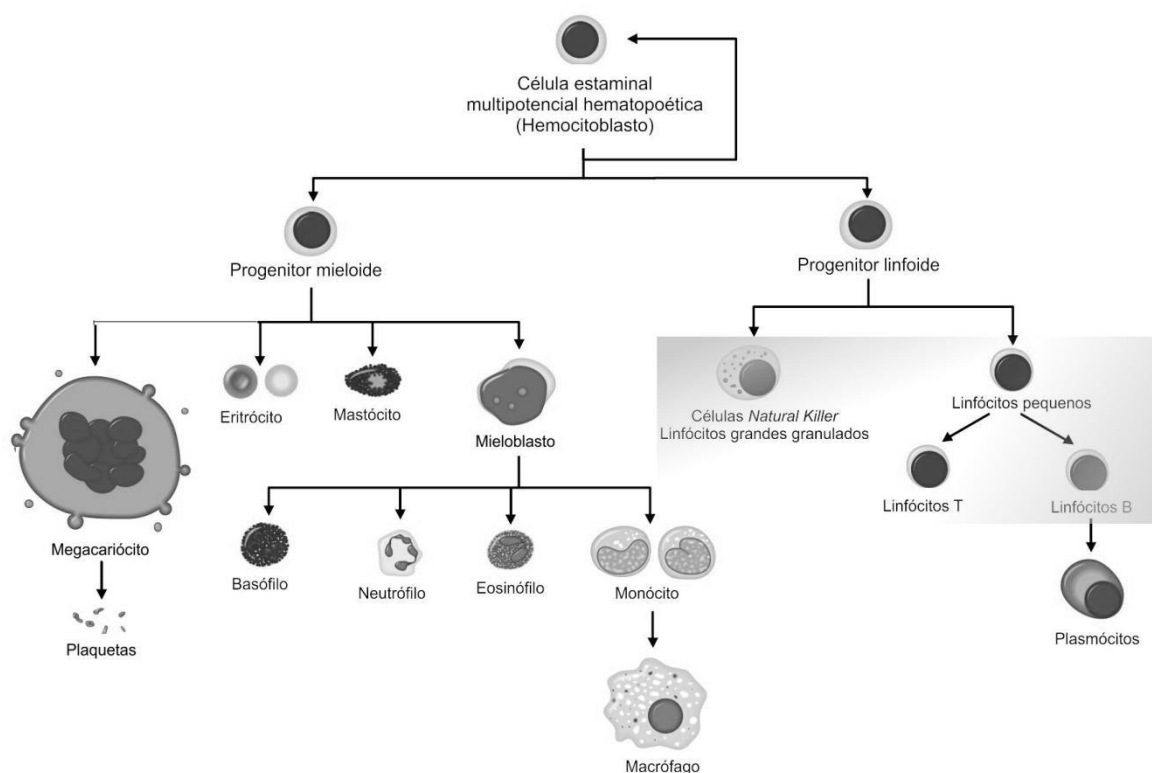


Figura 1 - Árvore genealógica das células sanguíneas – Hematopoiese (Adaptado de Wood 2006).

RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A resposta inflamatória fundamentada na vascularização e em mediadores celulares e moléculares, define-se, como um processo biológico e fisiológico que conduz à orientação dos meios de resposta (particularmente os celulares) para o local onde se processou a agressão. É uma resposta inata, inespecífica e estereotipada, independente do tipo de agressão e da existência ou não de contatos prévios com o mesmo. Clinicamente uma infecção apresenta sinais e sintomas (alterações sistémicas) que refletem o efeito dos mediadores inflamatórios no local onde se está a processar a agressão: calor, dor, rubor, edema, designados de sinais cardeais de Celsus da inflamação e que refletem o resultado de uma vasodilatação e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos. Há dois tipos de inflamação marcados pela sua durabilidade, inflamação aguda e crónica (má inflamação). Estes sinais cardeais, são mais visíveis na inflamação aguda comparativamente à inflamação crónica (Robbins & Cotran 2005)(Pinto 2013).

A inflamação aguda é uma inflamação de resposta rápida (segundos ou minutos) de pouca duração (minutos/horas ou alguns dias). É caracterizada principalmente por, exsudação de fluidos devido à alteração do calibre vascular; alterações estruturais na microcirculação que proporcionam a saída de proteínas plasmáticas e leucócitos da circulação sanguínea (edema) e por emigração de leucócitos, predominantemente neutrófilos, para o foco da inflamação com objetivo de eliminar o agente agressor. A inflamação crónica é uma inflamação de longa duração (semanas a meses) e está histologicamente relacionada com a presença de linfócitos e macrófagos, fibrose, proliferação dos vasos sanguíneos e necrose dos tecidos. Este tipo de inflamação que pode suceder uma inflamação aguda, normalmente inicia-se de uma forma dissimulada e muitas vezes de resposta assintomática, que conduz a diversas doenças devido ao dano de tecidos, como é o caso de artrite reumatoide, aterosclerose, tuberculose e fibrose pulmonar (Cotran et al. 2010).

Histologicamente a inflamação é definida como infiltração de leucócitos: macrófagos, neutrófilos e linfócitos através dos tecidos. Esta infiltração é conseguida, devido a uma vasodilatação e a um aumento da permeabilidade vascular que propicia o afluxo de sangue ao tecido e o transporte de proteínas plasmáticas e de mediadores celulares e moleculares, dos vasos para os tecidos - espaço extravascular (exsudado), que resulta num aumento de fluido neste local (edema). Para que isto ocorra é necessário haver

alterações no calibre e no fluxo vascular através de (1) vasodilatação e contração das células endoteliais proporcionada por mediadores moleculares (como por exemplo, histamina, bradicinina, leucotrienos e substância P), que resulta no aparecimento de intervalos intercelulares, como se tratasse de um “afastamento”, e conseqüentemente num aumento do fluxo sanguíneo que se traduz em calor e rubor; (2) retração juncional, para que haja aumento da permeabilidade vascular. Este processo reversível é mediado particularmente por citocinas (IL-1, IFN- γ e TNF- α) que induzem uma reorganização do citoesqueleto das células endoteliais; (3) perda de fluido que resulta numa acumulação de eritrócitos e aumento da viscosidade sanguínea e subseqüentemente numa dilatação vascular e diminuição de fluxo sanguíneo e; (4) acumulação e adesão de leucócitos, principalmente neutrófilos ao longo do endotélio vascular, que acabam por migrar através da parede vascular para o tecido intersticial. Pode-se assim inferir que, a resposta inflamatória é orquestrada por vários processos sequenciados: com o aumento da permeabilidade vascular, em que há um aumento da saída de fluidos dos vasos sanguíneos para a periferia da superfície endotelial, com conseqüente aumento da concentração de leucócitos neste local, iniciando-se assim, o processo de marginação. Seguidamente, os leucócitos rolam sobre as células endoteliais devido à expressão nestas células, de moléculas de adesão, como a P-selectina que respondem a mediadores químicos como a histamina, a trombina e o fator de ativação plaquetária (PAF), resultando na adesão dos leucócitos às células endoteliais. Esta adesão leva à ativação dos leucócitos, que expressam mediadores inflamatórios, como as citocinas (IL-1 e TNF). Estes mediadores inflamatórios são responsáveis também, pela expressão de moléculas de adesão como a E-selectina, a molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e a molécula de adesão vascular (VCAM-1). Todos estes mecanismos levam à formação de camadas de leucócitos aderentes ao endotélio – pavimentação, e conseqüentemente inicia-se a transmigração endotelial (diapedese). Esta transmigração requer o aumento de cálcio livre intercelular nas células endoteliais, adjacentes à transmigração leucocitária. Este aumento vai levar à ativação da cadeia leve da miosina cinase (MLCK) que induz modificações conformacionais da miosina II, e por sua vez leva à contração dos filamentos de actina-miosina e aumenta a tensão das células endoteliais. Após este processo de extravasamento, os leucócitos emigram nos tecidos em direção ao local da agressão, por resposta a estímulos quimiotáticos exógenos (produtos bacterianos, por exemplo) e

endógenos de natureza molecular (como fatores do complemento, quimiocinas, citocinas). Esta movimentação orientada – quimiotaxia, só é possível devido aos diferentes padrões de recetores expressos na superfície dos leucócitos que respondem aos diferentes sinais quimiotáticos, o que conduz à ativação leucocitária, com o objetivo destes exercerem as suas funções efetoras (fagocitose e libertação de enzimas) no local da resposta inflamatória (Pinto 2013) (Robbins & Cotran 2005).

A inflamação termina quando o agente agressor é então eliminado ou inativado e os mediadores secretados deixam de exercer as suas funções através da transição de um estado pró-inflamatório para um estado anti-inflamatório, para que não haja um dano excessivo no hospedeiro.

Dos mediadores celulares fazem parte: monócitos, macrófagos e neutrófilos, que têm como principal função efetora a fagocitose no local da inflamação; os mastócitos (MC), que têm como principais funções sintetizar e libertar mediadores quimiotáticos, recrutar células efetoras e modificar a permeabilidade vascular; os eosinófilos, que libertam mediadores pró-inflamatórios, proteínas catiónicas e citocinas; as plaquetas, estas libertam mediadores no local da lesão vascular que favorecem a atividade das células na integridade do endotélio, na coagulação sanguínea, fibrinólise e na resposta inflamatória (permeabilidade vascular e vasoconstrição) e; as células endoteliais têm um papel importante no revestimento da superfície vascular e na regulação do fluxo de nutrientes da atividade biológica de diversas moléculas e das próprias células sanguíneas.

Dos mediadores moleculares fazem parte: os mediadores extracelulares (o complemento, as cininas e os fatores de coagulação) que derivam do plasma, estes existem na circulação como precursores e geralmente têm de ser ativados por clivagem proteolítica para adquirirem propriedades biológicas e; os mediadores intracelulares (produzidos localmente pelas células) que se encontram geralmente nos grânulos celulares, (como acontece com a histamina nos MC) sendo secretados por ativação celular ou sintetizados de novo em resposta a estímulos (como as prostaglandinas e as citocinas).

Ainda que o objetivo principal da resposta inflamatória seja deter a agressão, a inflamação é uma resposta paradoxal já que ao ser inespecífica acaba por atingir o tecido adjacente à lesão (Pinto 2013) (Luo et al. 2010)(Romero et al. 2006).

1.1. RESPOSTA IMUNOLÓGICA INATA

Qualquer agressão interna ou externa ao organismo (microrganismos, toxinas, células infectadas, etc.) é reconhecida numa primeira linha de defesa por moléculas recetoras presentes em células eminentemente fagocíticas e de resposta imediata, o que leva ao desencadear de uma resposta imunológica, designada imunidade inata ou natural, que é fundamental para manter o equilíbrio do organismo (homeostasia). Quando as células fagocíticas são ativadas, o mecanismo efetor destas células, a fagocitose, surge na tentativa de eliminar o agressor. Este processo envolve a libertação de citocinas e outros mediadores biológicos de natureza inflamatória (Abbas et al. 2007)(Arosa et al. 2012).

Muitas das moléculas envolvidas na imunidade inata têm recetores que reconhecem padrões moleculares associados a agentes patogénicos ou PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns); esses recetores são designados de PRR (Pathern Recognition Recetor), e os recetores Toll Like (TLR) são aqueles que reconhecem um maior número de PAMP.

A fagocitose é um dos principais mecanismos de suporte da imunidade inata. O agente agressor é interiorizado pelas células fagocíticas e destruído ou neutralizado de seguida. Estas células fagocíticas são atraídas por estímulos químicos de atração desencadeados por quimiocinas. O processo de fagocitose pode ser desencadeado por ligação dos recetores aos agentes patogénicos ou por mediadores do processo de opsonização – opsoninas. Estas fazem a ligação entre o recetor da célula fagocítica e o antigénio, para promover a fagocitose.

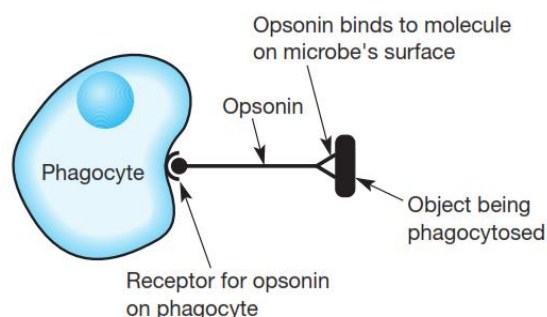


Figura 2- Processo de opsonização mediado por opsoninas. (*in* Wood 2006).

1.2. RESPOSTA IMUNOLÓGICA ADAPTATIVA

Nem sempre o sistema imunitário inato é capaz de eliminar todo o tipo de agentes patogénicos, pois alguns são resistentes ou não são reconhecidos, como é o caso dos vírus, persistindo assim a inflamação independentemente das células e moléculas envolvidas. Neste caso, a agressão é levada a cabo por moléculas altamente específicas, dando origem a uma resposta imunológica adaptativa, através da produção de anticorpos específicos (resposta humoral) e/ou produção de células efetoras capazes de reconhecerem e agredirem as células portadoras de antígenos (resposta celular). Todo este mecanismo constitui a segunda linha de defesa do organismo (Arosa et al. 2012)(Wood 2006). As principais células constituintes da imunidade adquirida são os linfócitos: linfócitos T e B, sendo que estas duas subpopulações linfocitárias não só têm diferentes funções como também se subdividem em várias subpopulações (Wood 2006). Todas as respostas imunitárias são iniciadas pelo reconhecimento de antígenos estranhos, apresentados em algumas células tais como macrófagos, células B e células dendríticas, denominadas de células apresentadoras de antígenos (APC).

Uma vez reconhecido o agente agressor por uma célula APC, este é ingerido e de seguida degradado, sendo assim destruído ou neutralizado. Após a degradação do agressor, a APC expressa os péptidos patogénicos à superfície da membrana, associados a uma molécula MHC de classe I ou II (Complexo Major de Histocompatibilidade), produzindo sinais químicos que atraem células T *naïve* (CD4 e CD8 *naïve*). Após a receção dos sinais por estes linfócitos T *naïve*, estas ligam-se às moléculas MHC classe I e II respetivamente, despoletando-se uma linguagem química mediada em particular por citocinas também designadas interleucinas (IL). Todo este mecanismo é necessário para que as células T *naïve* participem na resposta imunitária específica e haja proliferação e diferenciação destas mesmas células em células T efetoras com novas funções de eliminação do antígeno e especialização em diferentes atividades (CD4 *helper* – T_h e CD8 citotóxicas - T_c), dá-se assim início à resposta imunitária mediada por células (Murphy 2012).

As células T helper (T_h) são fundamentais para o recrutamento de células B, dado que, libertam outro tipo de citocinas que estimulam a produção de células B. Uma vez recrutadas, as células B tornam-se ativas, proliferam e produzem o mesmo tipo de anticorpos, estão assim implicadas na resposta imunológica humoral. As células B

diferenciam-se em, plasmócitos e células B de memória com funções distintas. Os plasmócitos são dedicados à produção e secreção/libertação de moléculas de anticorpo, enquanto as células B de memória não secretam anticorpos mas mantêm-se no organismo, o que permite que estas sejam novamente ativadas no caso de o organismo ser exposto ao mesmo tipo de agente patogénico (Stewart & Cooley 2004)(Murphy 2012).

1.3. CÉLULAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA IMUNITÁRIA

Os linfócitos podem ser classificados em três populações principais de acordo com a função biológica e a expressão superficial de antígenos: linfócitos T, B e células NK.

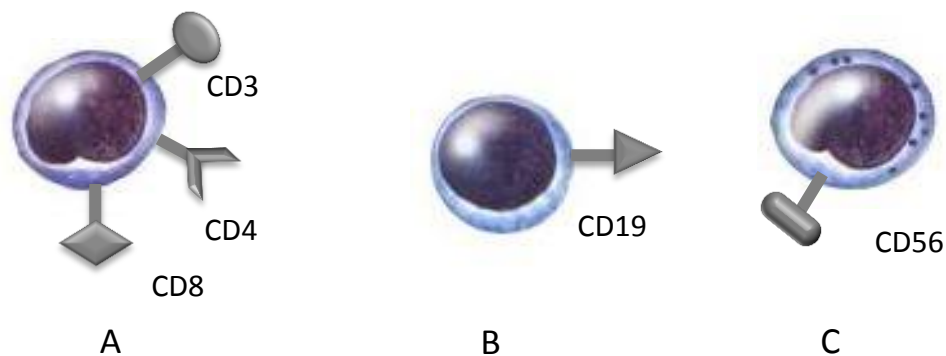


Figura 3- Esquema representativo dos principais marcadores de cada população major linfocitárias. A) Linfócitos T; B) Linfócitos B e C) Linfócitos NK.

LINFÓCITOS B E O SISTEMA IMUNITÁRIO

As células B são assim designadas, por terem origem na medula óssea (*Bone marrow*) e expressam na sua membrana plasmática um recetor típico designado, recetor das células B ou BCR (*B cell recetor*). Este recetor próprio das células B é constituído por uma imunoglobulina membranar (mIg) responsável pelo reconhecimento de antígenos, que se encontra associada não-covalentemente a um heterodímero $Ig\alpha/Ig\beta$ (CD79a/ CD79b), responsável pela transdução de sinal. Este recetor é responsável pela ativação, proliferação e diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos e linfócitos B de memória. Este processo é desencadeado quando há o reconhecimento do antígeno por parte dos recetores, para que os antígenos sejam destruídos por células do sistema imunológico,

componente fulcral da imunidade adaptativa, que confere proteção imediata e de longo prazo contra uma série de agentes infecciosos (Arosa et al. 2012)(Stemcell Technologies inc. 2011).

Os plasmócitos são as células *major* a nível da imunidade humoral por serem responsáveis pela síntese de imunoglobulinas, ou anticorpos, que circulam no sangue e sistema linfático. As suas ações efetoras são, por exemplo: a neutralização do agente agressor, opsonização/fagocitose, ativação do sistema complemento, citotoxicidade dependente de anticorpos – ADCC (mecanismo pelo qual certas células do sistema imunológico destroem células-alvo revestidas por anticorpos). Reciprocamente a sua desregulação está na base de várias patologias do sistema imunitário como já referido, incluindo doenças autoimunes e síndromes imunoproliferativas como o mieloma múltiplo.

Os linfócitos B precisam de passar por vários estádios de maturação na medula óssea, de forma a adquirirem características e funcionalidades necessárias para responderem a estímulos antigénicos. O final desta maturação dá-se em órgãos linfoides secundários, onde passam de linfócitos B *naïve* imaturos, a linfócitos B *naïve* maduros, antes de serem libertados para a corrente sanguínea. No primeiro estadio as células progenitoras dos linfócitos B (células pró-B) expressam o marcador de superfície CD19, mas não expressam a cadeia pesada das imunoglobulinas e os marcadores CD10 e CD34. No segundo estadio as células precursoras dos linfócitos B (pré-B) perdem a expressão do marcador de superfície CD34 e de determinadas proteínas, mas expressam a cadeia pesada apenas no citoplasma, e uma imunoglobulina IgM funcional à superfície da célula, todo este processo dá assim origem aos linfócitos B imaturos. Estas células B imaturas caracterizam-se por apresentarem à superfície o marcador CD19 e a cadeia pesada associada à cadeia leve e, dão origem aos linfócitos B maduros que irão entrar na circulação sanguínea após reconhecimento do antigénio, conseqüentemente há perda da expressão do marcador CD10 e aparecimento à superfície das imunoglobulinas, IgM e IgD (Arosa et al. 2012).

Adicionalmente, os linfócitos B (LB) produzem citocinas e podem ser subdivididos em LB reguladores e LB efetores. Os LB reguladores (Breg) distinguem-se pela sua capacidade de secretar IL-10 e TGF β -1 (Fator transformador do crescimento- β) ao passo que os LB efetores produzem as seguintes citocinas, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, TNF (Fator de necrose

tumoral alfa) e IFN- γ (Interferão- γ). A função principal dos Breg é manter o balanço imunológico que é necessário para a tolerância (previne a autoimunidade e ajuda na luta contra infecções) (Lund 2008)(Stemcell Technologies inc. 2011)(Biosciences 2013).

IMUNOGLOBULINAS OU ANTICORPOS (IGs)

São proteínas segregadas pelos plasmócitos e podem existir na forma membranar o que lhes confere a capacidade de reconhecer o antígeno, ou numa forma solúvel (com atividade anticorpo) responsáveis pelas respostas humorais, como já foi referido. O peso molecular de uma molécula de imunoglobulina é aproximadamente 150 kDa (referente a uma IgG, varia conforme o isótipo).

Estas proteínas glicosiladas são compostas por 4 cadeias polipeptídicas: 2 cadeias leves idênticas L (*Light*) de 25kDa e 2 cadeias pesadas H (*Heavy*) de 50-75kDa. Funcionalmente existem 2 regiões principais, a porção N-terminal variável (V) responsável pelo reconhecimento do antígeno e a porção C-terminal, região constante (C) com propriedades efetoras da molécula. As cadeias pesadas e leves são unidas entre si por pontes dissulfeto (Arosa et al. 2012)(Wood 2006)(Abbas et al. 2007).

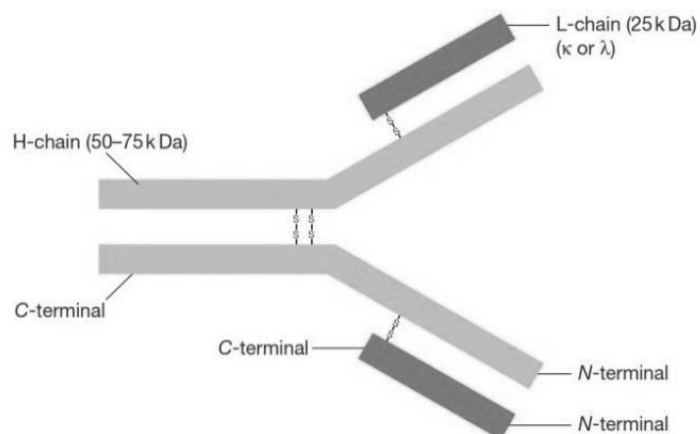


Figura 4- Estrutura molecular de um anticorpo. Cada molécula possui 2 cadeias idênticas (*Heavy*) e duas cadeias idênticas leves (*Light*), (Adaptado de Wood,2006).

A diversidade da especificidade da ligação de antígenos deve-se à diversidade de sequências de aminoácidos da região variável, quer das cadeias leves quer das cadeias pesadas.

Em resposta ao antígeno, os linfócitos B podem efetuar mudanças no isótipo da imunoglobulina que expressam, o que lhes confere a capacidade de alterarem as suas propriedades efetoras sem alterarem a especificidade pelo antígeno. As propriedades

efetoras são mediadas pela interação da região constante Fc (*Constant Fragment*) com as moléculas presentes na superfície de outros tipos de células, os recetores Fc. Esta interação desencadeia mecanismos ativos de defesa do organismo.

Deste modo, diferentes isótipos das imunoglobulinas têm uma atividade anticorpo diferente consoante a especificidade do antigénio. Os isótipos que estão envolvidos na neutralização de agentes agressores são: IgG, IgM e IgA. Existindo porém, outros isótipos funcionalmente diferentes (IgD e IgE).

A IgG é a imunoglobulina mais abundante no sangue e fluidos extracelulares. A IgA é o principal isótipo presente nas secreções e mucosas (saliva, leite materno, etc.), e a mais importante no leite materno, e é capaz de evitar a aderência de *Pneumoccus* e *Haemophilus influenzae* e neutralizar o polivírus, estando assim implicada na proteção dos recém-nascidos contra infeções. A IgM, é a imunoglobulina de maior peso molecular e a primeira a ser produzida depois do contato com o novo anticorpo (Arosa et al. 2012)(Wood 2006).

LINFÓCITOS T E O SISTEMA IMUNITÁRIO

Os linfócitos T são assim designados pelo fato da sua maturação ocorrer no timo. Funcionalmente existem três subtipos de linfócitos T (CD3⁺): linfócitos T auxiliares ou T_h – (CD3⁺CD4⁺); linfócitos T citotóxicos ou T_c – (CD3⁺CD8⁺) e linfócitos T reguladores/supressores ou Treg/Ts – (CD4⁺CD25⁺). As células T_c destroem células alvos infetadas através da libertação de determinadas proteínas, segregando maioritariamente IFN- γ , TNF, Linfócitos T - α , enquanto os linfócitos T_h têm um pouco de citotoxicidade e secretam as citocinas IFN- γ , IL4, IL-9, IL-10 TG- β , que atuam em outros leucócitos, como é o caso das células B, macrófagos, eosinófilos ou neutrófilos para eliminar o agente patogénico. As células Tregs possuem funções semelhantes às células Breg por suprirem a função das células T efetoras e conseqüentemente inibirem a secreção das suas citocinas (Becton & Dickinson 2010)(Lee et al. 2010).

Os linfócitos T expressam na sua membrana plasmática um recetor designado de recetor das células T ou TCR (*T cell recetor*). Este recetor confere especificidade de reconhecimento do antigénio pelos linfócitos T; para além desta função, este é responsável pelo sinal 1 intracelular de reconhecimento. O TCR é um heterodímero

constituído por duas cadeias polipeptídicas transmembranares (α e β) com porções extracelulares variáveis e constantes, envolvidas na interação com o complexo MHC (complexo *major* de histocompatibilidade): péptido e por um complexo CD3, responsável pela transmissão de sinal. Apesar do complexo TCR/CD3 ser o principal responsável pelo reconhecimento do antígeno apresentado por moléculas MHC, existem outros recetores presentes na superfície dos linfócitos T *naïve* envolvidos nesse processo de reconhecimento, como os recetores de adesão e sinalização (ativadores e inibidores). No caso dos recetores CD4 e CD8 estes podem ter funções de sinalização e de adesão. A associação destes recetores (CD4 e CD8) com o complexo TCR/CD3 facilita a interação com as moléculas MHCI e MHCII, respetivamente, apresentadas por APCs, e permite a transmissão de sinal intracelular de ativação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, respetivamente.

Este processo de reconhecimento do antígeno pela célula T é muito mais complexo relativamente ao reconhecimento do antígeno por parte dos linfócitos B. Enquanto nos linfócitos B, o antígeno se liga diretamente ao recetor de superfície (uma imunoglobulina), os linfócitos T auxiliares só reconhecem o antígeno quando este está associado a uma molécula classe II do MHC, e cabe às moléculas de classe I o reconhecimento do antígeno pelas células T citotóxicas (Arosa et al. 2012).

Tal como os linfócitos B, os linfócitos T têm de passar por diversos estádios de desenvolvimento em órgãos linfoides secundários antes de seguirem para a corrente sanguínea, para atingirem a maturação necessária para responderem eficientemente a ataques de agentes patogénicos, até atingirem o estado de linfócitos T *naïve* maduros. No primeiro estádio as células progenitoras mais imaturas apresentam à superfície CD34, e têm a capacidade de se diferenciar em linfócitos T, células NK e dendríticas. Estas células sequencialmente aumentam a expressão de CD5 e CD1a, até atingirem o estádio seguinte dos precursores dos linfócitos T (Pre-T) – os timócitos. Estas células são negativas para as moléculas CD4 e CD8, (CD4-CD8-).

Nesta fase perdem a capacidade de originar células NK ou dendríticas. Posteriormente passam a expressar CD4 e perdem a expressão de CD34 e começam a ser sintetizadas as cadeias do recetor TCR; numa fase final começam a expressar CD8 e passam assim a timócitos duplamente positivos (CD4+CD8+).

Por fim, os linfócitos T atingem o estado maduro através dum aumento da síntese do antígeno de ativação inicial (CD69) e da expressão total de TCR, nesta fase surge uma diminuição da expressão de CD1a.

De maneira a garantir uma resposta imunológica eficaz, os linfócitos T *naïve* têm de ser ativados e passar por uma série de fases: fase de ativação, fase de expansão e fase de contração. A fase de ativação é fase inicial em que há reconhecimento por parte dos complexos TCR/CD3 presentes nos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de péptidos antigénicos expostos na superfície das células dendríticas por moléculas MHC classe II e classe I, respetivamente. A interação destes fatores conduz a um primeiro sinal de ativação - sinal 1.

No entanto, a resposta adaptativa só é levada a cabo depois do sinal 2 de ativação, transmitido pelo recetor CD28, presente em todas as células diferenciadas de linfócitos ativados. Esta ativação leva à diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ *naïve* em quatro tipos principais de linfócitos: Th1, Th2, Th17 e Treg. No caso dos linfócitos T CD8⁺ *naïve* também ocorre diferenciação em quatro tipos principais de linfócitos: Tc1, Tc2, Tc17 e Treg CD8⁺ (Tabela 1).

A fase de expansão, é caracterizada pela proliferação celular, produzindo-se uma enorme quantidade de clones, com o objetivo de criar uma população de linfócitos T efetores com funções pró-inflamatórias e/ou citotóxicas capazes de neutralizar e eliminar agressões que originaram a ativação.

Esta fase é despoletada pelo sinal 3 proveniente da interação de citocinas presentes no microambiente e dos recetores ativados dos linfócitos T.

A última fase, a fase de contração, é caracterizada pela apoptose dos linfócitos T, que são eliminados por fagocitose (Becton & Dickinson 2010)(Lee et al. 2010)(Arosa et al. 2012).

Tabela 1- Características dos Linfócitos T ativados, função e citocinas envolvidas (Adaptado de Arosa et al. 2012).

Linfócitos		Função	Citocinas produzidas	Citocinas indutoras
Linfócitos T CD4 ⁺	Th1	Potenciar respostas contra bactérias intracelulares e vírus- regulação de respostas celulares.	IL-2, IFN- γ , TNF- β	IL-12, IFN- γ
	Th2	Inibe a diferenciação em linfócitos Th1; Regulação da resposta mediada por anticorpos produzidos pelos linfócitos B- regulação das respostas humorais.	IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13	IL-4
	Th17	Promovem respostas imunológicas contra bactérias extracelulares e fungos.	IL-17	TGF- β , IL1- β , IL-6 e IL-23
	Treg CD4 ⁺	Elevada capacidade de suprimir respostas mediadas.	IL-10, TGF- β	IL-10, IFN- α , TGF- β
Linfócitos T CD8 ⁺	Tc1	Responsáveis pela eliminação de células-alvo, através da libertação de grânulos lítios e da interação do recetor CD95L com o recetor de morte da célula-alvo; Responsáveis pela amplificação da resposta imunológica.	IFN- γ , TNF- α , perforina e granzima	IFN- γ , IL-12
	Tc2	Propriedades citotóxicas.	IL-4, IL-10, IFN- γ , perforina e granzima	IL-4
	Tc17	Propriedades inflamatórias.	IL-17	IL-1 β , IL-6, IL-23, TGF- β
	Treg CD8 ⁺	Regulação de respostas imunológicas. Ausência de CD28.		IL-10, TGF- β , IL-2, IL-15

CÉLULAS *Natural Killer* E O SISTEMA IMUNITÁRIO

As células *Natural Killer* (NK) foram identificadas em 1975, assim designadas devido à sua capacidade 'natural' de matar outras células sem precisarem de ser ativadas. São uma população heterogénea de linfócitos com aspeto granular que expressam predominantemente o recetor CD8. Ao contrário da maioria dos linfócitos, estas células fazem parte do sistema imunitário inato, uma vez que, não possuem memória. Têm a capacidade de distinguir células neoplásicas, células danificadas ou células infetadas, das células normais. As células NK podem ter a capacidade de promover e controlar doenças

autoimunes. Adicionalmente, o papel destas células pode alterar-se conforme o estado da doença.

As células NK são caracterizadas pela presença de grânulos citoplasmáticos que contêm proteínas citotóxicas como a perforina e granzima. A perforina cria orifícios na membrana da célula-alvo. Estes orifícios quebram a integridade da membrana plasmática e permitem a entrada de umas proteases, as granzimas, que por sua vez, irão ativar potentes proteases intracelulares denominadas caspases, que irão destruir componentes da membrana das mitocôndrias assim como componentes nucleares, provocando assim a morte da célula-alvo por apoptose (Arosa et al. 2012).

O desenvolvimento dos linfócitos NK é ainda pouco conhecido, no entanto, existem estudos que indicam que é na medula óssea que existem as condições necessárias para o seu desenvolvimento. Como já foi referido anteriormente, o progenitor NK é um progenitor T/NK que apresenta à superfície CD34 que possui a capacidade de se diferenciar em linfócito T e NK. Após a expressão de recetores para a citocina IL-15 pelos progenitores T/NK, estes diferenciam-se em progenitores NK. Seguidamente, dá-se a passagem dos progenitores NK para linfócitos NK imaturos, com expressão dos marcadores CD161 e CD2. Porém, estas células ainda não apresentam potencial citotóxico. Posteriormente os linfócitos NK imaturos diferenciam-se, fenotípica e funcionalmente em linfócitos NK maduros, após a expressão de CD56 e com o desenvolvimento do potencial citotóxico. Nesta fase, surge a expressão do complexo CD94/NKG2A, seguidamente à expressão de CD16, culminando com o aparecimento de recetores específicos para as moléculas MHC classe I, os KIR (*Killer cell Immunoglobulin-like Recetor*).

As células NK expressam um grande número de recetores na sua superfície tanto ativadores (por exemplo os recetores de citotoxicidade natural – NCR) como inibidores, cujos ligandos são moléculas MHC classe I clássicos e não clássicos, assim como, ligandos próprios expressos em condições de *stress*. Os NCR (NKp-30, NKp-44 e NKp-46) são responsáveis pela atividade citotóxica natural dos linfócitos NK contra tumores.

Concomitantemente à diversidade de recetores presentes nestas células NK, estas também produzem grandes quantidades de citocinas reguladoras da resposta imunológica. Estas células possuem duas funções principais: atividade citotóxica e

produção de citocinas; estas funções são atribuídas a dois tipos de linfócitos NK com expressão de recetores distintos (CD56 e CD16), respetivamente.

Embora as células NK derivem da mesma linhagem das células T e B, não expressam um recetor específico de antigénios como o recetor das células T ou B. As células têm que adquirir a capacidade de tolerância ao *self* (capacidade de reconhecer as células alvo com baixa expressão de MHC classe I em células hematopoiéticas) e simultaneamente têm de adquirir a capacidade de serem funcionais. Isto é conseguido pelo balanço entre os recetores de ativação e inibição que estas células apresentam, pois durante o início do desenvolvimento dos linfócitos NK, os recetores inibitórios predominam face aos de ativação; para além disto, os ligandos dos recetores de ativação normalmente não são expressos na altura em que os linfócitos NK se desenvolvem, são apenas expressos quando surge uma situação patológica (Arosa et al. 2012). Por este motivo, as células NK são 'educadas' através da deteção de moléculas hospedeiras MHC classe I pelos seus recetores inibitórios. Depois do reconhecimento, os recetores inibitórios interagem com as moléculas MHC classe I que são expressas constitutivamente pela maioria das células saudáveis, em condições normais, no entanto sob condições de *stress* pode haver perda dessas moléculas. Os recetores inibitórios específicos das moléculas MHC classe I providenciam uma forma das células NK permanecerem tolerantes perante células viáveis, e tóxicas para as células que estão submetidas a um *stress* adicional. Os recetores inibitórios servem para moderar a atividade das células NK, através da redução da libertação de citocinas e da citotoxicidade. Em contraste, os recetores ativadores das células NK detetam moléculas que estão sob condições de *stress*.

A atividade e a resposta biológica das células NK são controladas por recetores de superfície inibitórios e ativadores, influenciados por citocinas ativadoras (IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- α) e citocinas inibitórias (IL-10, TGF- β). Estas células têm a capacidade de secretar uma variedade de citocinas, tais como, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-17, IL-22, fatores de crescimento (Erlebacher 2013)(Cheng et al. 2012)(Vivier & Ugolini 2010)(eBioscience n.d.)(Young & Ortaldo 2006).

Entre as células NK maduras existem dois subtipos que são divididos com base na expressão superficial de CD56. As células CD3-CD56dimCD16+cells (CD56dim)

representam a população major de células NK presente no sangue periférico (~90%). Esta subpopulação também apresenta mais recetores KIR inibidores. Enquanto as células CD3⁻CD56^{bright} CD16⁻ (CD56^{bright}) estão em grande parte nos tecidos periféricos, representando apenas ~10% no sangue. Porém, esta subpopulação pode adquirir capacidades citolíticas perante a ativação pela IL-2. A atividade citotóxica quer natural quer dependente de anticorpos ou ADCC está associada ao subtipo CD56^{dim}, embora a secreção de citocinas se acredite que seja unicamente característica das células NK CD56^{bright} (Vacca et al. 2013)(Arosa et al. 2012).

1.3. COMPLEXO MAJOR DE HISTOCOMPATIBILIDADE

O complexo *major* de histocompatibilidade é constituído por proteínas de membrana, tendo uma estrutura trimérica associada de forma não-covalente. Este complexo funciona como um recetor que liga e apresenta péptidos a populações de linfócitos T, através da interação com o recetor TCR presente nestes linfócitos. Esta interação é crucial para o início da ativação do sistema imunológico.

O MHC é talvez das moléculas mais importantes no que toca ao desenvolvimento e funcionamento do sistema imunológico. As moléculas MHC humanas são denominadas antígenos leucocitários humanos ou HLA (*Human Leucocyte Antigen*). Em 1980 foram definidos dois grandes grupos de genes de MHC: os genes MHC classe I e MHC classe II (clássicos e não clássicos).

Os genes de HLA classe I com mais importância na resposta imunológica são aqueles que codificam a cadeia pesada (α) das moléculas clássicas: HLA-A, HLA-B e HLA-C. Os genes de HLA classe II, mais relevantes são aqueles que codificam as cadeias pesadas (α e β) das moléculas clássicas: HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR. Os genes codificantes das cadeias pesadas das moléculas MHC classe I e MHC classe II clássicas têm diversas funcionalidades, codificar: a sequência sinal; domínios extracelulares; a região transmembranar e a cauda citoplasmática.

As moléculas MHC classe I são constituídas por uma cadeia polipeptídica pesada transmembranar de 44 a 49kDa, designada de alfa com três domínios (α_1 , α_2 e α_3), uma cadeia polipeptídica leve de 12kDa, β_2 -microglobulina (β_2m) e um péptido de 8 a 19

aminoácidos. Enquanto as moléculas MHC classe II, são constituídas por duas cadeias polipeptídicas pesadas transmembranares: uma α com dois domínios ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) de 33 a 35kDa, e uma cadeia β com dois domínios ($\beta 1$ e $\beta 2$) de 26 a 28 kDa e um péptido de 12 a 30 aminoácidos.

As moléculas MHC classe I clássicas estão presentes em quase todas as células nucleadas, enquanto as moléculas MHC classe II clássicas, são expressas em linfócitos B, monócitos, macrófagos e células dendríticas. Estas moléculas têm múltiplas funções, tais como, envolvimento em resposta imunológicas contra agressões causadas por agentes patogénicos; células neoplásicas e rejeição de transplantes. Cada uma destas moléculas classe I e classe II, apresentam péptidos de origens diferentes, pois as moléculas classe I associam-se a péptidos de origem geralmente intracelular que são degradados no citoplasma e associam-se no retículo endoplasmático. Enquanto os péptidos apresentados pelas moléculas classe II, têm origem geralmente extracelular e são degradados em endolisossomas e aqui associados.

Relativamente ao modo de apresentação de péptidos, as moléculas MHC classe I ligam-se e expõem péptidos especialmente reconhecidos pelos recetores das moléculas $CD8^+$; este reconhecimento está dependente da interação do recetor do linfócito T $CD8^+$ com o péptido com os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ e da interação do correceptor $CD8$ com o domínio $\alpha 3$. À semelhança da molécula MHC classe I, a molécula MHC classe II também liga e expõe diferentes péptidos que irão ser especificamente reconhecidos, neste caso por recetores nos linfócitos T $CD4^+$. O mecanismo de reconhecimento dos péptidos por parte dos recetores destes linfócitos é dependente da interação do péptido com as regiões $\alpha 1$ e $\beta 1$ e da interação do correceptor $CD4$ com o domínio $\beta 2$ (Figura 5) (Arosa et al. 2012)(Wood 2006).

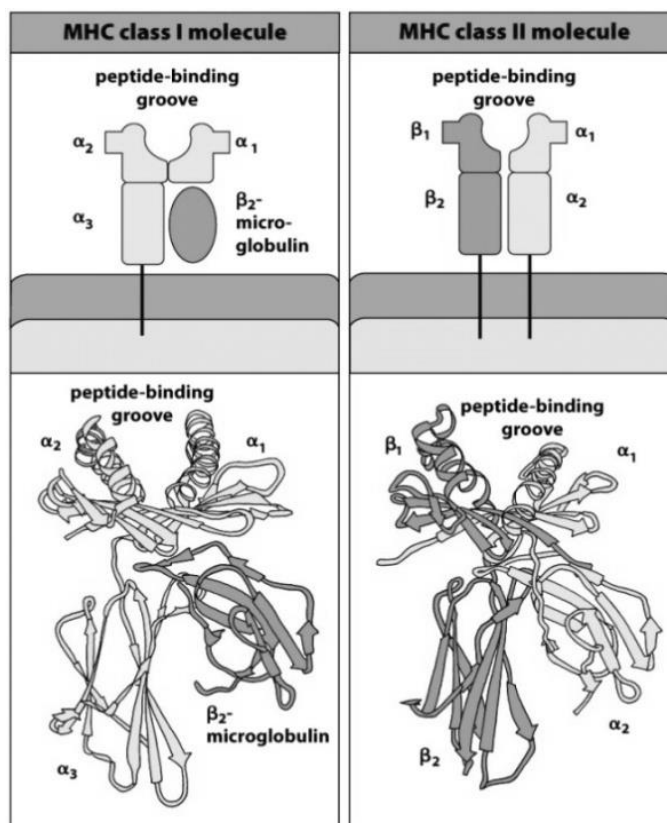


Figura 5- Estruturas das moléculas MHC classe I e II. (in Murphy 2011).

Desta forma, as moléculas MHC classe I e MHC classe II têm como principal função, apresentar os péptidos na superfície das células que serão reconhecidas pelos linfócitos T através do seu recetor TCR, este processo é designado de 'apresentação de antígeno'. Após o reconhecimento dá-se a degradação desse péptido por endocitose das moléculas MHC, designado de 'processamento do antígeno'.

Não obstante, as moléculas classe I também são reconhecidas por um recetor característico das células NK, os recetores KIR. Estes recetores têm grande importância na regulação de atividade citotóxica dos linfócitos NK. Porém, também são expressos pelos linfócitos T (Arosa et al. 2012).

1.4. MEDIADORES SOLÚVEIS DA RESPOSTA IMUNOINFLAMATÓRIA

A interação/atividade das células envolvidas na resposta imunológica (inata e adaptativa) é controlada por mediadores solúveis como as citocinas. As células imunoinflamatórias que produzem citocinas, sofrem elas próprias uma influência autócrina destas moléculas.

As citocinas são pequenas proteínas, normalmente com menos de 20kDa, que medeiam a sinalização e a comunicação celular, regulam também a ativação, diferenciação, crescimento, morte e funções efetoras de diferentes tipos de células. Desta forma, estão envolvidas praticamente em todas as respostas inflamatórias, desde a sua indução (pró-inflamatórias), à sua inibição (antinflamatórias). Neste largo campo de ação inclui-se a diferenciação de células na medula óssea, apresentação de antígenos, recrutamento e ativação celular, expressão de moléculas de adesão, para além da febre e ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Contudo, estas citocinas só atuam se a sua expressão for induzida pela ligação do agente patogénico a recetores PRR, pois estas não são expressas constitucionalmente.

As citocinas representam um grande grupo de moléculas, composto pelas principais famílias de citocinas: IL – Interleucinas (citocinas produzidas por um leucócito que atua noutro leucócito); IFN – Interferões (citocinas que inibem a replicação viral em células infetadas ou ligam-se a recetores de células tornando-as resistentes a infeções virais); TNF – Fator de necrose tumoral (citocinas que ativam macrófagos); quimiocinas (citocinas com propriedades quimiotáticas, em que controlam a migração de células atraindo-as para determinados locais); GF – fatores de crescimento (citocinas que promovem o crescimento de células); entre outras (Arosa et al. 2012)(Wood 2006).

De seguida descrever-se-ão algumas das citocinas mais citadas no estudo da inflamação durante a gravidez.

- O TNF é uma citocina pró-inflamatória com grande relevância na resposta inflamatória, por interferir na proliferação celular, diferenciação e apoptose. Existem células da imunidade inata que possuem recetores TLR, que reconhecem o lipopolissacarídeo (LPS), que está presente na membrana externa da parede celular das bactérias *gram* negativas. Este reconhecimento leva à indução da produção da citocina TNF, que é o principal mediador deste tipo de resposta.
- A família da IL-6 tem uma estrutura helicoidal e inclui a IL-6, IL-11, IL-31, IL-31RA, *leucemia inhibitory fator* (LIF), *ciliary neurotrophic fator* (CNTF) e a oncostatina M (OSM). A IL-6 é uma citocina multifuncional com um papel muito importante na resposta inflamatória, respostas imunológica e hematopoiese. Apresenta características pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, e é produzida por diversas

células em resposta a diversos estímulos (IL-1, IL-17, TNF- α) durante a resposta inflamatória. Esta citocina está implicada também na diferenciação de células de memória Th2 e inibe a supressão induzida por células T reguladoras (Arosa et al. 2012)(Hill 2010).

- A família da Interleucina -1 (IL -1 α , IL -1 β , o recetor antagonista da IL -1 [IL -1R α], a IL-18 e a IL-33 tem, a nível da resposta inflamatória, uma ação privilegiada, pelos seus efeitos claramente pró-inflamatórios, mas também anti-inflamatórios. Esta citocina interage a nível do sistema nervoso central, contribuindo para os sintomas da resposta de fase aguda da inflamação, está também envolvida na síntese e atividade das metaloproteinases da matriz e outras enzimas envolvidas na destruição da cartilagem na artrite reumatoide e osteoartrite (Arosa et al. 2012)(Hill 2010).
- A IL-4 é produzida maioritariamente por linfócitos Th2 e regula a expressão de recetores na célula B, melhora a capacidade de apresentação de antígenos pelas moléculas MHC classe II e está envolvida em respostas inflamatórias alérgicas e no prolongamento da vida dos linfócitos T e B em cultura (Arosa et al. 2012)(Hill 2010).
- A IL-10 é uma citocina produzida por diversas células (monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e células NK), tem características imunossupressoras ou de bloqueio, através da inibição da resposta pró-inflamatória por intermédio de células Treg. Controla assim as respostas imunológicas a agentes infecciosos, bem como a manutenção de tolerância aos antígenos do self, (previne o desenvolvimento de doenças autoimunes). As suas características imunossupressoras resultam da diminuição da expressão das moléculas MHC classe II nas células APC e da diminuição da síntese de citocinas pró-inflamatórias, entre outras (Arosa et al. 2012)(Hill 2010).
- O TGF- β (fator transformador do crescimento) pertence a uma família composta por diversos polipéptidos, capazes de regular diversos processos celulares incluindo a proliferação, diferenciação, adesão e morte; têm também um papel importante na homeostase e reparação de tecidos. O TGF- β tem também como função inibir a proliferação e diferenciação de linfócitos CD8 e ativação de outros leucócitos CD4 (Huber et al. 2002)(Massagué 1998)(Hill 2010).

As citocinas podem atuar de três formas distintas: ação autócrina, em que estas se ligam a recetores da célula que a produz; ação parácrina, em que as citocinas se ligam a recetores de células próximas da célula produtora dessas mesmas citocinas e ação endócrina, em que estas atuam num local distante ao seu local de produção.

No organismo as células nunca são expostas a apenas uma única citocina, elas interagem com um número diverso de citocinas, provavelmente produzidas por diversas células. Diferentes citocinas atuam cooperativamente para promover respostas sinérgicas ou podem atuar antagonicamente o que resulta numa inibição recíproca, como é o caso da ação das citocinas pró-inflamatórias que são atenuadas pela ação de citocinas com características anti-inflamatórias. É esta combinação de citocinas às quais as células estão expostas, que determinam o seu comportamento (Wood 2006)(Arosa et al. 2012).

2. RESPOSTA IMUNOINFLAMATÓRIA NA GRAVIDEZ E PARTO

2.1. IMUNOFISIOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO

A reprodução humana normal pressupõe a interação de uma diversidade de hormonas e de órgãos, controlada pelo hipotálamo. Este segrega hormonas ou outros fatores que estimulam a hipófise, a libertar outras hormonas. Por exemplo, as hormonas folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH) atuam nos ovários, a oxitocina atua no útero e nas glândulas mamárias da mulher. Praticamente todas as hormonas são libertadas de forma pulsátil, fato evidenciado pelas flutuações da sua concentração no sangue ao longo do tempo (Berkow n.d.).

A fisiologia do sistema reprodutor feminino assenta num conjunto de fenómenos cíclicos, o ciclo menstrual. Este divide-se em três fases: folicular, ovulatória e luteínica, com base nas alterações ováricas e na produção hormonal característica de cada fase.

Ao longo destas fases os níveis de estrogénios aumentam progressivamente até à secreção da hormona LH pela glândula pituitária que induz a ovulação e a estimulação da produção de progesterona. Se não houver fecundação os valores de estrogénios diminuem abruptamente, o que resulta na diminuição dos níveis de progesterona, iniciando-se um novo ciclo menstrual (Berkow n.d.)(Sheely 2001)(O'Reilly et al. 2008)(Zugaib 2008). Se houver fecundação, forma-se o embrião, que se vai implantar na parede uterina. Sob a ação da hormona gonadotropina (GnRH) coriónica humana, produzida pelo corpo amarelo, ocorre o desenvolvimento do feto até que este possa produzir as suas próprias hormonas (Berkow n.d.)(Sheely 2001).

Adicionalmente a todo este mecanismo também existem variações ao nível das células do sistema imunitário e dos seus mediadores (Figura 6). Alguns autores verificaram uma redução de linfócitos CD4⁺ na fase luteínica comparativamente à fase folicular; variações na presença das células NK na fase luteínica e folicular; alteração na expressão das células B devido à presença de anticorpos circulantes, contudo existem poucos dados relativamente à influência destas células no ciclo menstrual; e uma expansão dos

linfócitos Treg durante a fase folicular até à fase ovulatória, com diminuição na fase luteínica. Ao nível das citocinas parece haver uma indução da produção de citocinas Th2 e inibição de citocinas Th1 por parte da progesterona. Todavia, concentrações baixas de estrogénios parecem aumentar as respostas de citocinas Th1. Na fase luteínica também se verifica um aumento da produção de IL-4, induzida pela progesterona (Oertelt-Prigione 2012).

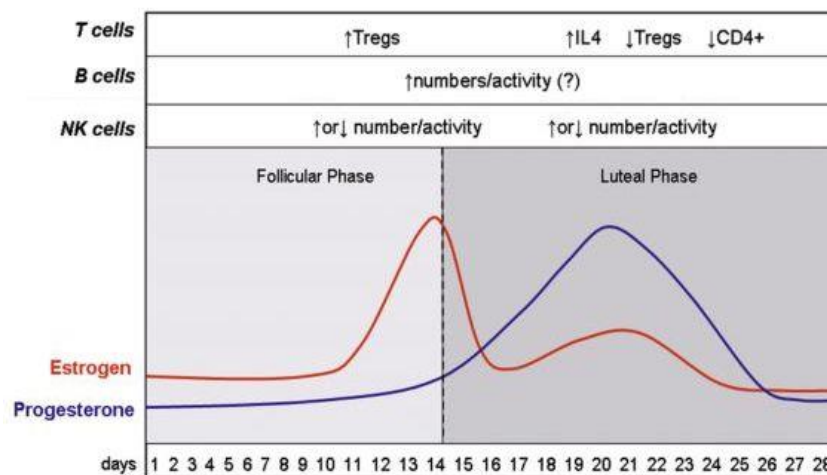


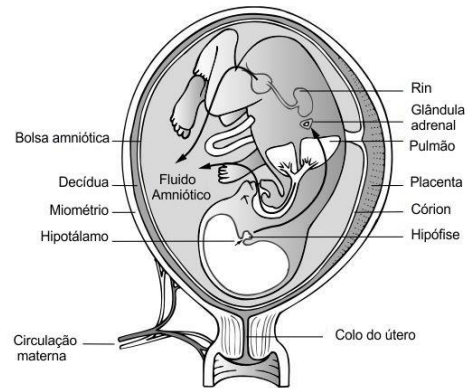
Figura 6- Imunomodulação durante o ciclo menstrual. (Adaptado de Oertelt-Prigione 2012).

2.2. GRAVIDEZ

Ao longo de 9 meses de gravidez (três trimestres), o embrião passa por três períodos distintos do seu desenvolvimento (Sheely 2001). Numa fase inicial do desenvolvimento embrionário, as células sanguíneas emergem em primeiro lugar no saco vitelino extraembrionário. Após o início da circulação sanguínea, as células estaminais hematopoiéticas colonizam o fígado fetal, que se torna o sítio predominante de formação das células hematopoiéticas durante a maior parte do desenvolvimento embrionário. Posteriormente há colonização do baço e da medula óssea fetais por células provenientes do fígado fetal, torna-se assim a medula óssea o principal produtor de células hematopoiéticas na altura do nascimento (Arosa et al. 2012).

INTERFACE FETO-MATERNA

O sucesso reprodutivo em mamíferos placentários depende da interação de dois órgãos distintos: a placenta e o útero. A placenta tem como função principal permitir a permuta de nutrientes, gases e metabolitos entre o sangue materno e o sangue fetal (com vasos sanguíneos fisicamente separados), ligados ao feto através do cordão umbilical. O útero fornece veias e um substrato celular (decídua) que permite à placenta utilizar o fluxo sanguíneo materno, garantindo uma gestação sustentável (Erlebacher 2013).



A interface feto-materna tem a particularidade de possuir células do sistema imunitário que enriquecem a decídua. Estas células, para além de terem funções altamente especializadas no desenvolvimento e funções da placenta também ajudam o sistema imunológico da mãe a distinguir entre o que é próprio (*self*) do não próprio (*non-self*), tolerando assim a unidade fetoplacentar evitando a rejeição. Além disso, a presença destas células na decídua é fundamental para combater infeções. Estudos demonstraram que aproximadamente 70% dos leucócitos presentes na decídua no primeiro trimestre são maioritariamente células NK e cerca de 20% macrófagos. A proporção de células T é mais variável (aproximadamente 10 a 20%), e relativamente às células dendríticas, B e T-*Natural Killer* (NKT), estas são muito mais raras (Erlebacher 2013).

No decurso da gravidez o miométrio passa por um processo de relaxamento/quiescência, aumentando de tamanho para acomodar o feto em desenvolvimento até atingir um estado contrátil, rítmico no sentido de expulsão do feto, culminando com o trabalho de parto (Mesiano et al. 2011)(Christiansen 2013)(Arck & Hecher 2013).

ETAPAS DO PARTO

Uma gravidez normal passa por quatro fases distintas: quiescência uterina, ativação do miométrio, estimulação do miométrio e dequitação, resumidamente representadas na Figura 7.

Mais de 95% da gestação é passada na fase 0 - Quiescência uterina. Durante esta fase, a contração do miométrio é inibida por diversas substâncias biológicas, incluindo a progesterona. Estas substâncias têm diferentes mecanismos, mas em geral aumentam os níveis de nucleótidos cíclicos (adenosina- 3',5'-monofosfato cíclico - [cAMP]), que em troca inibem a libertação de cálcio (Ca^{2+}) das reservas intracelulares ou reduzem a atividade da proteína cinase das cadeias leves da miosina (MLCK). Sequencialmente, dá-se a ativação do miométrio, característica da fase 1, é caracterizada pelo aumento da expressão de, (1) proteínas associadas à contração (CAPs), (2) *gap junctions* (as do miométrio são constituídas principalmente pela proteína, conexina 43 - CX-43), (3) recetores de oxitocina, (4) prostaglandinas e (5) recetores de estrogénios na placenta.

Uma vez, atingida a maturação/crescimento fetal, o hipotálamo fetal e/ou a placenta aumentam o nível de secreção da hormona libertadora de corticotrofina (CRH) que desencadeia a compressão/contração das paredes uterinas. A CRH por sua vez, vai estimular a expressão da hormona adrenocorticotrófica (ACTH) pela hipófise fetal e a produção de cortisol e androgénios pelas glândulas suprarrenais, todos estes estímulos propiciam a estimulação do miométrio (fase 2). A produção de CRH pela placenta leva a um bloqueio da produção de progesterona e ativação dos estrogénios pelo aumento dos níveis de expressão dos seus recetores. O aumento dos níveis de CRH ativa também, prostaglandinas e oxitocinas, que por sua vez estimulam a produção de Ca^{2+} intracelular. Este aumento dos níveis de Ca^{2+} leva a ativação da calmodulina, que subsequentemente induz mudanças conformacionais na MLCK, permitindo que esta fosforile a miosina e se dê início à junção da actina com a miosina, processo este que desencadeia as contrações uterinas características desta fase. Para além destes processos, as prostaglandinas também favorecem a produção de metaloproteínases da matriz (MMP), envolvidas no amadurecimento cervical e da decídua e a ativação das membranas fetais, através da degradação da matriz extracelular de proteínas. Por fim, dá-se a separação da placenta e contrações do útero (fase 3, denominada de dequitação) para que haja oclusão dos

vasos sanguíneos do miométrio cessando assim a hemorragia e diminuição do tamanho do útero (Behrman & Butler 2006).

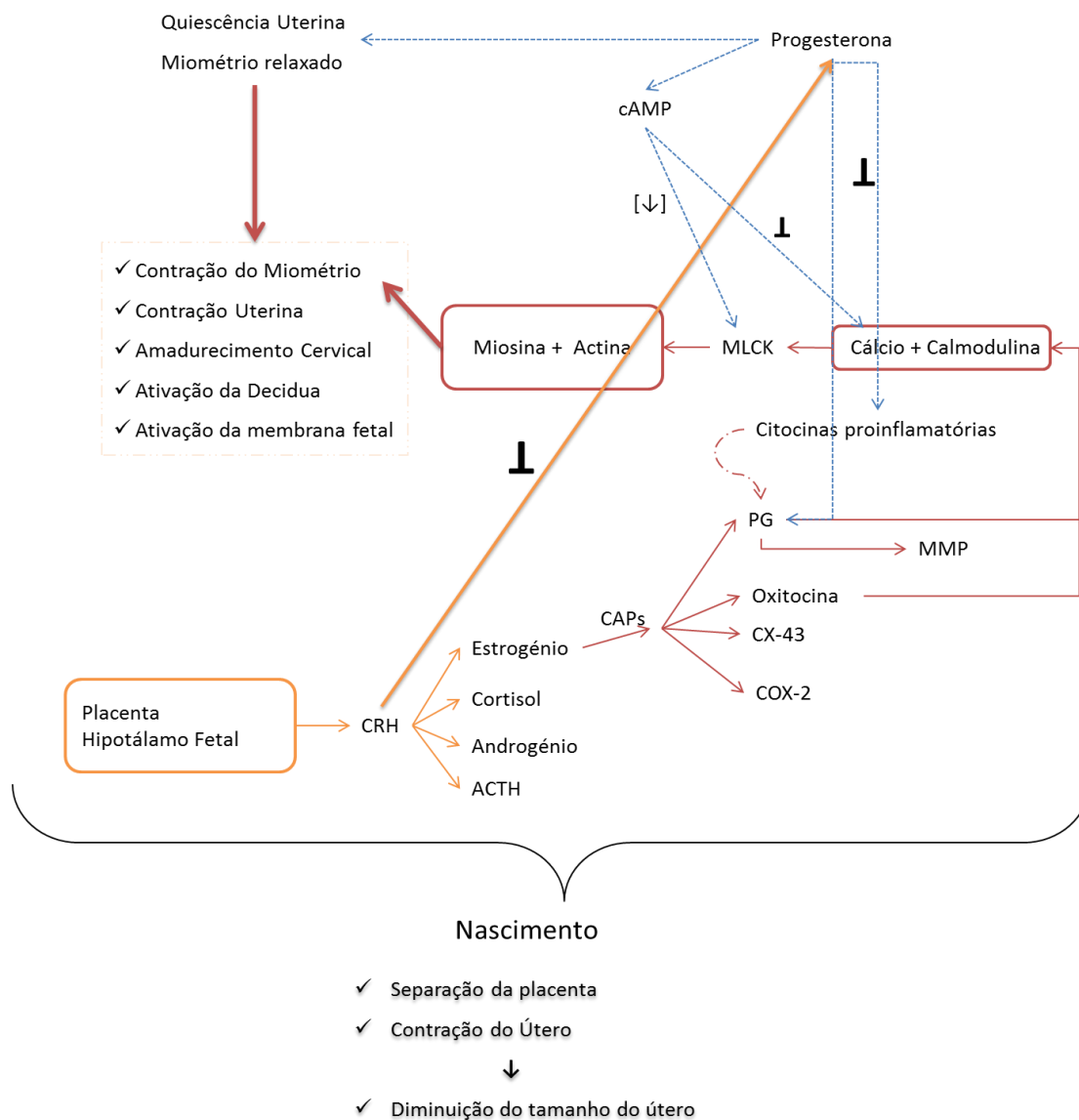


Figura 7- Vias envolvidas durante a gravidez e parto. (Baseado em Behrman&Butler 2006).

Todo este processo é controlado por uma complexa interação de hormonas entre múltiplos sistemas maternos e fetais, como se pôde verificar, sendo centrais para o normal processamento do trabalho de parto.

2.3. MECANISMOS DE MANUTENÇÃO DA QUIESCÊNCIA UTERINA DURANTE A GRAVIDEZ

Todo o processo do desencadear do trabalho de parto, caracterizado pelo amadurecimento cervical, rotura de membranas e contrações uterinas, com subsequente expulsão do feto é atualmente aceite como um processo inflamatório (Prins et al. 2012)(Hemberger 2013)(Kobayashi 2012). Esta explicação assenta em dados científicos como o aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias e células do sistema imunitário, em diversos componentes do sistema reprodutivo: líquido amniótico, miométrio, cérvix e membranas fetais (Byrns 2013)(Mendelson 2009). Por sua vez, a quiescência uterina durante a maior parte da gravidez parece ser mantida por ações anti-inflamatórias, com a progesterona através dos seus recetores e pela indução de citocinas igualmente anti-inflamatórias (Hemberger 2013)(Norman et al. 2007).

CITOCINAS E O SEU PAPEL NA MANUTENÇÃO/ATIVAÇÃO DA GRAVIDEZ

Vários estudos têm evidenciado o papel de citocinas anti-inflamatórias (IL-10, TGF- β , IL-4, entre outras) em gravidezes de termo. Estas citocinas imunossupressoras parecem desempenhar um papel complexo na gestação após a implantação, visando a produção de fatores de crescimento com ação trófica na placenta. Supõe-se que, o TGF- β produzido pelas células T (maioritariamente pelas Treg) poderá ajudar a atenuar qualquer ativação das células NK e a neutralização da produção de TNF- α pelas células T, durante intercorrências potencialmente lesivas para a gravidez, como a exposição intrauterina aos LPS's ou aos interferões. Relativamente à IL-10, verifica-se uma redução na sua produção ao longo da gravidez, o que parece favorecer o estado inflamatório dando início do parto (Romero & Espinoza 2006)(Hill 2010). Assim, todas essas citocinas têm um papel fundamental na limitação de qualquer resposta de rejeição imunológica ao feto, podendo ser assim consideradas citocinas principais na manutenção da gravidez (Roitt 2001)(Delves et al. 2013)(Arababadi & Aminzadeh 2012).

As citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-1 em contra partida, têm demonstrado um papel fulcral no mecanismo de inflamação/indução do parto, uma vez que, parecem estar envolvidas no enfraquecimento das membranas fetais e consequente rotura prematura de membranas e aumento de contrações uterinas, através da capacidade de

estimular a produção de prostaglandinas, que por sua vez promovem a regulação e a ativação de MMP envolvidas na morte celular programada, apoptose (Romero & Espinoza 2006)(Kobayashi 2012)(Peltier 2003). Adicionalmente, a existência de níveis elevados destas citocinas e particularmente do TNF- α parecem pôr em risco a gravidez (Rolle et al. 2013).

Desta forma, pode-se afirmar que a presença de citocinas imunossupressoras durante a gravidez parece estar relacionada com a sobrevivência fetal, o que poderá contribuir para uma gravidez de sucesso (Ayatollahi et al. 2005).

AS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS MAJOR E O SEU PAPEL NA MANUTENÇÃO/ATIVAÇÃO DA GRAVIDEZ

Células T

Existem estudos relativos aos níveis de produção de citocinas Th1/Th2 em que se verifica um aumento desta relação em mulheres com alterações gestacionais relativamente a mulheres férteis com um padrão gestacional normal (Piccinni 2006)(Lee et al. 2010). Para além desta evidência, o mesmo autor demonstrou haver inversão da produção de Th1 para Th2 na interface fetomaterna perante grandes concentrações de progesterona (Piccinni 2006). Este fenómeno é referido como o *shift* Th1/Th2 em que a diminuição da expressão de Th1 e o aumento de Th2 está associado com a manutenção da gravidez.

Relativamente às células Treg, estas parecem favorecer o desenvolvimento fetal através da supressão de células imunitárias (APCs, CD4⁺, CD8⁺). Considera-se que os níveis destas células aumentam na gravidez, entram em declínio perto do parto e diminuem no período pós-parto (Kobayashi 2012)(Guerin et al. 2009)(Robertson & Guerin 2009).

Células B

O papel destas células no estabelecimento e/ou manutenção da gravidez é ainda desconhecido. Estudos realizados por Rolleet, observaram percentagens de células Breg (CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺) significativamente altas em mulheres grávidas comparativamente a mulheres não-grávidas. Em mulheres com abortos recorrentes, os níveis destas células era significativamente baixo comparativamente com mulheres que tiveram uma gravidez

normal durante o primeiro trimestre. Este trabalho realizado por Rollet, sugere que as células Breg poderão estar envolvidas na tolerância imunológica durante a gravidez, através da produção de IL-10, tal como as Treg, através da inibição da secreção de TNF- α (Rolle et al. 2013).

Células NK

Existem dados bibliográficos, que evidenciam a presença de células NK no endométrio de mulheres não grávidas (e a sua proporção varia durante o ciclo menstrual) e na decídua de mulheres grávidas (diminuindo progressivamente durante a gravidez). Adicionalmente, também se verificam concentrações mais elevadas de células NK em mulheres com abortos recorrentes e/ou com múltiplos insucessos de implantação, relativamente a mulheres normais férteis (Lee et al. 2010)(Vacca et al. 2013).

3. PROGESTERONA COMO HORMONA IMUNOMODELADORA DA GRAVIDEZ E PARTO

Um dos maiores desafios no estudo dos mecanismos que estão na base da manutenção da gravidez e início do trabalho de parto, é a divergência destes mecanismos bioquímicos entre diferentes espécies, o que dificulta o desenvolvimento de bons modelos animais úteis na compreensão desta temática. Um exemplo concreto centra-se na placenta, que tem um papel completamente diferente na reprodução humana comparativamente a outros animais. Em humanos e primatas, existem dois locais de produção de progesterona sendo, inicialmente produzida pelo corpo lúteo e posteriormente pela placenta, passando esta a ser o órgão principal de síntese desta hormona esteróide.

Os Humanos e primatas, também são a única espécie que expressa a hormona libertadora de corticotrofina (CRH) na placenta, que é crucial na produção de progesterona e no tempo de duração de uma gestação. Por outro lado, sabe-se que existe uma variação nos padrões de síntese da CRH e no seu papel, uma vez que, em ensaios laboratoriais, os níveis de CRH no pós-parto decrescem, enquanto que aumentam exponencialmente durante o terceiro trimestre, permitindo e determinando a duração da gestação.

Ainda assim, sabe-se o quanto são importantes as hormonas esteróides, nomeadamente a progesterona, ao nível da regulação de vários processos no decorrer do parto, como já foi evidenciado (Byrns 2013)(Behrman & Butler 2006)(Chien et al. 2009).

Progesterona

A progesterona (P4), uma hormona descoberta em 1934, foi assim designada pelo seu papel como hormona esteróide progestacional e por ser responsável por vários processos que ajudam na manutenção da gravidez. A progesterona exerce um papel fulcral nos processos do sistema reprodutor feminino, nomeadamente no controlo da ovulação, desenvolvimento e função normal do útero e glândulas mamárias, e em algumas espécies é também responsável por promover a resposta sexual. Adicionalmente, a progesterona

pode ter efeitos sobre uma grande diversidade de sistemas fisiológicos tão diversos como o sistema nervoso central, cardiovascular e imunológico.

Ao longo da gravidez, a progesterona tem como papel principal: inibir o sistema Imunitário através do bloqueio da proliferação de linfócitos, para que haja tolerância fetal; modular a produção de anticorpos; reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta a produtos bacterianos e; alterar a secreção de citocinas por clones de células T, e favorecer a produção de IL-10,(Peltier 2003) até que a gravidez atinja o termo. Esta imunossupressão assegura uma gravidez a termo (Byrns 2013)(Mesiano et al. 2011)(Antonín Pařízek et al. 2013).

3.1. MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA SINALIZAÇÃO DA PROGESTERONA DURANTE A GRAVIDEZ

Como referido anteriormente, a progesterona tem um papel fulcral na manutenção da gravidez humana, sendo a sua atividade biológica mediada por uma cascata de eventos induzidos pela sua ligação ao seu recetor (Nickisch et al. 2013).

Estudos recentes mostram que, a progesterona não só exerce efeitos genomicamente através da sua ligação a recetores nucleares da progesterona (nPR), mas também exerce os seus efeitos por vias não genómicas, através da sua ligação a recetores membranares, que parecem encontrar-se na superfície celular (mPRs – *membranar progesterone receptors*), (Figura 8) (Zachariades et al. 2012)(Lai et al. 2012). Este fato surge, uma vez que muitos efeitos das hormonas esteroides, e nomeadamente da progesterona, não conseguem ser explicados pelo mecanismo genómico clássico que envolve a síntese de mRNA e proteínas, que é relativamente lento, com duração normalmente horas ou dias. Estudos verificaram que as hormonas esteroides iniciam ações rápidas através da ativação de vias sinalizadores intracelulares, que ocorrem em segundos. Existem evidências de que estas hormonas esteroides são internalizadas através da ligação a recetores específicos na membrana plasmática das células alvo, internalização esta caracterizada por ser uma via de ação rápida e ser iniciada na proximidade de, ou na

superfície celular, observando-se também uma rápida difusão para o interior das células (Mesiano et al. 2011)(Thomas 2008)(Ndiaye et al. 2012). No entanto, os mecanismos que levam à ligação da progesterona ao seu recetor membranar e subsequente internalização não são ainda bem conhecidos.

Os recetores nucleares estão envolvidos na regulação de diversas funções fisiológicas, nomeadamente: desenvolvimento embrionário, diferenciação celular e homeostase fisiológica. A transcrição do gene nPR é controlada por dois promotores que produzem duas isoformas *major*, PR-A (83kDa) e PR-B (99kDa). No entanto, cada uma destas isoformas possui diferentes funções ao longo da gravidez, a isoforma PR-B está implicada na ativação da produção de progesterona, que conduz à quiescência uterina, enquanto a isoforma PR-A atua como supressora da função da isoforma PR-B. Para além destas evidências, no final da gravidez foi detetada uma sobre expressão da isoforma PR-A, interligando-a com o bloqueio da produção de progesterona e consequentemente com a ativação de contrações uterinas.

Aparentemente a via genómica está envolvida também em duas outras vias intracelulares, uma direta e outra indireta. Além deste fator julga-se que haja um *crossstalk* entre a via genómica e a via não-genómica, e este duplo mecanismo poderá estar na base da ação da progesterona como promotor da quiescência uterina, no entanto, como referido anteriormente, todos estes novos conceitos necessitam de mais investigação criando um janela para o conhecimento (Byrns 2013)(Mesiano et al. 2011)(Behrman & Butler 2006)(Mendelson 2009)(Fernandes et al. 2005) .

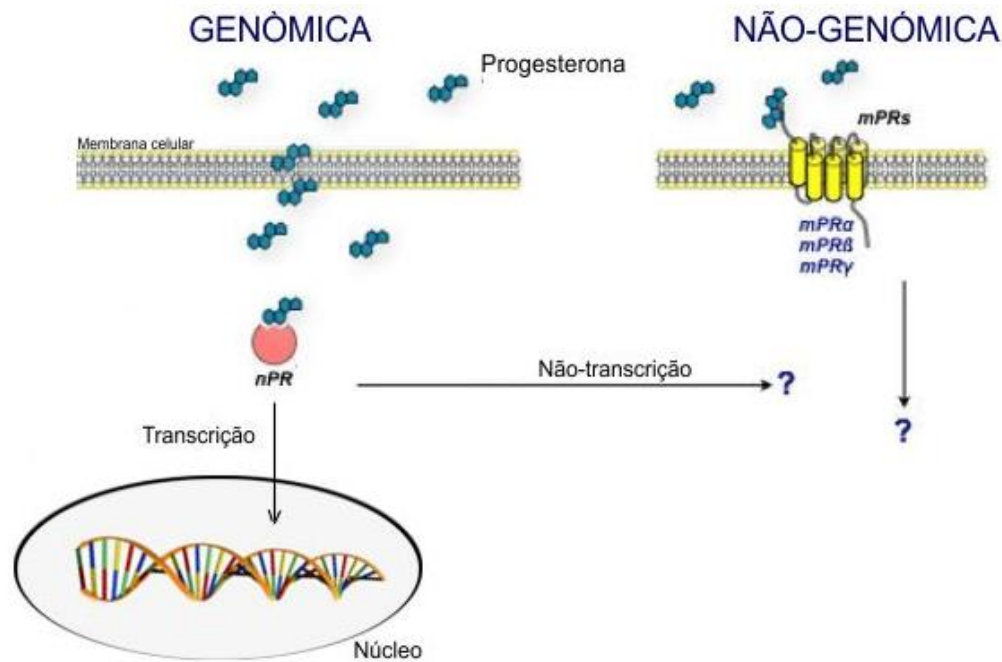


Figura 8- Vias de sinalização de ação da progesterona e receptores da progesterona envolvidos (PRs); via genômica e não-genômica. (Adaptado de Mesiano et al. 2011).

O recetor membranar da progesterona é o sétimo membro da família dos recetores transmembranares adipo Q (PAQR- *transmembrane progesterone adipo Q receptor*) que são estruturalmente independentes dos nPR e são filogenicamente distintos da superfamília dos recetores acoplados às proteínas G (GPCRs- *G protein-coupled receptors*) (Zachariades et al. 2012). Têm sido identificados 3 recetores membranares de progestinas (mPR- α , β e γ ; também denominados de PAQRVII, PAQRVIII e PAQRV, respetivamente) em diversas espécies, incluindo no homem. Estes recetores têm aproximadamente 40 kDa de peso molecular (UniProtKB n.d.) e a sua expressão é altamente tecido-específica, sendo a isoforma mPR- α predominante em tecidos do sistema reprodutor, mPR- β em tecido neural e mPR- γ no trato intestinal (Fernandes et al. 2005)(Dosiou & Hamilton 2008).

A sinalização dos PR's (*progesterone receptor's*) pode ser regulada através de dois mecanismos gerais, (Figura 9): (A) Variações na concentração do ligando, progesterona e (B) Alterações na resposta do próprio recetor membranar PR.

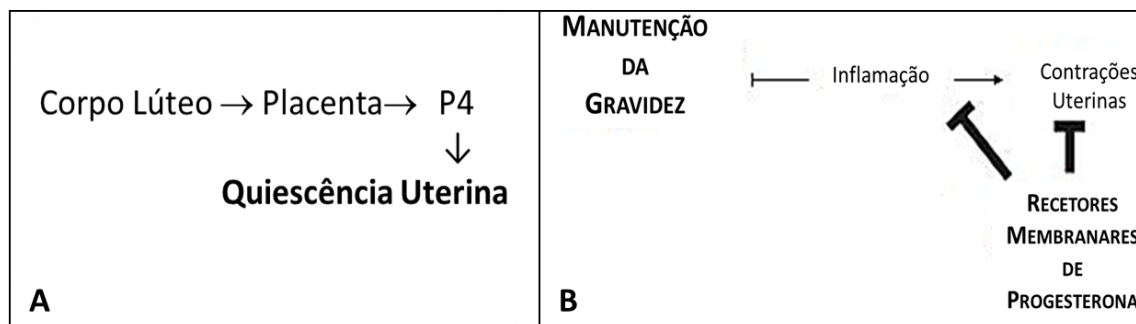


Figura 9- Mecanismos de regulação da sinalização dos receptores da progesterona. (A) variações na concentração do ligando e (B) alterações na resposta do recetor membranar PR. (Adaptado de Byrns,2013). *Abreviaturas:* P4, progesterona.

Cada um destes mecanismos A e B, ainda é regulado por dois processos distintos que ocorrem nos processos fisiológicos e obviamente ao longo da gravidez, a regulação endócrina e a regulação parácrina ou autócrina. Na via endócrina a concentração da progesterona é regulada a nível sistémico, pois inicialmente é produzida pelo corpo lúteo estimulado pela LH, ao longo de 4-5 semanas de gravidez, e posteriormente há um declínio na produção desta hormona passando a ser produzida pela placenta. Esta transição permite que os níveis se mantenham constantes ao longo da gravidez e assim promovam a quiescência uterina. Na regulação parácrina ou autócrina, a concentração de progesterona é regulada localmente, através da presença de enzimas metabólicas, nos tecidos alvo, as quais controlam os níveis de ligando progesterona, disponível no local de ação (Byrns 2013).

No final da gravidez, na maioria dos mamíferos, os níveis de progesterona decrescem e os níveis de estrogénios aumentam; no entanto, na mulher os níveis de progesterona e estrogénios aumentam continuamente ao longo da gravidez até à separação da placenta, no trabalho de parto. Os estudos de Behrman e Butler sugerem que o bloqueio da progesterona gravidez pode ocorrer devido a alterações nos níveis do recetor (Behrman & Butler 2006) e, para além desta alteração, estudos realizados por Fernandes (Fernandes et al. 2005) referem que há uma elevada produção de progesterona nos ovários e placenta humanos, induzindo a presença de diversos locais membranares de ligação da progesterona nas células constituintes destes órgãos. Além disso, existe um predomínio de mPR- α na placenta e membranas fetais relativamente aos recetores mPR- β ou mPR- γ , sublinhando assim a importância desta isoforma nos tecidos gestacionais, paralelamente o mesmo autor, através de técnicas de imunohistoquímica observou a expressão da

proteína mPR- α no endométrio humano durante a fase secretora do ciclo menstrual, evidenciando assim a existência desse recetor em tecidos reprodutores femininos (Fernandes et al. 2005).

A descoberta de três recetores membranares (mPR- β , mPR- γ e mPR- α), veio mostrar que progesterona não só exerce efeitos genomicamente através da sua ligação a recetores nucleares da progesterona, mas também exerce os seus efeitos por vias não genómicas, através da sua ligação a recetores membranares, que parecem encontrar-se na superfície celular (Thomas 2008)(Chien et al. 2009). Além disso, verificaram que existe um predomínio da isoforma mPR- α no sistema reprodutor feminino relativamente aos recetores mPR- β ou mPR- γ , sublinhando assim a importância desta isoforma nos tecidos gestacionais(Fernandes et al. 2005)(Dosiou & Hamilton 2008).

No entanto, não existem estudos relativamente à expressão deste recetor, mPR- α nas células do sistema imunológico em sangue periférico.

Ainda assim, uma vez que o bloqueio da progesterona na gravidez pode ocorrer devido a alterações nos níveis do seu recetor (Behrman & Butler 2006)(Ndiaye et al. 2012)(Zachariades et al. 2012), é vantajoso analisar as alterações do recetor mPR- α ao longo da gravidez nas populações linfocitárias do sistema imunológico, pois ainda não existem estudos que relacionem a expressão do recetor membranares nas populações linfocitárias e a gravidez, que poderá estar na base da percepção da transição do estado anti-inflamatório no início da gravidez, para o estado pro-inflamatório, no final da gravidez.

Objetivos

Este estudo pretende assim clarificar os fatores que estão envolvidos na manutenção da gravidez e também no desencadear do trabalho de parto, e avaliar a ação molecular da progesterona em mulheres grávidas.

É também de sublinhar a necessidade do desenvolvimento de novos procedimentos terapêuticos para a manutenção da gravidez e para o tratamento e compreensão dos mecanismos envolvidos nas diversas patologias a nível clínico, uma vez que, as estratégias para a prevenção ou tratamento de intercorrências da gravidez não se têm revelado eficazes (Christiansen 2013)(Norman et al. 2007).

Tem-se assim, como objetivos principais: (1) caracterizar fenotipicamente as populações linfocitárias major na gravidez normal no segundo, terceiro trimestre e parto, através da avaliação da variação destas populações ao longo da gravidez e dia do parto e (2) avaliar a expressão do recetor mPR- α nestas populações linfocitárias e estudar a sua variação ao longo da gravidez e dia do parto.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritas as técnicas da área de imunologia laboratorial utilizadas neste trabalho para isolar e estudar os diferentes tipos celulares que constituem o sistema imunológico, nomeadamente os linfócitos (T, B e NK), e à caracterização da expressão do recetor membranar da progesterona (mPR- α) nestas diferentes populações. Numa segunda fase deste trabalho, foram isoladas *PBMCs* (células mononucleares de sangue periférico) com o propósito de perceber o seu comportamento *in vitro* sob a influência de estímulos com progestativos (progesterona, agonista da progesterona e antagonista da progesterona), e por fim analisar as populações *major* linfocitárias, ou seja, imunofenotipagem destas diferentes populações e caracterizar a expressão do recetor membranar da progesterona (mPR- α) após os diferentes estímulos.

Ambos os estudos envolvem o grupo de interesse de grávidas saudáveis e um grupo controlo de dadoras saudáveis em idade reprodutiva (não-grávidas). No entanto o grupo controlo não sofre avaliação ao longo de trimestres ao contrário do grupo de grávidas.

Material Biológico e população de estudo:

Para o desenvolvimento deste projeto foram realizadas colheitas de sangue periférico por punção venosa para um tubo com heparina de sódio, num grupo controlo de mulheres saudáveis em idade reprodutiva (N=12) e num grupo de grávidas normais saudáveis (N=13), sem intercorrências na gravidez nem hábitos nefastos, durante 3 fases da gestação: segundo trimestre (20 a 22 semanas de gestação), terceiro trimestre (32 a 34 semanas de gestação) e dia do trabalho de parto, baseando o cálculo da idade gestacional pela data da última menstruação. Todas as colheitas de sangue foram realizadas após consentimento informado e o protocolo de colheita foi aprovado pelo Comité de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

IMUNOFENOTIPAGEM DAS POPULAÇÕES MAJOR LINFOCITÁRIAS E EXPRESSÃO DO RECEPTOR mPR- α NESTAS POPULAÇÕES

1. Protocolo de imunofenotipagem de células do sangue periférico

Para a caracterização imunofenotípica das populações linfocitárias major e para avaliação da expressão do receptor mPR- α nestas populações linfocitárias nos grupos de estudo, foi necessário marcar previamente o sangue periférico com marcadores de superfície específicos que permitam a detecção e análise de cada população linfocitária e a expressão do receptor membranar da progesterona.

Neste tipo de análise foi necessário estabelecer um protocolo tendo em conta o tipo de fluorescências utilizadas nos marcadores específicos para que não houvesse sobreposição, o que conduziria a uma má caracterização das populações celulares em estudo.

Reagentes e soluções:

Para a realização deste protocolo foram usadas as seguintes soluções e reagentes: (1) tampão fosfato salino (PBS) (Gibco) 0,5 % soro de bovino fetal (FBS) (Biochrom, Merck Millipore), (2) o reagente imunofluorescente de três cores, *Lymphogram* (Cytognos SL),- *Lymphogram*, é um *kit* imunofluorescente, que contém um cocktail de anticorpos monoclonais: CD3, CD19, CD56, CD4 e CD8 conjugados com 3 tipos de fluorocromos que nos permite identificar as diferentes subpopulações linfocitárias: Linfócitos T (CD3+), B (CD19+) e células NK (CD3-CD56+), assim como T helper (CD3+CD4+) e T citotóxicas (CD3+CD8+). O *Lymfogram* possui, o anticorpo CD8 conjugado com um fluorocromo (FITC- isotiocianato de fluoresceína); o anticorpo CD19 conjugado com um fluorocromo (FITC); o anticorpo CD3 conjugado com um fluorocromo (PE- ficoeritrina); o anticorpo CD56 conjugado com um fluorocromo (PE) e; o anticorpo CD4 conjugado com um fluorocromo (PECy5- ficoeritrina – cianina 5 tandem); (3) O anticorpo policlonal do tipo IgG, reconhece o receptor membranar alfa da progesterona, mPR- α (H-76), (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Uma vez que não existia comercialmente este anticorpo monoclonal conjugado com qualquer tipo de fluorocromo foi necessário a marcação com anticorpo secundário; (4) O anticorpo secundário, Donkey anticoelho IgG – Poly4064, conjugado

com o fluorocromo dylight 649 (Biolegend Inc.), com fluorescência similar à fluorescência APC (aloficocianina) ou Alexa Fluor 647. Este anticorpo é específico para o tipo de imunoglobulina do anticorpo policlonal mPR- α usado.

Procedimento experimental

Foram colocados 50 μ L de amostra de sangue periférico contendo cerca de $0,5 - 1 \times 10^6$ células/mL num tubo de citómetro e foram incubados com 50 μ L de uma solução PBS 0,5% FBS, durante 45 minutos, com o intuito de minimizar as ligações inespecíficas. Seguidamente cada amostra foi marcada com mPR α , e incubada durante 20 minutos, no escuro a 4°C. Após lavagem das amostras (com PBS 0,5% FBS e posterior centrifugação durante 5 minutos a 1800 rpm), estas foram marcadas com o anticorpo secundário conjugado com a fluorescência DyLight 649, durante 20 minutos, no escuro a 4°C. Ao fim dos 20 minutos, cada amostra foi lavada novamente, e posteriormente marcada com o reagente *Lymphogram*, durante 15 minutos no escuro a 4°C. Por fim, procedeu-se à lise dos eritrócitos com a solução de lise FACS Lysing solution (BD Biosciences), seguida de uma lavagem e ressuspensão em 500 μ L de meio isotónico, tampão fosfato salino - PBS 1x (Gibco).

Após marcação imunofenotípica as amostras foram guardadas a 4°C até serem adquiridas no espaço temporal de cerca de 3-4 horas. As amostras foram adquiridas num Citómetro de fluxo (BD FACSCanto II Flow Cytometer).

2. Estratégia de gating dos linfócitos

A citometria de fluxo tornou-se uma ferramenta útil na análise do fenótipo celular e no estudo do funcionamento das células que compõem o sistema imunológico, por ser uma técnica citológica avançada utilizada para contar, analisar e classificar partículas microscópicas em suspensão. É indiscutivelmente a tecnologia mais poderosa disponível para a caracterização imunofenotípica de células, uma vez que tem a capacidade de medir diversos parâmetros em diversos tipos de células (Arosa et al. 2012)(Murphy 2011).

Para assim subdividir as populações e subpopulações linfocitárias com base nas marcações/fluorescências dos anticorpos de superfície que permitem realizar a separação das populações linfocitárias, como já foi referido, começou-se por selecionar os linfócitos

(Figura 13) da população total de células de sangue periférico, representada num gráfico dotplot SSC/FSC. Essa separação é feita segundo os princípios básicos da citometria, de dispersão da luz e da emissão de fluorescência de fluorocromos conjugados com anticorpos específicos, para identificar, quantificar e analisar populações de células. A dispersão frontal da fonte de luz – FSC (*Forward Scatter Characteristics*) dá informação sobre o tamanho e forma da célula, enquanto a dispersão lateral da fonte de luz – SSC (*Side Scatter Characteristics*) fornece a informação sobre a granulosidade e complexidade celular. Estas características FSC e SSC, são únicas de cada célula permitindo assim identificar populações celulares, nomeadamente, linfócitos dos granulócitos, uma vez que estes possuem maior *side scatter* devido aos seus grânulos citoplasmáticos e monócitos por possuírem maior *forward scatter* devido ao seu tamanho (Arosa et al. 2012)(Murphy 2011).

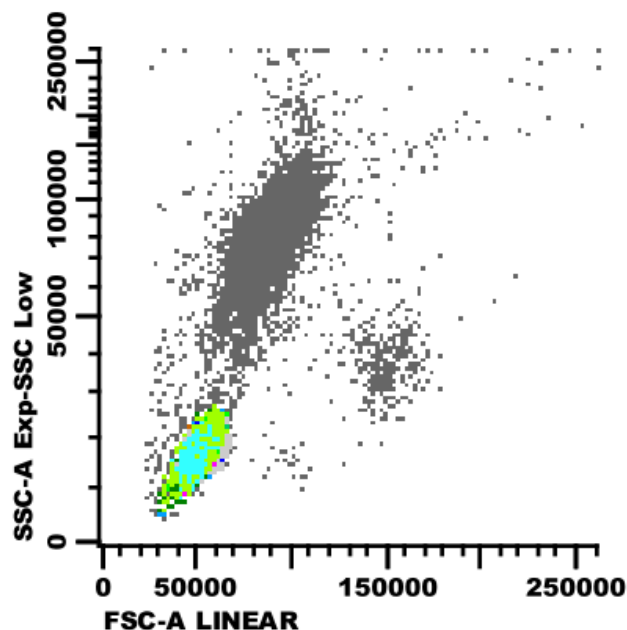


Figura 10 – Gráfico SSC/FSC da população celular de sangue periférico, com a respetiva seleção, a vermelho, da população linfocitárias.

Depois dos linfócitos selecionados, num outro tipo de gráfico, segue-se a separação das diversas populações linfocitárias, linfócitos T, B e NK conforme os seus marcadores de superfície característicos (Figura 11).

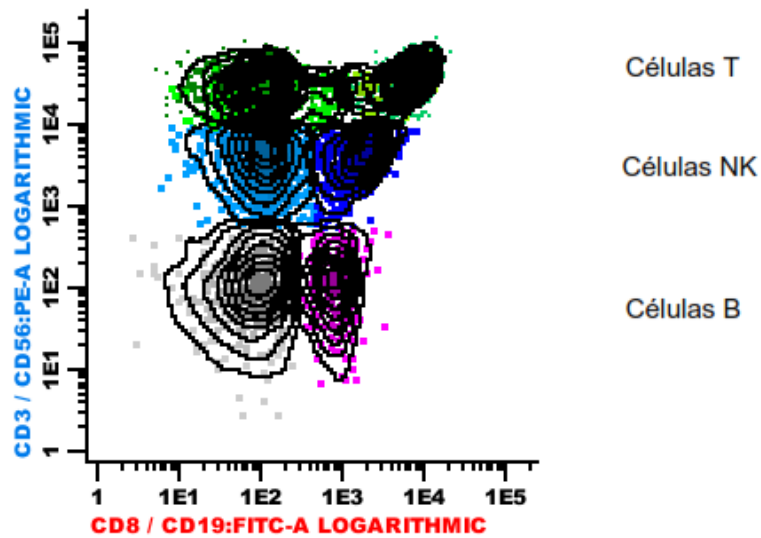


Figura 11 – Gráfico dotplot onde se encontram representadas cada uma das populações linfocitárias, conforme o seu marcador de superfície, células T (a verde), células NK (azul escuro), células sem marcação/negativas (cinzento) e células B (Rosa) com contornos de densidade populacional.

Por fim, a partir de um histograma seleciona-se a expressão do recetor mPR- α que marca em APC, em cada uma das populações linfocitárias (Figura 12). Esta expressão é passível de ser identificada e quantificada, através dos diferentes picos de densidade representados pelo histograma.

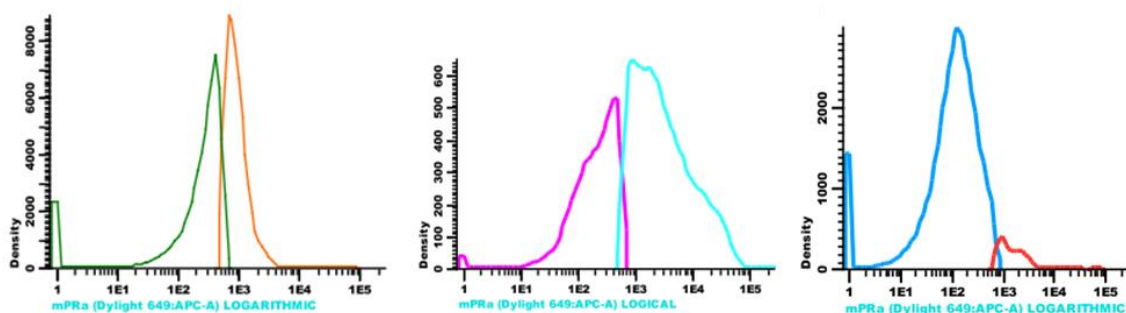


Figura 12 – Histogramas representativos da expressão do recetor mPR- α (laranja, azul e vermelho) em cada uma das diferentes populações linfocitárias, células T,B e NK, respetivamente.

Depois de adquiridas as amostras por citometria de Fluxo com recurso ao *software* de aquisição e análise (BD FACS DIVA™ Software) e após a análise dos resultados obtidos através do *software* *Infinicyt* versão 1.7 (Cytognos) foi possível caracterizar

imunofenotipicamente as populações linfocitárias e avaliar a expressão do recetor membranar (mPRa), no que diz respeito a percentagens e médias de canal de fluorescência (MIF). Estas análises foram feitas com base nas marcações/fluorescências dos anticorpos de superfície, referidos anteriormente, permitindo assim realizar a separação das populações linfocitárias.

3. Análise de dados e tratamento estatístico

Com já foi detalhadamente explicado neste capítulo todos os resultados obtidos foram tratados por recurso aos programas FACS DIVA™ e *Infinicyt* versão 1.7. Por fim, todos os resultados foram tratados estatisticamente, a partir do programa SPSS *statistics* versão 21 e por GraphPad, primeiramente todas as amostras seguiram um estudo de análise descritiva para conhecer os outliers da amostra, e assim se ter uma amostra mais homogénea, posteriormente seguiram para um teste não-paramétrico ANOVA de Friedman para um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), devido ao reduzido número de amostras do grupo de grávidas (N=13) e do grupo de controlo (N=12), com um teste de Dunn *a posteriori*.

RESULTADOS

1. IMUNOFENOTIPAGEM DAS POPULAÇÕES MAJOR LINFOCITÁRIAS E EXPRESSÃO DO RECEPTOR mPR- α NESTAS POPULAÇÕES

Para a caracterização imunofenotípica do sangue periférico do grupo de grávidas e do grupo controlo-não grávidas, analisou-se a percentagem das populações major linfocitárias nas amostras de sangue colhidas, sendo que no caso do grupo alvo do estudo, em 3 momentos diferentes ao longo da gravidez (2º e 3º Trimestres e dia do parto) e avaliou-se a expressão do recetor mPR- α em termos de percentagem de células que o expressam e a MIF (média de intensidade de fluorescência) em cada uma das populações linfocitárias e nas suas subpopulações.

Com já foi referido neste capítulo todos os resultados obtidos foram tratados por recurso aos programas FACS DIVA™ e *Infinicyt* versão 1.7.

Por fim, todos os resultados foram tratados estatisticamente, a partir do programa SPSS *statistics* versão 21 e por GraphPad, através do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman para um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), devido ao reduzido número de amostras do grupo de grávidas (N=13) e do grupo de controlo (N=12).

1.1. PERCENTAGEM DAS POPULAÇÕES MAJOR LINFOCITÁRIAS (T, B E NK), DURANTE A GRAVIDEZ

Como se pode observar na Figura 13, a percentagem da população linfocitária T não sofre alterações estatisticamente significativas ao longo da gravidez, nem existem diferenças percentuais nesta população comparativamente ao grupo controlo. No entanto, no segundo trimestre a percentagem destas células era de 79,3 % ($\pm 4,2$), no terceiro trimestre de 83,3% ($\pm 4,8$) e no dia do parto de 77,7% ($\pm 13,2$), de referir que a percentagem obtida para o controlo foi de 85,6% ($\pm 4,2$), um pouco superior à percentagem observada para o grupo de grávidas ao longo da gravidez.

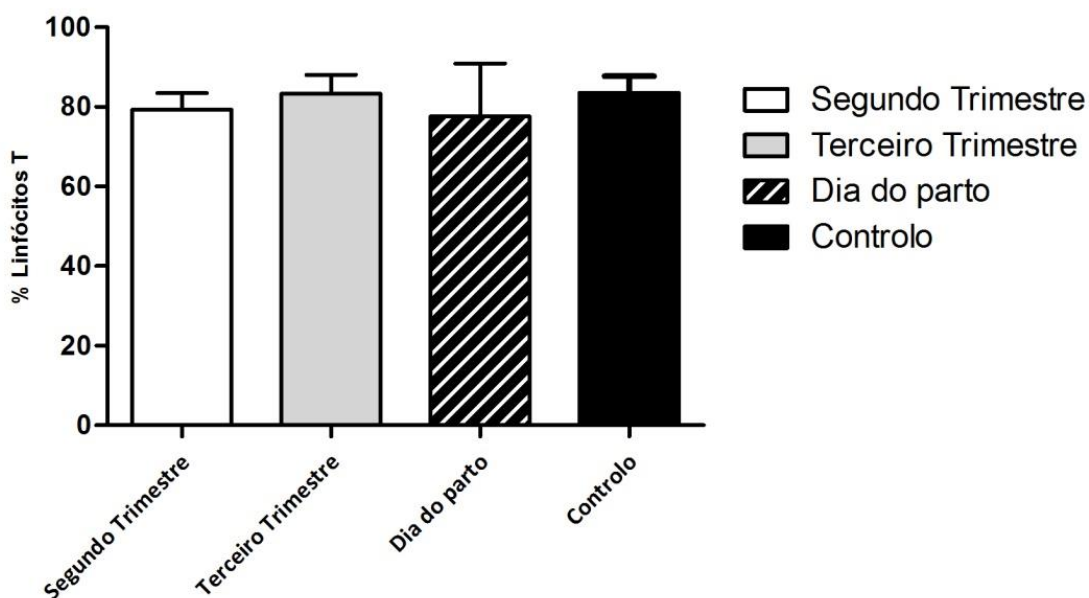


Figura 13- Evolução da **população linfocitária T** ao longo da gravidez e no grupo controlo. Os resultados são expressos em percentagem e foram comparados entre o grupo de grávidas ao longo da gravidez e com o grupo controlo. As análises estatísticas comparativas foram realizadas com recurso ao teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm e o desvio padrão de dez ensaios e não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Relativamente à percentagem da população linfocitária B (Figura 14), verifica-se uma diminuição ao longo da gravidez com diferenças estatisticamente significativas entre o segundo trimestre com 9,5% ($\pm 2,3$) e o dia do parto com 3,5% ($\pm 1,7$). Quando comparado cada momento da gravidez com o grupo controlo, também se observaram diferenças estatisticamente significativas entre este grupo 5,1% ($\pm 1,2$) e a determinação do segundo trimestre com 9,5% ($\pm 2,3$) no grupo das grávidas.

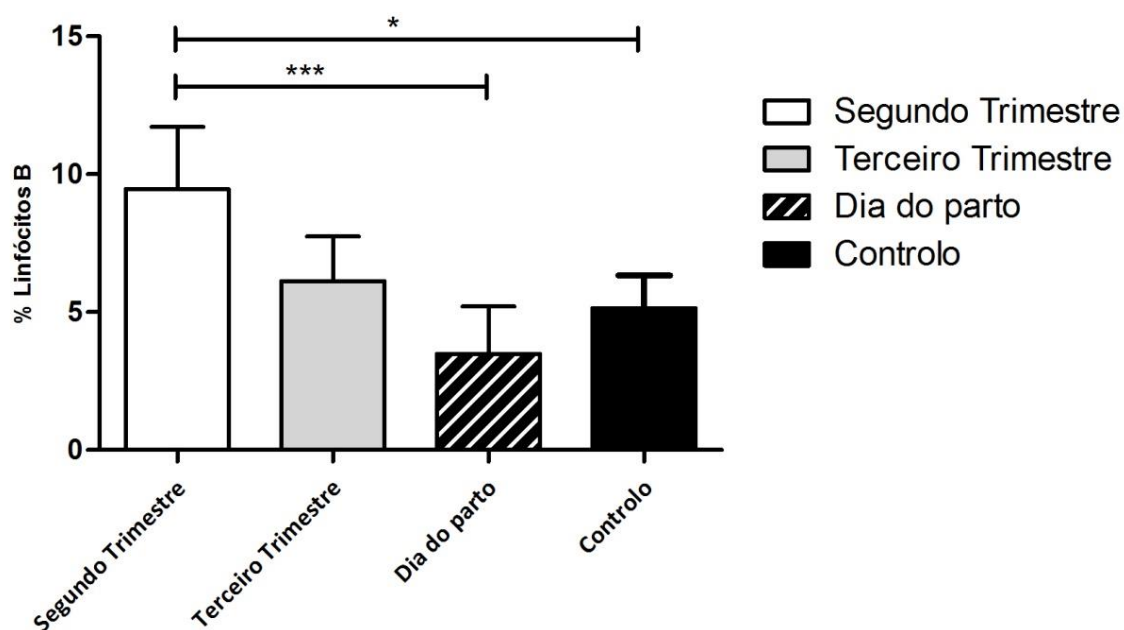


Figura 14 - Evolução da **população linfocitária B** ao longo da gravidez e no grupo controlo. Os resultados são expressos em percentagem e foram comparados entre o grupo de grávidas ao longo da gravidez e com o grupo controlo. As análises estatísticas comparativas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios, com um valor de p de * ≤ 0.05 entre o controlo e o segundo trimestre e ***P ≤ 0.001 entre o segundo trimestre e o dia do parto.

Por fim analisou-se a população linfocitária NK (Figura 15), onde se observa que esta diminui ligeiramente no 3º trimestre voltando a subir valores ligeiramente superiores aos do 2º trimestre e próximos do grupo controlo, no entanto estas variações ao longo da gravidez são de fraca amplitude, não existindo diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes determinações, nem quando comparadas ao grupo controlo. Assim, no segundo trimestre a percentagem de células NK era de 7,7 % ($\pm 2,7$), no terceiro trimestre de 5,6% ($\pm 2,3$) e no dia do parto 8,9 % ($\pm 4,3$), relativamente ao controlo obteve-se 8,5 % ($\pm 2,9$).

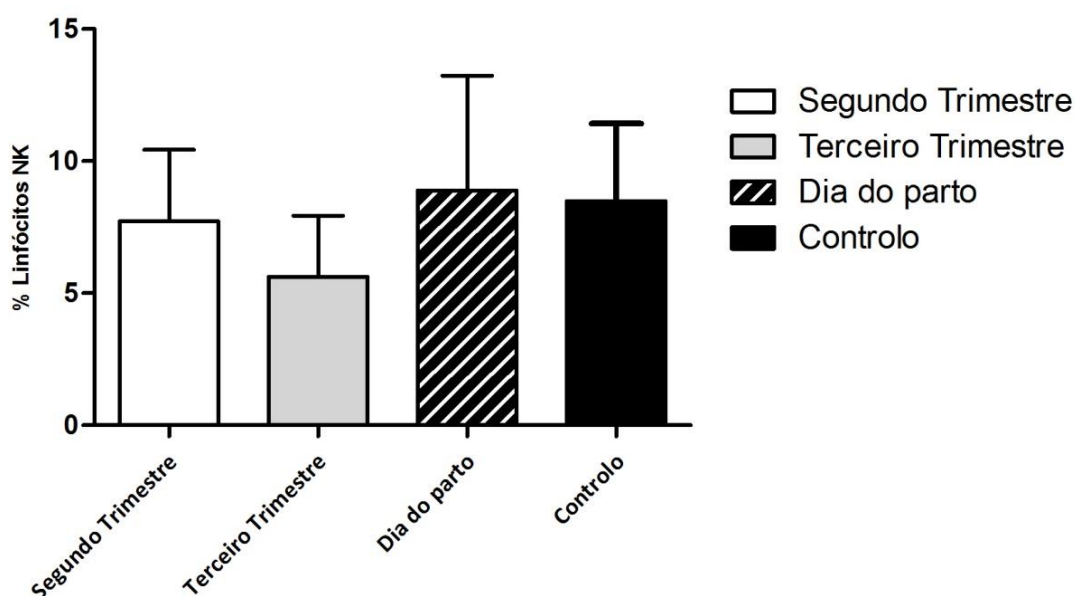


Figura 15 - Evolução da **população linfocitária NK** ao longo da gravidez e no grupo controlo. Os resultados são expressos em percentagem e foram comparados entre o grupo de grávidas ao longo da gravidez e com o grupo controlo. As análises estatísticas comparativas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios.

1.2. EXPRESSÃO DO RECETOR MPR-A, MEDIDA ATRAVÉS DA MÉDIA DE CANAL DE FLUORESCÊNCIA DAS POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS (T, B E NK), DURANTE A GRAVIDEZ

Quando realizada a análise da expressão do recetor mPR- α através da MIF, é visível uma diminuição da MIF ao longo da gravidez em cada uma das populações linfocitárias.

Nos linfócitos T (Figura 16) observam-se diferenças estatisticamente significativas entre o segundo trimestre 434,2 ($\pm 524,1$) e o dia do parto 105,7 ($\pm 129,0$), relativamente ao terceiro trimestre e controlo, os valores obtidos foram de 220,0 ($\pm 137,8$) e 161,2 ($\pm 239,7$) respetivamente.

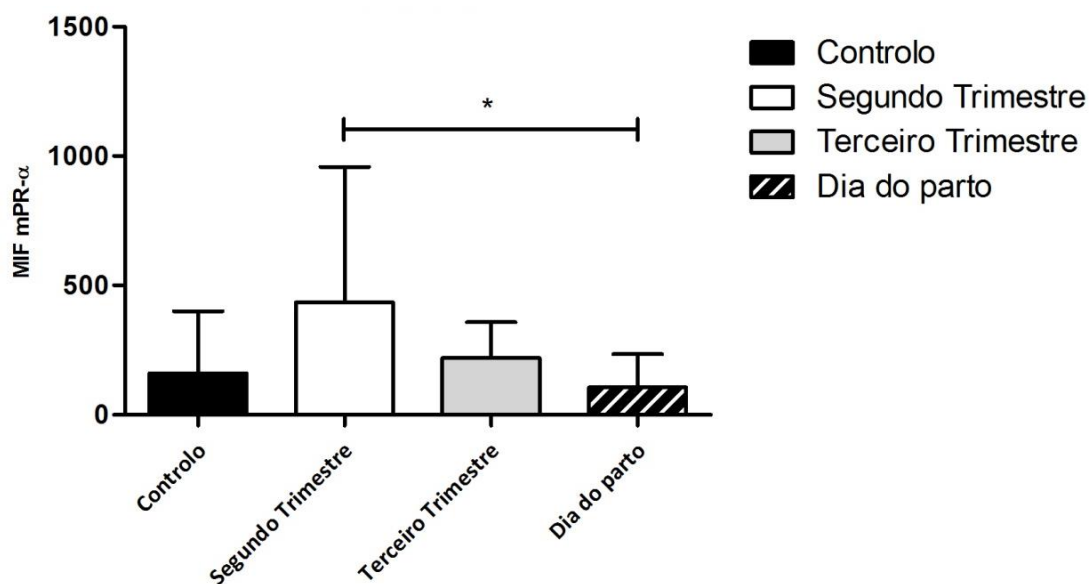


Figura 16 - Expressão do recetor mPR- α , medida através da média de canal de fluorescência (MIF) na população linfocitárias T, ao longo da gravidez e no grupo controlo. Os resultados são expressos em percentagem e foram comparados entre o grupo de grávidas ao longo da gravidez e com o grupo controlo. As análises estatísticas comparativas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios com $*P \leq 0.05$ entre o segundo trimestres e o dia do parto.

Nos linfócitos B (Figura 17), como já foi referido, há igualmente uma diminuição na MIF, sendo a diferença mais acentuada com diferenças estatisticamente significativas entre os valores de MIF no segundo trimestre 2117 (± 1045) e o dia do parto 229,3 ($\pm 273,5$). No terceiro trimestre o valor obtido foi de 1712 (± 2215) e para o controlo de 366,8 ($\pm 165,2$).

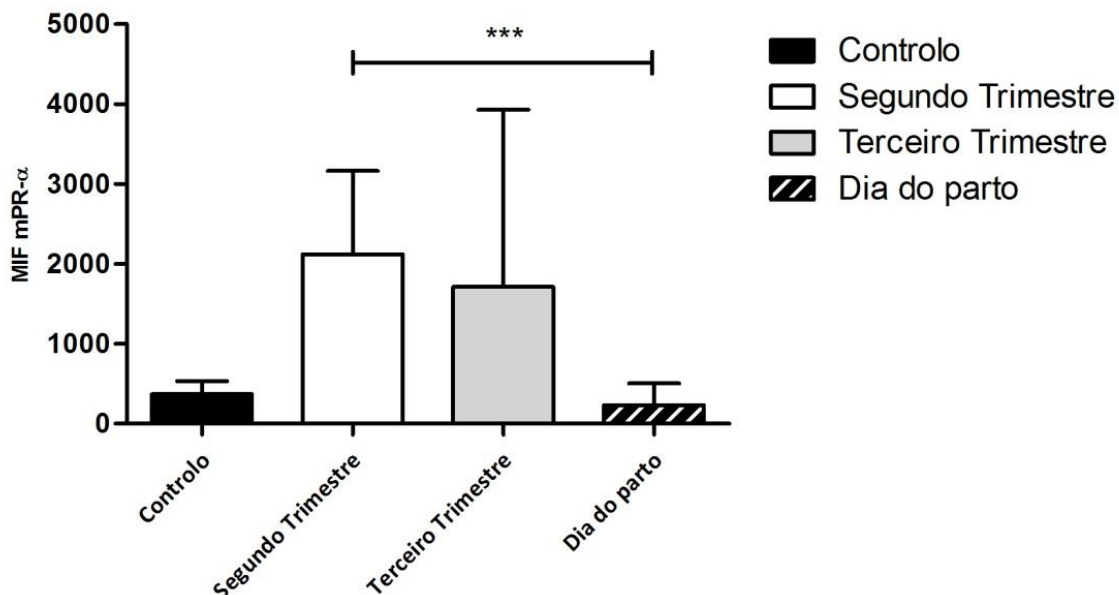


Figura 17 - Expressão do recetor mPR- α , medida através da média de canal de fluorescência (MIF) na **população linfocitárias B**, ao longo da gravidez e no grupo controlo. Os resultados são expressos em percentagem e foram comparados entre o grupo de grávidas ao longo da gravidez e com o grupo controlo. As análises estatísticas comparativas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios com *** $P \leq 0.001$ entre o segundo trimestres e o dia do parto.

Para os linfócitos NK (Figura 18), não se observam diferenças significativas ao longo da gravidez, em que o valor de MIF no segundo trimestre foi de 289,8 ($\pm 144,4$), 280,9 ($\pm 343,0$) no terceiro trimestre e 144,7 ($\pm 188,2$) no dia do parto, no entanto existem diferenças significativas nos valores de MIF no dia do parto 144,7 ($\pm 188,2$) relativamente aos valores de MIF no controlo 469,8 ($\pm 460,5$).

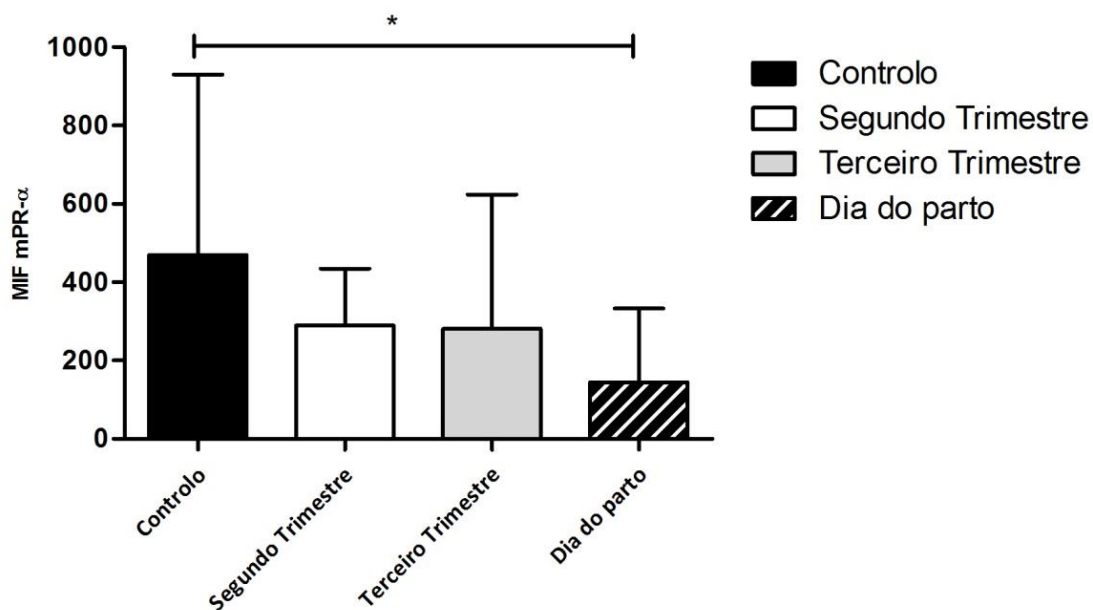


Figura 18 - Expressão do recetor mPR- α , medida através da média de canal de fluorescência (MIF) na **população linfocitárias NK**, ao longo da gravidez e no grupo controlo. Os resultados são expressos em percentagem e foram comparados entre o grupo de grávidas ao longo da gravidez e com o grupo controlo. As análises estatísticas comparativas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios com $*P \leq 0.05$ entre o controlo e o dia do parto.

1.3. PERCENTAGEM DAS POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS (T, B E NK) QUE EXPRESSAM O RECETOR MPR-A DURANTE A GRAVIDEZ

Relativamente à percentagem da de células que expressam do recetor mPR- α em cada população linfocitárias (T, B e NK), durante a gravidez, os resultados mostram claramente que esta diminui de um modo geral. Na população linfocitária T (Figura 23), existem diferenças estatisticamente significativas relativamente à percentagem de expressão deste recetor membranar entre o segundo trimestre 73,1% ($\pm 5,1$) e o dia do trabalho de parto 19,1% ($\pm 31,6$). Os valores obtidos para o terceiro trimestre e controlo foram respetivamente 63,2% ($\pm 31,91$) e 24,6% ($\pm 24,6$).

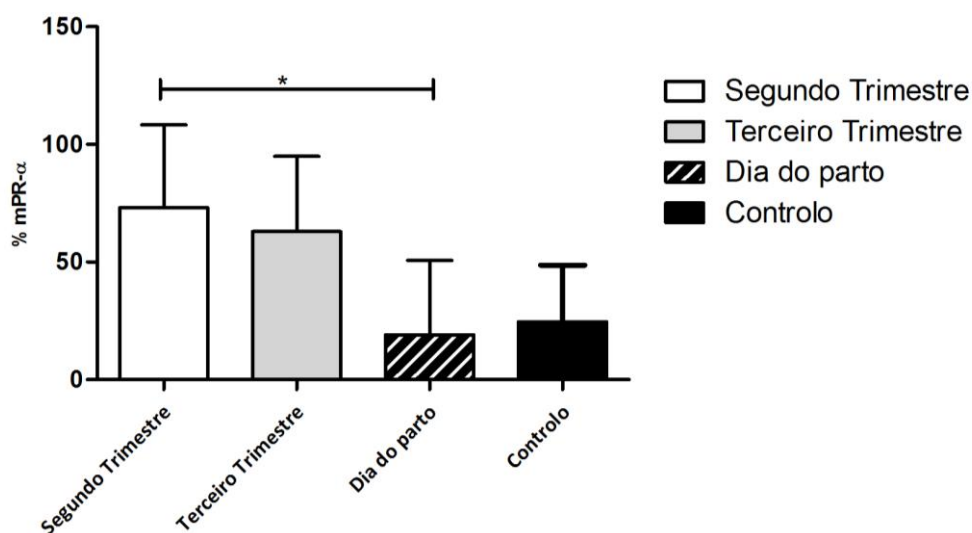


Figura 19- Percentagem da expressão do recetor mPR- α na **população linfocitárias T**, durante a gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios com * $P \leq 0.05$ entre o segundo trimestre e o dia do parto.

Na população linfocitárias B (Figura 20) observam-se diferenças estatisticamente significativas entre o segundo trimestre 74,8 % ($\pm 11,8$) e, o terceiro trimestre 12,6% ($\pm 16,1$); o controlo 7,0% ($\pm 6,5$); e o dia do trabalho de parto 7,1% ($\pm 13,6$). Sendo que existem diferenças estatisticamente muito significativas e visíveis entre o segundo trimestre e o dia do trabalho de parto.

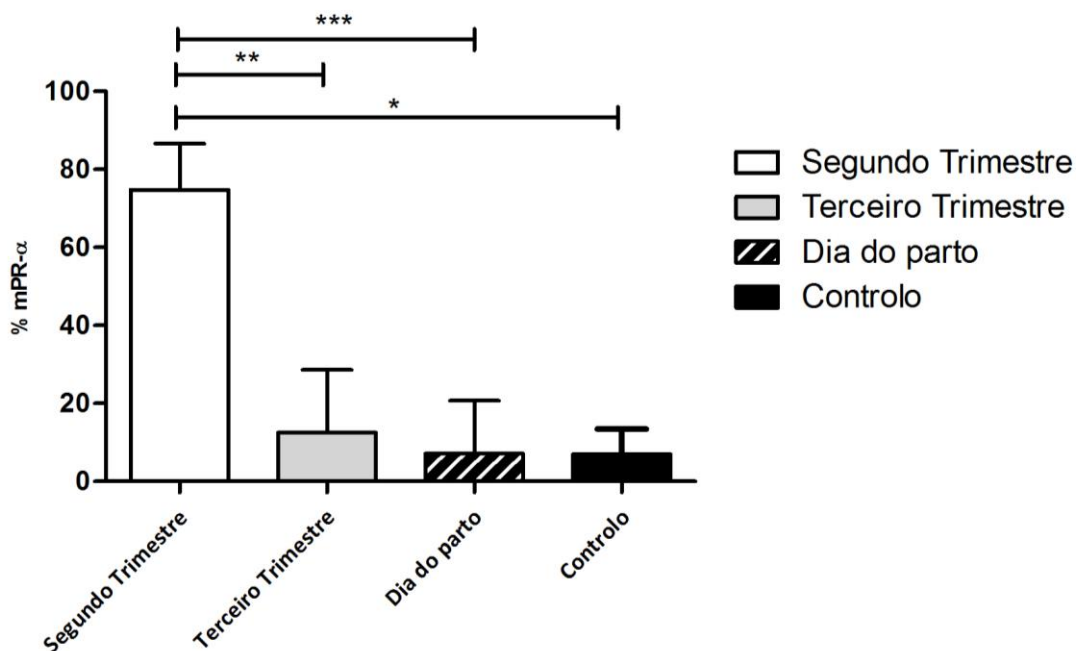


Figura 20 - Percentagem da expressão do recetor mPR- α na **população linfocitárias B**, durante a gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios, com * $P \leq 0.05$ entre o segundo trimestre e o controlo, ** $P \leq 0.01$ entre o segundo trimestre e o terceiro trimestre e *** $P \leq 0.001$ entre o segundo trimestre e o dia do parto.

Por fim, na população linfocitárias NK (Figura 21), é igualmente visível uma diminuição desta população ao longo da gravidez, no entanto não tão acentuada como nas outras populações e sem diferenças estatísticas. No segundo trimestre verifica-se uma percentagem de mPR- α , de 16,5% ($\pm 8,6$), no terceiro trimestre de 12,4% ($\pm 14,6$), no dia do trabalho de parto de 8,7% ($\pm 21,7$) e relativamente ao controlo observa-se uma percentagem do recetor membranar de 33,4% ($\pm 47,3$).

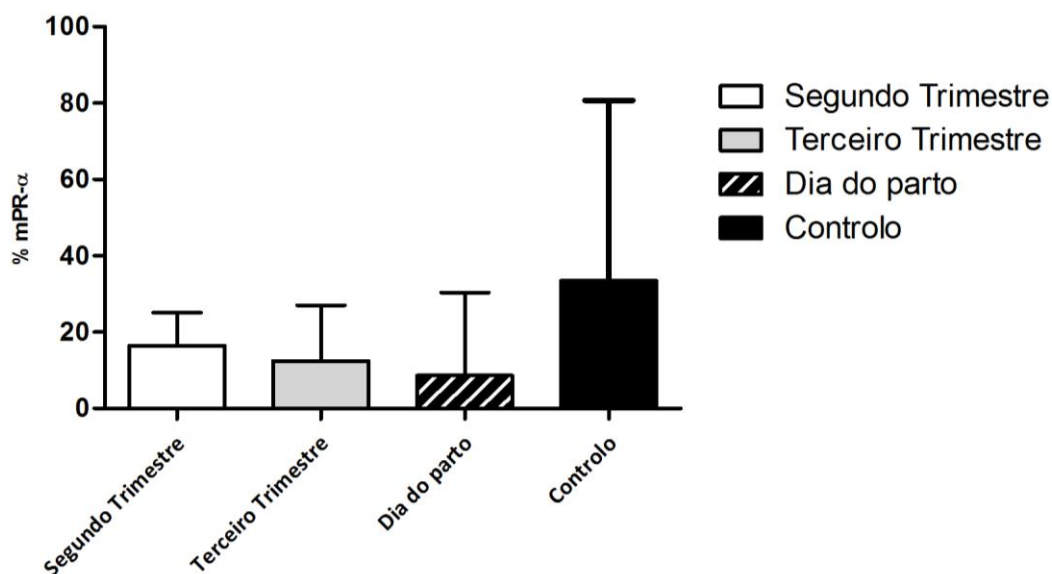


Figura 21- Percentagem da expressão do recetor mPR- α na **população linfocitárias NK**, durante a gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios e não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

1.4. PERCENTAGEM DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS T (CD4+CD8+, CD4+CD8-, CD4-CD8+, CD4-CD8-) E DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NK (CD56+CD8+, CD56+CD8-), DURANTE A GRAVIDEZ

Além da caracterização das populações major, foram também analisadas as amostras no sentido de avaliar as subpopulações linfocitárias T e NK.

Durante o segundo trimestre os valores da percentagem foram de 55,4% ($\pm 8,2$), no terceiro trimestre 55,8% ($\pm 8,6$) e no dia do parto 57,2% ($\pm 8,8$) para a subpopulação linfocitária CD4+CD8- (Figura 22), sendo que no controlo o valor obtido foi de 63,7% ($\pm 7,0$) e não existindo diferenças estatisticamente significativas entre as várias comparações efectuadas.

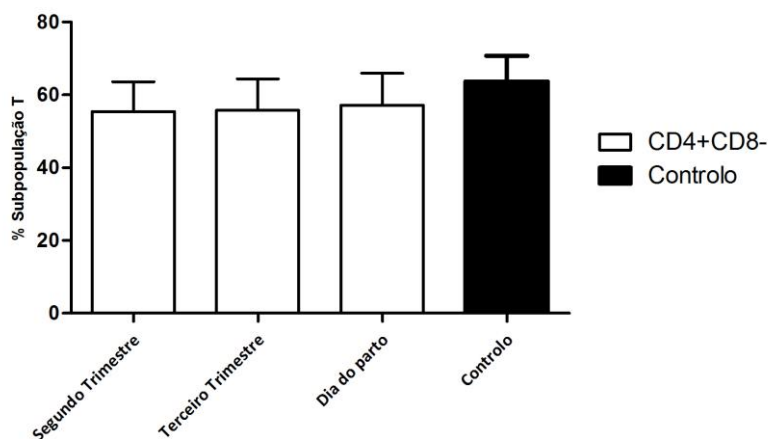


Figura 22- Percentagem da **subpopulação linfocitárias T (CD4+CD8-)**, durante a gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios e não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Em relação à subpopulação linfocitária CD4-CD8+ (Figura 23), o valor encontrado foi de 34,7% ($\pm 4,7$) no segundo trimestre, 35,9% ($\pm 8,2$) no terceiro trimestre e a 36,0% ($\pm 7,8$) no dia do parto, sendo que o controlo possui um valor inferior comparativamente a todas as medições efectuadas na gravidez, de 28,9% ($\pm 5,8$) para esta supopulação, mas sem significado estatístico.

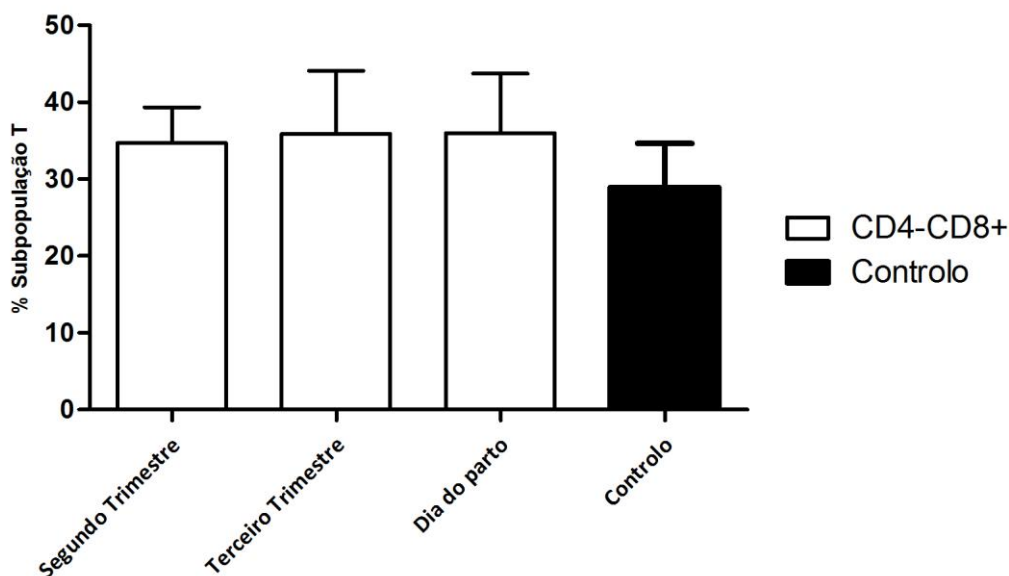


Figura 23- Percentagem da **subpopulação linfocitárias T (CD4-CD8+)**, durante a gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios e não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Relativamente à subpopulação linfocitária dupla negativa CD4-CD8- (Figura 24), esta encontra-se em menor percentagem comparativamente às subpopulações linfocitárias CD4+CD8- e CD4-CD8+, sendo que no segundo trimestre se encontraram valores de 4,5% ($\pm 1,7$), no terceiro trimestre de 4,3% ($\pm 2,4$) e no dia do parto de 5,5% ($\pm 4,3$), sendo que o controlo também apresenta um valor aproximado à população em estudo, 4,5% ($\pm 2,6$).

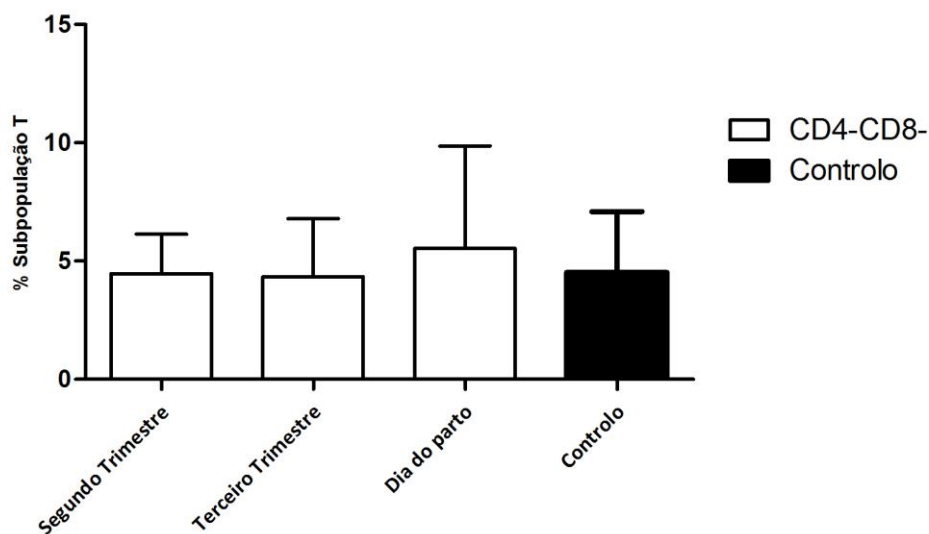


Figura 24- Percentagem da **subpopulação linfocitárias T (CD4-CD8-)**, durante a gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios e não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Por fim, analisando os resultados relativamente à subpopulação linfocitária T dupla positiva CD4+CD8+ (Figura 25), verifica-se que esta população encontra-se em muito menor percentagem relativamente a todas as outras subpopulações linfocitárias T. Assim, no segundo trimestre apresentou um valor de 1,0% ($\pm 0,4$), no terceiro trimestre a 1,1% ($\pm 0,9$) e no dia do parto a 1,3% ($\pm 1,3$), relativamente ao controlo obteve-se um valor de 0,9% ($\pm 0,3$).

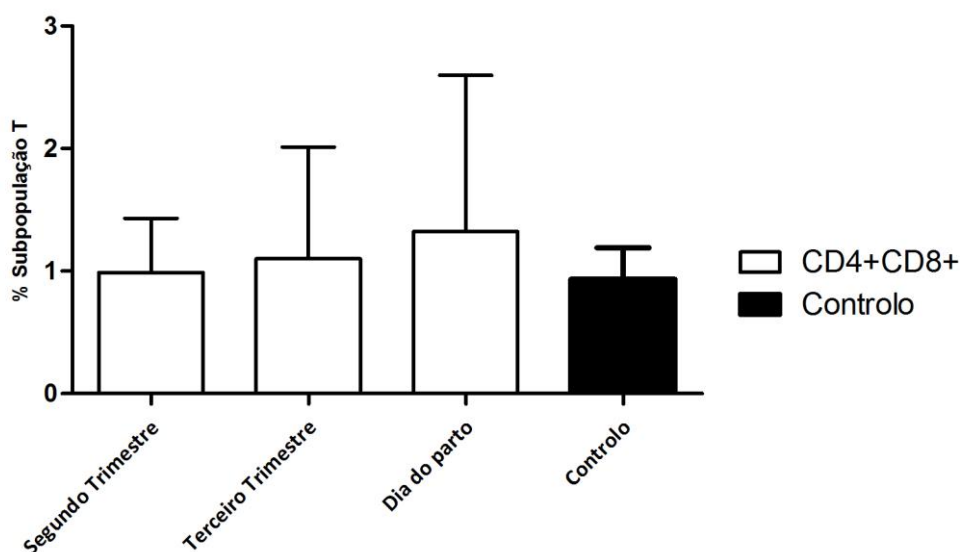


Figura 25- Percentagem da **subpopulação linfocitárias T (CD4+CD8+)**, durante a gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios e não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

No que respeita à subpopulação linfocitária NK CD56+CD8+ (Figura 26), durante o segundo trimestre encontraram-se valores de 35,0% ($\pm 13,9$), no terceiro trimestre de 38,7% ($\pm 14,6$) e no dia do parto de 33,1% ($\pm 10,0$), relativamente ao controlo este apresentou um valor de 40,8% ($\pm 12,9$).

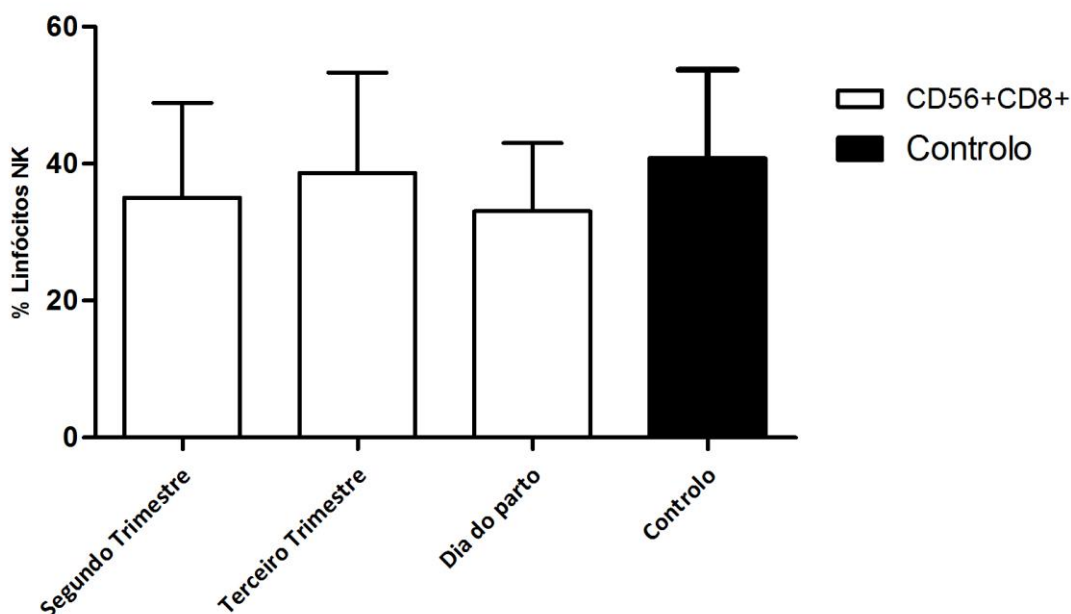


Figura 26- Percentagem da subpopulação linfocitárias NK (CD56+CD8+), durante a gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios e não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Por comparação, verifica-se que os linfócitos NK CD56+CD8- (Figura 31) encontram-se em maior percentagem, sendo que no segundo trimestre representam 65,0% ($\pm 13,9$), no terceiro trimestre 59,6% ($\pm 15,3$) e no dia do parto a 66,9% ($\pm 10,0$). Estas diferenças são estatisticamente significativas quando comparamos o segundo trimestre e dia do parto relativamente ao controlo, tendo este grupo um valor de 18,7% ($\pm 24,2$) nestas células.

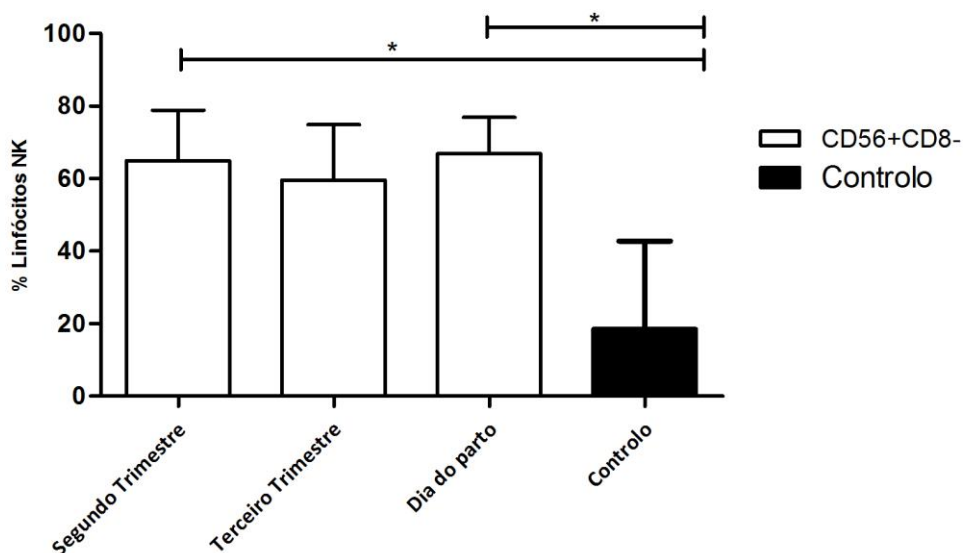


Figura 27- Percentagem da **subpopulação linfocitárias NK (CD56+CD8-)**, durante a gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios com com $*P \leq 0.05$ entre o segundo trimestre e o controlo e entre o dia do parto e o controlo.

1.1.1. EXPRESSÃO DO RECEPTOR MPR-A, MEDIDA ATRAVÉS DA MÉDIA DE CANAL DE FLUORESCÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS T (CD4+CD8+, CD4+CD8-, CD4-CD8+, CD4-CD8-) E DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NK (CD56+CD8+, CD56+CD8-), DURANTE A GRAVIDEZ

Relativamente ao padrão de expressão do recetor membranar nas subpopulações linfocitárias T e NK é variável ao longo da gravidez. No que concerne à expressão deste recetor nos linfócitos T CD4-CD8- (Figura 28), verifica-se que durante o segundo trimestre esta população apresenta para o recetor mPR α 1214 (\pm 576,4) de MIF, no terceiro trimestre 1134 (\pm 1060) e no dia do parto 226,9 (\pm 490,9), no entanto estas diferenças não são estatisticamente significativas, observando-se apenas significância estatística na MIF no dia do parto relativamente ao controlo 5085 (\pm 10430).

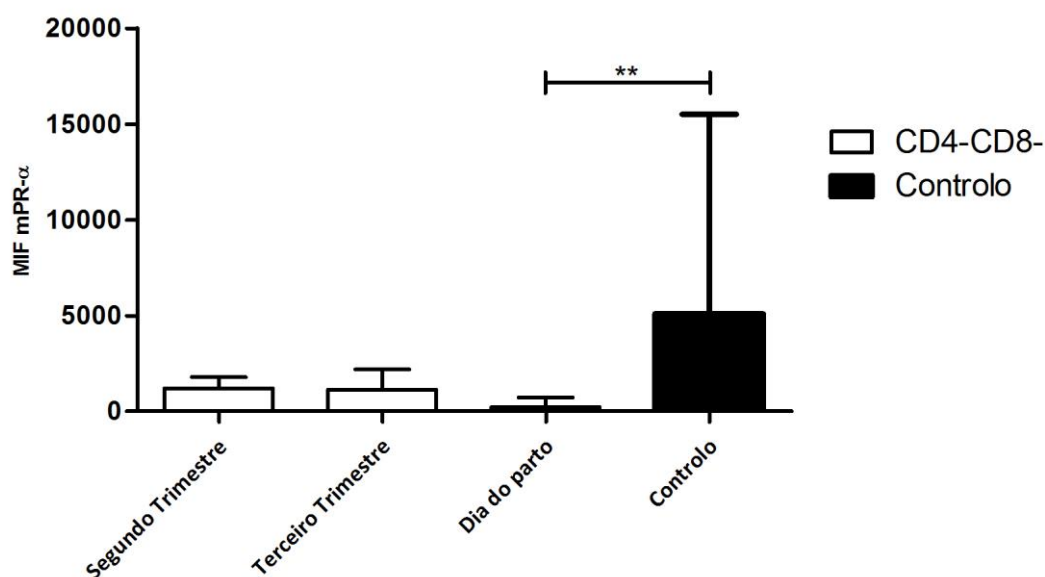


Figura 28- Expressão do recetor mPR- α , medida através da média de canal de fluorescência na subpopulação linfocitária CD4-CD8-, ao longo da gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios com com $^{**}P \leq 0.01$ entre o dia do parto e o controlo.

Nos linfócitos T CD4+CD8+ (Figura 29), observa-se uma ligeira diminuição na MIF do receptor ao longo da gravidez, sendo de 1282 ($\pm 479,4$) no segundo trimestre, 1123 ($\pm 860,6$) no terceiro trimestre e 484,1 ($\pm 652,4$) no dia do parto, não havendo diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo 273,1 ($\pm 580,0$) nem entre cada medição ao longo da gravidez.

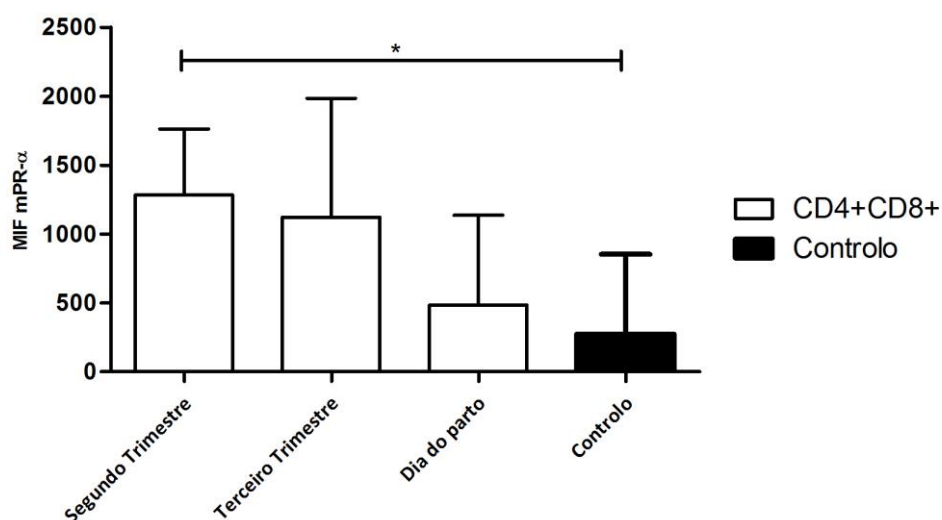


Figura 29 - Expressão do recetor mPR- α , medida através da média de canal de fluorescência na subpopulação linfocitária CD4+CD8+, ao longo da gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios com com * $P \leq 0.05$ entre o segundo trimestre e o controlo.

Nos linfócitos T helper CD4+CD8- (Figura 30), não se verificam diferenças com significado estatístico para a expressão do recetor ao longo da gravidez, no entanto durante o segundo trimestre apresentam 1034 ($\pm 241,2$), com um ligeiro decréscimo no terceiro trimestre 786,7 ($\pm 120,0$) e um novo aumento no dia do parto 1039 ($\pm 512,0$), sendo que o controlo apresenta 895,0 ($\pm 203,0$) de MIF de expressão do recetor membranar.

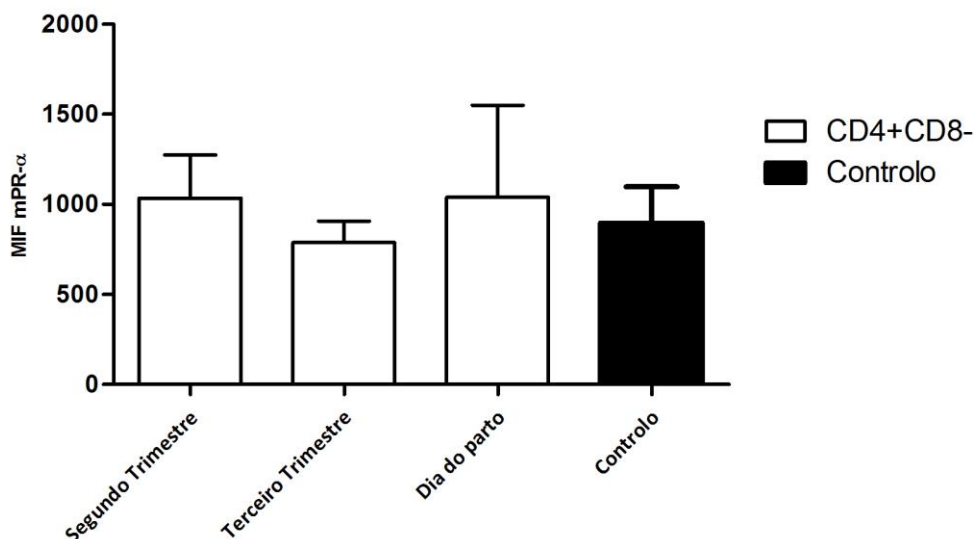


Figura 30 - Expressão do recetor mPR- α , medida através da média de canal de fluorescência na subpopulação linfocitária CD4+CD8-, ao longo da gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios, sem diferenças estatisticamente significativas.

Analogamente os linfócitos CD4-CD8+ (Figura 31), não apresentam diferenças estatísticas significativas no desenrolar da gravidez. Verifica-se, no entanto um decréscimo das MIF do recetor ao longo da gravidez com 1760 ($\pm 586,6$) no segundo trimestre, 1716 (± 1879) no terceiro trimestre e 1371 (± 1026) no dia do parto, mas sempre maiores que no grupo controlo 895,0 ($\pm 203,0$).

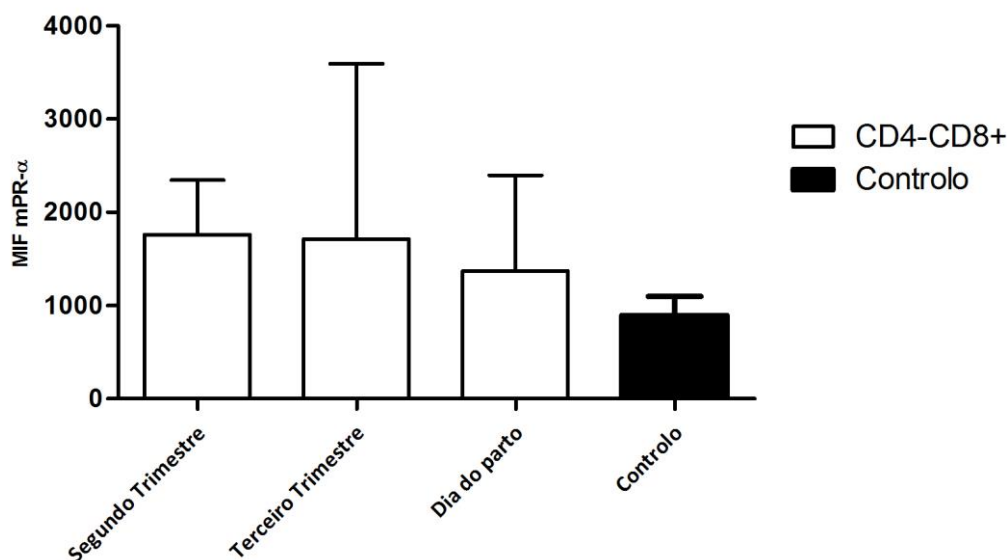


Figura 31 - Expressão do recetor mPR- α , medida através da média de canal de fluorescência na subpopulação linfocitária CD4-CD8+, ao longo da gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios, sem diferenças estatisticamente significativas.

Relativamente à expressão deste recetor membranar na subpopulação linfocitária CD56+CD8+ (Figura 32), existem diferenças estatisticamente significativas entre o segundo trimestre 4458 (± 5343) e o dia do parto 448,3 ($\pm 629,6$) e entre o terceiro trimestre 7659 (± 13880) e o dia do parto. O controlo apresenta uma percentagem de 2152 (± 2069).

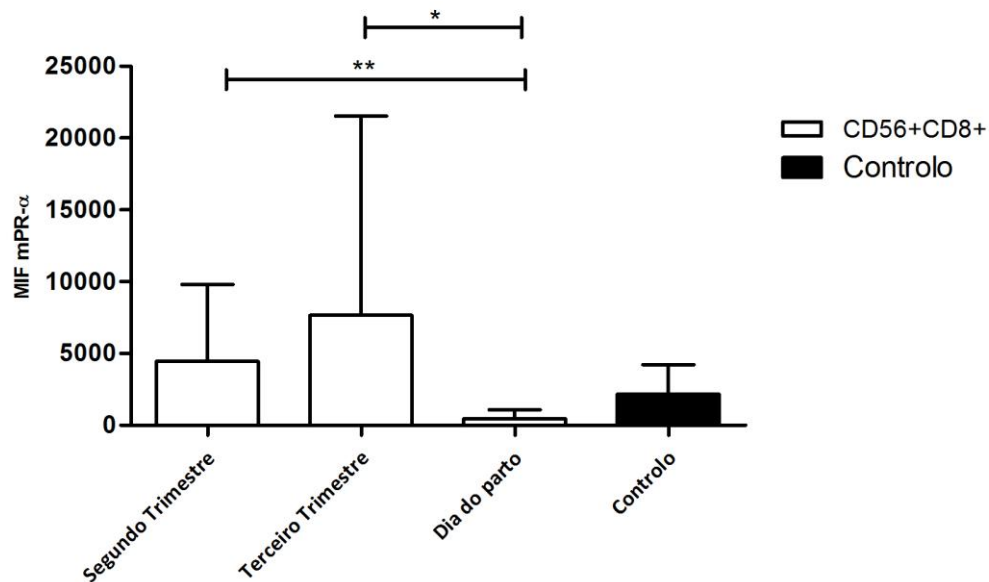


Figura 32 – Expressão do recetor mPR- α , medida através da média de canal de fluorescência na subpopulação linfocitária CD56+CD8+, ao longo da gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios, com $**P \leq 0.01$ entre o segundo trimestre e o dia do parto, e $*P \leq 0.05$ entre o terceiro trimestre e o dia do parto.

Por fim, a subpopulação linfocitária CD56+CD8- (Figura 33), verifica-se que no segundo trimestre estes linfócitos apresentam um MIF de 1446 ($\pm 501,5$), no terceiro trimestre 1562 (± 1526) e no dia do trabalho de parto de 1782 (± 2368), não se verificando diferenças com significância estatística relativamente ao controlo 1580 (± 1272).

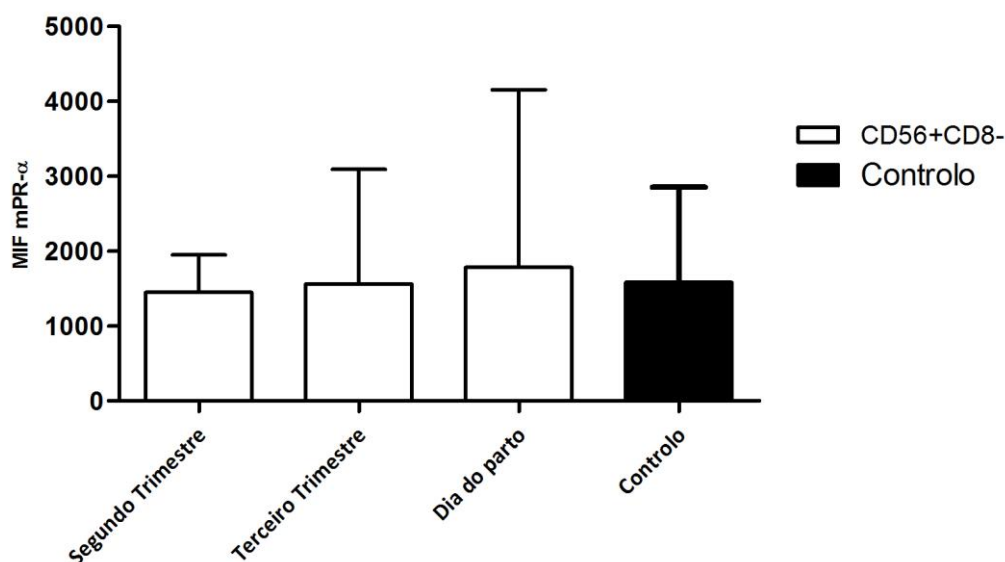


Figura 33 – Expressão do recetor mPR- α , medida através da média de canal de fluorescência na subpopulação linfocitária CD56+CD8-, ao longo da gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios, sem diferenças estatisticamente significativas.

1.1.2. PERCENTAGEM DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR MPR-A NAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS T (CD4+CD8+, CD4+CD8-, CD4-CD8+, CD4-CD8-) E NAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NK (CD56+CD8+, CD56+CD8-), DURANTE A GRAVIDEZ

Relativamente à percentagem de células T CD4-CD8+ (Figura 34) que expressam o recetor membranar, verifica-se que no segundo trimestre é de 1,0% ($\pm 1,4$), no terceiro trimestre de 2,0% ($\pm 2,8$) e no dia do parto de 0,7% ($\pm 0,8$), não havendo diferenças estatísticas entre as diferentes medições nem relativamente ao controlo 1,7% ($\pm 2,4$).

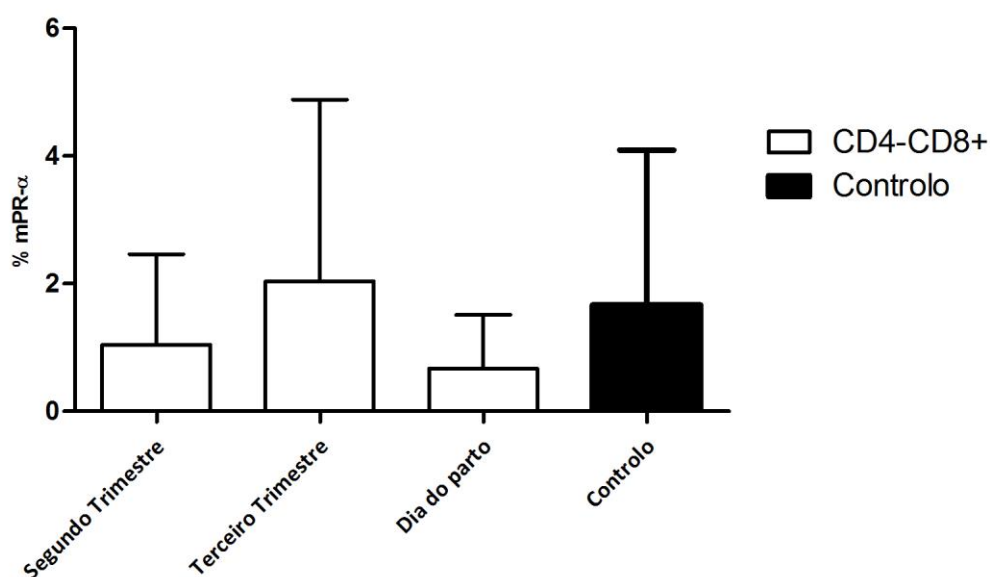


Figura 34 - Percentagem da expressão do recetor mPR- α subpopulação linfocitárias CD4-CD8+, durante a gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios, sem diferenças estatisticamente significativas.

Através da análise da população CD4+CD8- (Figura 35), verifica-se uma diminuição da percentagem de células T helper que expressam o recetor mPR- α ao longo da gravidez, sendo que estas diferenças são estatisticamente significativas entre o segundo trimestre 58,0% ($\pm 28,7$) e o dia do parto 9,3% ($\pm 19,8$), entre o segundo trimestre e o controlo 0,4% ($\pm 0,4$) e ainda entre o terceiro trimestre 38,6% ($\pm 21,6$) e o controlo 0,4% ($\pm 0,4$).

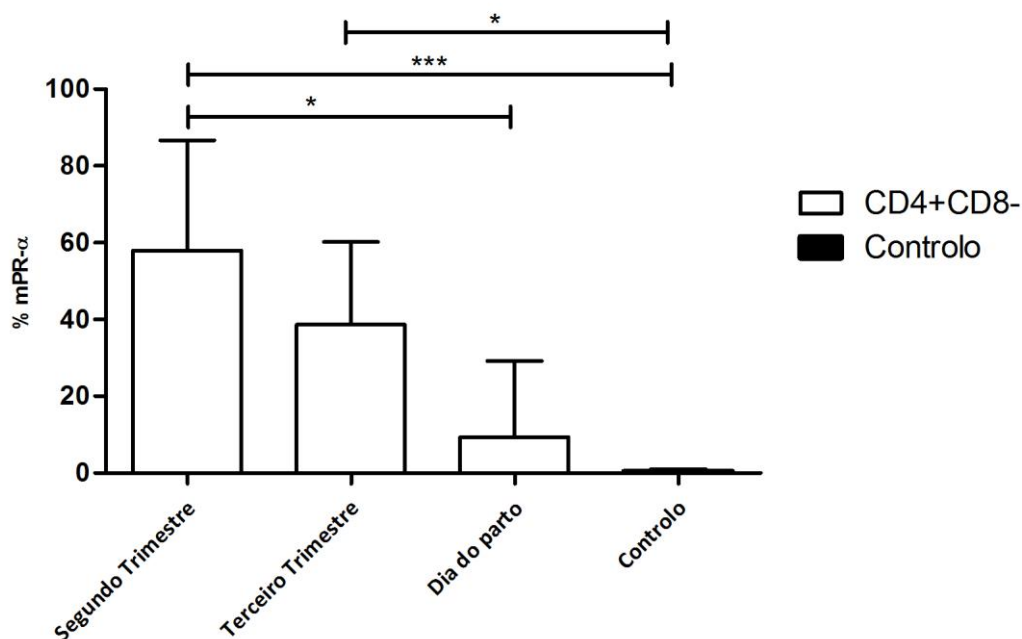


Figura 35- Percentagem da expressão do recetor mPR- α subpopulação linfocitárias CD4+CD8-, durante a gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios, com * $P \leq 0.05$ entre o segundo trimestre e o dia do parto e terceiro trimestre e controlo e *** $P \leq 0.001$ entre o segundo trimestre e o controlo.

No que concerne ao comportamento da população CD4-CD8- (Figura 36) que expressa do recetor membranar mPR- α , verificam-se diferenças estatisticamente significativas entre o terceiro trimestre 0,6% ($\pm 1,1$) e o controlo 26,4% ($\pm 22,1$), e ainda entre o dia do parto 1,9% ($\pm 6,0$) e o controlo 26,4% ($\pm 22,1$), sendo que no grupo das mulheres grávidas esta população é muito menor. No segundo trimestre a percentagem observada é de 1,5% ($\pm 1,9$),).

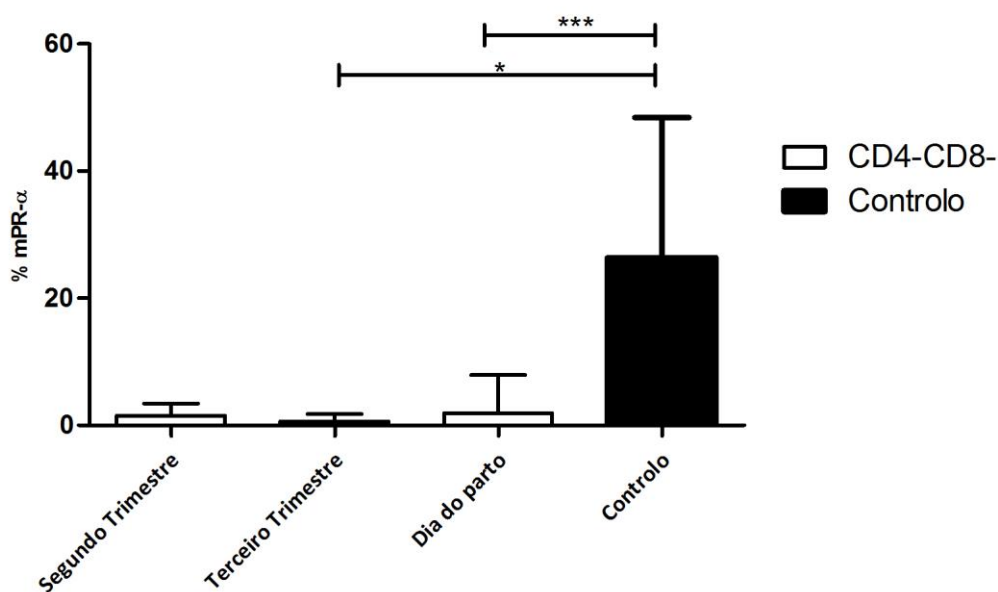


Figura 36 - Percentagem da expressão do recetor mPR- α subpopulação linfocitárias CD4-CD8-, durante a gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios, com *P \leq 0.05 entre o terceiro trimestre e o controlo e ***P \leq 0.001 entre o dia do parto e o controlo.

Tendo em conta a percentagem da população dupla positiva CD4+CD8+ (Figura 37) que expressam o recetor membranar os valores percentuais encontrados nas mulheres grávidas foram sempre superiores aos do grupo controlo, sendo que no segundo trimestre foram de 15,2% ($\pm 9,1$), no terceiro trimestre de 16,6% ($\pm 17,5$) e no dia do parto de 7,1% ($\pm 12,1$), apenas existindo diferenças estatisticamente significativas entre o segundo trimestre e o controlo 0,3% ($\pm 0,7$).

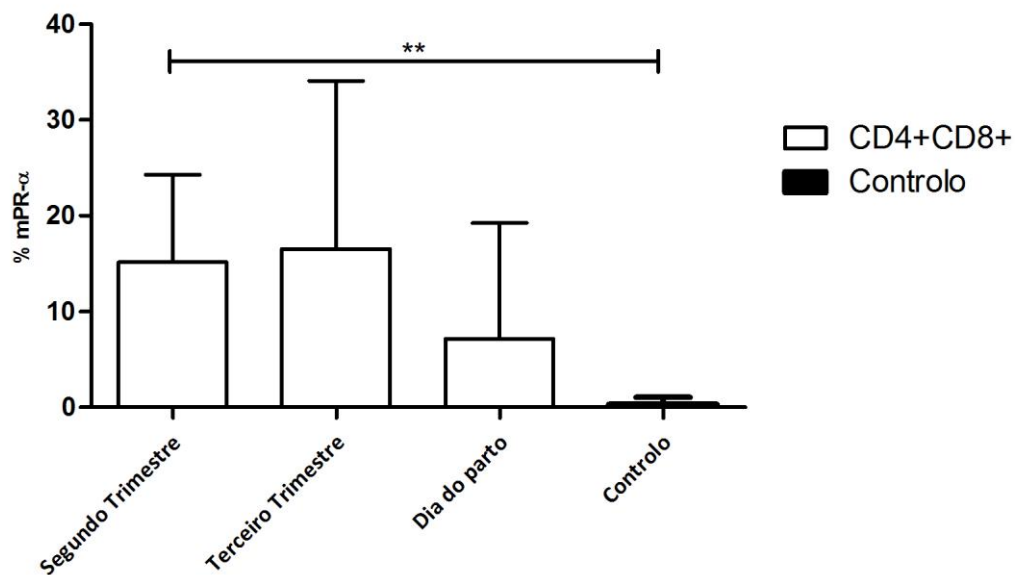


Figura 37 - Percentagem da expressão do recetor mPR- α subpopulação linfocitárias CD4+CD8+, durante a gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios, com $**P \leq 0.01$ entre o segundo trimestre e o controlo.

Em relação à subpopulação linfocitária CD56+CD8+ positiva para mPR α (Figura 38), verificam-se diferenças estatisticamente o terceiro trimestre 10,5% (\pm 14,4) e o dia do parto 1,2% (\pm 2,9), e entre o dia do parto e o controlo 32,8% (\pm 32,9) sendo que este apresenta um valor mais elevado quando comparado com as grávidas. No segundo trimestre encontram-se a 5,6% (\pm 4,2).

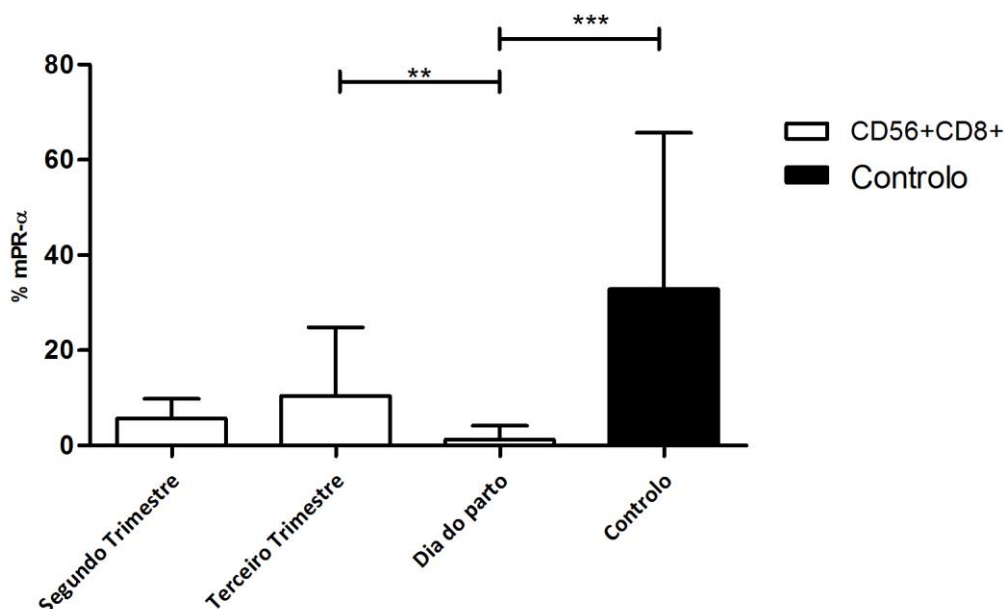


Figura 38- Percentagem da expressão do recetor mPR- α subpopulação linfocitárias CD56+CD8+, durante a gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios, com $**P \leq 0.01$ entre o terceiro trimestre e o dia do parto e $***P \leq 0.001$ entre o dia do parto e o controlo.

Por fim, quanto à percentagem da subpopulação linfocitária CD56+CD8- (Figura 39) positiva para o recetor membranar observa-se um perfil aproximadamente constante na sua percentagem ao longo da gravidez, sendo que no segundo trimestre a percentagem é de 6,7% ($\pm 3,8$), no terceiro trimestre de 6,7% ($\pm 8,9$), no dia do parto de 7,4% ($\pm 18,9$), porém não se verifica diferenças estatísticas relativamente ao controlo 11,7% ($\pm 16,8$) sendo esta, mais uma vez, representativa de uma maior percentagem.

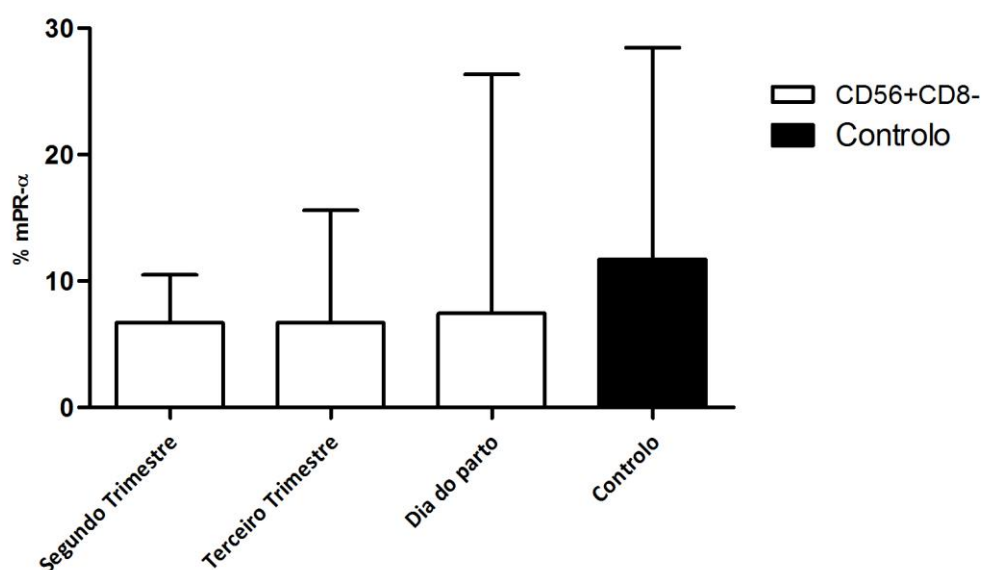


Figura 39 - Percentagem da expressão do recetor mPR- α subpopulação linfocitárias CD56+CD8-, durante a gravidez, ao longo da gravidez. Os resultados são expressos em percentagem por comparação do grupo de grávidas ao longo da gravidez com o grupo controlo. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste não-paramétrico ANOVA de Friedman seguido de um teste de Dunn *a posteriori*. Os resultados apresentam a média \pm o desvio padrão de dez ensaios, sem diferenças estatisticamente diferentes.

DISCUSSÃO

O interesse pelo estudo da resposta imunoinflamatória durante a gravidez, surgiu pelo desconhecimento dos fatores inerentes à tolerância imunológica, entre o feto e a mãe, durante a gestação e o despoletar do trabalho de parto (Sarafana & Coelho 2007)(Christiansen 2013).

Paralelamente, situações decorrentes de complicações ao longo da gravidez implicam um envolvimento/desregulação desta resposta pelo que o conhecimento da normalidade é de todo premente (Hemberger 2013)(Lashley et al. 2011)(Mendelson 2009)(Kobayashi 2012).

Durante a gravidez o sistema imunológico materno possui a capacidade de proteger a mãe contra infeções e paralelamente consegue a não rejeição do feto. Sendo assim, o sistema imunológico materno atua localmente na interface feto-materna, ao nível das células do sistema imunitário e ao nível dos seus mediadores quer ativadores quer bloqueadores. Para além do mais, tem sido reportado uma relação nas variações do perfil das populações linfocitárias relacionadas com o nível das hormonas, ao longo da gravidez, que afetam também a produção de citocinas envolvidas (Caucheteux et al. 2005).

1. Percentagem das populações major linfocitárias (T, B e NK) e suas subpopulações, durante a gravidez

Existem diversos estudos que exploram o papel da resposta imunoinflamatória local em diversos tecidos reprodutivos da mulher durante a gravidez, nomeadamente na placenta, decídua e miométrio. Neste sentido, e tendo em conta que este seria um objetivo indireto deste trabalho, além da caracterização da expressão do recetor mPR- α nas diversas populações linfocitárias foi também descrito o comportamento destas populações e subpopulações ao longo da gravidez.

Sendo o alvo do nosso estudo os linfócitos do sangue periférico, as populações major quando caracterizadas em termos percentuais revelam uma elevada percentagem de linfócitos T ($\approx 80\%$) (Figura 13) relativamente às outras populações linfocitárias em estudo

(Linfócitos B e NK) ($\approx 10\%$) ao longo da gravidez, como era espetável e concordante com estudos realizados. Uma vez que esta é a população maioritária da população de linfócitos, mesmo em mulheres não gestantes verifica-se que estas (grupo controlo) apresentam um valor ligeiramente maior comparativamente a todas as medições realizadas no grupo de grávidas, a que se deverá provavelmente à própria hemodiluição característica desta condição. Esta elevada percentagem de linfócitos T tem grande importância na manutenção da gravidez, favorecendo o crescimento da placenta e tolerância imunológica do feto e, conseqüentemente contribui para a sobrevivência fetal (van der Hoorn et al. 2014)(Sarafana & Coelho 2007).

Relativamente aos linfócitos B (Figura 14), verifica-se uma diminuição da percentagem desta população ao longo da gravidez, o que está em concordância com alguns estudos realizados por Lashley e Watanabe (Lashley et al. 2011) (Watanabe et al. 1997) e em discordância com outros autores que referem o contrário, como é o caso do estudo de Rolle (Rolle et al. 2013). No entanto esta diminuição poderá ser satisfatória por estar relacionada com a aceitação do feto, uma vez que, os linfócitos B estão associados à produção de anticorpos e conseqüentemente um aumento desses anticorpos poderia levar à rejeição do feto, sendo assim é espetável que esta população aumente dias depois do parto. Esta diminuição também poderá estar relacionada devido à supressão da atividade destes linfócitos, com conseqüente diminuição do clone, por parte dos linfócitos NK (Watanabe et al. 1997), o que está concordante com os resultados obtidos para as células NK, descritos em seguida.

Os linfócitos NK constituem 10–15% do sangue periférico, durante uma gravidez normal esta população linfocitária está diminuída no sangue periférico, este decréscimo poderá estar relacionado com alterações hormonais decorrentes da gravidez. principalmente causada pela hormona progesterona, ou seja esta população poderá ser hormono-dependente (Dosiou & Giudice 2005).

Considerando os valores percentuais de linfócitos NK (Figura 15), o que se verificou é que não existe um padrão constante ao longo da gravidez, quer de aumento quer de diminuição, tendo sofrido ligeiras oscilações. Estes resultados estão em concordância com alguns estudos descritos na literatura, sendo no entanto pouco expressivos uma vez que

não existem diferenças estatisticamente significativas entre as várias determinações. Neste sentido, verificou-se uma diminuição durante a gravidez, com um valor mais baixo no terceiro trimestre comparativamente ao controlo, o que parece fazer sentido se considerarmos que sendo uma população de natureza “assassin like”, deverá, numa gravidez normal estar diminuída caso contrário seria corresponsável pela “rejeição” do feto. Assim, o facto de no dia do parto este valor estar mais alto e próximo do grupo controlo, vem mais uma vez de encontro a este linha de pensamento e também com o que está escrito na literatura sobre a sua influência em situação de aborto (Watanabe et al. 1997)(Dosiou & Giudice 2005). Para além disso a diminuição desta população linfocitária durante a gravidez está relacionada com a suscetibilidade das grávidas a infeções (Sarafana & Coelho 2007)(van der Hoorn et al. 2014).

Estudos em células NK da decídua, referem a sua capacidade de manter uma imunotolerância e prevenir a resposta inflamatória na interface feto-materna. Esta população está relacionada com a supressão dos linfócitos T helper, nomeadamente Th17, células estas que contribuem para uma resposta inflamatória na decídua e para a possibilidade de patologia durante a gravidez (Fu et al. 2013).

Considerando as subpopulações linfocitárias T (Figura 22-Figura 25), pouco ou nada está descrito sobre o seu perfil ao longo da gravidez, no entanto obteve-se cerca de 50% de linfócitos Th (CD4+CD8-), cerca de 35% de linfócitos Tc (CD4-CD8+) e 5% de linfócitos T imaturos (CD4+CD8+ e CD4-CD8-). Segundo o autor Mikio, os linfócitos Tc encontram-se diminuídos no início da gravidez, uma vez que a sua atividade parece ser diminuída no início da gravidez, sendo esta diminuição também importante para a manutenção da gravidez e para a supressão de doenças autoimunes (Watanabe et al. 1997). Abordando agora a subpopulação NK (Figura 26-Figura 27), através dos resultados obtidos não é possível tirar conclusões elucidativas devido há variação no perfil destas células ao longo do parto, de notar que a subpopulação NK (CD56+CD8-) se encontra em maior percentagem relativamente à subpopulação NK (CD56+CD8+). Segundo Mikio, os linfócitos Tc encontram-se diminuídos em número e função no início da gravidez, sendo esta diminuição também importante para a manutenção da gravidez (Watanabe et al. 1997).

2. Expressão do recetor mPR- α em termos de percentagem e MIF em cada uma das populações linfocitárias e nas suas subpopulações, ao longo da gravidez

A descoberta de três recetores membranares (mPR- β , mPR- γ e mPR- α), originalmente na truta do mar e posteriormente no sistema reprodutor feminino, veio mostrar que a progesterona não só exerce efeitos genomicamente através da sua ligação a recetores nucleares da progesterona, mas também exerce os seus efeitos por vias não genómicas, através da sua ligação a recetores membranares, que parecem encontrar-se na superfície celular (Thomas 2008)(Chien et al. 2009). Além disso, verificaram que existe um predomínio da isoforma mPR- α no sistema reprodutor feminino relativamente aos recetores mPR- β ou mPR- γ , sublinhando assim a importância desta isoforma nos tecidos gestacionais (Fernandes et al. 2005)(Dosiou & Hamilton 2008). No entanto, como já foi referido existem muito poucos estudos relativamente à expressão deste recetor mPR- α , nas células do sistema imunológico em sangue periférico, nomeadamente noutras populações celulares que não as T.

Ainda assim, existem estudos que sugerem que o bloqueio do *intake* da progesterona por parte das células pode ocorrer devido a alterações nos níveis do seu recetor (Behrman & Butler 2006)(Ndiaye et al. 2012)(Zachariades et al. 2012). Seria assim vantajoso analisar as alterações na expressão do recetor mPR- α nas várias populações linfocitárias, ao longo da gravidez, uma vez que, os níveis de progesterona sistémica, poderão estar na base da transição do estado anti-inflamatório no início da gravidez, para o estado pro-inflamatório, no final da gravidez.

Como é possível observar nos resultados deste estudo, relativamente, por um lado, à percentagem de células que expressam o recetor membranares mPR α , por outro em termos de MIF do próprio recetor ao longo da gravidez, a expressão deste recetor e a percentagem de células que o expressam, diminui de uma forma acentuada ao longo da gravidez e com diferenças estatisticamente significativas em cada estadio. Estes resultados corroboram o que seria espetável, pois existe uma transição entre um estado anti-inflamatório e um estado pro-inflamatório que é mediado pelas propriedades anti-inflamatórias da progesterona. Os efeitos inibitórios da progesterona na proliferação dos linfócitos T já foram reportados por Cannon (Ndiaye et al. 2012). A literatura tem reportado que existe uma flutuação nas concentrações dos mPR nos tecidos reprodutivos

e não reprodutivos orquestrada pelas alterações nas concentrações das hormonas esteroides (Thomas & Pang 2013). Durante a gravidez os níveis de progesterona mantêm-se elevados ainda assim verificou-se uma modulação na expressão deste recetor. Neste sentido o conhecimento e caracterização da expressão deste recetor em várias populações e subpopulações celulares é importante pois só assim poderemos perceber o seu papel em fenómenos patológicos. Relativamente às subpopulações linfocitárias, o mesmo se verifica entre as duas subpopulações linfocitárias.

Relativamente aos resultados das subpopulações que expressam o recetor mPR- α no caso dos linfócitos Th (CD4+CD8-) também se verificou um valor percentual e de MIF mais elevado nas grávidas comparativamente ao controlo. Ao longo da gravidez foi visível um decréscimo da percentagem de células Th (CD4+CD8-) que expressam o mPR- α e, tratando-se a gravidez de um fenómeno essencialmente Th2, leva a crer que efetivamente há uma relação entre a ação da progesterona por intermédio deste recetor e que a liga às principais células do sistema imunitário.

CONCLUSÃO

Com a realização deste estudo pode-se concluir que, todas as células do sistema imunológico sofrem alterações na gravidez relativamente ao controlo de não-grávidas na tentativa de criar um ambiente imuno-tolerante, permitindo a quiescência uterina e assim aceitação do feto. Desta forma favorece-se todo um ambiente anti-inflamatório no início da gravidez, para mais tarde se desencadear um processo pro-inflamatório com objetivo de expulsar o feto por intermédio do amadurecimento cervical, rotura de membranas e contrações uterinas.

Este estudo torna-se importante e inovador pelo facto de demonstrar que existe expressão do recetor mPR- α nas populações major linfocitárias de sangue periférico, e não só nos linfócitos T como até então tinha sido descrito, e poderá vir a ser uma mais-valia à compreensão dos processos envolvidos durante a gravidez e em processos patológicos decorrentes de uma gravidez.

É também evidente que existe uma imunomodulação da expressão do recetor mPR- α ao longo da gravidez, estando assim dependente das células do sistema imunitário e das hormonas libertadas durante a gravidez, mais propriamente, a progesterona.

Esta imunomodulação é verificada pela diminuição da expressão do recetor membranar ao longo da gravidez, com menor valor no dia do parto, nas populações *major* linfocitárias, o que pode evidenciar a transição de um estado anti-inflamatório para um estado pro-inflamatório (na altura do parto), mediado pelas propriedades anti-inflamatórias da progesterona e por todas as células envolvidas na resposta inflamatória.

Desta forma, há necessidade de desenvolver mais estudos que relacionem a gravidez com o sistema imunológico, com o recetor membranar mPR- α , hormonas como a progesterona e sublinhando também, a necessidade de avaliar o perfil de citocinas durante cada período da gravidez, uma vez que, são também estes mediadores que vão ativar ou bloquear as células do sistema imunológico estando assim todos estes fatores interligados.

A realização de estudos que melhor caracterizem esta modulação da expressão do

recetor nas várias populações linfocitárias e que explorem a via membranar, de mais rápida atuação, possivelmente através de ensaios *in vitro*, serão muito úteis na compreensão desta temática.

O desenvolvimento de novos procedimentos terapêuticos para a manutenção da gravidez e para o tratamento e compreensão dos mecanismos envolvidos nas diversas patologias é de extrema importância a nível clínico, uma vez que as estratégias para a prevenção ou tratamento de intercorrências da gravidez não se têm revelado eficazes (Norman et al. 2007)(Christiansen 2013). Para além disto, há necessidade de perceber como opera a manutenção da gravidez normal no seu todo, pois também poderá ajudar no desenvolvimento de novas terapêuticas (Hemberger 2013)(Lashley et al. 2011)(Mendelson 2009)(Kobayashi 2012), a aplicar no caso de patologias que podem ocorrer numa gravidez.

Referências Bibliográficas

- Abbas, A., Lichtman, A. & Pillai, S., 2007. *Cellular and molecular immunology* 6 TH., Saunders Elsevier.
- Arababadi, M. & Aminzadeh, F., 2012. Cytokines in Preterm Delivery. *Labmedicine*, 43. Available at: <http://labmed.ascpjournals.org/content/43/4/27.short> [Accessed January 3, 2014].
- Arck, P.C. & Hecher, K., 2013. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nature Medicine*, 19(5), pp.548–556. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3160>.
- Arosa, F., Cardoso, E. & Pacheco, F., 2012. *Fundamentos de imunologia* Segunda. Lidel, ed.,
- Ayatollahi, M., Geramizadeh, B. & Samsami, A., 2005. Transforming growth factor beta-1 influence on fetal allografts during pregnancy. *Transplantation proceedings*, 37(10), pp.4603–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16387180>.
- Becton, M. & Dickinson, F., 2010. Novel multicolor flow cytometry tools for the study of CD4+T-cell differentiation and plasticity. Available at: bdbiosciences.com.
- Behrman, R. & Butler, A., 2006. *Preterm birth: causes, consequences, and prevention*, Available at: http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=9c_7kxBsKzIC&oi=fnd&pg=PR1&dq=Preterm+Birth:+Causes,+Consequences,+Prevention&ots=3deGouYLhr&sig=Ial9CDPv-i-d1-wApVk8w_Wm8u4k [Accessed November 23, 2013].
- Berkow, R., Manual Merck de Informação Médica - Saúde Para a Família. *Problemas de Saúde da Mulher*, p.Capítulo 249– Seção 22. Available at: http://mmspf.msdonline.com.br/pacientes/manual_merck/secao_22/cap_249.html.

- Biosciences, B., 2013. Flow cytometry tools for the study of B-cell biology.
- Byrns, M.C., 2013. Regulation of progesterone signaling during pregnancy: Implications for the use of progestins for the prevention of preterm birth. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23410596>.
- Caucheteux, S.M., Gendron, M.-C. & Kanellopoulos-Langevin, C., 2005. Pregnancy-induced alterations of B cell maturation and survival are differentially affected by Fas and Bcl-2, independently of BcR expression. *International immunology*, 17(1), pp.55–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15569774> [Accessed July 30, 2014].
- Cheng, M. et al., 2012. Natural killer cell lines in tumor immunotherapy. *Frontiers of medicine*, 6(1), pp.56–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22460449>.
- Chien, C.H. et al., 2009. Mifepristone acts as progesterone antagonist of non-genomic responses but inhibits phytohemagglutinin-induced proliferation in human T cells. *Human reproduction (Oxford, England)*, 24(8), pp.1968–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19401324> [Accessed March 19, 2014].
- Christiansen, O.B., 2013. Reproductive immunology. *Molecular Immunology*, 55(1), pp.8–15. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2012.08.025>.
- Cotran, R., Kumar, V. & Robbins, S., 2010. *Patologia: bases patológicas das doenças* 8ª edição., Elsevier Inc. Available at: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Patologia+Bases+Patologicas+da+Doencas#1> [Accessed April 19, 2014].
- Delves, P. et al., 2013. *Fundamentos de imunologia 12ª edição* Guanabara Koogan Ltda., ed.,
- Dosiou, C. & Giudice, L., 2005. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocrine Reviews*, pp.44–62.

Available at: <http://edrv.publicaciones.saludcastillayleon.es/content/26/1/44.short>
[Accessed January 7, 2014].

Dosiou, C. & Hamilton, A., 2008. Expression of membrane progesterone receptors on human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone. *Journal of Endocrinology*, 196, pp.67–77. Available at: <http://joe.endocrinology-journals.org/content/196/1/67.short> [Accessed April 19, 2014].

eBioscience, Natural Killer (NK) and Natural Killer T (NKT) Cells. Available at:
<http://www.ebioscience.com/cell-type/nk-and-nkt-cells.htm>.

Erlebacher, A., 2013. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annual review of immunology*, 31, pp.387–411. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23298207>.

Fernandes, M.S. et al., 2005. Regulated expression of putative membrane progesterin receptor homologues in human endometrium and gestational tissues. *The Journal of endocrinology*, 187(1), pp.89–101. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16214944> [Accessed November 16, 2013].

Fu, B. et al., 2013. Natural killer cells promote immune tolerance by regulating inflammatory TH17 cells at the human maternal-fetal interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(3), pp.E231–40. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3549088&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 30, 2014].

Guerin, L.R., Prins, J.R. & Robertson, S. a, 2009. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Human reproduction update*, 15(5), pp.517–35. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2725755&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Hemberger, M., 2013. Immune balance at the foeto-maternal interface as the fulcrum of reproductive success. *Journal of reproductive immunology*, 97(1), pp.36–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432870>.
- Hill, R., 2010. *Cytokine index Third Edition*, PeproTech Inc.
- Van der Hoorn, M.-L.P. et al., 2014. Differential immunoregulation in successful oocyte donation pregnancies compared with naturally conceived pregnancies. *Journal of reproductive immunology*, 101-102, pp.96–103. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24029471> [Accessed April 19, 2014].
- Huber, A. et al., 2002. Transforming growth factor-beta 1 serum levels in pregnancy and pre-eclampsia. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 81(2), pp.168–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11942909>.
- Kelder, J. et al., 2010. Comparison between steroid binding to membrane progesterone receptor and to nuclear progesterone receptor: Correlation with Physicochemical Properties Assessed by Comparative Molecular Field Analysis and Identification of mPR α -. *Steroids*, 75, pp.314–322. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2858063/> [Accessed April 19, 2014].
- Kobayashi, H., 2012. The entry of fetal and amniotic fluid components into the uterine vessel circulation leads to sterile inflammatory processes during parturition. *Frontiers in immunology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3478564/> [Accessed April 19, 2014].
- Lai, J.-N. et al., 2012. The non-genomic rapid acidification in peripheral T cells by progesterone depends on intracellular calcium increase and not on Na⁺/H⁺-exchange inhibition. *Steroids*, 77(10), pp.1017–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22449718> [Accessed July 30, 2014].
- Lashley, L.E.E.L.O. et al., 2011. Changes in cytokine production and composition of peripheral blood leukocytes during pregnancy are not associated with a difference in the proliferative immune response to the fetus. *Human immunology*, 72(10),

- pp.805–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708204> [Accessed March 22, 2014].
- Lee, S. et al., 2010. Fluctuation of peripheral blood T, B, and NK cells during a menstrual cycle of normal healthy women. *Journal of immunology*, 185(1), pp.756–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530263>.
- Lund, F., 2008. Cytokine-producing B lymphocytes—key regulators of immunity. *Current opinion in immunology*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952791508000277> [Accessed December 8, 2013].
- Luo, G., Abrahams, V. & Tadesse, S., 2010. Progesterone inhibits basal and TNF- α -induced apoptosis in fetal membranes: a novel mechanism to explain progesterone-mediated prevention of preterm birth. *Reproductive sciences*, 17, pp.532–539. Available at: http://rsx.sagepub.com/search/results?fulltext=Progesterone+Inhibits+Basal+and+TNF-alpha-Induced+Apoptosis+in+Fetal+Membranes%3A+A+Novel+Mechanism+to+Explain+Progesterone-Mediated+Prevention+of+Preterm+Birth&x=0&y=0&submit=yes&journal_set=sprsx&src=selected&andorexactfulltext=and [Accessed September 2, 2013].
- Massagué, J., 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759503>.
- Mendelson, C., 2009. Minireview: fetal-maternal hormonal signaling in pregnancy and labor. *Molecular Endocrinology*. Available at: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/me.2009-0016> [Accessed March 22, 2014].
- Mesiano, S., Wang, Y. & Norwitz, E.R., 2011. Progesterone receptors in the human pregnancy uterus: do they hold the key to birth timing? *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 18(1), pp.6–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20889955> [Accessed November 16, 2013].

- Murphy, K., 2011. *Janeway's immunobiology* 8th ed., Garland Science.
- Murphy, K., 2012. *Janeway's Immunobiology 8th Ed.*, Available at: http://www.libreriasaulamedica.com/Janeways-Immunobiology-8th-Ed._9780815342434_270899 [Accessed December 30, 2013].
- Ndiaye, K. et al., 2012. Progesterone effects on lymphocytes may be mediated by membrane progesterone receptors. *Journal of reproductive immunology*, 95(1-2), pp.15–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22709513> [Accessed March 19, 2014].
- Nickisch, K. et al., 2013. Synthesis and antiprogesterone properties of novel 17-fluorinated steroids. *Steroids*, 78(9), pp.909–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23607964> [Accessed October 16, 2013].
- Norman, J.E. et al., 2007. Inflammatory pathways in the mechanism of parturition. *BMC pregnancy and childbirth*, 7 Suppl 1, p.S7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22233348>.
- O'Reilly, B., Bottomley, C. & Rymer, J., 2008. *Livro de Bolso de Ginecologia e Obstetricia*, Lusididacta.
- Oertelt-Prigione, S., 2012. Immunology and the menstrual cycle. *Autoimmunity reviews*, 11(6-7), pp.A486–A492. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2011.11.023> [Accessed March 19, 2014].
- Pařízek, A., Koucký, M. & Dušková, M., 2013. Progesterone, inflammation and preterm labor. *The Journal of steroid biochemistry and Molecular Biology*, pp.1–7. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076013000393> [Accessed April 19, 2014].
- Pařízek, A., Koucký, M. & Dušková, M., 2013. Progesterone, inflammation and preterm labor. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23454115>.

- Peltier, M., 2003. Immunology of term and preterm labor. *Reprod Biol Endocrinol*, 11, pp.1–11. Available at: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1477-7827-1-122.pdf> [Accessed March 19, 2014].
- Piccinni, M., 2006. T cells in normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. *Reproductive biomedicine online*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472648310610334> [Accessed January 8, 2014].
- Pinto, A., 2013. *Fisiopatologia - Fundamentos e aplicações*, LIDEL - Edições Técnicas, Lta.
- Prins, J.R., Gomez-Lopez, N. & Robertson, S. a, 2012. Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders. *Journal of reproductive immunology*, 95(1-2), pp.1–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22819759>.
- Robbins, S. & Cotran, R., 2005. *Pathologic basis of disease* Seventh., Elsevier Inc. Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8051305> [Accessed July 19, 2014].
- Robertson, S. & Guerin, L., 2009. Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy—the contribution of seminal fluid. *Journal of reproductive immunology*, 83, pp.109–116. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165037809004409> [Accessed January 8, 2014].
- Roitt, I., 2001. *Essential immunology 10th ed*,
- Rolle, L. et al., 2013. Cutting edge: IL-10-producing regulatory B cells in early human pregnancy. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 70(6), pp.448–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24118333>.
- Romero, R. et al., 2006. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 11(5), pp.317–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16839830> [Accessed March 31, 2014].

- Romero, R. & Espinoza, J., 2006. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1744165X06000540> [Accessed December 15, 2013].
- Sarafana, S. & Coelho, R., 2007. Aspectos da imunologia da gravidez - artigo de revisão. *Acta Medica Portuguesa*, 20, pp.355–358. Available at: <http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/865> [Accessed October 16, 2013].
- Sheely, 2001. *Enfermagem de Urgência - Da Teoria à Prática 4.ª ed* Lusodidacta, ed.,
- Stemcell Technologies inc., 2011. Fast and Easy Isolation Of B Cell. *Stemcell Technologies*. Available at: <http://www.stemcell.com>.
- Stewart, G.S. & Cooley, D., 2004. *The Immune System*, Chelsea House.
- Thomas, P., 2008. Characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progesterin actions. *Frontiers in neuroendocrinology*, 29(2), pp.292–312. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2600886&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 29, 2013].
- Thomas, P. & Pang, Y., 2013. Protective actions of progesterone in the cardiovascular system: potential role of membrane progesterone receptors (mPRs) in mediating rapid effects. *Steroids*, 78(6), pp.583–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23357432> [Accessed July 31, 2014].
- UniProtKB, Membrane progesterin receptor alpha. Available at: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q86WK9>.
- Vacca, P., Mingari, M. & Moretta, L., 2013. Natural killer cells in human pregnancy. *Reproductive Immunology*, 97, pp.14–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432867> [Accessed January 7, 2014].

- Vivier, E. & Ugolini, S., 2010. NK cells: receptors and functions. *Nature Reviews Immunology*. Available at: http://xa.yimg.com/kq/groups/16749867/1941730882/name/nri1012_nkcells_poster.pdf [Accessed January 7, 2014].
- Watanabe, M. et al., 1997. Changes in T, B, and NK Lymphocyte Subsets During and After Normal Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, pp.368–377.
- Wood, P., 2006. *Understanding immunology second edition* second edi. Pearson Education Limited 2001, ed.,
- Young, H. a & Ortaldo, J., 2006. Cytokines as critical co-stimulatory molecules in modulating the immune response of natural killer cells. *Cell research*, 16(1), pp.20–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16467872>.
- Zachariades, E. et al., 2012. Changes in placental progesterone receptors in term and preterm labour. *Placenta*, 33(5), pp.367–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22341631> [Accessed November 16, 2013].
- Zugaib, 2008. *Obstetricia* 1.^a ed., Editora Manole.