

# Estudo-piloto: células NK nas gestantes com LES

Alessandra Cardoso Pereira<sup>1</sup>, Mônica Cristina Brandão dos Santos Lima<sup>2</sup>, Nilson Ramires de Jesús<sup>3</sup>,  
Marcus Montello França<sup>4</sup>, Homero da Silva Nahum Junior<sup>5</sup>, Roger Abramino Levy<sup>6</sup>

## RESUMO

O sistema imune inato desempenha papel central na reprodução, tendo as células NK participação marcante. Durante a gravidez, seu comportamento pode esclarecer pontos cruciais na patogênese das complicações que podem ocorrer em gestantes com LES. **Objetivo:** Quantificar as células NK circulantes e sua viabilidade em gestantes com LES. **Material e métodos:** Avaliaram-se amostras de sangue de quatro grupos de dez pacientes cada: 1 GLES: Gestantes com LES; 2 PLES: Pacientes com LES não gestantes; 3 Gcontroles: Gestantes controles; 4 Controles: Mulheres não gestantes saudáveis. Em todas as pacientes, a quantidade e a viabilidade das células NK foram medidas por citometria de fluxo, assim como por apoptose total por coloração para anexina V e iodeto de propidium. **Resultados:** Devido à variabilidade dos resultados, a mediana de cada grupo foi utilizada para avaliar: porcentagem CD56<sup>+</sup> [GLES (0,10), PLES (0,12), Gcontroles (0,15), Controles (0,08)]; apoptose total [GLES (0,06), PLES (0,04), Gcontroles (0,11), Controles (0,11)]. Os resultados da contagem de células vivas tiveram baixa variabilidade, por isso média e desvio-padrão foram utilizados para comparação: [GLES (0,91 ± 0,06), PLES (0,95 ± 0,03), Gcontroles (0,86 ± 0,11), Controles (0,88 ± 0,08)]. **Conclusão:** Apesar de não terem alcançado valor de significância estatística, o percentual de apoptose total nos grupos com LES foi menor que o dos controles, e a porcentagem de células vivas foi maior. Isso sugere que, em pacientes com LES, grávidas ou não, as células NK têm vida útil prolongada (ou tem *turnover* menor/diferente), o que indica um maior estímulo imune, fazendo com que as células NK levem mais tempo para ativar o processo de apoptose.

**Palavras-chave:** gravidez; lúpus eritematoso sistêmico; células NK.

## INTRODUÇÃO

### Células NK

As células NK são um subtipo de células mononucleares morfológicamente distintas dos linfócitos B e T, em virtude de sua densidade granular aumentada. Células NK participam de imunoregulação, hematopoiese, reprodução e interação neuroendócrina. Também desempenham papel significativo na defesa do hospedeiro contra certos micro-organismos, em parte por meio de sua capacidade para secretar citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF, e GM-CSF,<sup>1</sup>entre outras.<sup>2</sup>

São capazes de produzir citocinas, pró e anti-inflamatórias, e levar à morte da célula-alvo por apoptose. Dessa forma, apresenta implicações na patogênese de várias doenças humanas. Pela natureza da produção de citocinas, as células NK fazem parte da regulação da produção de anticorpos dependentes das células T nas doenças autoimunes. Uma redução na atividade das células NK é vista no LES. Dessa maneira, a modulação da atividade das células NK pode ser importante na patogênese e no controle das doenças autoimunes, infecciosas, e neoplásicas.<sup>3</sup>

Recebido em 26/06/08. Aprovado, após revisão, em 28/04/09. Os autores declaram ter recebido apoio financeiro do FAPERJ E-26/170.034/06, 2006.

Disciplina de Reumatologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (UERJ) e disciplina de Obstetrícia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (UERJ)

1. Professora Assistente da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina (UNIGRANRIO) e mestranda de Ciências Médicas do PGCM (UERJ)

2. Professora Bióloga da Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Patologia Geral, Laboratório de Imunopatologia (UERJ)

3. Professor Assistente da disciplina de Obstetrícia da Faculdade de Ciências Médicas (UERJ)

4. Residente da disciplina de Oftalmologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (UERJ)

5. Professor da disciplina de Bioestatística (Universidade Estácio de Sá)

6. Professor Adjunto da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Ciências Médicas (UERJ)

Endereço para correspondência: Alessandra Cardoso Pereira. Rua Marechal Bitencourt, 184, apt. 601, Bl. 1, Riachuelo, Rio de Janeiro - RJ. CEP: 20950-200.

Tel: (11) 9948-0820 FAX: (11) 2567-7530. Email: lelecpereira@gmail.com

## Células NK na gestação

O período gestacional representa um modelo único na natureza. Compreende um estado imunológico altamente complexo, com frequente exacerbação de enfermidades ou alterações preexistentes. Do ponto de vista imunológico, tem sido um grande desafio tentar entender quais os mecanismos envolvidos na não rejeição da placenta pelo sistema imunológico materno, já que ela, por ser de origem embriônica, contém material genético tanto materno como paterno.<sup>4</sup>O sistema imune inato está ativo na gravidez e, devido à relativa supressão da imunidade adaptativa, pode assumir papel relevante na defesa imune materna.<sup>5</sup>Além disso, o sistema imune inato tem um papel de influência dominante sobre a reprodução. Análises dos tipos celulares que estão presentes no local da implantação do óvulo mostram que as células T e B, típicas do sistema imune adaptativo, são raras, enquanto o predomínio populacional consiste de células NK.<sup>6</sup> Os principais tipos de células imunes no endométrio secretório são as células T, células NK e os macrófagos. As células T compreendem aproximadamente 45% dos leucócitos na fase proliferativa do endométrio, e esse número se mantém constante em toda a fase secretória e na gestação. Contudo, seu número aparentemente diminui devido ao grande aumento das células NK durante a fase secretória e no início da gravidez.<sup>7</sup>Várias observações sugerem que as células NK uterinas têm um importante papel na reprodução: são reguladas por hormônios, aumentando em número durante a fase lútea do ciclo menstrual, quando ocorre a implantação; estão presentes no início da gestação na ocasião em que as células trofoblásticas invadem as arteríolas espiraladas. São particularmente abundantes em torno da infiltração fetal derivada de células trofoblásticas extravilosas. Células NK (CD56<sup>+</sup>) proliferam ativamente na decídua, durante a fase lútea. Nessas fases, outros elementos da mucosa (glândulas epiteliais e células do estroma) cessam a proliferação e dão início à diferenciação, exceto pelas células endoteliais, que continuam a proliferar nessa ocasião. Contudo, o estímulo para a proliferação *in vivo* da célula NK ainda é desconhecido.<sup>8</sup> As NK da decídua estão em contato íntimo com trofoblasto da interface fetal e da materna. Entretanto, as NK da decídua não exercem ação citolítica contra as células trofoblásticas. Vários estudos têm mostrado que a citotoxicidade geral das NK da decídua é reduzida, quando comparada com as células NK do sangue periférico.<sup>9</sup>

## Gestação no LES

Por muitos anos, pacientes com LES foram advertidas para não engravidar, mas, com o maior conhecimento dos mecanismos

de fisiopatologia da doença e das manifestações clínicas durante a gravidez, associado aos cuidados médicos, a gravidez tem sido um evento normal na mulher com LES. Normal, mas não monótono. A gravidez da paciente com lúpus continua sendo uma gestação de alto risco, embora a maior parte das mulheres não apresente grandes complicações.<sup>10</sup> A doença autoimune fundamentalmente representa um distúrbio da reatividade imune, alterando a tolerância contra várias substâncias que passam a se comportar como autoantígenos. De modo semelhante, o sucesso da gravidez depende da tolerância materna ou da não reatividade imune contra antígenos paternos. A tolerância materna parece estar associada ao desenvolvimento de diversos mecanismos específicos que protegem o feto dos ataques citotóxicos imunes maternos.<sup>11</sup>

## Células NK no LES

Desde 1980, muitas evidências têm sido coletadas sugerindo associação entre a diminuição do número e da atividade das células NK e as doenças autoimunes. Em um estudo realizado com 71 pacientes com LES, verificou-se que o número de células NK (CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>) no sangue periférico desses pacientes foi apenas um terço dos níveis dos controles – uma diferença altamente significativa. A proporção de células NK no sangue periférico foi significativamente menor em pacientes com doença moderada ou grave, comparada com pacientes que estavam com doença fora de atividade, e mais deprimida em pacientes com nefrite lúpica grave.<sup>1</sup>Green *et al.* verificaram baixos níveis de atividade da célula NK em parentes de primeiro grau de pacientes com LES, sugerindo que a correlação da deficiência de célula NK com a atividade do paciente é importante na patogênese da doença e não é secundária ao processo da doença ou ao tratamento com drogas. Essa deficiência foi tanto no número como na função da célula.<sup>12</sup>

No LES, as células NK parecem sofrer alterações em relação à quantidade e à citotoxicidade, o que está relacionado com sua patogênese e, até o momento, não se verificou como essas células se apresentam durante a gestação no LES. Talvez um melhor controle da resposta imune seja a chave para evitar que a maioria das pacientes com LES entre em atividade da doença durante a gestação. Este estudo-piloto teve como objetivo avaliar a quantidade e o ciclo vital de células NK no sangue periférico e tentar correlacionar com a atividade da doença.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto e pelo

Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade-Escola da UFRJ, e tem inscrição no SISNEP.

Avaliamos quatro grupos de estudo. Grupo 1) gestantes com LES (GLES), que foi o grupo-alvo, e os outros três grupos controles; Grupo 2) gestantes sem doenças autoimunes (Gcontroles); Grupo 3) mulheres com LES (PLES); Grupo 4) mulheres sem doenças autoimunes (Controles). A atividade do LES foi avaliada pelo SLEPDAI<sup>13</sup> em gestantes e pelo SELENA-SLEDAI<sup>14,15</sup> em não gestantes. Cada grupo foi formado por dez mulheres em idade fértil, com exceção do grupo Controles, que tinha 11 indivíduos. O critério de inclusão foi: gestantes portadoras de LES que iniciaram o acompanhamento gestacional com até, no máximo, vinte semanas de gestação, e os grupos gestantes controles, pacientes com LES e controles pareados para idade e cor da pele. Os critérios de exclusão foram: 1) mais de vinte semanas de gestação no momento da coleta do material (sangue e urina) para estudo; 2) mulheres não gestantes com mais de 40 anos (não se encontravam em idade fértil); 3) portadoras de LES associada à outra doença autoimune, excetuando síndrome anticorpo antifosfolípideo; 4) processos infecciosos que requereram tratamento com antibioticoterapia sistêmica até sete dias antes do ingresso no estudo. No grupo PLES, foram aceitas somente pacientes que usassem, para tratamento do LES, prednisona (Pred), difosfato de cloroquina (CQN)/hidroxicloroquina (HCQ) e azatioprina (AZA), por serem as medicações mais comumente usadas para tratamento do LES na gestação. No dia da coleta de sangue e da amostra de urina, aplicou-se um questionário às pacientes, para avaliar fatores que poderiam interferir na resposta imune: febre, resfriado, alergias, uso de medicação, atividade física, exposição a sol e banho de mar, tabagismo, uso de bebida alcoólica e estado de humor.

Para determinação do número total de células NK, 50 µL de sangue (contendo, no máximo,  $0,5 \times 10^6$  células/mL por tubo) foram corados com 3 µL de anti-CD56-PE (BD 347747 Califórnia, EUA) e incubados por vinte minutos a 4 °C. Em seguida, as hemácias foram lisadas com *Quicklyse* (Cytognos, Salamanca, Espanha) por 15 minutos e as células restantes foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada pH 7,2 gelado. Logo após, as células foram centrifugadas por três minutos a 400 x g. Para a quantificação do percentual de apoptose nas células NK (CD56<sup>+</sup>), utilizou-se o *kit* de detecção de apoptose da *BD Pharmingen*<sup>TM</sup> (Califórnia, EUA), que cora com anexina V e iodeto de propidium. Neste ensaio, a apoptose é quantificada por meio da detecção de fosfatidilserina exposta na superfície de células apoptóticas usando anexina V, que tem afinidade por ela,<sup>16</sup> e o PI detecta células vivas ou mortas. As células, então, foram ressuspendidas em 300 µL de solução salina

tamponada; 2,5 µL de anexina-V-FITC e 2,5 µL de PI (FL-3) foram adicionados, seguidos de homogeneização e incubação por 15 minutos em câmara escura. Após a incubação, foram adicionados 300 µL de solução salina tamponada às células, as quais foram processadas e adquiridas no citômetro *FACSCalibur* (BD Biosciences, Califórnia, EUA) no máximo em uma hora. Foram adquiridos 10 mil eventos nos canais FL-1, FL-2 e FL-3. A análise foi realizada com lógica multiparamétrica para visualizar o movimento de migração das células vivas para aquelas em apoptose (inicial e tardia) e mortas. Utilizou-se o programa *Paint 'A' Gate* para essa análise e a quantificação dessas populações.

A avaliação estatística foi dividida em análise descritiva e inferencial; a primeira teve como objetivo caracterizar os grupos investigados, enquanto, com a realização das inferências, buscou-se compará-las para a identificação de possíveis diferenças estatísticas, sempre tendo o valor de  $\alpha = 0,05$ .

A análise descritiva levou às estimativas de medidas de localização (média e mediana) e dispersão (desvio-padrão e coeficiente de variação) para as variáveis quantitativas (idade, CD56<sup>+</sup>%, CD56<sup>+</sup> absoluta/mm<sup>3</sup>, célula viva, apoptose inicial, apoptose tardia, célula morta, apoptose total, idade gestacional), tal como defendido por Costa Neto.<sup>17</sup> Essa referência embasou também o desenvolvimento de tabelas de frequência para as variáveis qualitativas (cor da pele, humor, questionário, Pred, CQN/HCQ, AZA, SLEPDAI<sup>13</sup> e SLEDAI<sup>14,15</sup>).

Ainda no domínio descritivo, estimaram-se a correlação linear de Pearson e a covariância, ambas tomadas para as variáveis quantitativas.<sup>18</sup> O coeficiente de correlação V de Cramer foi estimado para a variável questionário contra CD56<sup>+</sup>%, CD56<sup>+</sup> abs/mm<sup>3</sup> e apoptose total, uma vez que envolve variável qualitativa.<sup>18</sup>

A comparação entre os grupos exigiu que a proximidade com a distribuição normal fosse avaliada para as variáveis quantitativas, o que foi realizado por meio do teste de Shapiro-Wilk, dado o baixo número de indivíduos/grupo.<sup>17</sup>

A normalidade possibilitou que a comparação de quatro grupos fosse realizada por meio da ANOVA *two-way*.<sup>19</sup> Na inobservância de proximidade com a distribuição normal, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis,<sup>20</sup> (CD56<sup>+</sup>%, CD56<sup>+</sup>abs, apoptose inicial, apoptose tardia, célula morta).

Os grupos GLES e PLES foram comparados para algumas variáveis que somente se fizeram presentes neles; então, a investigação de diferença estatística foi desenhada pelo teste de Mann-Whitney<sup>20</sup> (idade gestacional).

Para as variáveis qualitativas, a comparação das frequências se deu por meio do teste Qui-Quadrado<sup>19</sup> (cor da pele, humor, questionário, Pred, CQN/HCQ, AZA).

As análises estatísticas foram feitas com base no coeficiente de variação (CV).<sup>17</sup>

CV < 20,00% - baixa variabilidade, os indivíduos tiveram resultados uniformes, então a caracterização da variável foi feita pela média e pelo desvio-padrão.

CV > 20,00% - alta variabilidade, os indivíduos tiveram resultados discrepantes, então a caracterização da variável foi feita pela mediana e pelo coeficiente de variação.

## RESULTADOS

As pacientes GLES, no momento da avaliação, tinham idade gestacional que variava entre dez semanas e três dias a vinte semanas e as Gcontroles, de nove semanas e seis dias a 18 semanas. A idade gestacional foi estimada em dias, e o grupo GLES tinha 105,00 dias  $\pm$  23,55%, e do grupo GControles 100,45 dias  $\pm$  16,73%. A idade das mulheres estudadas nos quatro grupos variou de 17 anos e 11 meses a 40 anos; no grupo GLES foi de 25 anos  $\pm$  24,66%, enquanto, no PLES, Gcontroles e Controles, foi respectivamente 32,40  $\pm$  6,20 anos, 25,80  $\pm$  4,85 anos e 30,91  $\pm$  5,01 anos, o que, *a priori*, indicou que os grupos eram uniformes no tocante à idade. Portanto, essa variável não deve ter impactado nas demais, exceto no GLES. Obteve-se a contagem das células CD56<sup>+</sup> (porcentagem e valor absoluto). Sua porcentagem apresentou alta variabilidade e as medianas foram: no grupo GLES, 0,10  $\pm$  91,01%; no PLES, 0,12  $\pm$  27,65%; Gcontroles, 0,15  $\pm$  45,70%; e controles, 0,08  $\pm$  47,47%. Na tabela 1, estão descritos os valores individuais.

**Tabela 1**

Valor percentual do CD56<sup>+</sup> por indivíduo de cada grupo

Paciente	Grupo			
	GLES	PLES	Gcontroles	Controles
1	10,0%	15,7%	13,6%	5,7%
2	8,0%	6,3%	15,7%	4,6%
3	11,3%	14,3%	22,4%	9,4%
4	10,6%	12,4%	16,3%	8,3%
5	46,6%	13,4%	18,1%	6,7%
6	5,9%	9,2%	2,9%	7,9%
7	10,8%	9,4%	7,5%	8,4%
8	8,4%	11,1%	15,8%	17,1%
9	3,8%	8,6%	10,9%	12,0%
10	26,6%	15,7%	6,7%	19,8%
11	-	-	-	15,7%
Mediana	10,3%	11,7%	14,6%	8,4%

A porcentagem de CD56<sup>+</sup> apresentou alta variabilidade. As medianas foram: no grupo GLES, 0,10  $\pm$  91,01%; no PLES, 0,12  $\pm$  27,65%; Gcontroles, 0,15  $\pm$  45,70%; e Controles, 0,08  $\pm$  47,47%.

Após a determinação do valor total das células NK, essas foram analisadas em relação à sua viabilidade, sendo diferenciadas nas fases de células vivas, células em apoptose inicial, células em apoptose tardia e células mortas. O valor de apoptose total foi considerado como a soma das fases apoptose inicial, apoptose tardia e célula morta. Essa determinação se baseou na consideração de que, uma vez que a célula entra em apoptose, seu curso natural é a morte. Os resultados de cada fase foram calculados em porcentagem e analisados em relação à sua média, ao desvio-padrão, à mediana e ao coeficiente de variação (Tabela 2). As células vivas apresentaram baixa variabilidade, com médias: no grupo GLES, 0,91  $\pm$  0,06%; PLES, 0,95  $\pm$  0,03%; Gcontroles, 0,86  $\pm$  0,11%; e Controles, 0,88  $\pm$  0,08. Os grupos de pacientes com LES tiveram um número maior de NK vivas, se compararmos com as pacientes sem doença, e o grupo GLES teve valor menor que o grupo PLES, assim como o grupo Gcontroles, quando comparado ao grupo Controles (Tabela 2).

As fases de apoptose inicial, apoptose tardia e célula morta apresentaram alta variabilidade, assim como a apoptose total. A mediana da apoptose total, GLES 0,06  $\pm$  73,45%, PLES 0,04  $\pm$  54,86%, Gcontroles 0,11  $\pm$  75,72% e Controles 0,11  $\pm$  62,30%, foi menor nos grupos de pacientes com LES quando comparados com os grupos de pacientes sem doença (Tabela 2) (Figura 1).

Algumas pacientes estavam em uso de medicações durante o período do estudo, excetuando tratamento com antibiótico sistêmico. Analisou-se a frequência do uso dessas medicações (Tabela 3).

Foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para as variáveis de idade, CD56<sup>+</sup>, célula viva, apoptose inicial, apoptose tardia, célula morta e apoptose total (Tabela 4). Em seguida, aplicou-se o teste da ANOVA<sup>13</sup> para as variáveis de idade (P = 0,02), célula viva (P = 0,06), apoptose total (P = 0,03), sendo também aplicado o teste de Fisher<sup>13</sup> para idade e apoptose total (Tabela 5). Encontrou-se diferença significativa na apoptose total dos grupos Gcontroles e Controles em relação ao grupo PLES, mas não foi possível identificar diferença em relação ao grupo GLES.

Foram analisados os resultados dos índices de atividade do LES, SLEPDAI<sup>13</sup> e SELENA/SLEDAI<sup>14,15</sup> em relação as CD56<sup>+</sup>%, CD56<sup>+</sup> abs, célula viva e apoptose total (Tabela 6), e observou-se dependência com o CD56<sup>+</sup>abs, porém inverso, ou seja, quando a variabilidade de CD56<sup>+</sup> aumentou a do SLEPDAI<sup>13</sup> e a SELENA/SLEDAI<sup>14,15</sup> diminuiu. Verificou-se uma relação, mas não uma correlação, entre CD56<sup>+</sup>% e CD56<sup>+</sup> abs: a dependência somente se deu no CD56<sup>+</sup> abs. As correlações das células vivas e da apoptose total não foram significativas (P > 0,05). Não houve dependência entre as variáveis. Talvez

**Tabela 2**

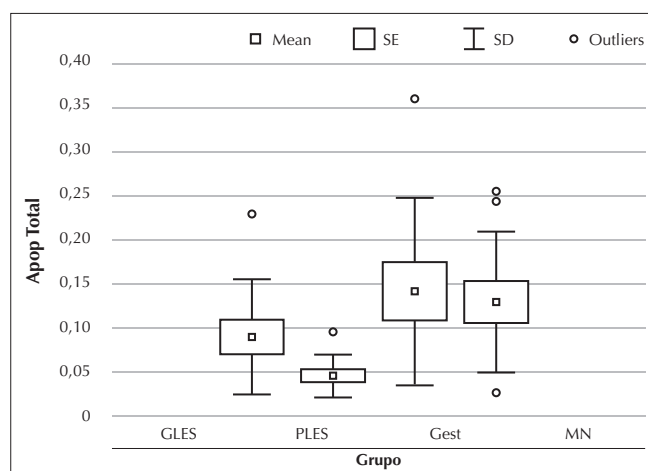
Resultados descritivos das fases de viabilidade da NK

Variável	Grupo			
	GLES	PLES	Gcontroles	Controles
<b>Célula viva</b>				
Média	0,91	0,95	0,86	0,88
Desvio-padrão	0,06	0,03	0,11	0,08
Mediana	0,94	0,96	0,89	0,90
Coefficiente de variação	7,15	2,71	12,41	8,82
<b>Apop. inicial</b>				
Média	0,05	0,03	0,11	0,07
Desvio-padrão	0,02	0,02	0,09	0,05
Mediana	0,04	0,02	0,08	0,04
Coefficiente de variação	53,61	74,81	79,37	80,10
<b>Apop. tardia</b>				
Média	0,02	0,01	0,01	0,04
Desvio-padrão	0,03	0,01	0,02	0,04
Mediana	0,01	0,00	0,01	0,03
Coefficiente de variação	188,18	148,12	109,55	93,57
<b>Célula morta</b>				
Média	0,03	0,01	0,02	0,04
Desvio-padrão	0,03	0,01	0,01	0,04
Mediana	0,01	0,01	0,02	0,03
Coefficiente de variação	115,31	81,58	57,61	93,57
<b>Apop. total</b>				
Média	0,09	0,04	0,14	0,13
Desvio-padrão	0,07	0,02	0,11	0,08
Mediana	0,06	0,04	0,11	0,11
Coefficiente de variação	73,45	54,86	75,72	62,30

devido ao pequeno número de indivíduos em cada grupo e/ou a alguma variável que interferiu nos resultados, não foi possível verificar valores estatisticamente significativos.

## DISCUSSÃO

As células NK são a população de leucócitos predominantes na mucosa uterina e muito se tem estudado para analisar seu papel no momento da implantação e na manutenção da



**Figura 1.** Resultados descritivos da porcentagem de apoptose total (Apop Total) nos grupos estudados. Mean = média;  $\pm$  SE = erro padrão;  $\pm$  SD = desvio-padrão; Outliers = anômalos.

**Tabela 3**

Frequência de uso de medicação

Medicações	Variável			
	GLES	PLES	Gcontroles	Controles
AZA	0	2		
CQN/HCQ	4	7		
Pred	4	6		
Ácido acetil salicílico	3	1		
Ácido fólico	2		1	
Amitriptilina		1		
Anticoncepcional				7
Cabergolina				1
Cálcio + vitamina D		3		
Candesartan A				1
Clordiazepóxido		1		
Corticoide inalatório				2
Ácido gama-aminobutírico + monoclórato del-lisina		1		
Heparina	1			
Inibidor de ECA		5		
Levotiroxina	1			
Clonazepam		1		
Sertralina		1		
Sibutramina				1
Sulfato ferroso	1		1	
Tioconazol+tinidazol (creme vaginal)			1	
Varfarina	1	1		

AZA = azatioprina; CQN = difosfato de cloroquina; HCQ = hidroxiquina; Pred = prednisona; ECA = enzima conversora de angiotensina.

**Tabela 4**  
Resultados do teste de Shapiro-Wilk ( $n < 50$ ;  $\alpha = 0,05^*$ )

	Variável			
	GLES	PLES	Gcontroles	Controles
CD56+ (%)	0,00	0,62	0,86	0,20
Célula viva	0,06	0,30	0,21	0,18
Apop. inicial	0,87	0,00	0,30	0,04
Apop. tardia	0,00	0,00	0,02	0,11
Célula morta	0,01	0,60	0,59	0,12
Apop. total	0,06	0,11	0,21	0,32

\*Valor-P < 0,05, variável não próxima à distribuição normal.

**Tabela 5**  
Resultados do teste de Fisher ( $\alpha = 0,05^*$ )

Variável	GLES	PLES	Controles
<b>Idade (anos)</b>			
PLES	0,02		
Gcontroles	0,94	0,01	
Controles	0,05	0,55	0,05
<b>Apop. total</b>			
PLES	0,20		
Gcontroles	0,14	0,01	
Controles	0,24	0,01	0,72

\*Valor-P < 0,05, variável não próxima à distribuição normal. Idade do grupo PLES diferente dos grupos GLES e Gcontroles. Apoptose total do grupo PLES diferente de GLES e Controles.

**Tabela 6**  
Correlação com os índices de atividade do LES

Variável	Correlação*		Covariância	
	SLEPDAI (GLES)	SLEDAI (PLES)	SLEPDAI (GLES)	SLEDAI (PLES)
CD56+ %	0,13	-0,27	0,06	-0,04
CD56+ abs	-0,4	-0,28	-392,3	-80,52
Célula viva	0,51	-0,49	0,13	-0,06
Apop. total	-0,5	0,58	-0,13	0,06

\*Valor-P > 0,05.

gestação. Alterações na regulação das células NK têm sido associadas a alterações reprodutivas, como abortos espontâneos, falha na implantação e infertilidade, e pré-eclâmpsia.<sup>21</sup> Aborto espontâneo está associado a aumento nas células NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> e diminuição na CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> no endométrio durante a fase lútea.<sup>22</sup> Um estudo que avaliou os níveis de células NK no sangue periférico no período de pré-concepção e pós-concepção não constatou alterações significativas desses níveis, quando foram estudadas mulheres com história de

abortos de repetição em comparação a controles normais. No entanto, quando avaliadas as subpopulações das células NK, as células CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> se encontraram moderadamente reduzidas nas gestantes em comparação com as não gestantes.<sup>21</sup> É importante lembrar que os valores da contagem de células NK não refletem especificamente a resposta imune da gravidez, e que a quantidade e a atividade dessas células podem flutuar de acordo com diferentes variáveis, tais como: efeitos hormonais, atividade física, hora do dia e resposta simpática ao estresse. Além disso, o número de células NK do sangue periférico não está necessariamente correlacionado com sua citotoxicidade.<sup>21</sup> Em nosso estudo, usamos um questionário contendo algumas dessas variáveis, que poderiam interferir nos valores das células NK, para tentar minimizar erros na interpretação dos resultados. Não verificamos correlação entre os valores de células NK e as variáveis estudadas (febre, resfriado, alergias, uso de medicação, atividade física, exposição a sol e banho de mar, tabagismo, uso de bebida alcoólica e estado de humor).

Apesar de ainda controversos, alguns estudos demonstram aumento nos índices de atividade do LES adaptados para gestação. O aumento da atividade do LES tem implicações profundas sobre os resultados fetais, sendo associado ao menor número de nascidos vivos, e de prematuridade. Entretanto, a presença do lúpus anticoagulante aumenta o risco de perda fetal.<sup>23</sup> Existem relatos de diminuição do número das células NK do sangue periférico de pacientes com LES, e essa diminuição seria mais acentuada em pacientes com doença ativa.<sup>1</sup> Este estudo não verificou redução no número de células NK em pacientes gestantes e/ou controles com ou sem LES, mas o pequeno número de indivíduos em cada grupo pode ter dificultado essa avaliação. Não se avaliou atividade das células NK, mas seu ciclo celular. Não se encontraram relatos sobre a avaliação do ciclo celular das células NK em pacientes com LES.

Schepis et al. verificaram um aumento de células NK em paciente com LES, independentemente da atividade da doença. Esse aumento foi relacionado ao aumento de INF tipo I (citocina de primeira resposta, produzida principalmente por células dendríticas; parece estar envolvida na patogênese do LES), uma citocina abundante no LES e que pode levar ao aumento de células NK *in vitro*. Os níveis séricos de INF- $\alpha$  estavam aumentados em pacientes em atividade da doença, mas não naqueles fora de atividade.<sup>24</sup> Neste estudo, não observamos diferenças significativas na contagem de células NK entre os grupos estudados devido à alta variabilidade nos resultados. No entanto, quando relacionado aos índices de atividade do LES (SLEPDAI<sup>13</sup> e SELENA/SLEDAI<sup>14,15</sup>), verificamos relação inversa com o número absoluto de CD56<sup>+</sup>, mas essa relação

não se manteve no percentual de células CD56<sup>+</sup>, não havendo correlação entre o percentual e o número absoluto. Esses resultados não tiveram significância estatística.

Ainda há discussão se os testes sanguíneos com aumento dos níveis de células NK podem ser reprodutíveis, se os valores das pacientes com perda gestacional estão dentro do índice de normalidade e os níveis elevados no sangue podem representar uma mobilização em resposta ao estresse. O aumento dos níveis de células NK pode decorrer, em parte, de uma resposta ao estresse da punção venosa (elevação da contagem de NK foi encontrada na amostra inicial, e não vinte minutos mais tarde). No entanto, contagens elevadas de células NK no sangue periférico poderiam ser importantes para eventos na interface materno-fetal, elevação de estresse da atividade das células NK e respectiva mobilização, sugerindo um papel relevante na fisiopatologia das perdas fetais.<sup>25</sup> Essas discordâncias na literatura sobre os valores encontrados de células NK em pacientes com LES podem estar relacionadas à dificuldade em determinar uma relação entre os valores das células NK e sua correlação com a atividade da doença, devido aos vários fatores que podem interferir na resposta imune.

Neste estudo, foram avaliados a contagem de células NK, sua viabilidade e o número de células vivas e em fase de apoptose inicial e tardia, células mortas e apoptose total. Os resultados das células vivas apresentaram baixa variabilidade e os grupos de pacientes com LES (GLES e PLES) tiveram um número maior de células NK vivas, em comparação com as pacientes sem a doença, e o grupo das gestantes (GLES) apresentou valor menor que o grupo das não gestantes (PLES), assim como o grupo das gestantes sem doença (Gcontroles), quando comparado ao grupo Controles. Talvez isso mostre que, no sangue periférico, há um número menor de células NK vivas no início da gestação. Em geral, células apoptóticas são rapidamente removidas por fagocitose devido à indução de mudanças na superfície da célula pelo processo de apoptose. Isso impede a liberação de constituintes fisiológicos intracelulares, incluindo nucleossomos, que são formados durante o processo de apoptose por meio de clivagem da cromatina por nucleases. Por isso, distúrbios, quer em apoptose ou em fagocitose, das células apoptóticas têm sido propostos no desenvolvimento de doenças autoimunes, especialmente em LES.<sup>26</sup> Vários estudos usando camundongos com deficiências de moléculas (por exemplo, C1q e IgM) ou receptores envolvidos na fagocitose de células apoptóticas têm mostrado que a alteração na remoção das células apoptóticas conduz à autoimunidade contra nucleossomos e glomerulonefrite. Além disso, os defeitos de depuração de células apoptóticas têm sido descritos em

camundongos e pacientes com lúpus. Nucleossomos não só são importantes para a indução da doença, como também podem influenciar na depuração das células apoptóticas. Além disso, autoanticorpos formados no LES também podem modular esse processo. Por isso, durante a progressão da doença, quando nucleossomos e autoanticorpos começam a circular, eles podem amplificar a doença por inibição da depuração das células apoptóticas.<sup>26</sup> Em nosso estudo, verificamos que a apoptose total esteve diminuída nos grupos de pacientes com LES quando comparados com os grupos sem doença.

Não foi possível determinar o perfil predominante das células NK, mas talvez esse aumento no valor de células vivas e a diminuição em apoptose total possam sugerir que as células NK em pacientes com LES, gestantes ou não, permanecem vivas e talvez em funcionamento, por um período maior.

---

## CONCLUSÃO

Neste estudo-piloto, não foi possível demonstrar diferenças nos valores das células NK de pacientes com LES ou sem a doença. Em relação ao ciclo celular da célula NK, as células vivas nos grupos de pacientes com LES estiveram em maior número que nos controles sem a doença; as gestantes apresentaram valores menores do que as não gestantes nos grupos com LES e nos de pacientes sem a doença. A apoptose total esteve diminuída nos grupos de pacientes com LES quando comparados com os grupos sem a doença, porém menos nas pacientes não grávidas do que nas gestantes.

Essas diferenças entre contagem de células vivas e apoptose total talvez demonstrem que, em pacientes com LES, grávidas ou não, as células NK têm uma vida útil prolongada (ou um *turnover* menor/diferente), o que sugere que pode haver um maior estímulo imune, fazendo com que as células NK levem mais tempo para ativar o processo de apoptose. Devido ao pequeno número de pacientes em cada grupo, os resultados encontrados podem ter sido apenas uma coincidência. Continuaremos coletando amostras de novos casos dentro do mesmo protocolo.

---

## AGRADECIMENTOS

Aos médicos e residentes das disciplinas de Reumatologia e Obstetrícia da Universidade Estadual do Rio de Janeiro e da Maternidade Escola da UFRJ, onde realizamos parte de nosso estudo com as gestantes; aos funcionários do Laboratório Bronstein, RJ (Diagnósticos da América SA), onde foram realizados os exames.

## REFERÊNCIAS

1. Baxter AG, Smyth MJ. The Role of NK Cells in Autoimmune Disease. *Autoimmunity* 2002;35:1-14.
2. Ruddy S, Harris Jr ED, Sledge CB. *Kelley's Textbook of Rheumatology*, 6. ed, Philadelphia: Saunders, 2001.
3. Sigal LH. Natural Killer Cell Receptors and Activation Mechanisms. *J Clin Rheumatol* 2003;9:55-9.
4. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M *et al.* Human Cytotrophoblasts Adopt a Vascular Phenotype as They Differentiate. A Strategy for Successful Endovascular Invasion? *J Clin Invest* 1997;99:2139-51.
5. Sacks G, Sargent I, Redman C. An Innate View of Human Pregnancy. *Immunol Today* 1999;20:114-8.
6. Moffett-King A. Natural Killer and Pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002;2:656-63.
7. Lobo SC, Huang ST, Germeyer A, Dosiou C, Vo KC, Tulac S *et al.* The Immune Environment in Human Endometrium during the Window of Implantation. *Am J Reprod Immunol* 2004;52:244-51.
8. Verma S, Hiby SE, Loke YW, King A. Human Decidual Natural Killer Cells Express the Receptor for and Respond to the Cytokine Interleukin 15. *Biol Reprod* 2000;62:959-68.
9. Manaster I, Mandelboim O. The Unique Properties of Human NK Cells in the Uterine Mucosa. *Placenta* 2008;29:S60-6.
10. Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA. Evaluation of Systemic Lupus Erythematosus Activity during Pregnancy. *Lupus* 2004;13:679-82.
11. Wilder RL. Hormones, Pregnancy, and Autoimmune Diseases. *Ann NY Acad Sci* 1998;840:45-50.



12. Green MRJ, Kennell ASM, Larche MJ, Seifert MH, Isemberg DA, Salaman MR. Natural Killer Cell Activity in Families of Patients with Systemic Lupus Erythematosus: Demonstration of a Killing Defect in Patients. *Clin Exp Immunol* 2005;141:165-73.
13. Buyon JP, Kalunian KC, Ramsey-Goldman R, Petri MA, Lockshin MD, Ruiz-Irastorza G *et al.* Assessing Disease Activity in SLE Patients during Pregnancy. *Lupus* 1999;8:677-84.
14. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A Disease Activity Index for Lupus Patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992;35:630-40.
15. Buyon JP, Petri MA, Kim MY, Kalunian KC, Grossman J, Hahn BH *et al.* The Effect of Combined Estrogen and Progesterone Hormone Replacement Therapy on Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus: a Randomized Trial. *Ann Intern Med* 2005;142:953-62.
16. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A Novel Assay for Apoptosis. Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on Early Apoptotic Cells Using Fluorescein Labelled Annexin V. *J Immunol Meth* 1995;184:39-51.
17. Costa Neto, PLO. *Estatística*, 2 ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2002.
18. Bunchaft G, Kellner SRO. *Estatística sem mistério*. Petrópolis: Vozes, 1999, pp. 350-899.
19. Beiguelman B. *Curso prático de bioestatística*. 5 ed. Ribeirão Preto: FUNPEC 73-212, 2002.
20. Siegel S, Castellan Jr NJ. *Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed 2006, pp. 134-178.
21. Kwak-Kim J, Gilman-Sachs A. Clinical Implication of Natural Killer Cells and Reproduction. *Am J Reprod Immunol* 2008;59:388-400.
22. Kalkunte S, Chichester CO, Gotsch F, Sentman CL, Romero R, Sharma S. Evolution of Non-Cytotoxic Uterine Natural Killer Cells. *Am J Reprod Immunol* 2008;59:425-32.
23. Petri M. Prospective Study of Systemic Lupus Erythematosus Pregnancies. *Lupus* 2004;13:688-9.
24. Schepis D, Gunnarsson I, Eloranta ML, Lampa J, Jacobson SH, Kärre K *et al.* Increased Proportion of CD56(bright) Natural Killer Cells in Active and Inactive Systemic Lupus Erythematosus. *Immunology* 2008 Jun 18 - in press.
25. Clark DA. Immunological Factors in Pregnancy Wastage: Fact or Fiction. *Am J Reprod Immunol* 2008;59:277-300.
26. Licht R, Dieker JW, Jacobs CW, Tax WJ, Berden JH. Decreased Phagocytosis of Apoptotic Cells in Diseased SLE mice. *J Autoimmun* 2004;22:139-45.