

MScMM

MESTRADO EM
**MICROBIOLOGIA
MÉDICA**

Madalena Godinho Barata
BSc em Ciências Biomédicas
Laboratoriais

**Gravidez, imunomodulação e a
infecção por CMV**

Janeiro, 2024



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Tecnologia Química e Biológica

GRAVIDEZ, IMUNOMODULAÇÃO E A INFEÇÃO POR CMV

Autora: Madalena Godinho Barata

Orientadora: Professora Doutora Catarina Martins

Coorientadores: Professora Doutora Maria de Jesus Chasqueira

Professor Doutor Paulo Paixão

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica

Departamentos:

Departamento de Microbiologia, NOVA Medical School|Faculdade de Ciências Médicas
(NMS|FCM), Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, PORTUGAL

Departamento de Imunologia, NOVA Medical School|Faculdade de Ciências Médicas (NMS|FCM),
Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, PORTUGAL

Janeiro 2024



“Happiness can be found, even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light”

Albus Dumbledore

Congressos

Barata M, Ângelo-Dias M, Lopes T, Marques A, Lima J, Chung A, Appleton C, Sarzedas S, Fernandes E, Chasqueira MJ, Borrego LM, Martins C, Paixão P. 2023. “Linfócitos B e o Torque Teno Vírus na Gravidez”. Poster apresentado na 44ª reunião anual da SPAIC – Troia, Portugal, Setembro de 2023.

Agradecimentos

A realização deste projeto contou com o apoio de diversas pessoas, às quais fico muito agradecida.

À minha orientadora, a Professora Doutora Catarina Martins, por toda a disponibilidade, ajuda, simpatia, positivismo, paciência, compreensão, e por me dar a oportunidade de ter participado em diversos eventos relacionados à Imunologia.

Aos meus coorientadores, Professora Doutora Maria de Jesus Chasqueira e Professor Doutor Paulo Paixão, que sempre estiveram disponíveis para qualquer esclarecimento e ajuda.

Ao Mestre Miguel Dias e à Técnica Augusta Marques, pelo enorme auxílio e paciência a nível laboratorial, assim como momentos de descontração.

À Técnica Teresa Lopes, por toda a boa disposição, motivação constante e doces à mistura.

À Doutora Anabela Cunha, pelo auxílio e acessibilidade para a realização das Serologias.

Às minhas camaradas da Biologia Molecular, Ana, Joana e Irina. Pela compreensão com os meus horários, pela paciência quando chego ao laboratório stressada ou cansada, e por todos os momentos de risada.

Um agradecimento também à Susana e à Fátima, que também sempre mostraram apoio durante esta caminhada

À minha chefe, a Doutora Lurdes Monteiro, pelo apoio nesta etapa e acessibilidade.

À minha família e amigos, por sempre me motivarem e acreditarem mais em mim do que eu. É bom saber que tenho tanto apoio à minha volta

Resumo

Alterações às normais dinâmicas imunes estabelecidas durante a gravidez podem ser prejudiciais para mãe e feto. O Vírus Torque Teno (TTV) tem-se mostrado um bom biomarcador do status imunológico. Desvios nos perfis imunes normais da gravidez, podem despoletar complicações obstétricas, e maior suscetibilidade a infecções, nomeadamente por Citomegalovírus (CMV). Este Betaherpesvirus é a principal causa de malformações congénitas associadas a infeção nos países desenvolvidos, sendo necessário compreender o que suporta uma resposta imune anti-CMV eficaz na gravidez, considerando as referidas dinâmicas imunes, e a necessidade de identificar biomarcadores para detetar alterações neste equilíbrio.

Assim, este projeto avaliou, longitudinalmente, oscilações dos perfis imunes em grávidas saudáveis, bem como a dinâmica do TTV (prevalência e carga viral) e do CMV (serologia e carga viral), e a sua eventual relação com os perfis imunes estudados.

Recrutaram-se 35 grávidas, entre os 25-43 anos. Em cada trimestre, foram colhidas amostras de sangue para análise dos perfis imunes por Citometria de fluxo, para pesquisa de anticorpos anti-CMV por imunoensaio quimioluminescente e para pesquisa de ADN de CMV e TTV por qPCR.

Os resultados mostram oscilações características durante a gravidez, com diminuição progressiva de várias subpopulações B, e aumento de subpopulações T ativadas, observando-se ainda menor prevalência de TTV no último trimestre de gravidez. No 1º trimestre, grávidas com TTV detetável apresentaram mais Linfócitos B CD27-IgD- que as mulheres sem TTV, mas as cargas virais de TTV parecem correlacionar-se negativamente com Linfócitos B naive e positivamente com Linfócitos B memória *switched* e Tfh. As grávidas seropositivas para CMV apresentaram, no mesmo período, um perfil característico com mais Linfócitos T CD8, Tfc, Tfh e células T ativadas.

Este estudo permitiu recolher dados preliminares, sendo essencial a sua continuação com uma coorte maior onde se possam abordar quadros de infeção primária e reinfeção por CMV.

Palavras-chave: CMV, subpopulações B, subpopulações T, Perfis Imunes, TTV

Abstract

Changes to the normal immune dynamics established during pregnancy can harm both mother and fetus. Torque Teno Virus (TTV) appears to be a promising biomarker of the immunological status. Deviations from normal immune profiles can lead to obstetric complications, and to a higher susceptibility to infection, namely by Cytomegalovirus (CMV). This Betaherpesvirus is the leading cause of congenital malformations associated with infection, in developed countries. A better understanding of what supports efficient immune responses against CMV during pregnancy is crucial, considering the aforementioned immune dynamics, and the need for biomarkers to detect deviations.

Therefore, this project evaluated, longitudinally, variations in the immune profiles of healthy pregnant women, as well as the dynamics of TTV (prevalence and viral load) and CMV (serology and viral load), and their eventual relationship with the immune profiles.

Thirty-five pregnant women were recruited, aged 25-43 years. Blood samples were collected in each trimester, with the immune profiles being analyzed by flow cytometry, anti-CMV antibodies quantified by chemiluminescence immunoassay, and CMV and TTV DNA detected by qPCR.

The results display characteristic oscillations during pregnancy, with progressive decrease of several B-cell subsets, and rise of activated T-cell subsets. A minor TTV prevalence was present in the last trimester. In the first trimester, woman with detectable TTV showed higher values of CD27-IgD- B-cells than TTV negative ones, and TTV viral loads were negatively correlated with naive B-cells, and positively correlated with switched memory B-cells and Tfh. CMV seropositive woman seropositive showed, in the same period, a characteristic profile, with increased CD8, Tfc, Tfh and activated T-cells.

This study allowed the collection of preliminary data, being essential its continuation, with a bigger cohort, allowing the evaluation of primary and secondary infection by CMV.

Keywords: CMV, B-cell subsets, T-cell subsets, Immune profiles, TTV

Índice

Parte I – Introdução	1
1. Sistema Imunitário	1
1.1. Definição e componentes	1
1.1.1. Imunidade Inata	1
<i>i. Inflamação</i>	1
a. Reconhecimento de padrões	2
b. Fagocitose	3
c. Ativação do Complemento	4
<i>ii. Células da resposta inata imune</i>	4
a. Neutrófilos	4
b. Monócitos e Macrófagos	4
Monócitos	4
Macrófagos	5
c. Células Dendríticas	6
d. Mastócitos	6
e. Basófilos	7
f. Eosinófilos	7
g. Células Linfoides Inatas	9
h. Células NK	9
<i>iii. Outros Mediadores da Resposta Inata</i>	10
a. Interferões	10
1.1.2. Imunidade Adquirida	10
<i>i. Apresentação do Antígeno</i>	10
<i>ii. Linfócitos T</i>	12
a. Maturação dos Linfócitos T	12
b. Ativação e diferenciação dos Linfócitos T	14
c. Linfócitos Th1	16
d. Linfócitos Th2	17
e. Linfócitos Th17	18
f. Linfócitos T foliculares	18
g. Linfócitos T reguladores	19
Linfócitos T reguladores CD4+	19
Linfócitos T reguladores CD8+	20
h. Linfócitos T duplamente negativos	21
Linfócitos T DN $\alpha\beta$	21

Linfócitos T $\gamma\delta$	21
iii. <i>Linfócitos B</i>	22
a. <i>Maturação</i>	22
b. <i>Linfócitos B naive</i>	24
c. <i>Diferenciação</i>	25
d. <i>Linfócitos B de memória</i>	26
e. <i>Linfócitos B reguladores</i>	27
2. <i>Gravidez</i>	28
2.1. <i>Imunidade na Gravidez</i>	28
2.1.1. <i>Alterações na face materno-fetal</i>	29
2.1.2. <i>Alterações periféricas</i>	30
3. <i>Torque Teno Vírus</i>	31
3.1. <i>Características</i>	31
3.2. <i>Aquisição e Transmissão</i>	32
3.3. <i>Imunomodulação</i>	33
3.4. <i>Marcador do Status Imunológico</i>	33
3.5. <i>TTV e Gravidez</i>	35
4. <i>Citomegalovírus</i>	36
4.1. <i>Características</i>	36
4.2. <i>Citomegalovírus e Gravidez</i>	36
4.2.1. <i>Diagnóstico materno e fetal do Citomegalovírus</i>	38
i. <i>Diagnóstico de Infecção materna</i>	38
ii. <i>Diagnóstico de infecção fetal</i>	39
a. <i>Amniocentese/Cordocentese</i>	39
b. <i>Imagiologia</i>	39
4.3. <i>Citomegalovírus e Sistema Imunológico</i>	40
5. <i>Associação entre a infecção por CMV e a Imunidade durante a gravidez</i>	41
5.1. <i>Perfis Imunes</i>	42
5.2. <i>Serologia</i>	43
6. <i>Técnicas Laboratoriais</i>	43
6.1 <i>Citometria de Fluxo</i>	43
6.2 <i>Polymerase Chain Reaction</i>	47
6.3 <i>Serologia</i>	49
7. <i>Objetivos deste trabalho Experimental</i>	51
7.1. <i>Objetivos gerais</i>	51
7.2. <i>Objetivos específicos</i>	51

Parte II – Materiais e Métodos	53
1. Classificação do estudo	53
2. Amostragem em Estudo	53
3. Amostras	53
4. Técnicas Laboratoriais	54
4.1 Citometria de Fluxo para avaliação de subpopulações linfocitárias B e T	54
4.1.1. Linfócitos B	55
4.1.2. Linfócitos T	56
4.2. Patologia Molecular	56
4.2.1. Extração de ADN	56
4.2.2. qPCR - TTV	56
4.2.3. qPCR – CMV	58
4.3 Imunoserologia	58
4.4. Análise Estatística	59
1. Dados Clínicos e Demográficos das participantes	60
2. Subpopulações B e T ao longo da Gravidez	62
2.1. Compartimento B	62
2.2. Compartimento T	64
3. Torque Teno Vírus	68
3.1. TTV ao longo da gravidez – Carga Viral e Prevalência	68
3.2. Torque Teno Vírus e Subpopulações celulares B e T: interações no 1º trimestre de gravidez	69
4. Citomegalovírus	72
4.1. Estudo serológico de CMV ao longo da gravidez	72
4.2. Citomegalovírus e Subpopulações celulares B e T: interações no 1º trimestre de gravidez	73
Parte IV – Discussão	78
Parte V – Conclusão	85
Bibliografia	86
Anexos	98
Anexo 1 – Aprovação do projeto pela comissão de Ética da NMS FCM-UNL (CEFCM).....	98
Anexo 2 – Aprovação do projeto pela comissão de Ética para a Saúde do Hospital da Luz	99
Anexo 3 – Consentimento informado.....	100
Anexo 4 – Estratégia de Gate para a identificação de Linfócitos B	105
Anexo 5 – Estratégia de Gate para a identificação de Linfócitos T	106
Anexo 6 – Protocolo de Caracterização de Linfócitos B e T (tubos ExBio).....	107
Anexo 7 – Protocolo de Extração de ADN em amostras biológicas	110

Índice de Figuras

Figura 1. Infecção fetal e desenvolvimento de sequelas após infecção materna.	38
Figura 2. Classificação dos Linfócitos T.....	46
Figura 3. Etapas da PCR.....	48
Figura 4. Esquema representativo de uma técnica de CLIA do tipo sanduiche, com partículas magnéticas..	50
Figura 5. Subpopulações B ao longo da gravidez (valores percentuais).....	63
Figura 6. Subpopulações B ao longo da gravidez (contagens absolutas).....	64
Figura 7. Subpopulações T ao longo da gravidez (valores percentuais).....	66
Figura 8. Subpopulações T ao longo da gravidez (contagens absolutas).....	67
Figura 9. Dinâmica da prevalência e carga viral do TTV ao longo da gravidez.....	68
Figura 10. Correlação entre carga viral de TTV e subpopulações celulares.....	69
Figura 11. Valores percentuais de Subpopulações B em mulheres com e sem virémia TTV detetável B.....	70
Figura 12. Contagens absolutas de Subpopulações B em mulheres com e sem virémia TTV detetável.....	71
Figura 13. Valores percentuais de Subpopulações B em mulheres seropositivas e seronegativas para CMV, no 1º trimestre de gravidez.....	74
Figura 14. Contagens absolutas de Subpopulações B em mulheres seropositivas e seronegativas para CMV, no 1º trimestre de gravidez.....	74
Figura 15. Valores percentuais de Subpopulações T em mulheres seropositivas e seronegativas para CMV no 1º trimestre de gravidez.....	75
Figura 16. Contagens absolutas de Subpopulações B em mulheres seropositivas e seronegativas para CMV, no 1º trimestre de gravidez.....	76
Figura 17. Cargas virais de TTV em mulheres seropositivas e seronegativas para CMV, no 1º trimestre de gravidez.....	77
Figura 18. Níveis de anticorpos IgG anti-CMV em mulheres positivas e negativas para TTV.....	77

Índice de Tabelas

Tabela 1. Classificação dos Linfócitos B	45
Tabela 2. Características Demográficas da população do estudo.....	60
Tabela 3. Características Demográficas da população do estudo avaliada nos 3 trimestres de gravidez.....	61
Tabela 4. Compartimento B – avaliação dos valores percentuais e contagens absolutas das subpopulações estudadas	62
Tabela 5. Compartimento T – avaliação dos valores percentuais e contagens absolutas das subpopulações estudadas	65
Tabela 6. Prevalência e carga viral de TTV no 1º trimestre de Gravidez.....	69
Tabela 7. Serologia CMV – Prevalência de casos positivos e níveis de IgG ao longo da gravidez.....	72
Tabela 8. Serologia CMV – Prevalência de casos positivos e níveis de IgG no 1.º trimestre de gravidez	73

Abreviaturas

ADCC – Citotoxicidade celular mediada por anticorpo (*Antibody-dependent cellular cytotoxicity*)

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ALPS – Síndrome linfoproliferativo autoimune

AMPPD – *adamantyl 1, 2-dioxetane aryl phosphate*

APC – Célula apresentadora de antígenos

Areg – Anfiregulina

ARN - Ácido ribonucleico

AV – Anellovírus

Bcl-6 – *B-cell lymphoma 6*

BCR – Recetor da célula B (*B Cell Receptor*)

Bregs – Linfócitos B reguladores

BTLA – *B- and T-lymphocyte attenuator*

CD – *Cluster of Differentiation*

CG – Centro germinativo

CLEIA – Imunoensaio enzimático quimioluminescente (*chemiluminescence enzyme immunoassay*)

CLIA – Quimioluminiscência

CLP – Progenitores linfoides comuns

CMV – Citomegalovírus

Ct – *cycle threshold*

CTLA-4 – *Cytotoxic T lymphocyte associated molecule 4*

DAMP – *Damage-associated molecular patterns*

DC – Células Dendríticas

DSA – Anticorpos específicos do dador (*Donor specific antibody*)

ECP – Proteína catiónica eosinofílica

EDN – Neurotoxina derivada de eosinófilos

EPO – Peroxidase eosinofílica

FADD – *Fas-associated protein with death domain*

FDC – Células Dendríticas foliculares

FLT3L – *FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*

FOXP3 – *Forkhead box P3*

GAPDH – *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GM-CSF – *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GrB – Granzima B

HAART – *Highly Active Antiretroviral Therapy*

HLA – *Human Leucocyte Antigens*

HSC – Células Pluripotenciais Hematopoiéticas (*Hematopoietic Stem Cells*)

ICOS – *Inducible costimulator*

IFN – Interferão

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

ILC – Células Linfoides da Resposta Inata (*Innate lymphoid cells*)

ITAM – *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

LES – Lupus eritematoso sistémico

LFA-1 – *Leukocyte function-associated antigen 1*

LPS – Lipopolissacárido

LTC4 – Leucotrieno C4

LTi – *Lymphoid tissue inducer*

MAIT – *Mucosal-associated invariant T cells*

MALT – Tecido linfóide associado às Mucosas (*Mucosal-associated lymphoid tissues*)

MBP – Proteína básica major

M-CSF – *Macrophage colony-stimulating factor*

MHC – Complexo Major de Histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex*)

MICA/B – *MHC class I chain-related protein A and B*

MMP – Metaloproteinases

MPP – Progenitores multipotentes

MZ – Zona marginal

NET – *Neutrophil extracellular traps*

NF-κB – *Nuclear factor kappa B*

NK – Célula *Natural Killer*

NKG2D – *Natural killer group 2D*

NKp – *Natural cytotoxicity receptors*

ORF – *Open reading frame*

PAF – *Platelet-activating factor*

PAMP – *Pathogen-associated molecular patterns*

PCR – *Polymerase chain reaction*

PD-1/2 – *Programmed death-1*

PD-L 1/2 – *Programmed death-ligand 1/2*

PRR – *Pattern-recognition receptors*

ROI – *Reactive oxygen intermediates*

HSM – hipermutação somática

SHNL – Perda auditiva neurosensorial

SLC – *Surrogate light chains*

STAT1/4 – *Signal transducer and activator of transcription 1/4*

Tc – Células T citotóxicas

TCM – Células T de memória central

TCR – Recetor da célula T (*T-cell receptor*)

TEM - Células T de memória efetora

Tfc– Células T citotóxicas foliculares

Tfh – Células T helper foliculares

TGF – Fator de Crescimento Tumoral (*Transforming growth factor*)

Th – Células T helper

TLR – *Toll-Like receptors*

TNF-alfa – Fator de Necrose Tumoral alfa (*Tumor necrosis factor alfa*)

TRAIL – (*TNF*)-*related apoptosis-inducing ligand*

Treg – Células T reguladoras

TSLP – *Thymic stromal lymphopietin*

TTMDV – Torque teno midi vírus

TTMV – Torque teno mini vírus

TTV – Torque Teno Vírus

UTR – *Untranslated region*

VHB – Vírus da Hepatite B

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida

VLA-4 – *very late antigen 4*

vICA – *viral inhibitor of caspase-8 activation*

vRAP – *viral regulators of antigen presentation*

Parte I – Introdução

1. Sistema Imunitário

1.1. Definição e componentes

O Sistema Imunitário – que pode ser dividido em duas linhas de defesa (Imunidade Inata e Imunidade Adaptativa) – consiste num conjunto de células, órgãos e tecidos linfoides, moléculas e processos que funcionam em conjunto para proteger o organismo. Os tecidos linfoides dividem-se em órgãos linfoides primários e secundários. Os órgãos linfoides primários incluem a medula óssea e o timo, nos quais ocorre a produção das diferentes células do sistema imunitário. Os tecidos linfoides secundários incluem nódulos linfáticos e as amígdalas, o baço, e certos tecidos presentes em algumas membranas mucosas – *mucosal-associated lymphoid tissues* (MALT). Nestes locais, as células do sistema imunitário diferenciam-se, para desempenharem as suas funções no combate a agentes estranhos. (4, 5) Assim, nas principais vias de entrada de microrganismos - como a pele, as vias respiratórias, o trato intestinal - e noutras áreas onde possam existir antigénios considerados estranhos - como os presentes em células cancerígenas e as toxinas -, ocorre uma articulação entre as diferentes células imunes e mecanismos de resposta imune, para defesa do organismo. (1, 3-7)

1.1.1. Imunidade Inata

A Imunidade Inata representa a primeira linha de defesa contra agentes patogénicos invasivos, sendo um mecanismo de defesa não específico que é desencadeado imediatamente ou poucas horas depois do encontro com um agente estranho. Classicamente, considera-se que não apresenta a chamada memória imunológica, apesar de alguns fenómenos de memória terem vindo a ser apontados recentemente a células da resposta inata (i.e., fenómenos de *trained immunity*). Na resposta inata, fazem parte vários tipos de barreiras, destacando-se as barreiras mecânicas (como a pele e as membranas mucosas), as barreiras químicas (como o pH baixo do estômago) ou os mediadores químicos; mas também as barreiras microbiológicas assumidas pela normal microbiota, que habita por exemplo o sistema gastrointestinal. Do ponto de vista celular, observam-se as seguintes populações de leucócitos (não sendo as únicas): Monócitos (que se diferenciam nos tecidos em Macrófagos), células dendríticas, Neutrófilos, Eosinófilos, Basófilos e células NK (*Natural Killer cells*). Para além das células NK, foram também descritas recentemente outras populações linfoides na resposta inata que compõem os diferentes tipos de ILC (*Innate lymphoid cells*). (1, 3-7)

i. Inflamação

A resposta natural do sistema imune às agressões é dar início ao processo inflamatório, com vista a limitar, por exemplo, a progressão de uma infeção.

Nos locais de lesão, ocorre a ativação das células endoteliais, por ação de citocinas produzidas por células sentinelas presentes nos tecidos (i.e., células dendríticas, macrófagos e mastócitos). Uma vez ativadas, é induzida nestas um aumento na expressão de quimiocinas e de moléculas de adesão. As quimiocinas, junto com fatores de crescimento também produzidos nesta fase pelas células sentinela e endoteliais, são responsáveis pela migração dos leucócitos até ao local da inflamação, num processo designado de quimiotaxia. (1, 3, 4, 6, 7)

As primeiras células a chegarem ao local da agressão são leucócitos de linhagem mieloide, nomeadamente neutrófilos, monócitos - que se diferenciam em macrófagos nos tecidos-, e mastócitos. Estas células produzem citocinas e quimiocinas, assim como outras moléculas antimicrobianas e promotoras da inflamação, nomeadamente, proteases, defensinas, histamina prostaglandinas, leucotrienos e proteoglicanos. Pode ainda ser referido que os neutrófilos programam as APCs (células apresentadoras de antígenos), que por sua vez, ativam os Linfócitos T; e que os macrófagos realizam fagocitose e funções de APCs. (1, 3, 4, 6, 7)

Numa segunda fase, existe migração de Linfócitos efetores dos órgãos linfoides secundários (onde foram expostos a antígenos, com a sua consequente proliferação e diferenciação) até aos locais de infeção/lesão, onde desempenham as suas funções protetoras. (1, 3, 4, 6, 7)

Como acima descrito, existem diversas moléculas importantes para que o processo inflamatório se inicie e desenvolva, nomeadamente moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas. A adesão dos leucócitos à camada endotelial das vénulas pós-capilares é mediada por duas classes de moléculas, as seletinas, nomeadamente as seletinas P, E (presentes em células endoteliais) e L (presentes nos leucócitos); e integrinas, como a LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen 1*) e a VLA-4 (*very late antigen 4*), assim como os seus respetivos ligandos. Dentro das citocinas que podem atuar no processo inflamatório, pode-se destacar o TNF-alfa (Fator de Necrose Tumoral alfa), a Interleucina (IL)-1 e a IL-6, que são também chamadas de citocinas pró-inflamatórias, por intensificarem a resposta inflamatória. Entre as ações dependentes destas moléculas, observam-se a ativação e diferenciação de diversas células do sistema imune, o aumento da temperatura corporal, ou a produção aumentada de certas proteínas plasmáticas por parte do fígado, as chamadas proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa. (1, 3, 4, 6, 7)

a. Reconhecimento de padrões

O reconhecimento dos agentes patogénicos é um passo fundamental para a ativação da resposta inata e acontece exatamente porque certas moléculas presentes nos microrganismos são expressas com padrões diferentes dos encontrados em células humanas, permitindo o seu reconhecimento por recetores da resposta inata. Estes recetores de padrões (*ou pattern-recognition receptors - PRR*),

reconhecem então diferentes tipos de padrões molecular presentes na superfície ou no interior de vários microrganismos, e que designamos por PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). Esta estratégia de reconhecimento encontra-se otimizada, permitindo uma distinção adequada entre o que é estranho e o *self*. Existem vários tipos de PRRs na superfície das células da resposta inata, tais como os TLR (*Toll-Like receptors*) ou os recetores de manano (*mannan-binding lectin receptors*); e recetores citoplasmáticos, como os recetores NOD ou os recetores RIG-I helicase, que reconhecem estruturas dos microrganismos já processadas dentro das células, como os ácidos nucleicos, entre outros. Os PRR podem ainda reconhecer um outro tipo de padrões, os DAMP (*damage-associated molecular patterns*), que surgem em células danificadas ou que estão a morrer (quer se esteja perante um processo infeccioso ou não). (1, 3, 4, 8)

b. Fagocitose

A Fagocitose consiste no reconhecimento e ingestão de partículas por uma vesícula derivada da membrana plasmática (fagossoma). Entre as partículas ingeridas, encontram-se agentes patogénicos e células apoptóticas, indicando que este processo além de essencial para a eliminação microbiana, também é importante para a homeostasia tecidual. As células que realizam este processo designam-se de fagócitos, os quais podem ser divididos em profissionais e não profissionais. Os fagócitos profissionais incluem monócitos, neutrófilos, células dendríticas, osteoclastos e eosinófilos. Por oposição, os fagócitos não profissionais incluem fibroblastos, células epiteliais e células endoteliais, que apesar de não conseguirem ingerir microrganismos, são importantes na eliminação de corpos apoptóticos. (11)

O reconhecimento das partículas a serem fagocitadas ocorre via recetores presentes nos fagócitos, o que gera uma sinalização em cascata. Estes recetores podem ser divididos em opsónicos e não opsónicos. Os recetores não opsónicos conseguem reconhecer diretamente grupos moleculares presentes na superfície dos seus alvos, sendo que estes recetores incluem as moléculas CD169, CD33, lectinas do tipo C (Dectina-2, DNGR-1, Mincle), SRs (scavenger receptors) e a Dectina-1. Apesar de detetarem partículas estranhas, os TLRs não funcionam como recetores indutores de fagocitose – no entanto, colaboram com outros recetores não opsónicos para estimular este processo. (11)

Os recetores opsónicos reconhecem moléculas designadas de opsoninas (produzidas pelo hospedeiro), sendo que estas últimas se ligam a partículas estranhas e as tornam um alvo para fagocitose. As opsoninas incluem anticorpos, complemento, fibronectina, lectina, MBL (mannose-binding lectin) e a lactaderina. Entre os recetores opsónicos, os mais bem caracterizados (e talvez mais importantes) são os recetores Fc (FcR) e do complemento (CR). Os FcR reconhecem a porção constante (Fc) das imunoglobulinas da classe IgG e IgA; por oposição, os recetores do complemento,

como o CR3, ligam-se às moléculas de iC3b depositadas nas partículas estranhas (após ativação do Complemento). (11)

c. Ativação do Complemento

Desde as fases mais precoces de uma lesão, pode existir também a ativação Sistema do Complemento, um sistema complexo de enzimas que circulam na corrente sanguínea num estado inativo e que são ativadas sequencialmente. Este sistema tem diversas funções: 1) lise dos agentes patogénicos ou das células danificadas e infetadas; 2) opsonização (*coating*) de entidades estranhas para intensificar a fagocitose; 3) clearance de imunocomplexos; 4) geração de mediadores envolvidos na resposta inflamatória, vulgarmente chamados de anafilotoxinas. (8, 10)

Existem 3 vias de ativação do Sistema do Complemento: a via clássica (dependente do reconhecimento de complexos imunes), a via alternativa (independente da resposta humoral) e a via das lectinas (que reconhece maioritariamente resíduos de manose na superfície de patogénicos. (8, 10)

ii. Células da resposta inata imune

a. Neutrófilos

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes em circulação (50-75%), apresentando um núcleo segmentado em 3-5 lóbulos. Estes fazem parte dos chamados Granulócitos, sendo que os seus grânulos podem ser divididos em primários – contêm substâncias antimicrobianas, como mieloperoxidasas, lisozimas, elastase, proteinase-3, defensinas e catepsina G - e secundários/específicos – contêm lisozima, gelatinase, lactoferrina, colagenase e componentes de “burst” respiratório. A principal função destas células é a fagocitose de microrganismos (especialmente os que se encontram opsonizados) e de produtos de necrose celular. Além disso, estas células também secretam para o espaço extracelular o conteúdo dos seus grânulos, e expulsam os seus conteúdos nucleares, formando NETs (*neutrophil extracellular traps*) que imobilizam e matam microrganismos extracelulares. O seu tempo de semivida é curto, e após entrada nos tecidos (em contexto de infeção/inflamação), morrem após 1-2 dias. Tal como já descrito, estas são as primeiras células que surgem nos locais onde existe lesão. (3, 8, 12)

b. Monócitos e Macrófagos

Monócitos

Os Monócitos são as maiores células no sangue periférico, correspondendo a 4-10% de todos os leucócitos em circulação. Todos os monócitos expressam moléculas de MHC classe II, CD11b e CD86 - no entanto, estas células podem ser divididas em 2 subpopulações, os monócitos clássicos e

os monócitos não clássicos, que podem ser distinguidas pela expressão relativamente elevada de CD14 nos primeiros. Os monócitos clássicos/inflamatórios correspondem a cerca de 90-95% do total de monócitos, produzem mediadores inflamatórios, nomeadamente citocinas pró-inflamatórias e ROIs (*reactive oxygen intermediates*), têm capacidade fagocítica, e são rapidamente recrutados para locais de infecção/lesão tecidual (onde se diferenciam em macrófagos). Os monócitos não clássicos correspondem aos restantes 5-10%, sendo recrutados para os tecidos após a ocorrência de infecção/lesão, podendo contribuir para a sua reparação. (3, 8, 12)

Os monócitos contêm dois tipos de grânulos: os primeiros com peroxidase, fosfatase ácida e arilsulfatase (semelhantes aos lisossomas dos neutrófilos); os segundos com lisozima, lipase e β -glucuronidase. (3, 8, 12)

Macrófagos

Os macrófagos são células que podem resultar da diferenciação de monócitos recrutados para locais de lesão/infecção, apesar de estudos recentes realizados em modelos animais sugerirem que a maioria dos macrófagos residentes nos tecidos (em condições normais) têm origem embrionária - mais precisamente no saco vitelino ou no fígado fetal, colonizando os tecidos/órgãos durante o desenvolvimento fetal e embrionário. A sua capacidade de proliferação permitirá depois a sua autorrenovação nos tecidos. (3, 8, 12, 13)

Estas células possuem diferentes nomes, dependendo do tecido onde estão localizadas: no pulmão, designam-se por macrófagos alveolares; no fígado, células de Kupffer; no cérebro, células microgliais; nos ossos, osteoclastos; no tecido conjuntivo, histiócitos. (3, 8, 12, 13)

Os macrófagos são elementos importantes para a resposta imune inata e adaptativa. O seu papel na resposta imune inata contribui para a erradicação de microrganismos e para a atividade anti-tumoral, atuando com secreção de mediadores solúveis e por apresentarem, tal como os neutrófilos, capacidade fagocítica, apesar de a sua motilidade ser mais lenta. O seu potencial é intensificado quando os macrófagos se tornam ativados por contacto com microrganismos ou com citocinas, bem como pela interação com células T. Na verdade, na resposta imune adaptativa, os macrófagos são essenciais para a apresentação antigénica a Linfócitos T. Os macrófagos podem ainda promover a reparação de tecidos danificados, ao estimularem a angiogénese e a síntese de uma matriz extracelular rica em colagénio (por ação de diversas citocinas). (3, 8, 12, 13)

O seu fenótipo pode variar, conforme os estímulos. Existem 2 grandes fenótipos descritos:

1) macrófagos M1 (ativação clássica), ativados por citocinas libertadas por Linfócitos Th1 (i.e., GM-CSF, TNF- α e IFN- γ) e/ou LPS (lipopolissacáridos) de bactérias. Estes produzem citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, e TNF- α . (3, 8, 12, 13)

2) macrófagos M2 (ativação alternativa), ativados por citocinas libertadas por Linfócitos Th2 (i.e., IL-4 e IL-13) e produzem citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e o TGF- β . (3, 8, 12, 13)

c. Células Dendríticas

As células dendríticas (DC) encontram-se nos tecidos (tecidos linfoides, mucosas epiteliais e parênquima de diversos órgãos) e em circulação, possuindo a capacidade de detetar microrganismos. Na presença de um microrganismo, estas células passam de imaturas a maduras, e iniciam uma resposta imune inata. Além disso, estas são capazes de apresentar à sua superfície proteínas dos agentes por ela fagocitados, para que possam ser reconhecidas pelos Linfócitos T naïves presentes nos nódulos linfáticos, promovendo a sua ativação e diferenciação (e com isto, dando-se início à resposta imune adaptativa). São considerados os fagócitos mais potentes. (3, 8)

Existem diferentes classes de DC, sendo que o desenvolvimento de todas elas depende da citocina FLT3L, e que todas elas expressam a proteína CD11c: 1) Células dendríticas clássicas/convencionais – principal classe de DC responsável pela captura de antígenos proteicos oriundos de microrganismos que entram através das barreiras epiteliais (com posterior apresentação aos Linfócitos T), 2) células dendríticas plasmocitóides - Encontradas no sangue (e em pequenos números nos órgãos linfoides). São as maiores produtoras de Interferão do tipo I (enorme potencial antiviral), descritas mais à frente. Apresentam capacidade para capturar microrganismos transmitidos pelo sangue (*blood borne*), migrando até ao baço, onde apresentam os seus antígenos aos Linfócitos T; 3) células dendríticas derivadas de monócitos – derivam de monócitos recrutados para locais de infeção. Apresentam marcadores típicos de DC e de monócitos (i.e., CD11b e CCR2); e 4) células de Langerhans - presentes na epiderme. (8)

d. Mastócitos

Os mastócitos são células com uma distribuição ampla, estando presentes em diversos tecidos (i.e., pele, tecido conjuntivo e mucosas epiteliais dos tratos digestivo, respiratório e genital-urinário). Estas encontram-se geralmente adjacentes a nervos e pequenos vasos sanguíneos, e não se encontram em circulação no sangue periférico. (3, 8, 12)

Os mastócitos são considerados células sentinela, que rapidamente secretam citocinas pró-inflamatórias e mediadores lipídicos na presença de infeções e outros estímulos. Estes contêm diversos grânulos citoplasmáticos, cujo conteúdo inclui mediadores inflamatórios, que são libertos

quando os mastócitos são ativados - quer por agentes microbianos (por ligação aos TLR presentes na sua superfície), como por um mecanismo dependente de anticorpo (por ligação de imunoglobulinas da classe IgE aos recetores FcεRI presentes na sua superfície). Os grânulos contêm aminas vasoativas (i.e., histamina), que causam vasodilatação e aumento na permeabilidade capilar; e enzimas proteolíticas, capazes de matar bactérias e inativar toxinas microbianas. Como descrito acima, os mastócitos também produzem mediadores lipídicos (como leucotrienos e prostaglandinas) e citocinas (como o TNF). Uma vez que se localizam perto de vasos sanguíneos, os grânulos libertados por estas induzem alterações de forma rápida. Os mastócitos também promovem defesas contra parasitas (helmintas) e são responsáveis pelos sintomas das doenças alérgicas, havendo evidências de que podem ainda funcionar como APCs. (3, 8, 12)

e. Basófilos

Os basófilos representam menos de 1% de todos os leucócitos, e são considerados os menores granulócitos. Estas células constituem as principais células imunes envolvidas na resposta alérgica e nas reações de hipersensibilidade – inclusive asma, anafilaxia e rinite alérgica. Os basófilos auxiliam no combate contra helmintas e contra diversas infeções bacterianas, nomeadamente por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), Streptococcus não hemolíticos, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*). (3, 8, 12, 14)

Os seus grânulos contêm moléculas como fatores de crescimento, histamina, proteases de serina, leucotrienos, prostaglandinas, citocinas e uma pequena quantidade de heparina. A histamina atua ao promover a contração dos músculos-lisos, enquanto a heparina atua como anticoagulante. As moléculas produzidas pelos basófilos ainda auxiliam no estabelecimento de uma resposta inflamatória Th2 (por ação de certas citocinas, como a IL-4 e a IL-13), e estimulam os Linfócitos B a produzirem anticorpos da classe IgE. (3, 8, 12, 14)

A ativação clássica dos basófilos ocorre através da ligação de imunocomplexos IgE-antígeno a recetores presentes na membrana destas células, designados de FcεR1. No entanto, a ativação destas células também pode ocorrer por ação de diversas citocinas, nomeadamente IL-17, IL-18, IL-26 e IL-33; ou pela ligação de recetores específicos aos fragmentos do complemento C3a e o C5a, que promovem a libertação de histamina. (3, 8, 12, 14)

f. Eosinófilos

Os eosinófilos correspondem a aproximadamente 1-3% dos leucócitos em circulação no sangue, em condições normais. Esta percentagem encontra-se aumentada em contexto de reações alérgicas ou em resposta a certas infeções por parasitas. (3, 8, 12, 14, 15)

Estas células apresentam grânulos distribuídos uniformemente, com o seu conteúdo a incluir lisozima, citocinas (i.e., IL-4, IL-6, IL-13, IL-2, IL-8, TNF- α , IFN- γ), catalase, fatores de crescimento (i.e., GM-CSF, TGF- α/β), mediadores lipídicos (i.e., fator ativador de plaquetas - PAF), leucotrieno C4 (LTC4), metaloproteinases de matriz (MMPs), proteína catiónica eosinofílica (ECP), peroxidase eosinofílica (EPO), proteína básica major (MBP), e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN). (3, 8, 12, 14, 15)

A MPB causa perturbações nas membranas celulares e consegue matar parasitas grandes que não podem ser fagocitados (i.e., Schistosoma). Esta molécula ainda estimula a resposta inflamatória de outras células imunes, nomeadamente neutrófilos (aumento na produção de IL-8 e superóxido) e mastócitos (aumento na libertação de histamina). A ECP apresenta atividade antiviral; e é capaz de aglutinar bactérias Gram negativas, ao se ligar a LPS e peptidoglicanos. A EDN reduz significativamente a infecciosidade por vírus sincicial respiratório do grupo B; e promove a ativação das células dendríticas. A EPO facilita a geração de espécies de oxigénio reativas. O Fator de crescimento nervoso (do inglês, *nerve growth factor*) prolonga a sobrevivência dos neutrófilos e mastócitos. Entre as citocinas, a IL-4 e a IL-13 estimulam a proliferação de Linfócitos B e a produção de IgE; e a IL-6 promove a sobrevivência dos plasmócitos. Estes são exemplos de manifestações promovidas por algumas das moléculas produzidas pelos eosinófilos, sendo que estas manifestações também incluem aumento na permeabilidade vascular, constrição da musculatura lisa e aumento na secreção de muco. (3, 8, 12, 14, 15)

A ativação dos eosinófilos pode ser mediada por ligação de recetores de membrana designados Fc γ RII, às imunoglobulinas IgG-1 e IgG-3. Esta ligação induz a desgranulação dos grânulos destas células, promovendo um processo de ADCC (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*). Esta ativação também pode ocorrer por ligação de recetores específicos a várias proteínas do complemento – inclusive C3a e C5a, que promovem o recrutamento dos eosinófilos. Pensa-se que o complemento facilita a aderência e dano dos eosinófilos a helmintas da classe Nematódea. (3, 8, 12, 14, 15)

Os eosinófilos são ainda capazes de reconhecer PAMPS, como Lipopolissacáridos (LPS) e beta-glucanos, presentes em bactérias e fungos, respetivamente, e produzem “armadilhas” (do inglês, *traps*) extracelulares constituídas por ADN mitocondrial e conteúdo dos seus grânulos, que são induzidas por LPS das bactérias Gram negativas. Apesar de não ser esta a sua principal função, têm ainda capacidade fagocítica, contudo, consideravelmente menos eficiente que a dos neutrófilos, não só por estarem presentes em menor número, mas também pela falta de enzimas digestivas. Além disso, os eosinófilos conseguem apresentar antígenos a Linfócitos T. (3, 8, 12, 14, 15)

g. Células Linfoides Inatas

As células Linfoides Inatas (ILC, do inglês *Innate lymphoid cells*) são células presentes em todos os tecidos, estando mais concentrados na superfície de mucosas. A sua presença no sangue periférico é rara. À semelhança dos Linfócitos B e T, desenvolvem-se a partir do progenitor linfoide comum, tornando-se posteriormente Linfócitos residentes dos tecidos. (7, 8, 16)

As ILC refletem os fenótipos e funções dos Linfócitos T, e podem ser classificadas de diversas formas, nomeadamente com base na sua origem, habilidade de produzir citocinas e os principais reguladores de transcrição. Esta classificação separa as ILC em três grupos distintos (7, 8, 17, 18):

1) As **ILC-1** englobam as células sensíveis à IL-12, IL-15 e IL-18, que promovem a ativação do fator de transcrição T-bet; e que secretam IFN- γ ou TNF-alfa. Este grupo inclui ILC1 homólogas dos Linfócitos Th1 e Células NK;

2) As **ILC-2** englobam as células sensíveis à IL-25, IL-33 e à TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*), que ativam o fator de transcrição GATA-3; e que secretam IL-4, IL-5, IL-13 e anfiregulina (Areg). Estas células são homólogas dos Linfócitos Th2;

3) As **ILC-3** englobam células sensíveis a IL-1 β a IL-23, que ativam o fator de transcrição ROR γ t; e que secretam IL-17a, IL-22, IFN- γ e GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). Estas células são homólogas dos Linfócitos Th17, e incluem, por exemplo, as células LTi (*Lymphoid tissue inducer*). (10,11, 18,19)

Apesar de homólogas aos diferentes subgrupos de Linfócitos T, as ILC não expressam recetores de antigénio (TCR) e não passam por um processo de seleção e expansão clonal quando estimuladas. As ILC atuam numa fase precoce da resposta imune, reagindo rapidamente a diversos sinais - nomeadamente citocinas, que neste contexto, também podem ser chamadas de alarminas. As alarminas são produzidas numa resposta inata a infeções e tecido danificado, por parte de células sentinela residentes nos tecidos. (7, 8, 17, 18)

h. Células NK

As células NK são células linfoides da resposta inata, granulares, que não possuem um recetor de antigénio, com atividade citotóxica. Fenotipicamente, caracterizam-se pela ausência de expressão de CD3, CD4 e CD19; e tipicamente, expressam de CD16 e CD56, podendo ainda expressar níveis variáveis de CD8. As células NK reconhecem e destroem células infetadas por vírus e células tumorais, através da produção de perforinas e granzimas (à semelhança dos Linfócitos Tc), bem como de várias citocinas. Este processo não requer que os antigénios tenham de ser expressos em moléculas de MHC classe I ou II. Na verdade, as células NK atuam nas células-alvo quando estas não expressam

MHC classe I na sua superfície (ou a sua quantidade está muito reduzida). Por outro lado, são capazes de reconhecer IgGs que estejam a revestir as células-alvo (processo de ADCC), sendo este processo mediado pelo CD16, um recetor de baixa afinidade da IgG (Fc γ RIII), presente em cerca de 90% das células NK. (1, 4, 10, 19-22)

iii. Outros Mediadores da Resposta Inata

a. Interferões

Em relação à resposta antiviral, é importante ainda salientar a ação dos interferões, mais especificamente os Interferões α (alfa), β (beta) e γ (gama). Os Interferões do tipo I (α e β) são sintetizados no início da infeção viral, por várias populações celulares, incluindo as próprias células infetadas. Estes vão induzir um “estado de proteção antiviral” nas células adjacentes, por exemplo, por inibição da síntese proteica. Por sua vez, o interferão γ atua principalmente ao intensificar a morte celular, nomeadamente através da ativação dos macrófagos e de outras células com capacidade fagocítica e citotóxica; mas é também responsável por aumentar a síntese de moléculas de MHC de classe I e II, o que de alguma forma permitirá dar início aos mecanismos de reconhecimento da resposta adaptativa. (4, 5)

1.1.2. Imunidade Adquirida

A Imunidade Adquirida (ou adaptativa) tem as suas respostas normalmente iniciadas com a ajuda do sistema imune inato. Na verdade, as respostas inatas e adaptativas são complementares e trabalham em conjunto. Assim, numa primeira etapa, a apresentação do antígeno vai permitir o seu reconhecimento específico por clones de Linfócitos, seguindo-se então o desenvolvimento de uma resposta imune específica, com ativação de vias efetoras que eliminam os agentes estranhos agressores. Em paralelo, ocorre o desenvolvimento de memória imunológica, uma característica fundamental da Imunidade adquirida. Isto significa que, após uma reexposição a um antígeno, há o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa mais rápida e eficaz, assegurada pela ativação de Linfócitos T e B de memória, que se mantém após a resolução da infeção primária - mesmo depois de as células efetoras terem desaparecido. (1, 3, 4)

As células que assumem os mecanismos da Imunidade Adquirida são os Linfócitos T, ativados após interação e apresentação dos antígenos por APCs; e os Linfócitos B, que após ativação, se diferenciam em células de memória e plasmócitos, capazes de produzir anticorpos. (1)

i. Apresentação do Antígeno

As principais vias de entrada de microrganismos (como a pele e tratos gastrointestinal e respiratório) contém células apresentadoras de antígeno especializadas, que vão capturar antígenos, transportá-

los para os tecidos linfoides periféricos e apresentá-los aos Linfócitos aí presentes, levando à sua ativação e diferenciação. As APCs são tipicamente células dendríticas (DCs), macrófagos, e Linfócitos B, sendo as DCs as APCs mais eficazes - sobretudo para a ativação de células T naive. Quer os Linfócitos B, quer os macrófagos, são mais limitados na sua capacidade de ativar um Linfócito T naive, mas conseguem ativar adequadamente Linfócitos T de memória e efetores. Nos centros germinativos dos folículos linfoides, existem ainda células dendríticas foliculares, que não funcionam como APCs para os Linfócitos T, mas estão envolvidas nos processos de diferenciação dos Linfócitos B. (23)

A apresentação de antígenos ocorre principalmente por intermédio de moléculas de MHC classe I e II, que se apresentam na superfície das células APC, expondo antígenos de origem proteica. No humano, estas moléculas pertencem ao chamado complexo HLA (*Human Leucocyte Antigens*), um complexo de genes altamente polimórfico, localizado no braço curto do cromossoma 6. Estes genes são expressos num padrão de codominância, o que significa que há expressão concomitante de alelos paternos e maternos em todas as células. (10, 19, 23-25)

As moléculas de MHC classe I podem ser divididas em clássicas (i.e., HLA-A, HLA-B, HLA-C) e não-clássicas (i.e., HLA-E, HLA-F, HLA-G, MICA, MICB, entre outras). Todas as moléculas de MHC classe I possuem 3 subunidades α e uma subunidade de β -microglobulina (codificada por um gene no cromossoma 12). A variabilidade destas moléculas reside sobretudo ao nível das subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 2$. Todas as células nucleadas e as plaquetas expressam MHC de classe I (em graus variados), expondo antígenos formados no meio intracelular (endógenos), como acontecerá com partículas virais em células infetadas, no decorrer de uma infeção viral. Fora de contexto infeccioso ou tumoral, estas moléculas apresentam antígenos do “self”, para que a célula possa ser identificada como normal pelas células do sistema imune. (10, 19, 23-25)

A moléculas de MHC classe II também podem ser divididas em clássicas - HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR; e não clássicas - HLA-DM e HLA-DO. Todas as moléculas de MHC II possuem duas cadeias, uma composta por duas subunidades α e outra por duas subunidades β . A expressão de MHC de classe II é praticamente exclusiva de APCs (macrófagos, células dendríticas e Linfócitos B). Há, no entanto, a possibilidade de se verificar a sua expressão noutras células, como Linfócitos T ativados, endotélio vascular inflamado e algumas células epiteliais (i.e., no timo). Tipicamente, os antígenos apresentados são de origem extracelular (exógenos), tendo sido internalizados por fagocitose, macropinocitose ou transporte mediado por recetores como o BCR. (10, 19, 23-25)

Assim, de acordo com a sua origem, os antígenos são processados e apresentados em moléculas de MHC de classe I ou II, existindo respetivamente a via endógena e a via exógena de processamento e apresentação. (1, 10, 19, 23-25)

ii. Linfócitos T

Os Linfócitos T são células caracterizadas pela expressão de um TCR (*T-cell receptor*), que pode ser constituído por cadeias α e β (TCR $\alpha\beta$) ou cadeias γ e δ (TCR $\gamma\delta$). (8, 10, 26-28)

A sua maturação acontece no timo, onde a partir dos timócitos imaturos, originam-se diversas populações de Linfócitos T CD4 e Linfócitos T CD8. Os Linfócitos T CD8 são classicamente Linfócitos T citotóxicos, e os Linfócitos T CD4 são também chamados de auxiliares ou *helper*, de acordo com as principais funções assumidas por estas células, que podem também diferenciar-se em Linfócitos T reguladores (Tregs). Os Linfócitos Tregs expressão tipicamente o fator de transcrição Foxp3, tendo como função o controlo do Sistema Imunitário, prevenindo uma resposta descontrolada contra um agente estranho e respostas autoimunes contra antígenos do *self*. (8, 10, 26-28)

Cerca de 90 a 95% dos Linfócitos T num indivíduo adulto possuem TCR $\alpha\beta$, enquanto os Linfócitos T com TCR $\gamma\delta$ correspondem a cerca de 5-10% dos Linfócitos T em circulação no sangue periférico. Os Linfócitos T $\gamma\delta$ pertencem a um grupo comumente designado de Linfócitos T não convencionais (ou *innate like T cells*), tal como os Linfócitos NKT e MAIT (*mucosal-associated invariant T cells*). Todas estas populações celulares se encontram principalmente em barreiras biológicas (mucosas), sendo abundantes em tecidos epiteliais (i.e., trato gastrointestinal, pulmões, pele, entre outros). Estes Linfócitos T *innate-like* apresentam características típicas, nomeadamente o facto de reconhecerem um número limitado de antígenos (maioritariamente de origem não proteica), que podem não ser apresentados pelas APCs em moléculas clássicas de MHC de classe I e II. Neste caso, são estimulados pela ligação do TCR (e outros recetores) a moléculas como citocinas e moléculas de MHC de classe I não clássicas, como o MICA e MICB (produzidos em condições de stress celular) ou o CD1d (apresenta antígenos lipídicos ou glicolipídicos). Relativamente aos antígenos de origem proteica, este grupo de células é capaz de reconhecer certas proteínas solúveis que não foram previamente processadas e expostas via MHC clássico, como acontece em alguns subsets de Linfócitos T $\gamma\delta$. Após serem estimuladas, estas células vão atuar na estimulação/ativação de outras células do sistema imunitário. (8, 10, 26-28)

a. Maturação dos Linfócitos T

A maturação dos Linfócitos T começa a partir de células pluripotenciais hematopoiéticas (HSC, do inglês *Hematopoietic Stem Cells*), que se diferenciam em progenitores multipotentes (MPP), e estes, em progenitores linfoides comuns (CLP). Os CLP vão migrar da medula óssea para o timo, um

compartimento distinto e crucial para a seleção e maturação de Linfócitos T. OS CLP chegam ao timo com potencial para se poderem diferenciar em Linfócitos T, células NK, ou células dendríticas de origem linfoide. (8, 10, 26, 29-31)

As células linfoides imaturas que povoam o timo, também designadas de timócitos, apresentam estádios diferentes de desenvolvimento e morfologia semelhante, sendo normalmente distinguíveis pelo seu padrão de expressão de marcadores de superfície ou pelo status do rearranjo dos genes que codificam as cadeias do TCR. Assim, a maturação dos timócitos no timo foi dividida em 3 fases: 1) DN (dupla negativa), na qual não existe expressão de CD4 e de CD8; 2) DP (dupla positiva), no qual há expressão concomitante de CD4 e CD8; e 3) SP (simples positiva), no qual ocorre a expressão exclusiva de CD4 ou de CD8. (8, 10, 26, 29-31)

A fase DN divide-se em 4 etapas (DN1-DN4), com base na expressão de marcadores como CD34, CD1a e CD38, e no local do timo onde estes timócitos se encontram. Durante a fase DN, ocorre o rearranjo do locus que codifica a cadeia β do TCR, que possui diversos segmentos V (*variable*), D (*diversity*) e J (*joining*) – correspondentes à região variável da cadeia β -, e ainda um segmento correspondente à região constante da cadeia. Após o processo de rearranjo das regiões VDJ, o segmento final passa por uma etapa de checkpoint, na qual se junta a um homólogo da cadeia α do TCR, chamado pT α . Caso este pré-TCR seja funcional, o timócito recebe um sinal de diferenciação e sobrevivência que envolve a sinalização Notch 1, avançando para a fase DP. A partir deste momento, também ocorre inibição do rearranjo do outro locus da cadeia β e dos loci que codificam as cadeias γ e δ . Se o rearranjo em ambos os loci β falhar, a célula entra em apoptose. É também o sinal do pré-TCR que permitirá o início da expressão de CD4 e CD8, o que fará com que a célula entre na fase seguinte, DP. (8, 10, 26, 29-31)

Na fase DP, ocorre o rearranjo do locus que codifica a cadeia α do TCR, que por oposição ao locus da cadeia β , não possui segmentos D. Antes de haver um avanço para a terceira e última fase, existe um novo checkpoint que seleciona os TCR funcionais (agora já com as cadeias α e β). Neste momento, desenvolvem-se processos de seleção positiva e de seleção negativa. Na seleção positiva, é promovida a sobrevivência dos timócitos cujos TCRs se ligam com baixa afinidade a complexos MHC-péptidos do self dispostos em células epiteliais do córtex do timo. Os timócitos cujos TCRs não reconhecem esses complexos, morrem por apoptose. Por sua vez, na seleção negativa, os timócitos cujos TCRs reconhecem complexos MHC-péptidos do self com elevada afinidade, sofrem apoptose ou diferenciam-se em Linfócitos T reguladores. Este processo elimina os Linfócitos T com um elevado potencial de autoreatividade, consistindo num mecanismo de auto-tolerância ou tolerância central. Várias teorias sugerem ainda que a ligação a complexos com MHC I ou classe II determinam depois

a seleção de linhagem, com os Linfócitos T CD8+ a responderem a moléculas de MHC classe I, e os Linfócitos T CD4+ a ligarem-se a complexos MHC classe II. (8, 10, 26, 29-31)

No fim destes processos de seleção, são obtidos os diversos clones de Linfócitos T naive, que expressam apenas CD4 ou CD8, e que apresentam diferentes especificidades para antígenios. A partir do momento em que timócitos SP saem do timo e entram na circulação, chegando aos tecidos linfoides secundários, são considerados Linfócitos T CD4+ ou CD8+ periféricos naive maduros. (10)

b. Ativação e diferenciação dos Linfócitos T

No decurso de uma resposta imune, a apresentação do antígeno permite a ativação dos Linfócitos T naive, começando estes a proliferar e a diferenciar-se em células efetoras e de memória. Esta ativação inicial ocorre principalmente nos órgãos linfoides secundários (mais precisamente no paracórtex dos nódulos linfáticos), onde os antígenios estranhos capturados se concentram e são apresentados às células T, via APCs (i.e., DCs). (5, 19)

As células efetoras geradas são depois ativadas pelo mesmo antígeno, começando a desempenhar as suas funções para a eliminação da fonte do antígeno já nos tecidos. (4) O processo de ativação dos Linfócitos T naive pode levar à sua diferenciação em Linfócitos T citotóxicos (tipicamente CD8+) ou Linfócitos T helper, Th, (tipicamente CD4+). Os Linfócitos T CD8+ estão principalmente envolvidos na destruição de células infetadas por agentes estranhos (i.e., vírus) e células tumorais, sendo ativados por interação com antígenios apresentados em moléculas de MHC classe I. Os Linfócitos T CD4+ medeiam sobretudo a resposta imune ao direcionar a ação de outras células, sendo ativados por reconhecimento de antígenios ligados a moléculas de MHC classe II. Após ativação, os Linfócitos Th produzem diversas citocinas que influenciam a atividade de vários tipos celulares, inclusive das APCs que os ativam. (1)

A ativação dos Linfócitos T envolve três sinais diferentes:

1) sinal 1: ligação entre o antígeno, apresentado pelas células dendríticas em moléculas de MHC, e os TCRs presentes na superfície dos Linfócitos T naive. Nesta ligação, também ocorre a ancoragem das moléculas de CD4 e CD8 a regiões não poliméricas das moléculas de MHC classe II e I, respetivamente. As caudas ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) presentes nas moléculas de CD3 (associadas aos TCRs) são fosforiladas por ação de enzimas Lck, com o desenvolvimento de um processo de sinalização que se prolonga durante horas, e que é necessário para a ativação de certos fatores de transcrição nucleares. (1, 4, 8, 10, 24, 32, 33)

2) sinal 2 (coestimulação): na maioria dos casos, a ligação entre os TCRs e os antígenios presentes nas moléculas de MHC não é suficiente para ativar os Linfócitos T naive, sendo necessário um

segundo sinal, que é induzido através de recetores coestimuladores. O principal recetor de coestimulação presente nos Linfócitos T (e também o mais bem caracterizado) é o CD28, que se liga aos seus ligandos, presentes principalmente em APCs (como células dendríticas, macrófagos e Linfócitos B), o B7-1 (CD80) ou o B7-2 (CD86). Inicialmente, as células dendríticas não expressam níveis ótimos das moléculas do complexo B7, mas, a própria ligação inicial CD28-B7 leva à sobre-regulação da produção de CD40L por parte dos Linfócitos T, que ao ligar-se ao CD40 presente nas células dendríticas, promove um aumento na expressão de B7 nas APC. Este processo aplica-se sobretudo aos Linfócitos Th, uma vez que os Linfócitos Tc não expressam CD40L. Como tal, a sua ativação depende da ligação a uma célula dendrítica cuja expressão de B7 já tenha sido previamente estimulada por interação com um Linfócito Th. Este processo designa-se também de *DC licensing*. (1, 4, 8, 10, 24, 32, 33)

A coestimulação via CD28 tem diversos efeitos moleculares, nomeadamente a expressão de proteínas anti-apoptóticas (i.e., BCL-2), a produção de citocinas (i.e., IL-2), a expressão de recetores (em particular IL-2R) na superfície dos Linfócitos T, e ainda a expressão de moléculas reguladoras e coestimuladoras adicionais. Além do CD28, já se identificaram outros coestimuladores, como o ICOS (*inducible costimulator*, CD278), cujo ligando, ICOS-L (CD275), é expresso em DCs, Linfócitos B e outras populações de células. O ICOS desempenha um papel essencial nas respostas de Linfócitos T ligadas à reação do centro germinativo. De facto, este recetor é fundamental para o desenvolvimento e ativação de Linfócitos Th foliculares, que são essenciais para a formação de centros germinativos e consequentemente de Linfócitos B produtores de anticorpos de alta afinidade. (1, 4, 8, 10, 24, 32, 33)

3) sinal 3: citocinas presentes no microambiente. Os Linfócitos T ativados conseguem produzir muitas das citocinas que se vão ligar aos recetores de citocinas produzidos em resposta ao Sinal 2, sendo a IL-2 a principal. Acredita-se que a IL-2 é crucial para a proliferação de Linfócitos T naive ativados. (1, 4, 8, 10, 24, 32, 33)

O potencial destrutivo dos Linfócitos T deve ser altamente controlado, para que seja aplicado apenas onde e quando necessário. Como tal, esta ativação é influenciada por um equilíbrio entre a estimulação de recetores ativadores e de recetores inibidores (todos eles pertencentes à família CD28). Destacam-se aqui o PD-1 (*programmed death-1*) e o CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated molecule 4*), ambos muito importantes para limitar respostas imunes e prevenir reações autoimunes. O CTLA-4 é expresso de forma constitutiva (e em elevados níveis) por Linfócitos T reguladores (Tregs), e de forma transitória em Linfócitos T recentemente ativados. Esta molécula atua por competição com o CD28, uma vez que ambos reconhecem os mesmos ligandos (B7-1 e B7-2). No entanto, a afinidade do CTLA-4 para o B7 chega a ser 10 a 20 vezes superior à do CD28. O

PD-1, por sua vez, é expresso em Linfócitos T ativados, células NK, Linfócitos B, macrófagos, monócitos e células dendríticas, atuando assim na inibição quer da resposta imune adaptativa, quer da inata. O PD-1 vai reconhecer dois ligandos, o PD-L1 (expresso em macrófagos, Linfócitos B, DCs, células endoteliais e hematológicas, entre outros) e o PD-L2 (expresso sobretudo em DCs ativadas, macrófagos e Linfócitos B). Apesar de ambos atuarem como agentes inibitórios da resposta imune, o CTLA-4 e o PD-1 parecem ter funções complementares (e não idênticas). Esta afirmação é sustentada, por exemplo, pelo facto de o PD-1 parecer ser mais importante para terminar a resposta dos Linfócitos T efetores nos tecidos periféricos (especialmente os CD8+), limitando uma resposta excessiva contra agentes patogénicos (principalmente vírus), enquanto o CTLA-4 atua ao limitar a ativação inicial dos Linfócitos nos órgãos linfoides secundários, prevenindo resposta a antígenos do *self*. (4, 8, 10, 32, 34, 35)

Os Linfócitos Th ativados (chamados inicialmente de Th0) ainda passam por uma diferenciação terminal em diversos *subsets* de células efectoras. Dos vários *subsets*, podem-se destacar os Linfócitos Th1, Th2 e Th17. Existem outros, como os Linfócitos Th9, Th22 e Th foliculares; ou ainda, os já mencionados Linfócitos T reguladores, que se podem diferenciar igualmente na periferia. A diferenciação dos vários *subsets* depende da ação de diferentes citocinas, que levam à regulação dos fatores transcricionais tipicamente associados a cada população. (36)

c. Linfócitos Th1

No contexto de uma infeção por agentes intracelulares (i.e., bactérias intracelulares, protozoários, ou vírus, como o Citomegalovírus) ou no desenvolvimento de células tumorais, células como os macrófagos e as DCs produzem determinadas citocinas, como IL-12 e interferões dos tipos I (IFN- α e - β) e II (IFN- γ). Isto leva à ativação de fatores de transcrição, como o STAT1 e o STAT4, e à consequente diferenciação da célula num Linfócito Th1, capaz de produzir ainda mais IFN- γ , bem como GM-CSF, IL-2 e TNF- α . (1, 4, 10, 19-22)

Na verdade, os IFN α e β são principalmente produzidos por células infetadas, apesar de as DCs plasmocitóides serem também importantes produtoras destes interferões, uma vez que possuem PRRs endossomais, principalmente TLR9, que lhes permitem detetar ARN e ADN viral, ou mesmo os fibroblastos. Estes interferões são estimuladores de genes antivirais, cujo propósito é prevenir a replicação viral no interior das células infetadas, assim como das células saudáveis que as rodeiam. (1, 4, 10, 19-22)

O IFN- γ é, numa fase inicial, predominantemente produzido por células NK e por ILC-1, através do estímulo promovido pela interação com os agentes infecciosos e com a IL-12 e os IFN- α e - β . Mais tarde, passa então a ser também produzido pelos Linfócitos Th1 e células T citotóxicas. O IFN- γ

auxilia no processo de diferenciação de forma direta e indireta, visto que estimula os macrófagos e as DCs a produzirem mais IL-12, num *loop* em que IFN- γ e IL-12 estimulam reciprocamente a sua produção. Além disso, o IFN- γ também estimula a produção de mais moléculas pró-inflamatórias (como IL-1, TNF e quimiocinas) em várias populações celulares, e promove a chamada ativação clássica dos macrófagos (M1), que intensifica a sua atividade fagocítica e oxidativa. O IFN- γ vai ainda ter outros efeitos, nomeadamente o aumento da produção de MHC classe I e II (intensificando a apresentação antigénica); a diferenciação dos Linfócitos B em plasmócitos produtores de anticorpos IgG-1, que além de ativarem o complemento, servem como opsoninas, e por fim, a diferenciação de células Tc efectoras, atuando em conjunto com a IL-2 produzida por Linfócitos Th1. (1, 4, 10, 19-22)

d. Linfócitos Th2

A diferenciação dos Linfócitos Th2 ocorre sobretudo em resposta a helmintas (organismos demasiado grandes para serem fagocitados, havendo conseqüentemente a ativação de outro tipo de resposta) e a alergénios, sendo a IL-4 uma das citocinas que suporta este processo. As células que constituem a fonte primária de IL-4 não estão ainda concretamente definidas, no entanto, acredita-se que possam ser basófilos, Linfócitos Th2 previamente diferenciados, Linfócitos NKT, mastócitos e/ou as mais recentemente identificadas ILC2. Após a sua diferenciação, os Linfócitos Th2 vão então produzir IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, apresentando diversas funções. (1, 4, 10, 19-22)

A IL-4 promove uma troca de isótipo para a classe IgG4, que não ativa o complemento e não medeia processos de ADCC (um processo que poderia danificar as mucosas onde está a ocorrer a infeção); e estimula um aumento na produção de MHC classe II. Em conjunto com a IL-13, a IL-4 promove ainda a produção de IgE e a ativação alternativa dos macrófagos para células M2, (um perfil contrário aos macrófagos M1, produzindo substâncias que limitam o processo inflamatório e que promovem a reparação tecidual e processos de fibrose); o recrutamento de leucócitos (com destaque para eosinófilos); e a estimulação dos movimentos peristálticos no trato gastrointestinal. A ação conjunta de IL-4, IL-3 e a IL-10 promove também a ativação dos mastócitos. (1, 4, 10, 19-21)

Por seu lado, a IL-13 estimula ainda a produção de muco nos tratos gastrointestinal e respiratório; e a IL-5 vai ajudar na ativação dos eosinófilos (que se ligam às IgEs através dos seus recetores Fc), com conseqüente libertação de diversas substâncias: hidrolases lisossomais (também encontradas noutros granulócitos); peroxidase eosinofílica (que catalisa a produção de ácido hipocloroso ou hipobromoso, tóxicos para helmintas, protozoários e células hospedeiras); e proteínas específicas eosinofílicas, que apesar de não possuírem atividade enzimática conhecida, causam dano ao tegumento dos helmintas e às paredes das bactérias, assim como às células hospedeiras. As células Th2 também produzem mediadores lipídicos (i.e., prostaglandinas, leucotrienos cisteinil e PAF),

diversas citocinas – como a IL-4 e o TGF- β , que podem promover respostas inflamatórias e de fibrose -, e elevados níveis da proteína galectina 10, que se agrega e forma cristais chamados de Charcot-Leyden, com diversas atividades proinflamatórias (incluindo ativação de inflamassomas e estímulo de DCs para induzirem diferenciação Th2). (1, 4, 10, 19-21)

e. Linfócitos Th17

Ocorre diferenciação de Linfócitos Th naive em Linfócitos Th17 no contexto de infecção por alguns fungos (i.e., *Candida albicans*) e bactérias extracelulares (i.e., *Borrelia burgdorferi* e *Klebsiella pneumoniae*), principalmente ao nível da pele e das mucosas, como a mucosa respiratória e intestinal. Subentende-se, portanto, que o ambiente tecidual da infecção tem influência no desenvolvimento deste subset. Esta diferenciação ocorre por ação das citocinas TGF- β (anti-inflamatória), IL-1, IL-6 e IL-23 (pró-inflamatórias), que são produzidas por células como macrófagos e DCs em resposta a agentes como os acima citados. (1, 4, 10, 19-21)

As principais citocinas produzidas pelas células Th17 são a IL-17 e a IL-22, apesarem de poderem também produzir outras citocinas, como a IL-21. A IL-17 tem como principais funções induzir a produção de quimiocinas (i.e., IL-8/CXCL8) e outras citocinas (i.e., TNF) por outras células, promovendo o recrutamento de leucócitos (principalmente neutrófilos, e em menor extensão, monócitos) para o local da infecção. Promove também a produção de substâncias antimicrobianas, designadas de defensinas. Por seu lado, a IL-22 também estimula a produção de quimiocinas e ajuda a promover a integridade das barreiras epiteliais. Em relação à IL-21, além de ativar os Linfócitos B nos centros germinativos, ainda estimula a proliferação e diferenciação de Linfócitos T CD8+ efetores e células NK. (1, 4, 10, 19-21)

f. Linfócitos T foliculares

Os Linfócitos T foliculares (Tf) são um *subset* de Linfócitos T que permanecem principalmente nos nódulos linfáticos e no baço, onde atuam em colaboração com os Linfócitos B, promovendo a sua sobrevivência e proliferação, bem como a maturação da afinidade e o *class switch* dos seus anticorpos. Ao contrário de outras populações efetoras destinadas a deixar os órgãos linfoides secundários para se direcionarem e atuarem no local de infecção/inflamação, a ação das células Tf é desenvolvida ao nível dos folículos linfoides. As células Tf apresentam um conjunto de marcadores característico, onde se incluem o PD-1, o ICOS, o fator transcricional definidor de linhagem Bcl-6 (*B-cell lymphoma 6*) – considerado, aliás, o marcador determinante da sua diferenciação, e o recetor de quimiocina CXCR5 – essencial para que as células Tf migrem da Zona T para a Zona B nos órgãos linfoides secundários, em resposta ao ligando CXCL13 (produzido por células estromais e células dendríticas foliculares). Os Linfócitos Tf também expressam outras moléculas, nomeadamente o BTLA (*B- and*

T-lymphocyte attenuator) e o CD40L, sendo esta última essencial para a ativação dos Linfócitos B e para a formação dos centros germinativos. (29, 36-40)

A sua diferenciação ocorre em várias etapas e envolve duas APCs diferentes – DCs e Linfócitos B, que cooperam entre si para que esta diferenciação ocorra. No caso dos Linfócitos T Foliculares *helper* (Tfh), outra característica importante é que se dividem em subgrupos (i.e., Tfh1, Tfh2 e Tfh17), de acordo com o padrão de expressão de recetores de quimiocinas, como o CXCR3 e CCR6. (29, 36-40)

Em 2007, foram descobertos Linfócitos T foliculares citotóxicos (Tfc) – Bcl-6⁺ CXCR5⁺ Tcf1⁺ Tim3⁻ CD8⁺, derivados de Linfócitos T CD8⁺ que migram para os centros germinativos, e que expressam marcadores comuns aos Linfócitos Tc e Tfh. Estas células surgem em situações de inflamação crónica, como se verifica em casos de infeção viral crónica, diversos tipos de carcinoma e de doenças autoimunes mediadas por anticorpos; e têm capacidade de autorrenovação. (41-43)

Nas células Tfc, podem observar-se diversos subgrupos, cujas funções incluem Citotoxicidade, associada à produção de certas IFN- γ , TNF- α , perforinas e granzimas. Esta é essencial para a remoção de Linfócitos B e Tfh infetados/cancerígenos. Outras funções destas células incluem memória, facilitação do processo de class-switch dos anticorpos produzidos pelos Linfócitos B (i.e., por ação do IFN- γ , que promove um class switch para IgG2c ou por sinergia com os Linfócitos Tfh) e aprimoramento da função dos Linfócitos B (também, por exemplo, por sinergia com os Linfócitos Tfh, ou por ação de CD40L). (41-43)

Estas células parecem apresentar menores níveis de exaustão que as células Tc efetoras, podendo aqui representar uma *pool* de células a partir da qual se podem diferenciar posteriormente Linfócitos T CD8⁺ terminalmente diferenciadas de forma a que a resposta T persista. (41-43)

g. Linfócitos T reguladores

Os Linfócitos T reguladores são células fundamentais para diversos processos, nomeadamente para a tolerância a antígenos do self, da microbiota e alérgenos; para o controlo da resposta imune a nível periférico (desde a sua intensidade à sua duração); para a regulação da imunidade feto-placentária; e ainda como garante da homeostasia imune e dos processos de regeneração de diversos tecidos. (44)

Existem diversas populações de Tregs descritas, quer com expressão de CD4 quer de CD8, apesar de as subpopulações de células Treg CD4 estarem mais bem caracterizadas. (10)

Linfócitos T reguladores CD4+

Os Tregs podem ser divididos em Tregs naturais (nTreg) e Tregs induzidos/periféricos (pTreg).

Os nTreg são o *subset* mais bem caracterizado, diferenciando-se no timo a partir de células precursoras, sobretudo estimuladas em resposta a antígenos do self (para posterior prevenção de processos de autoimunidade). Caracterizam-se pela expressão de FOXP3, que codifica uma proteína repressora de transcrição, a scurfina. Expressam ainda CD25, e níveis baixos (ou ausentes) de CD127. Assim como qualquer Treg, os nTregs têm a capacidade de bloquear a proliferação e produção de IL-2 de Linfócitos T CD4+ convencionais. Os seus efeitos supressores requerem sobretudo contacto direto intercelular entre os Treg e os Linfócitos T convencionais (independente dos TCRs de ambas as células). Como exemplos, temos a indução da apoptose dos Linfócitos T convencionais por uma interação Fas-FasL, ou pela presença de elevadas concentrações de substâncias reguladoras na superfície dos nTregs (como o CTLA-4 e o PD-1). (10, 19, 29)

As células Treg periféricas advêm da diferenciação de Linfócitos T convencionais/naive nos nódulos linfáticos, e podem ser divididos em iTreg, Tr1 e Th3. Os iTreg expressam FOXP3 e níveis elevados CD25 (assim como os nTreg) – no entanto, as suas funções imunossupressoras advêm da secreção das citocinas IL-10 e TGF- β e não tanto de contactos intercelulares. São também capazes de atenuar as funções das DCs (com perturbação da ativação de Linfócitos T naive). O desenvolvimento dos iTreg (FOXP3+) requer que haja primeiro uma estimulação dos TCR de Linfócitos T naive por DCs maduros, com posterior sinalização dos Linfócitos Th0 ativados resultantes pelas citocinas IL-2 e TGF- β (que permitem esta diferenciação). Por oposição, as células Tr1 e Th3 não expressam FOXP3 e expressam baixos níveis de CD25. Pensa-se que derivam de Linfócitos T naive que interagem com DCs tolerogénicas, que por sua vez se desenvolvem quando as DCs imaturas captam um antígeno num ambiente desprovidos de DAMPs/PAMPs e rico em IL-10 e/ou TGF- β 1. Se a IL-10 for dominante, desenvolvem-se Linfócitos Tr1, que produzem predominantemente IL-10 e TGF- β 1, e IL-5 e IFN- γ em baixas quantidade; se o TGF- β for dominante, desenvolvem-se Linfócitos Th3, que produzem predominantemente TGF- β 1. (10, 45)

Linfócitos T reguladores CD8+

Relativamente aos Tregs CD8+, já identificados em humanos, muitos dos subsets expressam FOXP3 e CD25. Desempenham a sua função inibitória através de diversos mecanismos: alguns subsets promovem o bloqueio da proliferação de Linfócitos T naive e efetores por contacto direto intercelular, enquanto outros produzem IL-10 e/ou TGF- β . Existem ainda alguns *subsets* que interagem diretamente com células dendríticas imaturas, tornando-as tolerogénicas. (10)

h. Linfócitos T duplamente negativos

Dentro dos Linfócitos T, existe ainda uma população de células com expressão de TCR/CD3, mas que não expressa CD4 nem CD8 ($CD3^+CD4^-CD8^-$). Designam-se como Linfócitos T duplamente negativos (DN), podendo expressar um TCR $\alpha\beta$, ou um TCR $\gamma\delta$. (46-49)

Estas células têm sido descritas como apresentando contagens elevadas em diversas doenças autoimunes, nomeadamente Síndrome de Sjögren, Lupus eritematoso sistémico (LES), Artrite reumatoide e síndrome linfoproliferativa autoimune (ALPS). (47, 48, 50)

Linfócitos T DN $\alpha\beta$

Os Linfócitos T DN $\alpha\beta$ correspondem a 1-3% dos Linfócitos T em circulação, em indivíduos saudáveis. A origem dos Linfócitos T DN $\alpha\beta$ não é compreendida a 100%, tendo a maioria dos estudos sido realizados em murinos. Assim, estas células podem derivar do timo, a partir de determinados estadios de maturação dos timócitos (i.e., após a fase DN3 da maturação dos Linfócitos T, crítica para definir que TCR será expresso, alguns Linfócitos T $\alpha\beta$ DN podem escapar para a periferia, sem passarem pelas fases DP e SP); e/ou diferenciar-se a partir de Linfócitos T maduros em circulação, em consequência de um defeito intrínseco. Os Linfócitos T DN que se desenvolvem na periferia têm características diferentes dos que se desenvolvem no timo (e dos seus percursos $CD4^+$ ou $CD8^+$). Entre os Linfócitos T DN $\alpha\beta$, é possível observar-se subpopulações com atividade pró-inflamatória e anti-inflamatória. Em estudos realizados em murinos, foi descrita uma associação entre doenças autoimunes e subpopulações de Linfócitos T DN $\alpha\beta$ com perfil pró-inflamatório, sendo que estas células não expressam marcadores de células NK ($CD56$, $CD16$) ou de Tregs (como o $Foxp3$, $CD25$ e $CTLA-4$). As subpopulações de Linfócitos T DN $\alpha\beta$ com perfil anti-inflamatório são assim descritas com base nas suas capacidades de inibir a função de Linfócitos T convencionais e a sua citotoxicidade contra células tumorais e infetadas com vírus. Inclusive, observou-se em murinos uma produção de elevados níveis de IL-10 por parte destas células, em contexto de transplante (com consequente não desenvolvimento de rejeição do órgão transplantado) e de diabetes autoimune. (46-50)

Linfócitos T $\gamma\delta$

Como já descrito, os Linfócitos T $\gamma\delta$ correspondem a cerca de 10-15% dos Linfócitos T em circulação no sangue, sendo células que residem principalmente em tecidos periféricos (i.e., fígado, baço, derme e epitélio intestinal). (51-53)

A maioria dos Linfócitos T $\gamma\delta$ sai do timo após a fase DN3, permanecendo com fenótipo DN ($CD4^-CD8^-$). No entanto, uma pequena fração coexpressa CD4 e/ou CD8, com a subpopulação $CD8^+\gamma\delta$ a ser a mais abundante. Tal sugere que esta fração passe por um processo de maturação semelhante ao

dos Linfócitos T $\alpha\beta$. Também já se identificaram Linfócitos T $\gamma\delta$ com elevada expressão de CD56, fenotipicamente semelhantes a células NKT (que maturam no timo, na fase DP). (51-53)

Os Linfócitos T $\gamma\delta$ podem-se comprometer com um perfil efetor durante o seu desenvolvimento no timo (por oposição ao que se observa nos Linfócitos T $\alpha\beta$). Isto permite que respondam rapidamente a infeções e a lesão tecidual, podendo estas células ser designadas por Linfócitos T $\gamma\delta$ “pré-programados”, “naturais” ou “*innate-like*”. Por contraste, alguns Linfócitos T $\gamma\delta$ saem do timo como células naive, adquirindo funções efetoras após ativação na periferia. Estas células podem ser designadas de Linfócitos T $\gamma\delta$ “induzíveis”. (51)

Nos humanos, os Linfócitos T $\gamma\delta$ podem ser divididos em subtipos. Estes são tipicamente definidos com base na cadeia δ , e os mais relevantes são os subtipos $\delta 1-3$. A subpopulação de Linfócitos T $\gamma\delta$ predominante no sangue periférico expressa um TCR composto pelo gene variável (V) $V\gamma 9$ emparelhado com $V\delta 2$ (Linfócitos T $V\gamma 9V\delta 2$), correspondendo a cerca de 50-95% dos Linfócitos T $\gamma\delta$. (51-53)

Estas células apresentam um TCR que lhes permite reconhecer uma maior variedade de antígenos (inclusive moléculas não peptídicas), por uma via independente de MHC, e a sua ativação pode ocorrer por ação de um único sinal, em oposição aos Linfócitos T $\alpha\beta$, cuja ativação requer 2 sinais (reconhecimento do antígeno e coestimulação). Outras características podem ser descritas, nomeadamente a frequente coexpressão de recetores presentes em células imunes inatas, como NKG2D, NKp30 e/ou NKp44 (desencadeiam diretamente uma atividade citotóxica), e certos TLRs. Mediante o microambiente, os Linfócitos T $\gamma\delta$ podem-se diferenciar em subtipos semelhantes aos Th1, Th2, Th9 ou Th17 (observados em Linfócitos T $\alpha\beta$ CD4+) e produzir diferentes citocinas, como $IFN\gamma$, IL-4, IL-10, IL-9, ou IL-17, entre outras. (51-53)

iii. Linfócitos B

a. Maturação

À semelhança do que se relatou para o Linfócito T, as células estaminais hematopoiéticas sofrem diversas divisões celulares e diferenciações em diferentes estádios quando se mantêm na medula óssea: progenitor multipotente (MPP), progenitor linfoide comum (CLP), pro-Linfócito B (Linfócito B progenitor), pré-Linfócito B (Linfócito B precursor), Linfócito B imaturo naive, Linfócito B de transição, até eventualmente se chegar ao estadió de Linfócito B maduro naive. Este processo é independente da exposição a antígenos, decorrendo num microambiente de células estromais não linfoides que fornecem as quimiocinas (i.e., CXCL12) e citocinas (i.e., IL-7) necessárias. (5, 10)

Aqui, ocorrem vários processos cruciais, sendo um deles o rearranjo dos genes das cadeias pesadas e leves das imunoglobulinas. Primeiro, ocorre o rearranjo dos genes das cadeias pesadas (no locus *Igh*), que possui diversos segmentos V (*variable*), D (*diversity*), J (*joining*), para além do segmento constante, onde se encontram as regiões C μ e u C δ , entre outras. Nos domínios variáveis, começa por haver a junção dos segmentos D e J (fragmento DJ), seguindo-se a junção dos segmentos V (formação de segmento VDJ, que codificará a região variável da cadeia pesada). (8, 11) Após a junção deste fragmento à região constante (C), a viabilidade desta cadeia pesada é testada num pré-BCR formado pela junção de duas cadeias pesadas com duas cadeias leves de substituição (*surrogate light chains*, SLC), homólogas da região N-terminal da cadeia leve. Se a cadeia pesada não for funcional, ocorre um novo rearranjo no segundo alelo do locus *Igh* (sendo que uma segunda falha leva à apoptose celular); se for funcional, ocorre um estímulo para o rearranjo do locus das cadeias leves (*Ig κ* e *Ig λ*), que ocorre primeiro no locus *Ig κ* , e em caso de falha, segue para o rearranjo do locus *Ig λ* . O processo é muito semelhante ao locus *Igh*, porém os loci das cadeias leves não possuem segmentos D. (10, 24)

Após este último rearranjo, são obtidos Linfócitos B imaturos, cujos BCR correspondem somente a imunoglobulinas da classe IgM, não expressando ainda IgD (presente nos Linfócitos B naive maduros) ou outras classes de imunoglobulinas. Os BCRs são testados para autorreatividade, e os Linfócitos B imaturos cujos BCRs apresentem reatividade de alta afinidade contra antígenos do self, passam por um de dois mecanismos. O primeiro corresponde a apoptose (deleção clonal). No segundo mecanismo, ocorre reativação dos genes RAG, havendo um novo rearranjo dos loci da cadeia leve κ , que leva a uma alteração na especificidade dos BCR (*Receptor Editing*). Se falharem ambos os loci, podem ocorrer rearranjos nos loci da cadeia leve λ . Caso também estes falhem, pode ser induzida a apoptose destas células. Estes mecanismos são referidos como de Tolerância Central. (8, 54-56)

Após este processo de seleção, os Linfócitos B saem da medula óssea e entram na corrente sanguínea, na forma de Linfócitos B de transição. Estas células migram para o baço, onde se realizam os restantes passos de maturação. No baço, os Linfócitos B de transição passam por uma nova etapa de seleção negativa, uma vez que alguns Linfócitos B autorreativos podem sobreviver à tolerância central e sair de medula óssea. Nesta seleção, todos os Linfócitos B que apresentem autorreatividade sofrem apoptose, anergia, ou são impedidos de atuar (i.e., por ação de Tregs). Ainda assim, podem existir Linfócitos B de transição autorreativos que se diferenciem em Linfócitos B naive maduros, num processo chamado de ignorância clonal, com eventual impacto no desenvolvimento posterior de autoimunidade. (8, 55)

Os Linfócitos B de Transição podem ser classificados em T1, T2 e T3 – no entanto, esta classificação não é unânime, existindo autores que classificam estas células em 2 ou 4 grupos, por exemplo. As

células T1 diferenciam-se em células T2, com um aumento da expressão de IgD e CD21 – e estas células, por sua vez, diferenciam-se em células T3 (precursoras dos Linfócitos B foliculares) ou T3' (precursoras dos Linfócitos MZ e B-1), com base na expressão de CD45RB^{MEM55} glyco-epitope e IgM. Pensa-se que as células T1 migram a partir da medula óssea, diferenciando-se em células T2 no baço (e posteriormente em células T3). No entanto, existem evidências de que parte das células T1 se pode diferenciar em células T2 ainda na medula óssea, onde se encontram proporções semelhantes de células T1 e T2. Além disso, células T3 também foram observadas na medula óssea (e não só na periferia), o que sugere que a maturação dos Linfócitos B possa ocorrer em simultâneo no baço e na medula óssea. (83, 84) Outro achado que parece corroborar esta hipótese, é o facto de doentes nascidos sem baço ou sujeitos a esplenectomia terem Linfócitos B naive maduros normais. (57, 58)

Apesar de imaturos, os Linfócitos B de Transição apresentam diversas funções, nomeadamente a inibição da proliferação de Linfócitos T CD4+ autorreativos; a prevenção da diferenciação de Linfócitos T CD4+ em células Th1 e Th17, limitando a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ e IL-17); a conversão de Linfócitos T CD4+ efetores em Tregs Foxp3+; e a inibição de respostas mediadas por Linfócitos T CD8+. (54)

b. Linfócitos B naive

Os Linfócitos B naive maduros podem ser divididos em três subpopulações diferentes – Linfócitos B1, B2 e da zona marginal. Os Linfócitos B-2 (também chamados convencionais ou foliculares) constituem a maioria dos Linfócitos B, sendo os responsáveis pela resposta imune dependente de Linfócitos T, que promove processos de *class switch* e maturação de anticorpos de alta afinidade (em resposta a antigénios proteicos), e dá origem a plasmócitos e células de memória. Os Linfócitos B-1 e os Linfócitos da zona marginal induzem resposta imune T-independente a antigénios de origem lipídica ou polissacárida, produzindo predominantemente IgMs (anticorpos naturais). Os Linfócitos da Zona Marginal (MZ) encontram-se principalmente nas regiões periféricas do baço, apesar de também poderem ser encontrados noutras localizações (amígdalas, Placas de Peyer, seio subcapsular dos gânglios linfáticos) e em recirculação. As células B MZ constituem cerca de 15-20% dos Linfócitos B do baço e 15% dos Linfócitos B no sangue periférico. Reconhecem antigénios circulantes no sangue, com ênfase para bactérias capsuladas, o que explica que pessoas sujeitas a esplenectomias sejam mais suscetíveis a estas infeções (i.e., *Streptococcus pneumoniae*). O seu padrão de marcadores inclui expressão de baixos níveis de IgD e elevados níveis de IgM, CD21, CD35, e da molécula não clássica de MHC de classe I CD1c. Além destas moléculas, também há uma elevada expressão de CD27, o que levou a que se achasse que estas células consistissem em Linfócitos B de memória IgM⁺. No entanto, evidências recentes sugerem que os Linfócitos MZ advenham de

uma linhagem distinta. Em relação ao CD21, deve ser destacado o facto da sua expressão estar diminuída em Linfócitos MZ que se encontram em recirculação (por comparação com os que se encontram no baço). (59)

Em relação aos Linfócitos B-1, a maioria da informação atual advém de estudos com murinos. No modelo animal, estas células encontram-se predominantemente no peritoneu e nas mucosas, podendo existir também no baço e na medula óssea. A sua principal função consiste na secreção espontânea e constitutiva de anticorpos (predominantemente da classe IgM), que se acumulam como “*resting immunoglobulin*”, além de serem responsáveis por promover estimulação eficiente de Linfócitos T. Não é claro se os Linfócitos B-1 humanos também residem no peritoneu, devido à dificuldade em colher estas amostras em indivíduos saudáveis. No entanto, em amostras de sangue de cordão umbilical e sangue periférico, foi descrita a presença de um subgrupo de células que apresentam características funcionais dos Linfócitos B-1 de murinos, apresentando o fenótipo CD20⁺/CD27⁺/CD43⁺/CD70⁻. Considerando que este fenótipo também inclui precursores de plasmablastos e pré-plasmablastos, a classificação atual mais rigorosa dos Linfócitos B-1 humanos considera-os como CD20⁺/CD27⁺/CD43⁺/CD38^{lo/int}. (23, 38, 60, 61)

c. Diferenciação

A Fase de Diferenciação da célula B dependente da presença de antígeno ocorre nos folículos dos nódulos linfáticos, onde se encontram preferencialmente Linfócitos B naive IgM+IgD+.

Quando um antígeno se liga aos BCRs dos Linfócitos B naive, estas células ativam-se, ocorrendo internalização dos antígenos e posterior exposição à sua superfície, em moléculas de MHC classe II. Após esta primeira interação, os Linfócitos B migram para o espaço interfolicular, onde proliferam e interagem com Linfócitos T CD4⁺, que migraram para o folículo e se começaram a diferenciar em Linfócitos T foliculares *helper* (Tfh). Quando esta interação ocorre, o evento coestimulador mais importante para a ativação dos Linfócitos B é a ligação CD40 (Linfócitos B) – CD40 ligando (presente em Linfócitos Th efetores). Também ocorre o estabelecimento da chamada ponte B-T, na qual os Linfócitos Th efetores se ligam aos antígenos expostos na superfície dos Linfócitos B, ocorrendo ainda o reconhecimento de citocinas secretadas pelas células Th efetoras por recetores presentes na superfície dos Linfócitos B (nomeadamente IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFNs e TGF-β). (5, 10, 24)

Este processo permite a ativação completa dos Linfócitos B, que podem partir para o centro germinativo (CG); diferenciarem-se em Linfócitos B de memória sem *switch*, mantendo o seu BCR intacto e com afinidade relativamente baixa, ou com eventual *class switch* limitado (IgA+ ou IgG+); ou diferenciarem-se em plasmablastos extrafoliculares de vida curta, cujos anticorpos produzidos

apresentam apenas uma afinidade baixa-moderada para o antígeno, apesar de alguns apresentarem *class switch*. Os Linfócitos B que migram de volta para o folículo, vão auxiliar na formação do CG seguem para a sua diferenciação neste ambiente. Após 4-8 dias, o CG fica maduro, apresentando dois microambientes, diferenciados histologicamente: a zona clara e a zona escura. (62-64)

Na zona escura, os Linfócitos B proliferam e são sujeitos a processos de Hipermutação Somática (HMS). Aqui, a maioria dos Linfócitos B sofre apoptose, enquanto os restantes regressam à zona clara do CG, de forma a testarem os seus BCR recém-mutados. Na zona clara, encontram-se diversos tipos celulares, nomeadamente Linfócitos Tfh do centro germinativo, células dendríticas foliculares (FDC), macrófagos e Linfócitos B CG. Entre os Linfócitos B CG, a maioria apresentará baixa afinidade para o antígeno, e vão sofrer apoptose. No entanto, uma pequena porção vai-se diferenciar em Linfócitos B de memória. Os Linfócitos B CG com elevada afinidade para o antígeno diferenciam-se em plasmablastos. Por último, os Linfócitos B CG com afinidade intermédia recebem sinal para reentrarem na zona escura (e serem sujeitos a mais ciclos de HMS). (62-64)

A seleção dos Linfócitos B CG de elevada afinidade ocorre da seguinte forma: os Linfócitos B estão em constante contacto com uma porção limitada de antígeno intacto (exposto pelas FDCs), sendo este reconhecido pelas suas imunoglobulinas de superfície e processado, com posterior apresentação do antígeno à sua superfície (via moléculas de MCH II). A afinidade do recetor é diretamente proporcional com a quantidade de antígeno capturado e de complexos de MCH II/antígeno na superfície dos Linfócitos B, com os Linfócitos Tfh a formarem contactos mais longos e fortes com os Linfócitos B que apresentem uma maior densidade destes complexos. Como resultado, estas células recebem um sinal dos Linfócitos Tfh, para (re)entrarem na zona escura e serem sujeitas a outro processo de proliferação e maturação da afinidade ou se diferenciarem em plasmablastos. (62, 63)

Parte dos plasmablastos gerados no CG entra na corrente sanguínea e migra até aos chamados nichos de sobrevivência, onde se diferenciam em plasmócitos (vida longa). Os nichos de sobrevivência dos plasmócitos dependem do isótipo que estas produzam. Linfócitos B que produzam anticorpos da classe IgG diferenciam-se em plasmablastos que migram principalmente para a medula óssea. Por outro lado, Linfócitos B ativados em MALT's (*mucosa-associated lymphoid tissue*) –, e que expressam essencialmente anticorpos da classe IgA, vão-se diferenciar em plasmablastos que vão residir essencialmente nas mucosas. (8, 62, 63)

d. Linfócitos B de memória

Os Linfócitos B de memória advém, na sua maioria, de Linfócitos B de baixa afinidade, apesar de uma pequena porção também ser gerada através dos Linfócitos B de alta afinidade. Já foram descritos

alguns subgrupos destas células (em humanos), nomeadamente Linfócitos B de memória *unswitched* (IgM⁺IgD⁺ CD27⁺ ou IgM⁺IgD⁻ CD27⁺) e *switched* (i.e., IgG⁺CD27⁺). (8, 62-66)

A maioria dos Linfócitos B *unswitched* (IgM⁺IgD⁺CD27⁺) em circulação no sangue periférico apresentam de forma consistente BCRs mutados e resposta aumentada a estimulação mitogénica, levando a que estas sejam considerados Linfócitos B de memória pós-CG. (59) No entanto, e no contexto de uma resposta T dependente, também ocorre desenvolvimento de Linfócitos B de memória numa fase pré-CG (como descrito anteriormente). Além disso, também foi demonstrado que há desenvolvimento de Linfócitos B de memória aquando de uma resposta T independente tipo II, a antígenos polissacáridos, apesar destas células demonstrarem baixos níveis de HSM e *class switch*. (8, 62-66)

Em humanos, os Linfócitos B de memória IgM⁺ parecem estar preferencialmente programados para se diferenciarem em Linfócitos B CG, promovendo a formação de novos CGs; por outro lado, os Linfócitos B de memória IgG⁺ apresentam uma predisposição para se diferenciarem diretamente em plasmablastos (após reencontro com o antígeno). (65)

e. Linfócitos B reguladores

Nos últimos anos tem vindo a ser discutida a existência de uma nova subpopulação de Linfócitos B, designada de Linfócitos B reguladores (Bregs). Os Bregs desempenham uma função semelhante aos Tregs, possuindo efeitos inibitórios na resposta imunitária. Estas células constituirão apenas 0,5% dos Linfócitos B num humano saudável, e exercem o seu efeito supressor predominantemente pela produção de diversas citocinas como IL-10, IL-35, e TGF-β. A produção de IL-10 é o elemento-chave da identificação deste subgrupo de células, que suprime a proliferação de Linfócitos T, assim como a sua produção de citocinas pró-inflamatórias, e podendo igualmente induzir o desenvolvimento de Tregs FoxP3⁺. A IL-10 produzida também atua indiretamente, ao inibir a apresentação antigénica e a produção de citocinas pró-inflamatórias por parte de DCs, monócitos e macrófagos. Os Bregs também podem produzir determinadas enzimas citotóxicas que atuam nas células alvo, como a granzima B intracelular e a proteína de superfície CD73 (que medeia a geração de Adenosina). Por fim, podem ainda atuar através de mecanismos que dependem do contacto com as células alvo. Ao contrário do que se observa nos Tregs, não existe um fenótipo/marcadores de linhagem característicos dos Bregs (assim como um perfil de citocinas que realmente caracterizem inequivocamente este grupo de células). A sua caracterização tem mostrado alguma heterogeneidade, identificando-se diversas variantes fenotípicas em humanos, como por exemplo: Bregs CD19⁺CD25^{High}, que intensificam a função dos Tregs; Bregs CD24⁺CD38⁺, produtores de IL-10; Bregs

CD19⁺CD38⁺CD1d⁺IgM⁺CD147⁺ (induzidos por IL-21), que expressam granzima B (GrB) e inibem a proliferação de Linfócitos T; etc. (67-70)

2. Gravidez

A gravidez, que resulta da fecundação do óvulo pelo espermatozoide, seguida da implantação do novo embrião, é o período durante o qual há o desenvolvimento de um ou mais fetos no útero de uma mulher (num período aproximado de 40 semanas). Tipicamente, divide-se em três trimestres: o 1º trimestre compreende as primeiras 12 semanas de gestação; o 2º trimestre vai da 12ª semana à 28ª semana; e por fim, o 3º trimestre vai da 29ª semana até ao fim da gravidez. (71)

À gravidez, estão associadas diversas alterações fisiológicas. Para além de alterações no sistema cardiovascular e respiratório, com aumento do volume sanguíneo, são também observadas alterações hematológicas, nomeadamente ao nível dos fatores de coagulação (cuja produção está aumentada, levando a um risco aumentado de eventos trombóticos), mas também no que se refere à contagem de plaquetas (cujo número tem tendência a ir decrescendo ao longo da gravidez, devido a hemodiluição), de eritrócitos (nos quais ocorre um aumento de aproximadamente 30%, apesar de a hemodiluição condicionar um estado de “anemia fisiológica”) e de leucócitos. Em concreto, estas alterações vão relacionar-se com uma importante dinâmica de imunomodulação, que assim condiciona o sistema imunitário da grávida ao longo da gestação. (72, 73)

2.1. Imunidade na Gravidez

Durante a gravidez, tem de haver um equilíbrio delicado entre as diversas funções do sistema imune materno, que tem de manter um estado de tolerância em relação ao feto semi-alogénico, de modo a evitar que os antígenos paternos desencadeiem uma resposta inflamatória; e por outro lado, preservando mecanismos de resposta imune inata e adaptativa que protejam mãe e feto contra possíveis agressões que se venham a desenvolver durante este período. (10, 74, 75)

Como tal, a gravidez pode distinguir-se em 3 fases imunológicas: um 1º estado pró-inflamatório, associado com os processos de implantação do embrião e desenvolvimento da placenta; um 2º estado anti-inflamatório, associado com o crescimento e desenvolvimento do feto, e no qual há um *shift* para um microambiente semelhante ao existente numa resposta do tipo Th2; e um 3º estado novamente pró-inflamatório, essencial para o início do parto. (76)

Apesar de existirem diversos estudos em animais e em humanos - com o intuito de perceber as diferentes alterações imunológicas sistémicas e na interface materno-fetal durante a gravidez-, há ainda muito por explorar neste âmbito, sobretudo as alterações sistémicas no humano. (68) Um maior

conhecimento destes processos terá certamente um grande significado clínico para prever o desenvolvimento de complicações na gravidez. (77)

2.1.1. Alterações na face materno-fetal

Têm vindo a ser descritos diversos mecanismos que contribuem para a tolerância materno-fetal. Pode assinalar-se a não expressão de MHC de classe II em células do trofoblasto, que parecem igualmente quase desprovidas de MHC classe I, com exceção de moléculas como HLA-G, -E, -F e -C. O HLA-G, por exemplo, tem um efeito inibidor nos Linfócitos T e inibe a citotoxicidade das células NK decíduais (dNK). Em paralelo, parece importante a presença de células NK decíduais, que constituem quase 70% dos leucócitos presentes na placenta no início da gravidez, e que se caracterizam por apresentarem um fenótipo pouco citotóxico com expressão de CD56^{bright}CD16⁻CD160⁺. Estas células atuam por libertação de citocinas que promovem a invasão do trofoblasto, como fatores angiogénicos e IFN- γ . Também induzem o desenvolvimento de Tregs. A sua diferenciação pode decorrer da ação da IL-15 produzida pelo trofoblasto. Também é importante a presença de macrófagos do subgrupo M2, cuja indução parece ser derivada da ação das moléculas M-CSF e IL-10, produzidas pelo trofoblasto. Estes macrófagos são imunomoduladores, secretando citocinas que inibem o processo inflamatório (i.e., IL-10), e baixas quantidades de citocinas pró-inflamatórias (i.e., IL-12), além de produzirem baixos níveis de moléculas coestimuladoras (i.e., CD80 e CD86, associados à ativação de Linfócitos T). Os macrófagos M2 também participam na remodelação da vasculatura; fagocitam células apoptóticas durante o processo de placentação, evitando a libertação de antigénios paternos e o consequente desencadear de uma resposta imune materna; e produzem interferões do Tipo I. (10, 74, 78-80)

Outro mecanismo importante parece ser a presença de DCs não profissionais que carecem de moléculas coestimuladoras, conferindo tolerância aos antigénios de origem paterna e auxiliando na remodelação tecidual e angiogénese. Na eventualidade de alguma DC se ativar, será inibida pela ação dos Tregs presentes na interface materno-fetal, já que estas células têm sido implicadas na prevenção de aborto em modelos animais. De facto, outro mecanismo de tolerância será certamente a presença de Tregs, cuja contagem aumenta no 1º trimestre, inclusive na circulação sanguínea, persistindo até depois do parto, e acumulando-se rapidamente em gravidezes futuras, indicia uma resposta reguladora de memória. As células Treg têm a capacidade de limitar a resposta imune, inclusive de Linfócitos Th17, cuja população se expande durante a gravidez (apesar de não na mesma extensão que os Tregs), ajudando a proteger a interface materno-fetal de infeções microbianas. Em humanos, uma contagem anormalmente baixa destas células no útero tem sido associada a infertilidade e a abortos espontâneos/recorrentes. A presença de Bregs, que se caracterizam pela produção de citocinas

(principalmente a IL-10) é ainda importante, já que podem inibir a maturação das DCs e promover a diferenciação de Tregs. Os Bregs estão presentes no início e no final da gravidez. Por último, algumas células da placenta produzem altos níveis de progesterona, o que interfere na sinalização intracelular de tal forma que as ações dos Linfócitos T efetores são geralmente inibidas. E há ainda evidências de que os Linfócitos B maternos produzem anticorpos protetores contra os antígenos paternos, nos quais se podem identificar anticorpos assimétricos, que se ligam aos antígenos paternos, mas não induzem uma resposta contra estes. (10, 74, 76, 78-80)

2.1.2. Alterações periféricas

Como mencionado anteriormente, já foram realizados alguns estudos com o objetivo de caracterizar os diferentes perfis imunes em mulheres grávidas saudáveis. Estes estudos indicam uma intensificação das respostas do sistema imune inato. Por um lado, há um aumento significativo das contagens absolutas de células como neutrófilos, monócitos e DCs plasmocitóides circulantes até cerca de metade do período gestacional (havendo um decréscimo gradual depois desta fase). Existe também uma intensificação da resposta destas células, o que inclui promoção da expressão de genes e vias relacionadas com a inflamação e migração leucocitária. Pode haver também um aumento das respostas antivirais mediadas por monócitos e células NK. Já se relatou ainda que, numa fase mais precoce da gravidez, as DCs apresentam uma sinalização diminuída dos seus TLR4; e que a diminuição nas células NK poderá dever-se à sua migração para a placenta (por ação da IL-15 produzida pelas células endometriais), onde se concentram e se diferenciam em células dNK. (39, 74-77, 81)

Por oposição, observa-se uma diminuição na resposta imune adaptativa, com diminuição de Linfócitos B totais e diversas das suas subpopulações, nomeadamente alguns fenótipos de Bregs, plasmablastos, Linfócitos B de memória (com e sem *switch*) e de transição, sobretudo no 3º trimestre e no momento do parto/pós-parto. Contrariamente, observa-se em paralelo um aumento nos Linfócitos B naive. (69-71, 75) Estas alterações podem ser consequência de diversos fatores, nomeadamente redução seletiva da linfopoiese, por ação do estradiol; inibição da ativação dos Linfócitos B foliculares naive, como consequência da inibição da função dos Linfócitos T efetores, por ação da progesterona; ou processos de migração para a placenta, onde as células B se diferenciam em Bregs. Apesar destas observações, tem sido sugerido uma melhoria da resposta imune humoral no 3º trimestre de gestação, com um aumento dos Linfócitos Tfh circulantes, proporcional ao aumento dos níveis de anticorpos de certos vírus (i.e., VHB e CMV) e de citocinas, como a IL-21 (produzida pelos Linfócitos Tfh). (40) Os estudos não são consensuais relativamente às contagens de Linfócitos T, com autores a reportar diminuição nas suas contagens (71, 160, 161), mas também aumento de

Linfócitos T CD4+ e de Linfócitos T CD8+. (69) Ainda assim parece existir diminuição da expressão de genes de citotoxicidade e defesa celular por parte de células NK, Linfócitos T CD8+ e um pequeno número de Linfócitos T duplo positivos, assim como maior inibição dos Linfócitos T, redução na sinalização de genes associados à função T e B (i.e., CD40, ICAM e MHC II), e um aumento em sinalizações tolerogénicas (i.e., ICOS, muito associado à indução da resposta de Tregs, via DCs). (77)

Como sugerem muitos dos achados imunológicos aqui descritos, grande parte da gravidez ocorre num ambiente em que as respostas imunes apresentam um certo grau de imunossupressão (quer na interface materno-fetal, quer a nível sistémico), que permitem assim tolerar o feto semi-alogénico.

3. Torque Teno Vírus

3.1. Características

A família Anelloviridae é uma família de vírus pequenos, sem invólucro, de ADN cadeia simples circular, que pode ser dividida em 31 géneros e 155 espécies, que infetam quer humanos como diversas espécies de animais. Os Anellovírus humanos são classificados em três géneros: Alphatorquevírus (Torque teno vírus - TTV), Betatorquevírus (Torque teno mini vírus - TTMV) e Gammatorquevírus (Torque teno midi vírus - TTMDV). O genoma dos Anellovírus (AV's) é estruturalmente semelhante, sendo que todos eles possuem uma região UTR e uma região codificante. A região UTR possui um pequeno segmento altamente conservado entre todos os isolados de Anellovírus, aparentando ser responsável pelo controlo da replicação e expressão do vírus. A região codificante apresenta diversas ORFs (open reading frames) sobrepostas. A ORF1 é a maior proteína codificada pelo TTV, havendo estudos que indicam o seu papel crucial no packaging do ADN deste vírus. A ORF2 aparenta ser uma potencial proteína não estrutural (100-120 aminoácidos) com atividade de fosfatase, essencial na replicação viral. Existem outras proteínas, nomeadamente a ORF1/1, ORF1/2, OFR2/2, com eventual participação na regulação da replicação do genoma e na expressão génica - e OFR2/3. Os AV's não codificam ADN polimerase, pelo que a sua replicação depende da maquinaria da célula hospedeira, ocorre no núcleo da célula. (82-87)

Os Anellovírus são considerados vírus órfãos, uma vez que, até ao momento, não existem evidências que associem a sua infeção com manifestações clínicas específicas. São também considerados os componentes mais prevalentes e representativos do viroma humano - sobretudo o TTV. O viroma humano também é constituído por bacteriófagos, retrovírus endógenos, vírus eucariotas não patogénicos, e vírus patogénicos que podem causar infeções agudas, crónicas ou latentes. (82-85)

O TTV foi o primeiro vírus da família Anelloviridae a ser descoberto (1997), num doente japonês que desenvolveu hepatite pós-transfusional de etiologia desconhecida, sendo igualmente o Anellovírus mais estudado. Tem um genoma que varia entre 3,5 e 3,9 Kb. Está descrito que aproximadamente 2/3 da população mundial está infetada com o TTV, no entanto, a infeção por Anellovírus pode atingir uma prevalência de quase 100%, se considerarmos os indivíduos que possuem o vírus na ausência de virémia. Este facto faz com que o TTV (e restantes Anellovírus) seja considerado ubíquo. Uma vez que o TTMV e o TTMDV têm uma prevalência atual equivalente ao TTV, a coinfeção com mais do que uma destas espécies é muito frequente (>70%). (82-85)

3.2. Aquisição e Transmissão

O TTV aparenta ser adquirido pelo humano logo durante a infância, tal como demonstrado em diversos estudos. De facto, tem vindo a ser observado que o TTV geralmente aparece após o nascimento, e que ocorre um aumento rápido na sua prevalência durante o primeiro ano de vida, com a prevalência do TTV aos 2 anos de idade a alcançar os 93%. (87, 88)

O TTV pode ser transmitido por diversas vias, nomeadamente através do contato direto, transfusão, por inalação ou por transmissão fecal-oral, entre outras, como sugere a presença do TTV em diversos produtos biológicos (sangue/plasma, saliva, fezes, urina, secreções genitais, lágrimas, fluídos nasais, etc). No entanto, a facilidade de transmissão em idades precoces e a presença frequente deste vírus na saliva sugerem que esta última deverá ter um papel importante na transmissão. A transmissão vertical do TTV também parece possível, no entanto, não há concordância a este respeito. Com efeito, existem estudos em que foi detetada a presença de TTV em sangue do cordão (89, 90), incorrendo num risco de transmissão do TTV ao feto – no entanto, e nestes mesmos estudos, não se descartou a hipótese de as amostras terem sido contaminadas com sangue materno. Por oposição, existem estudos no qual o TTV não foi encontrado em nenhuma amostra de cordão umbilical de grávidas positivas para TTV (91). Ainda existem estudos que apesar de não descartarem a hipótese de transmissão *in utero*, consideram que a sua probabilidade é baixa (e que a infeção primária ocorre principalmente após o nascimento). (88, 92-94)

Relativamente à transmissão por amamentação, já foi provado que o TTV é excretado via leite materno, numa grande percentagem de mães positivas para o TTV; e existem estudos que sugerem a amamentação como possível via de transmissão deste vírus - com tal a ser demonstrado, por exemplo, pela presença do TTV no leite materno de mães de bebés também positivos para este vírus; e pela homologia na sequência de ADN do TTV entre diversas amostras (leite materno, sangue do bebé, soro materno, etc). (94, 95) No entanto, existem estudos que sugerem que a presença do TTV no leite

materno não consiste num fator de risco para o bebé (96), ou que não existe diferença na taxa de infecção entre bebés mediante o status de amamentação. (97)

Um achado interessante sobre o TTV (e restantes Anellovírus) é o facto da sua prevalência ser igualmente elevada em pessoas que vivem isoladas e que têm pouco contacto com o mundo exterior. (82-87)

3.3. Imunomodulação

Até à data, sabe-se que o sistema imune interage com o TTV via TLR-9. Considerando a elevada prevalência e persistência dos Anellovírus (inclusive o TTV) na população, foram estudados possíveis mecanismos pelos quais estes vírus conseguem evadir o sistema imune. Existem evidências de que a proteína ORF2 tem potencial de suprimir a atividade da via NF- κ B, conhecida por promover a expressão de diversos genes – inclusive citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão, recetores imunes, etc. Foi descoberto que as partículas do TTV conseguem circular dentro de exossomas, o que faz com que este esteja menos exposto a anticorpos neutralizantes. Também foi proposto que estes vírus conseguem evadir a resposta mediada por anticorpos através da excisão do terminal imunodominante da proteína ORF1 C do vírus maturo; e através da produção de microARNs do TTV que atacam mARNs do hospedeiro responsáveis pela modulação das vias de sinalização das citocinas e dos interferões. (85, 85)

3.4. Marcador do Status Imunológico

A carga viral do TTV e/ou a composição relativa de Anelloviridae no viroma humano têm sido estudados como potenciais biomarcadores do status imunológico. Estes estudos têm sido realizados mais extensivamente em transplantados, nos quais se observou que níveis elevados/aumentados na carga viral de TTV aparentam corresponder a um status de imunossupressão, tendo-se já observado que a probabilidade de ocorrência de uma infeção (nomeadamente o CMV), ou outras complicações atribuídas a imunossupressão (iRAE) num transplantado, durante o 1º ano, era maior em pacientes com maiores aumentos na carga viral de TTV durante o 1º mês após o transplante (em transplantados renais). (107, 108) Nestes mesmos estudos, foram sugeridos cut-offs para a carga viral de TTV no 1º mês pós-transplante, com o intuito de discriminar os pacientes que vão ou não desenvolver estes fenómenos. A título de exemplo, Fernández-Ruiz e colaboradores definiram 2 cut-offs: um para o risco de infeção (3.15 log₁₀ cópias/mL) e outro para o risco de iRAE (4.56 log₁₀ cópias/mL). Por outro lado, níveis baixos/diminuídos de carga viral de TTV parecem estar associados a um status imune robusto, com o conseqüente risco de desenvolvimento de uma rejeição aguda do órgão transplantado. De facto, já foi demonstrada uma associação entre o desenvolvimento de DSA (*donor*

specific antibody) de novo, formados pelo paciente transplantado contra o complexo MHC presente no órgão doado, e uma menor carga viral de TTV no 1º ano pós-transplante. (82-85)

Também já foi relatada uma correlação inversamente proporcional entre a carga viral do TTV e a função dos Linfócitos T. (106) Há estudos que relatam uma correlação inversamente proporcional entre as contagens de Linfócitos T e a carga viral do TTV. Nos mesmos estudos em que se observa uma associação entre um maior risco de desenvolvimento de infecção e uma carga viral de TTV mais elevada no 1º mês pós transplante, também foram detetadas alterações nalguns perfis imunes no 1º mês pós transplante (e não só), que podem-se associar à carga viral aumentada do TTV, nomeadamente Linfócitos T – totais, CD4+ e CD8+ - e Linfócitos B totais. Mas há estudos que determinaram a ausência de correlação entre a contagem de Linfócitos T e a carga viral de TTV, levantando a hipótese de que, e após o início da terapia com imunossuppressores, a contagem dos Linfócitos T pode normalizar sem que haja necessariamente uma restauração da função imune. Como tal, a eventual utilização deste parâmetro iria permitir a avaliação do sistema imune dos pacientes transplantados e guiar os clínicos em relação a eventuais intervenções farmacológicas. (82-85)

O estudo do TTV como indicador do status imunológico também foi realizado noutros contextos, nomeadamente em pacientes com VIH-1 e Doença de Alzheimer. A título de exemplo, vão ser descritos dois estudos.

No estudo de Fogli e colaboradores, pacientes VIH-1 positivos, assintomáticos, ainda não sujeitos a terapia com HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) e com uma contagem de Linfócitos T CD4+ preservada, tinham uma contagem de Linfócitos B totais normal, mas as frequências das suas subpopulações não, havendo um aumento em Linfócitos B CD21low (CD27+ e CD27-). Os Linfócitos B CD21lowCD27- são Linfócitos B de memória exaustos, enquanto os Linfócitos B CD21lowCD27+ são normalmente designadas de elementos maduros ativos. A presença destas duas populações é muito provavelmente derivada de uma hiperativação do compartimento B, como consequência da infecção crónica pelo VIH-1 (apesar de assintomática). E observou-se uma associação positiva entre estas alterações e a carga viral de TTV, muito provavelmente devida à incapacidade de controlar a replicação do vírus. No entanto, e nos pacientes tratados com HAART, já se observa uma normalização das contagens e frequências das diferentes subpopulações de Linfócitos B (assim como uma melhoria nas suas respostas T dependente e T independente), o que indica uma restauração adequada do sistema imune. E em simultâneo, observou-se uma normalização da virémia de TTV a níveis semelhantes aos observados em pessoas saudáveis. (98)

Num outro estudo, observou-se que, em pacientes com doença de Alzheimer (DA), a carga viral de TTV apresenta uma associação positiva com a idade e uma associação negativa com o título de IgG

anti-CMV (marcador da resposta humoral a este vírus) e com a presença de HLA-B27. Por outro lado, não houve associação entre a carga viral do TTV e o status da DA, pelo que este vírus não seria indicado como marcador do status desta patologia. (99)

3.5. TTV e Gravidez

Também em grávidas se têm realizado estudos considerando o TTV, nomeadamente para averiguar um possível impacto da sua colonização vaginal na gravidez e parto. (100)

Já foi demonstrada uma maior prevalência de TTV, em amostras de soro, e TTMV em amostras de soro, saliva e plasma, em grávidas cujo parto foi prematuro (por oposição a partos de termo), o que indica um possível papel dos Anellovírus no desencadear do trabalho de parto. Um potencial mecanismo para este fenómeno pode ser a modulação do sistema imune, diminuindo o *threshold* necessário para se iniciar o parto. Considerando o tropismo dos Anellovírus para os leucócitos, e a alteração das populações de leucócitos induzida pelo trabalho de parto, é possível que uma carga viral aumentada desta família de vírus seja consequência de outros fatores que levam ao parto prematuro, nomeadamente um ambiente inflamatório mais intenso, e não a causa. Por oposição, houve estudos onde não se observaram associações entre a carga viral de TTV e o parto prematuro, nem entre a carga viral de TTV e outros efeitos adversos, nomeadamente pré-eclampsia e corioamnionite. Além disso, e até ao momento, não existem dados que permitam inferir qualquer associação entre TTV e a ocorrência de abortos. (86, 101-103)

Também em amostras vaginais, foram feitas algumas observações semelhantes. Nestas amostras, observou-se uma prevalência menor de TTV em mulheres em que o *Lactobacillus crispatus* é a bactéria dominante na microbiota vaginal, o que se associa a um nível de ácido D-láctico maior, a uma matriz de metaloproteinase 8 (MMP-8) menor (níveis elevados podem resultar na perda de integridade cervical), e a ausência de inflamação vaginal. Isto sugere a possível associação de prevalências/níveis mais elevados de TTV e parto prematuro, visto que a dominância do *L. crispatus* é associada a uma gravidez normal, e que um nível elevado de ácido D-láctico vaginal tem sido associado a um ambiente local imune quiescente e uma largura cervical normal. (128) Quando isto não ocorre (i.e., presença de *Lactobacillus iners* e outras bactérias que não bacilos), observa-se que as células epiteliais da vagina parecem estar em stress fisiológico, e com um aumento na concentração vaginal de mediadores pró-inflamatórios. Especula-se que, no ecossistema vaginal, a carga viral de TTV esteja relacionada com a presença de células linfóides ativadas e Linfócitos T (onde a replicação do TTV ocorre preferencialmente), o que explicaria os seus níveis mais elevados nestas condições. Outros autores (125) verificaram que os níveis de TTV apresentaram correlações negativas com os níveis de *L. crispatus* e *L. jensenii*, e correlações positivas com os níveis das bactérias *Sneathia*,

Shuttleworthia e *L. iners*, com as contagens de leucócitos e com as concentrações de citocinas pró-inflamatórias (como IL-6 e IL-8). Estas citocinas apresentam igualmente correlações negativas com os níveis de *L. crispatus* e *L. jensenii*. Estes achados sugerem que o TTV poderá ser um bom indicador do status imune vaginal na gravidez. (86, 101, 104)

4. Citomegalovírus

4.1. Características

O Citomegalovírus, também conhecido como Herpesvírus 5, é um vírus envelopado de ADN dupla cadeia linear pertencente à família Betaherpesvírus. A sua distribuição é mundial, com uma prevalência que varia entre 50-90%, dependendo da população e das suas condições. A sua transmissão pode ocorrer por diversas vias e este pode infectar diferentes tipos celulares, como células musculares, endoteliais, hepatócitos e células mononucleadas (i.e., macrófagos e monócitos). Dada a família a que pertence, este é um vírus que tem a capacidade de entrar em latência dentro das células, com possibilidade de ocorrer reativações (na presença de condições que as favoreçam). Aquando da fase de latência, o CMV permanece latente em progenitores mieloides. Além disso, devido a possuir um genoma altamente variável (e ao facto da imunidade contra ele ser incompleta), é possível haver reinfeção com estirpes diferentes. Em hospedeiros imunocomprometidos, a reativação do Citomegalovírus leva ao desenvolvimento de doença séria – nomeadamente em situações de transplantação de órgãos/tecidos e/ou em casos em que os hospedeiros tenham imunodeficiência genética e/ou adquirida (i.e., VIH). Este vírus tem um período de incubação que varia entre 20-60 dias, após o qual pode haver desenvolvimento de febre, linfocitose, linfadenopatia e alterações da função hepática - no entanto, a maioria dos casos é assintomática). O CMV apresenta um genoma grande de 236 kb, apresentando duas regiões – UL (*unique long*) e US (*unique short*) – flanqueadas por repetições terminais e internas. (105-109)

4.2. Citomegalovírus e Gravidez

O Citomegalovírus (CMV) é a principal causa de infeção congénita, principal agente de malformações congénitas associadas a infeção nos países desenvolvidos, a principal causa não genética de SHNL (perda auditiva neurosensorial) – responsável por cerca de 8-21% de todos os casos de SHNL congénito à nascença (aumentando para 25% até aos 4 anos de idade) - e um dos principais causadores de incapacidade neurológica - responsável por até 10% de todos os casos de paralisia cerebral. De facto, diversos estudos determinaram que pelo menos 8-10% das crianças que foram infetadas por CMV in útero vão desenvolver anomalias neurológicas (independentemente de terem nascido com ou sem sintomas). Podem ainda desenvolver outros problemas não neurológicos,

nomeadamente hepáticos, esplénicos, pulmonares e de desenvolvimento. Apesar de poderem nascer sem sintomatologia, os recém-nascidos podem vir a desenvolver sequelas tardiamente, pelo que devem ser monitorizados durante os primeiros anos de vida, com ênfase para testes auditivos, oftalmológicos e de desenvolvimento neurológico. O CMV congénito (cCMV) tem uma prevalência de 0,2-2,5%, nos recém-nascidos vivos, com uma prevalência de 1,1% em Portugal Continental. (3, 109-112)

Durante a gravidez, a grávida pode desenvolver uma infeção por CMV (com possibilidade de a transmitir ao feto), que pode ser primária (se for a primeira vez que a mulher tem contacto com o vírus) ou não primária (no caso de a mulher ser infetada por uma nova estirpe ou de haver uma reativação de estirpes endógenas latentes). (110)

Segundo diversos estudos, a taxa de transmissão vertical da mãe para o feto aumenta ao longo da gravidez. Em caso de infeção primária durante a gravidez, a taxa de transmissão no 1º e 2º trimestres é de 30-40%; e no 3º trimestre, pode chegar a 70% dos casos. Na infeção não primária, as taxas de transmissão ainda não foram estudadas em detalhe, apesar de alguns artigos mencionarem que não ultrapassam os 2%, contrastando com as elevadas taxas associadas à infeção primária durante a gravidez. Ou seja, o risco de transmissão é muito maior no caso de uma infeção primária, como tem sido demonstrado em diversos estudos, que se vão explorar abaixo. No entanto, e em países onde a seroprevalência é grande, os casos de infeção congénita associadas a infeções não primárias chegam a ser superiores aos originados por infeções primárias, podendo representar 2/3 dos casos. Este é um dos motivos que justificam a existência de mais estudos com infeções não-primárias. (111, 113-116)

Um facto constatado em diversos estudos é que a taxa de transmissão do CMV ao feto é inversamente proporcional à gravidade das sequelas, sendo que infeções congénitas no 2º e 3º trimestre não estão normalmente associados a sequelas severas. De facto, a morbilidade neurossensorial grave aparenta estar restringida a fetos infetados durante o primeiro trimestre (com ênfase nas situações em que ocorre infeção primária materna nesta mesma fase). (109, 115, 116)

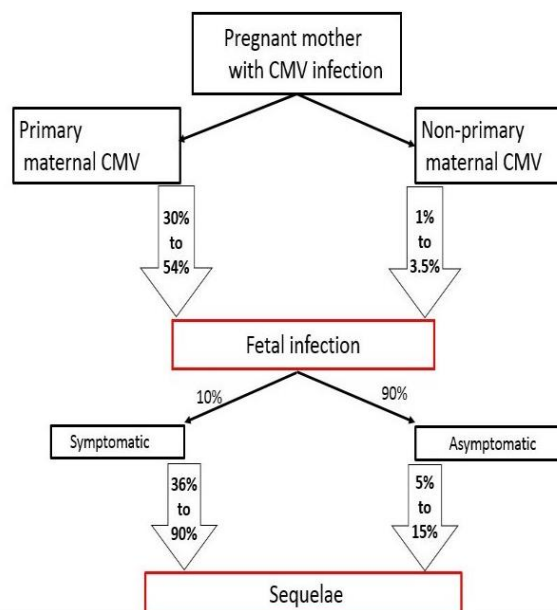


Figura 1. Infecção fetal e desenvolvimento de sequelas após infecção materna.

Neste esquema, é assumido que a transmissão do CMV apresenta a mesma frequência nos 3 trimestres. Adaptado de (136).

4.2.1. Diagnóstico materno e fetal do Citomegalovírus

i. Diagnóstico de Infecção materna

O diagnóstico de infecção primária na mãe é baseado em Serologia, com pesquisa de anticorpos anti-CMV (IgM e IgG). Quando é detetada uma seroconversão das IgGs anti-CMV, estamos perante uma infecção primária – no entanto, e não sendo possível averiguar o momento da sua seroconversão, não pode ser aferido se a infecção é primária ou antiga apenas com base neste parâmetro. Como complemento, pode ser feita a pesquisa das IgMs anti-CMV. A sua ausência indica infecção não ativa, enquanto a sua presença é sugestiva de infecção primária - no entanto, estas podem ser detetáveis até 18 meses após o estabelecimento da infecção e podem surgir numa reativação/reinfecção. Além disso, uma IgM positiva (na ausência de uma IgG positiva) pode ser indicativo de um falso positivo (derivado de reação cruzada), uma vez que esta é uma classe de anticorpo menos específica. Em casos de IgM e IgG anti-CMV positivos, deve ser realizado o teste da Avidéz das IgGs, que permite estabelecer se a infecção ocorreu à menos de três meses. Este teste reflete a força de ligação entre anticorpo e antigénio, que vai aumentado no decorrer da infecção e do estabelecimento da resposta imune perante esta. Uma baixa avidéz é indicativa de uma infecção recente, enquanto uma alta avidéz (> 0,65) reflete uma exposição passada. Um teste de avidéz elevado no 1º trimestre permite descartar que a infecção primária ocorreu depois do período gestacional/perigestacional – no entanto, tal não é possível se este teste só for realizado no 2º e 3º trimestre, pelo que estas grávidas devem de ser monitorizadas. A Serologia não é adequada no diagnóstico de infecções não primárias por CMV, pelo

que este é realizado através da pesquisa do CMV por PCR (em sangue, urina ou saliva). (3, 109, 115, 116)

ii. Diagnóstico de infecção fetal

Quando há suspeita/confirmação de uma infecção primária durante o 1º trimestre da gravidez, ou na presença de alterações ecográficas sugestivas, devem ser realizados testes para pesquisa de infecção fetal por CMV. (109, 110, 115, 116)

Devem ser usadas técnicas diretas, como a amniocentese, que tem elevada sensibilidade e especificidade, . O uso de ecografia e ressonância magnética consistem em alternativas não invasivas, mas cuja especificidade e sensibilidade são baixas, não permitindo o diagnóstico etiológico. (109, 110, 115, 116)

a. Amniocentese/Cordocentese

No caso de grávidas com infecção primária por CMV confirmada, o método de eleição para diagnóstico de infecção fetal é a PCR, a partir de uma amostra de líquido amniótico colhida por amniocentese (um feto infetado excreta o vírus através da urina). A amniocentese só deve ser realizada após um período mínimo de 6-8 semanas após a altura em que se estabeleceu a infecção primária da grávida (a partir das 17 semanas de gestação). A sensibilidade varia entre 85-95%. Poderão existir falsos negativos, estando descrito que em 5-15% dos casos, um recém-nascido nasce infetado (após um teste negativo). Isto resulta habitualmente de uma transmissão tardia do vírus (após o 1º trimestre). Considerando esta possibilidade, e na presença de um teste negativo durante a gravidez, o recém-nascido deve ser testado, a partir de uma amostra de urina ou saliva. Em alternativa à amniocentese, pode ser realizada pesquisa de CMV por PCR numa amostra de sangue do cordão umbilical (colhida através de cordocentese). No entanto, e por oposição à amniocentese, esta apresenta uma maior taxa de complicações e é menos sensível. (109, 110, 115, 116)

b. Imagiologia

A ecografia e a ressonância magnética permitem avaliar a eventual existência de anomalias estruturais resultantes da infecção por CMV – no entanto, nem sempre existe desenvolvimento destas; ou em alternativa, estas podem ser transitórias. As alterações observadas podem ser diversas, podendo incluir alterações na placenta (aumento da espessura, presença de calcificações) e nos órgãos do feto, nomeadamente o rim (levando a um volume de líquido amniótico menor que o esperado), o coração (cardiomegalia, e mais raramente, calcificações), ou o cólon, onde pode existir perfuração com peritonite meconial. No entanto, a deteção de uma lesão cerebral (microcefalia, hipoplasia cerebelosa, ventriculomegalia, síndrome de Dandy-Walker, vasculite dos núcleos talâmicos e dos núcleos cinzentos centrais, entre outras) é altamente sugestiva de infecção por CMV. (109, 110, 115, 116)

4.3. Citomegalovírus e Sistema Imunológico

O Citomegalovírus utiliza diversos mecanismos para se evadir da ação do sistema imune, como a capacidade de latência. Na verdade, já foram descobertas mais de 40 moléculas que apresentam um papel na evasão imune por parte do CMV.

O CMV expressa as chamadas vRAP (*viral regulators of antigen presentation*), que desregulam gradualmente a expressão de MHC de classe I nas células infectadas, conseqüentemente levando à diminuição da apresentação dos antígenos virais. Isto é alcançado através dos produtos expressos pelos genes US2, US3, US6 e US11, cujas funções combinadas levam ao bloqueio do transporte de péptidos através da TAP para o interior do retículo endoplasmático (RE), onde se iriam ligar ao MHC-I. Ocorre assim retenção do MHC de classe I no RE e degradação proteossômica destas moléculas. O produto do gene US2 interfere com o MHC de classe II, promovendo a sua degradação. (107, 108, 117)

Este vírus também codifica diversos supressores da morte celular programada, a apoptose, que é um mecanismo de autodefesa da célula contra infecções virais. A apoptose pode ser desencadeada por diversas vias, nomeadamente: **1)** pelo desenvolvimento de stress celular, ou **2)** pela ligação das células infectadas a citocinas (através de recetores de morte associados a membrana, também designados de DR, *death receptors*). Dois ligandos conhecidos de DRs são o FasL e o TNF- α . Aquando da ativação dos DRs, ocorre o recrutamento de moléculas adaptadoras como a FADD (*Fas-associated protein with death domain*), que por sua vez recruta a molécula Casp8- e esta ativa-se e vai induzir apoptose dependente de caspase. O CMV é capaz de inibir a apoptose desencadeada pela Casp8 através da expressão da proteína vICA (*viral inhibitor of caspase-8 activation*), produto do gene UL36. (107, 108)

O produto do “*late gene*” UL111A codifica uma molécula designada cmvIL-10 (homóloga da IL-10 humana), que é expressa durante a fase de latência do CMV e que promove um estado de imunossupressão, ao regular a expressão de MHC de classe I e II e interferir com as funções das células dendríticas. (61) A IL-10 é um forte inibidor de outras citocinas produzidas pelos Linfócitos Th1 CD4+ (como o IFN- γ e a IL-2), além de inibir a produção de citocinas por parte dos monócitos e macrófagos. (117)

São conhecidas atualmente 12 moléculas (codificadas pelos genes US20, UL16, UL17, UL18, UL40, UL43, UL140, UL83, UL141-UL144, e UL148) que interferem e bloqueiam o reconhecimento de moléculas de CMV por parte de células NK, sendo estas normalmente responsáveis pelo controlo imediato de infecções virais. (61) Alguns dos mecanismos pelos quais este bloqueio acontece incluem a interferência com a expressão, à superfície das células infectadas, de ligandos de recetores de

ativação nas células NK (i.e., MIC A/B); a expressão de moléculas codificadas pela família ULBP, que se ligam ao NKG2D (um recetor de ativação presente na superfície de todas as células NK); expressão de ligandos que se ligam a recetores inibitórios, como por exemplo, a molécula UL18 (semelhante às moléculas de MHC-I). A UL18 liga-se ao recetor inibitório LIR-1 (presente na superfície de um subgrupo de células NK); e com auxílio de um péptido processado a partir da proteína viral UL40, é capaz de promover a expressão de HLA-E à superfície das células infetadas, que se liga ao heterodímero inibitório CD94/NKG2A, presente na superfície das células NK. A UL141 liga-se diretamente aos recetores de morte celular TRAIL, (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), que se encontram à superfície das células NK, inibindo-os, interferindo assim com a morte celular mediada por estas células. (107, 117)

A molécula US28 é um recetor acoplado a proteína G que se liga a diversas quimiocinas (CCL5, MCP-1, MCP-3, MIP1- α , MIP1- β , etc). Esta ligação resulta na internalização destas últimas, com diminuição da sua concentração no local da infeção. (117)

5. Associação entre a infeção por CMV e a Imunidade durante a gravidez

A infeção por CMV humano no feto em desenvolvimento pode levar a diversas consequências neste (inclusive morte intrauterina), sendo que estas lesões derivam diretamente dos danos citopáticos causados pelo CMV no interior das células infetadas. No entanto, existem evidências de que a infeção do CMV na placenta possa causar danos ao feto de forma indireta, pois o CMV tem propriedades imunomodulatórias que podem afetar o perfil de citocinas nesta estrutura. Já foi demonstrado que, em placentas infetadas por CMV (de nados mortos), há um aumento na expressão de certas moléculas pró-inflamatórias, como o MCP-1/CCL-2 (quimiocina) e TNF- α (citocina), cuja produção aberrante tem sido associada com efeitos prejudiciais para a gravidez, nomeadamente pré-eclampsia, restrição do crescimento intrauterino, aborto espontâneo e parto prematuro. Como tal, estes dados sugerem que a suprarregulação de moléculas pró-inflamatórias por parte do CMV podem levar a lesão fetal, através de diversos mecanismos: insuficiência placentária, devido a uma placentação insuficiente; aumento na transmissão vertical e disseminação viral, devido a haver um comprometimento do Sincitiotrofoblasto (que funciona como uma barreira); efeitos adversos em proteínas consideradas essenciais para o sucesso de gravidez (i.e., hormonas placentárias, moléculas de adesão, etc); perda da tolerância imune à placenta, resultado do CMV induzir um desvio na resposta imune para um resposta Th1. Apesar da resposta imune por anticorpos, Linfócitos T CD4+ e CD8+ estar geralmente intacta na gravidez, existem alterações no balanço entre as respostas Th1/Th2 (favorecendo a última). (118, 119)

5.1. Perfis Imunes

Diversos elementos do sistema imune têm os seus valores aumentados na infeção por CMV e estão associados a um maior controlo desta infeção. Num quadro de infeção primária por CMV, os Linfócitos T $\gamma\delta$ (e em particular o subgrupo V δ 2), com funções nas respostas inatas e adaptativas, apresentam-se expandidos – quer em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos, como também em grávidas e em fetos/recém-nascidos com infeção congénita. (119, 120)

Em relação aos Linfócitos T CD8+, já foi demonstrada a existência de resposta a diversos péptidos do CMV, apesar de a reatividade contra as proteínas pp65 (ppUL83) e IE-1 aparentar ter uma maior importância no controlo da doença por CMV. De facto, esta resposta é gerada rapidamente após a infeção, quer em crianças quer em fetos (ainda *in utero*). Além disso, e por comparação com controlos não infetados, fetos infetados com CMV apresentaram um grande aumento de Linfócitos T CD8+ ativados e terminalmente diferenciados, suportando o papel importante destas células no controlo da doença por CMV. (119)

Também as células NK já foram alvo de estudo, verificando-se maior presença de células NK NKG2C^{bright}CD57⁺ em crianças com infeção congénita por CMV, assim como em casos de infeção congénita sintomática e de infeção pós-natal (i.e., infeção via amamentação). A mesma subpopulação de células NK está significativamente aumentada em indivíduos seropositivos (por comparação com indivíduos seronegativos). (93) Com base em estudos realizados em pacientes com imunossupressão, especula-se que a expansão das células mencionadas seja inversamente proporcional à eficácia da resposta imune T à infeção por CMV. No entanto, há ainda muito por explorar sobre o papel destas e de outras células na infeção e na transmissão do CMV ao feto. (119-122)

Alguns estudos já abordaram possíveis alterações nos perfis imunes em sangue periférico, associados a infeção congénita por CMV (ou ao desenvolvimento de sequelas/efeitos secundários mais significativos). A resposta linfoproliferativa dos Linfócitos T (principalmente CD4+) encontra-se significativamente diminuída/ausente, ou com desenvolvimento mais tardio em grávidas que transmitiram o CMV ao feto, por comparação com grávidas sem transmissão. (119, 123, 124)

Os Linfócitos T incluem Linfócitos T de memória, que podem ser divididos em vários subgrupos, destacando-se os Linfócitos T de memória efetora (TEM) e os Linfócitos T de memória central (TCM), que apresentarem elevada resposta linfoproliferativa. Na verdade, foi descrita uma associação entre não transmissibilidade do CMV ao feto e uma maior presença de Linfócitos T de memória com capacidades proliferativas, específicos de alguns antigénios do CMV (i.e., pp65). Temos de considerar as propriedades das células TCM, que sobrevivendo por longos períodos, com função efetora baixa ou inexistente, rapidamente começam a proliferar e a diferenciar-se em células efetoras

após um reencontro com o antígeno. Como tal, o estabelecimento de uma proteção imunológica de longa duração estará mais dependente destas células (ao contrário dos Linfócitos T de memória efetores, que conferem uma proteção de duração mais limitada). (119, 121, 125-129)

Relativamente aos TEM, em contexto de infeções por vírus com capacidade de desenvolver latência (como o CMV), uma porção destas células reverte o fenótipo de CD45RO para CD45RA, após a fase aguda da infeção, apesar de não se conhecerem bem as suas funções. Em gravidezes nas quais houve transmissão de CMV ao feto, observou-se uma diminuição destas células TEM cujo fenótipo reverteu ou um atraso nesta reversão. (129)

5.2. Serologia

Também já foram realizados estudos com o objetivo de avaliar a resposta humoral dirigida contra o CMV e a sua relação com uma maior ou menor taxa de transmissão deste vírus ao feto.

Existem evidências de que uma menor taxa de transmissão do CMV ao feto se relaciona com a deteção precoce de anticorpos neutralizantes contra o complexo pentamérico gH/gL/pUL128-131, em particular aos produtos do gene UL128-131, e com níveis mais elevados destes anticorpos. (130) O risco de infeção congénita por CMV parece ser inversamente proporcional aos níveis de anticorpos IgG maternos contra a molécula pp150, numa fase inicial da gravidez, e as taxas de transmissão do CMV ao feto são muito superiores em grávidas com baixa avidéz da IgGs, em relação a grávidas com avidéz intermédia das IgGs no 1º trimestre. (120, 130-133)

6. Técnicas Laboratoriais

6.1 Citometria de Fluxo

A Citometria de fluxo é uma tecnologia útil em diversas áreas, tais como Hematologia, Virologia, Biologia Molecular, Imunologia, Oncologia e monitorização de doenças infecciosas. Esta técnica permite a análise das propriedades físicas e químicas de partículas ou de células (suspensas numa solução tampão), utilizando 3 componentes principais: 1) sistema de fluidos, fundamental para que as células se movam pelo equipamento; 2) sistema ótico, para detetar a luz emitida pelos fluorocromos excitados, composto por 1 ou mais lasers, que excitam os fluorocromos, e uma rede de filtros e espelhos que conduzem os feixes de luz; 3) sistema eletrónico, para traduzir os espetros de emissão em dados digitais passíveis de análise em softwares computacionais. (134, 135)

As propriedades físicas das partículas são avaliadas pela deteção da luz visível que é dispersa quando entra em contacto com as partículas/células. Esta dispersão é medida em duas direções diferentes, pelo que a luz dispersa pode então ser avaliada com a dispersão frontal ou *Forward Scatter* (FSC), e

pela dispersão lateral ou *Side Scatter* (SSC). O FSC corresponde à luz dispersa no mesmo eixo do laser emissor de luz, dando informações relativas ao tamanho das células, tendo também em consideração parâmetros como o ratio núcleo:citoplasma e a topografia da membrana celular. Por sua vez, o SSC corresponde à luz dispersa perpendicularmente ao laser (90°), dando informações sobre a complexidade/granularidade da célula. (134-136)

Ainda é possível avaliar as amostras através da aplicação de moléculas fluorescentes (cuja fluorescência vai ser medida). Pode-se inserir um gene codificante de uma proteína fluorescente (i.e., Green Fluorescent Protein, GFP) junto, por exemplo, ao gene que codifica a proteína de interesse; mas também se podem usar corantes fluorescentes (i.e., Iodeto de Propídio – cora ADN) ou fluorocromos conjugados com anticorpos monoclonais dirigidos contra estruturas específicas (i.e., CD3 FITC). (134)

A utilização da citometria de fluxo multicolor é muito útil para identificar e caracterizar funcionalmente as diversas populações do sistema imune – no entanto, há que ter em consideração o impacto que o uso simultâneo de diversos fluorocromos tem na qualidade e precisão dos dados. Mediante os fluorocromos utilizados, pode ocorrer um fenómeno designado de “*Spillover*”, que ocorre quando a fluorescência de emissão (ou parte desta) de um fluorocromo é detetado no detetor definido para ler a fluorescência de sinal de outro fluorocromo. Esta sobreposição pode fazer com que certas células aparentem expressar certos marcadores de superfície (quando na verdade, não o expressam), ou fazer com que a intensidade de expressão de certos marcadores aparente ser superior à real. Para corrigir este fenómeno, é fundamental a realização de uma compensação, na qual as sobreposições entre os diversos fluorocromos são subtraídas e corrigidas. (135, 137) A realização da compensação implica a utilização de controlos, que correspondem preferencialmente às células de interesse (ou, na impossibilidade de utilizar células, podem ser usadas esferas de compensação). Os controlos marcados, ou não, com os fluorocromos utilizados no painel em questão (em cada tubo as células/esferas estarão marcadas apenas com um dos fluorocromos a usar), são lidos no equipamento, que calculará a respetiva matriz de compensação a considerar todos os fluorocromos. (136)

Após a aquisição das amostras, existem diversas estratégias de *gating* que permitem a distinção e exclusão dos agregados celulares, de forma a que estes não sejam contabilizados na análise subsequente. A estratégia mais utilizada para a exclusão de dupletos ou agregados é realizada a partir de um gráfico FSC-H (Height) Vs FSC-A (Area). Em células isoladas, estas duas medidas aumentam proporcionalmente, enquanto os agregados apresentam um desvio da linearidade - por comparação com células isoladas, o FSC-H dos agregados vai ser o mesmo, no entanto, o FSC-A vai estar aumentado. (136, 138)

Como mencionado anteriormente, a Citometria de fluxo tem diversas aplicações, sendo a Imunofenotipagem considerada a principal aplicação desta técnica. Na imunofenotipagem, são utilizados anticorpos conjugados com fluorocromos, sendo estes dirigidos contra diversos antígenos presentes - na sua grande maioria, na superfície das diferentes células do sistema. Existem diversos marcadores, nomeadamente marcadores de linhagem, específicos de certas populações de células (i.e., Linfócitos B: CD19, CD20; Linfócitos T: CD3, CD4, CD8; monócitos: CD14, CD11b; células NK: CD56, CD16). Existem outros marcadores, que permitem caracterizar mais detalhadamente cada população celular, como marcadores de maturação (CD45RO, CD27), recetores de citocinas e quimiocinas (CD127, CCR7, CCR5, CXCR4, CCR6), marcadores de ativação (CD69, CD25, CD62L), marcadores intracelulares (i.e., fator de transcrição FoxP3), ou podem mesmo marcar-se citocinas (i.e., IFN- γ , TNF- α , IL-2) ou marcadores de proliferação (Ki67, CFSE). (134)

Os Linfócitos B (CD19+) podem ser diferenciados em diversas subpopulações, mediante os marcadores presentes em cada painel. Através do uso dos marcadores de superfície IgD, CD27, CD38, e CD24, os Linfócitos B podem ser subdivididos em Linfócitos B de memória *switch* e *unswitched* (ou *pré-switched*), Linfócitos B de transição, Linfócitos B Naive, Plasmablastos e Linfócitos B duplo negativos/atípicos. No entanto, existem outros marcadores disponíveis que auxiliam na diferenciação das diversas subpopulações destas células. A tabela 1 apresenta algumas das subpopulações de Linfócitos B mais reconhecidas e os respetivos fenótipos. (139, 140)

Tabela 1. Classificação dos Linfócitos B

Adaptado de Sainz et al., 2019. doi:10.3389/fimmu.2019.02458

Compartimento B (subpopulações)		Marcadores	Marcadores adicionais
Transição	T1/T2	IgD ⁺ CD27 ⁻ CD38 ⁺⁺ CD24 ⁺⁺	CD10 ^{++/+} IgM ⁺⁺ MTG ⁺ CD10/IgM expressão= T1 > T2 > T3
	T2-MZP	IgD ⁺ CD27 ⁻ CD38 ⁺⁺ CD24 ⁺⁺ CD21 ⁺⁺	CD10 ⁺ IgM ⁺⁺
	T3	IgD ⁺ CD27 ⁻ CD38 ⁺ CD24 ⁺ CD21 ⁺	CD10 ^{++/+} IgM ⁺ MTG ⁺
Naive	<i>Resting</i>	IgD ⁺ CD27 ⁻ CD38 ⁺ CD24 ⁺ CD21 ⁺	IgM ⁺ MTG ⁻
	Ativadas	IgD ⁺ CD27 ⁻ CD38 ⁻ CD24 ⁻ CD21 ⁻	IgM ⁺ MTG ⁺ CD95 ⁺ CD23 ⁻ CD11c ⁺ T-bet ⁺ FcRL5 ⁺ SLAMF7 ⁺ CXCR5 ⁻
	Anérgicas	IgD ⁺ CD27 ⁻ CD38 ^{+/low} CD24 ⁺ CD21 ⁻	IgM ^{low/-}
Memória	Sem <i>switch</i>	IgD ^{low} CD27 ⁺ CD38 ^{+/low} CD24 ⁺ CD21 ⁺	CD1c ⁺ IgM ⁺⁺
	Pré- <i>switch</i>	IgD ⁻ CD27 ⁺ CD38 ^{+/low} CD24 ⁺ CD21 ⁺	IgM ⁺
	Com <i>switch</i> (<i>resting</i>)	IgD ⁻ CD27 ⁺ CD38 ^{+/low} CD24 ⁺ CD21 ⁺	IgG/IgA ⁺ CD95 ⁻
	Com <i>switch</i> (ativadas)	IgD ⁻ CD27 ⁺ CD38 ⁻ CD24 ⁻ CD21 ⁻	IgG/IgA ⁺ CD95 ⁺ CD86 ⁺
	<i>Atypical tissue-based</i>	IgD ⁻ CD27 ⁻ CD38 ^{low} CD24 ^{low} CD21 ⁻	FcRL4 ⁺ IgM/IgG/IgA ⁺ FcRL5 ⁺
Duplamente Negativas	DN1	IgD ⁻ CD27 ⁻ CD38 ⁺ CD24 ⁺ CD21 ⁺	FcRL4 ⁻ IgM/IgG/IgA ⁺ FcRL5 ⁻ CXCR5 ⁺
	DN2	IgD ⁻ CD27 ⁻ CD38 ⁻ CD24 ⁻ CD21 ⁻	IgM/IgG/IgA ⁺ T-bet ⁺ CD11c ⁺ FcRL5 ⁺ CXCR5 ⁻ SLAMF7 ⁺

Secretoras de Anticorpos	Plasmablastos (<i>early</i>)	IgD ⁻ CD27 ^{low/+} CD38 ⁺⁺ CD24 ⁻	CD20 ^{+/+} HLA-DR ⁺ CD138 ⁻
	Plasmablastos	IgD ⁻ CD27 ⁺⁺ CD38 ⁺⁺⁺ CD24 ⁻	CD20 ⁻ HLA-DR ⁺ CD138 ⁻ Ki67 ⁺
	Plasmócitos	IgD ⁻ CD27 ⁺⁺ CD38 ⁺⁺⁺ CD24 ⁻	CD19 ^{+/+} CD20 ⁻ CD138 ⁺
Reguladoras (Bregs)		Apresenta diferentes fenótipos de superfície, correspondentes a diferentes subpopulações	
Plasmócitos Reguladores		IgD ⁻ CD27 ⁺⁺ CD38 ⁺⁺	CD19 ^{+/+} CD138 ⁺ IL-10 ⁺ ou IL-35 ⁺ IgM ^{hi} or IgA ⁺ (populações distintas)
Células B1		IgD ⁺⁺ CD27 ⁺	IgM ⁺ CD43 ⁺ CD70 ⁻ CD11c ⁺ CD14 ⁺ CD5 ^{+/+}

Da mesma forma, os Linfócitos T (CD3⁺) podem ser diferenciados em diversas subpopulações, mediante os marcadores utilizados. Os Linfócitos T podem ser primeiramente diferenciados em CD4⁺ (*helper*) e CD8⁺ (citotóxicos). A partir destes dois subgrupos major, distinguem-se outros subgrupos: Linfócitos T naive, efetores e de memória (central e efetora). Dentro dos Linfócitos T CD4⁺, existem ainda mais subgrupos, nomeadamente Linfócitos Th1, Th2, Th17, T foliculares e Treg. A partir de cada subpopulação, é possível analisar as células que se encontram ativadas (com base, por exemplo, nos marcadores HLA-DR e CD38), ou o respetivo estadio maturativo. (139, 141, 142)

A figura 2 ilustra algumas das subpopulações de Linfócitos T mais reconhecidas e os respetivos fenótipos. Apesar de não representada nesta figura, existe evidência da existência de Linfócitos T foliculares CD8⁺, como referido anteriormente no capítulo 1 da Introdução.

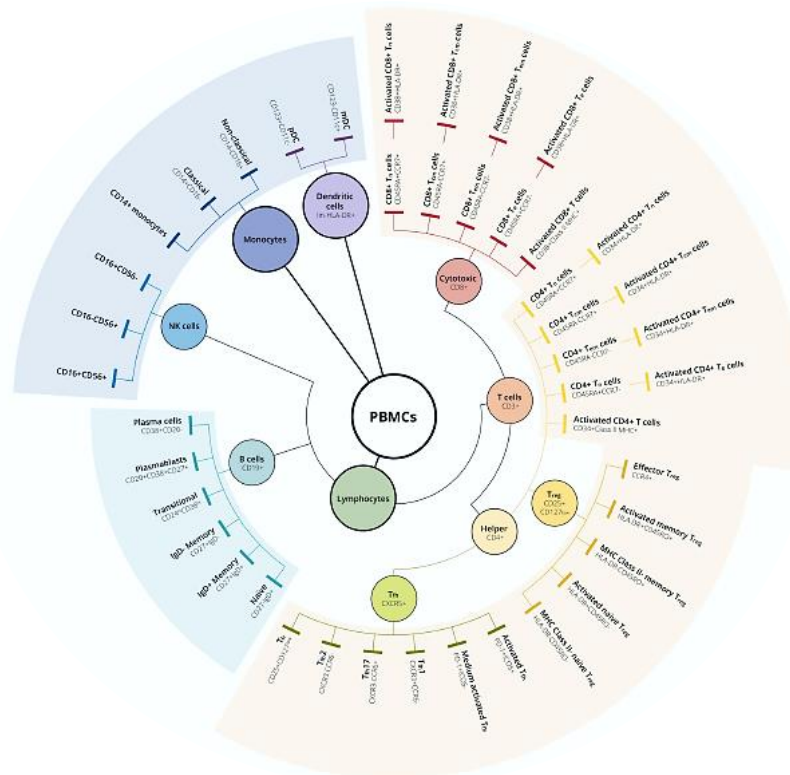


Figura 2. Classificação dos Linfócitos T

Adaptado de: Yi et al., 2019. doi:10.1371/journal.pone.0225512

6.2 Polymerase Chain Reaction

A PCR (*Polymerase chain reaction*) é uma técnica que permite a amplificação de um ou mais segmentos de ADN, através de um processo *in vitro* onde ocorrem diversos ciclos de amplificação, nos quais as novas cópias do ADN alvo que estão a ser produzidas servem de *template* para os ciclos seguintes de amplificação. No final da reação de PCR, a concentração da sequência de ADN alvo encontra-se exponencialmente aumentada – 2^n ($n = n^\circ$ de ciclos). (143-145)

Este processo é mediado por uma ADN polimerase termoestável resistente a temperaturas extremas, descoberta na bactéria *Thermophilus aquaticus* – a Taq Polimerase. O seu funcionamento depende de diversos fatores, nomeadamente 1) a temperatura: funcionamento ótimo da enzima entre 70°-80°C; 2) o pH (8-10), sendo usado uma solução tampão (normalmente Tris-Cl pH 8,3); 3) a concentração de catiões divalentes (mais precisamente Mg^{2+}). Além disso, torna-se ainda importante a existência de um par de *primers*, que consistem em sequências de aproximadamente 20 nucleótidos, complementares a uma região *forward* e *reverse* de um segmento de ADN que engloba a sequência alvo da técnica de PCR. Outro elemento importante da PCR são os DNTP's (*deoxynucleotide triphosphates*). (143-145)

Cada ciclo de PCR engloba 3 fases distintas (com temperaturas variáveis): 1) *Desnaturação*: ocorre a aproximadamente 95°C, com o propósito de separar o ADN alvo em moléculas de cadeia simples (que servirão como molde para a formação de novas cópias); 2) *Annealing* dos *primers*: os *primers* reconhecem e ligam-se (por pontes de hidrogénio) às moléculas de cadeia simples do ADN alvo. A temperatura desta etapa depende das características dos *primers* usados, variando entre 50-60°C; 3) *Extensão dos Primers*: ocorre a aproximadamente 72°C. Nesta etapa, a Polimerase catalisa a polimerização dos DNTPs (sentido 5' → 3'), a partir da extremidade 3' dos *primers*. (144, 145)

Na chamada PCR convencional, as amostras são sujeitas às 3 etapas mencionadas acima, sendo os produtos resultantes separados por eletroforese num gel de agarose ou poliacrilamida (e posteriormente analisados). Na presença da molécula alvo, esta será amplificada em quantidade suficiente para que seja visível na forma de bandas, após marcação ou coloração adequada. (144, 145)

Atualmente, a PCR convencional tem caído em desuso, sendo substituída pela PCR em Tempo Real (PCR_Tr). A PCR_Tr inclui um detetor de fluorescência e a utilização de agentes intercalantes de ADN (i.e., SYBR green) ou sondas marcadas com fluorocromos, o que permite a monitorização dos produtos de PCR à medida que estes estão a ser amplificados. O *cycle threshold* (Ct) é definido como o ciclo de PCR a partir do qual o sinal de fluorescência pode ser diferenciado da fluorescência de fundo. Estão disponíveis diferentes tecnologias para produzir sondas, nomeadamente as sondas TaqMan. (143-145)

As sondas TaqMan consistem em oligonucleótidos, com um fluorocromo conjugado à extremidade 5', e um *quencher* conjugado na extremidade 3'. Durante a reação de PCR, e na presença de uma sequência complementar, vai haver ligação das sondas, sem emissão de fluorescência (por ação do *quencher*). Aquando do passo de extensão, o fluorocromo é clivado pela Taq polimerase, o que permite que este emita fluorescência (diretamente proporcional à quantidade da sequência alvo). (143-145)

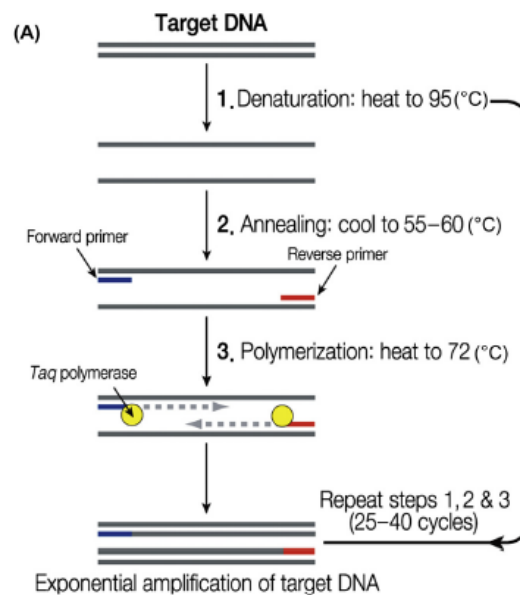


Figura 3. Etapas da PCR

Adaptado de: Ryu WS. Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses. Elsevier. 2017

Aquando da realização da técnica de PCR, é importante o uso de diversos controlos que a validem, nomeadamente um controlo positivo (CP), um controlo negativo (CN) e um controlo interno (CI). Na ausência de reatividade, um CN garante a ausência de contaminação dos reagentes, e que as amostras positivas assim o são; por outro lado, um CP garante a viabilidade dos reagentes de PCR e da mistura reacional preparada pelo operador, e garante ainda que as amostras negativas assim o são. Os controlos internos (CI) podem ser divididos em exógeno e endógeno. O CI exógeno é uma molécula de ADN/ARN (i.e., plasmídeo, bacteriófago, molécula sintética) de sequência conhecida, que pode ser acrescentada na mistura reacional, ou antes da fase de Purificação. Uma ausência de curva de PCR para este controlo (numa amostra negativa) pode indicar presença de inibidores da PCR no extrato de ADN/ARN, ou uma eventual degradação deste reagente. Por outro lado, um CI endógeno consiste num gene que existe naturalmente nas amostras biológicas a serem estudadas, sendo este detetado na mesma reação de PCR do alvo em estudo. Estes genes também podem ser pesquisados numa reação à parte, e nesses casos, estes controlos designam-se de Controlos de Extração (CE). Os CI endógeno/CE permitem não só a validação das etapas de PCR e da purificação, como da fase pré-

analítica - mais precisamente da colheita da amostra, uma vez que permite aferir a existência de células da espécie em estudo na amostra. Nas amostras humanas, é comum o CI endógeno/CE consistir em genes que sejam expressos em todas as células e de forma constitutiva (os *Housekeeping genes*), como por exemplo: componentes do citoesqueleto (i.e., β -actina, α -tubulina), componentes do complexo major de histocompatibilidade (i.e., β 2-microglobulina), enzimas de via glicolítica (GAPDH - *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), entre outros. (145, 146)

6.3 Serologia

A Serologia é o ramo que estuda o soro (a porção do sangue desprovida de elementos celulares). A Imunoserologia estuda a presença de anticorpos específicos e antigénios em circulação no soro. Esta pesquisa permite avaliar a exposição prévia e a imunidade a determinados agentes patogénicos, assim como determinar a presença de autoanticorpos, presentes em diversas doenças autoimunes, como a artrite reumatoide, o lúpus eritematoso sistémico ou a Síndrome de Sjögren. Existem diversas técnicas que permitem esta avaliação, nomeadamente técnicas de precipitação, técnicas de imunodifusão, técnicas eletroforéticas, reações de aglutinação e imunoensaios com elementos marcados com sondas, que permitem a deteção e/ou a quantificação de analitos. (3, 147)

Entre os imunoensaios, pode ser destacada a técnica de Quimioluminescência (*chemiluminescence immunoassay*, CLIA). Nesta técnica, é promovida uma reação de oxidação, na qual uma dada molécula é excitada. Esta volta espontaneamente ao seu status original, libertando energia sob a forma de luz. Os métodos de CLIA podem ser diretos ou indiretos. Nos métodos diretos, o anticorpo ou o antigénio são conjugados diretamente com marcadores luminescentes, como ésteres de ruténio e acridinium, sendo este último capaz de emitir luz na presença de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e de hidróxido de sódio (NaOH), sem que haja necessidade de uma enzima. Nos métodos indiretos, como o CLEIA (*chemiluminescence enzyme immunoassay*), são usados marcadores enzimáticos, aos quais se juntam substratos luminescentes. Podem combinar-se fosfatase alcalina, com o AMPPD (adamantyl 1, 2-dioxetane aryl phosphate) como substrato, e a peroxidase de rábano, com o luminol (ou os seus derivados) como substrato. A quantidade de analito presente na amostra será proporcional à intensidade da luminescência emitida pela molécula usada como indicadora da reação. (3, 148-150)

Entre as variantes de CLIA, as mais usadas são imunoensaios de sanduiche, na maioria dos casos usando microplaca como fase sólida. Nos últimos anos, tem-se observado um aumento na utilização de partículas magnéticas revestidas com anticorpos dirigidos contra o analito alvo, sendo que, e numa segunda fase, são adicionados anticorpos conjugados (também eles dirigidos contra o analito alvo).

Na presença de um campo magnético externo, estas partículas agregam-se rapidamente – e quando este campo magnético é desfeito, as partículas magnéticas são ressuspensas em solução. (151)

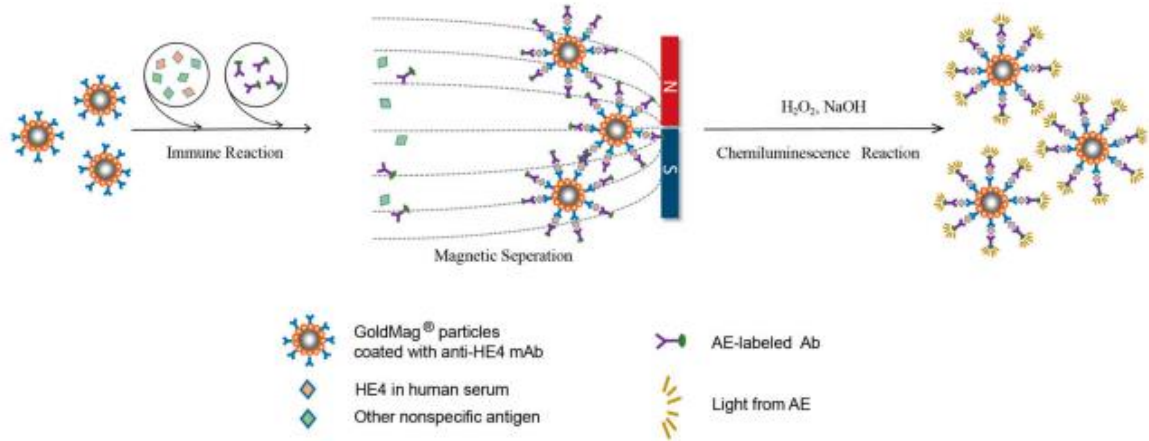


Figura 4. Esquema representativo de uma técnica de CLIA do tipo sanduíche, com partículas magnéticas

Adaptado de Ma et al. 2017. doi:10.3390/mi8050149

7. Objetivos deste trabalho Experimental

Tal como foi descrito na contextualização teórica, é fundamental aprofundar os conhecimentos já existentes da dinâmica dos perfis imunes ao longo de uma gravidez sem complicações, em grávidas saudáveis. Esta caracterização irá permitir, no futuro, a detecção de possíveis anomalias no perfil imunológico da grávida, que podem estar associadas a efeitos adversos na gravidez (i.e., aborto, pré-eclampsia, parto prematuro). Em paralelo, o estudo de biomarcadores indicadores do status do perfil imune pode-se tornar útil. Tal é o caso do TTV, que tem mostrado potencial neste âmbito, em pacientes sujeitos a transplante, estando já descrito uma associação entre a carga viral de TTV e uma reativação do CMV nestes.

Por outro lado, o Citomegalovírus (CMV) é de grande destaque como o principal causador de infecções congénitas, apesar de a taxa de transmissão materno-fetal ser baixa. Como tal, é de grande importância aprofundar os conhecimentos sobre como o status do perfil imune na grávida seropositiva pode estar associado a uma maior ou menor taxa de infeção do feto, e quais os elementos do sistema imune que estão mais associados a uma resposta eficaz contra a infeção por CMV. Isto permitirá, no futuro, a tomada de medidas mais precoces em grávidas infetadas por este vírus (principalmente em casos de primoinfeção no primeiro trimestre) e auxiliaria na produção de uma vacina 100% eficaz.

Com base no descrito, o presente estudo apresenta os seguintes objetivos

7.1. Objetivos gerais

1. Aprofundar os conhecimentos sobre o perfil imunológico normal numa grávida saudável sem complicações obstétricas
2. Estudar o TTV como possível indicador do status imunológico na grávida
3. Avaliar a dinâmica da infeção por CMV ao longo da gravidez
4. Estudar possíveis associações entre o perfil imunológico, os níveis de TTV e a infeção por CMV

7.2. Objetivos específicos

Parte I – Descrever o Perfil Imune ao longo da gravidez, avaliando oscilações em diferentes subpopulações de Linfócitos B e T

Parte II – Avaliar oscilações na prevalência e carga viral de TTV ao longo da gravidez, e eventuais correlações com as diferentes subpopulações dos compartimentos B e T

Parte III – Avaliar a prevalência de casos de CMV, e eventuais infecções primárias ou reativações ao longo da gravidez

Parte IV – Avaliar eventuais diferenças nos perfis imunes e na prevalência/carga viral de TTV em mulheres seropositivas e seronegativas para CMV (e/ou mulheres com infecção ativa / reinfeção por CMV)

Parte II – Materiais e Métodos

1. Classificação do estudo

O presente estudo consiste num estudo Observacional (*Natureza do estudo*), quantitativa analítica (*abordagem do estudo*), exploratória (*Objetivos do estudo*), longitudinal prospetivo (*Desenvolvimento no tempo*).

2. Amostragem em Estudo

A amostragem deste estudo corresponde a grávidas a ser acompanhadas no Hospital da Luz de Lisboa. O recrutamento das participantes em estudo ocorreu entre Junho de 2022 e Setembro de 2023.

Cada participante teve de assinar um consentimento informado (Anexo 3).

Para a seleção da **amostragem em estudo**, considerou-se os seguintes critérios de inclusão: grávidas com idade compreendida entre os 18 e os 45 anos; ausência de história de diabetes, hipertensão ou doença autoimune e tabagismo nos 6 meses anteriores à colheita de sangue periférico; sem toma de qualquer medicamento (exceto vitaminas e suplementos de ferro); sem complicações durante a gravidez.

Amostragem de conveniência (inclusão de todas as grávidas que cumpriram o critério de inclusão e aceitaram participar no estudo). Não foi possível efetuar uma amostragem aleatória, nem estratificada por idades ou qualquer outra variável.

3. Amostras

A cada participante deste estudo, foram colhidas 2 amostras por cada trimestre – 1 amostra de sangue total em tubo com anticoagulante EDTA e 1 amostra em tubo sem anticoagulante para separação de soro. A amostra de sangue total foi usada para avaliação dos compartimentos circulantes B e T (por Citometria de Fluxo); a amostra de soro foi usada para a determinação de anticorpos anti-CMV. Por centrifugação final das amostras de sangue total, após a análise por citometria de fluxo, obtiveram-se amostras de plasma, usadas para pesquisa de CMV (em grávidas Seropositivas) e de TTV.

O TTV foi pesquisado utilizando uma técnica de qPCR (PCR em tempo real quantitativo). Por sua vez, a pesquisa de CMV foi realizada, por PCR em tempo real qualitativo, seguida de qPCR.

Em cada trimestre, as amostras foram colhidas em *time points* pré-definidos: 1º trimestre: entre a 9ª e 12ª semanas; 2º trimestre: entre 24ª e 28ª semanas; e 3º trimestre: a partir da 32ª semana.

De cada participante, foram ainda recolhidos diversos dados - nomeadamente patologia clínica, que inclui análises de bioquímica, endocrinologia, microbiologia, serologia e Hematologia. Os dados Hematológicos incluem hemogramas, a partir dos quais foi possível o cálculo dos valores absolutos de cada subpopulação B e T avaliada neste estudo. Outros dados recolhidos incluem idade, peso, altura, índice obstétrico (nº de partos pré-termo, nº de partos a termo, nº de Abortos/interrupções/gravidezes ectópicas e nº de recém-nascidos vivos) e dados do parto atual (tipo de parto, parto pré-termo ou a termo, recém-nascido vivo morto aquando do nascimento, semana gestacional aquando do parto).

4. Técnicas Laboratoriais

4.1 Citometria de Fluxo para avaliação de subpopulações linfocitárias B e T

A análise de cada uma das amostras de sangue total-EDTA, por Citometria de Fluxo (BD FACSCanto II de 8 cores, BD Biosciences, USA) implicou a análise de 2 tubos pré-validados, contendo anticorpos marcados (com fluorocromos) liofilizados:

- um tubo direcionado à caracterização de Linfócitos B e respetivas subpopulações (DryFlowEx ASC Screen kit, Exbio, Praga), com CD45 / IgD / CD27 / CD24 / CD19 / CD21 / CD38;
- um tubo direcionado à caracterização de Linfócitos T e seus subgrupos (DryFlowEx ACT T Screen kit, Exbio), com CD45 / CD8 / CD4 / PD-1 / HLA-DR / CD3 / CXCR5 / CD38

Antes da realização da técnica de Citometria de fluxo, existe uma preparação prévia das amostras (anexo 1), que inclui os seguintes passos:

1. Lavagem das amostras de sangue total-EDTA com FACS Flow, seguida de centrifugação (e descarte do sobrenadante);
2. Incubação da amostra com os anticorpos dos painéis pré-validados;
3. Lise dos Glóbulos vermelhos, com Excel Lise;
4. Remoção da solução de Lise (centrifugação e descarte do sobrenadante);
5. Lavagem com FACS Flow (centrifugação e descarte do sobrenadante);
6. Ressuspensão dos leucócitos em FACS Flow.

O software do equipamento utilizado (FACS DIVA) permitiu a obtenção em ficheiro dos dados adquiridos, num formato compatível com o programa FlowJo (BD Biosciences). Como tal, e para cada amostra/paciente, foram obtidos dois ficheiros: 1 referente à análise dos Linfócitos T, e outro referente à análise dos Linfócitos B.

No FlowJo, os diversos ficheiros foram sujeitos a análise de dados. Foram criados diversos gates, cada um dos quais correspondente a uma subpopulação específica (e às quais correspondia uma percentagem e um nº de eventos).

4.1.1. Linfócitos B

A estratégia de *gating* para análise das subpopulações de Linfócitos B está demonstrada no Anexo 4.

O processo de análise de dados começou com a seleção dos Linfócitos, a partir das propriedades físicas (gráfico SSC-A Vs FSC-A). A partir do gate obtido (Linfócitos), selecionou-se somente os Linfócitos correspondentes a single cells (gráfico FSC-H Vs FSC-A) – e dentro destes, os correspondentes a Linfócitos B (gráfico CD45 Vs CD19). A partir do total de Linfócitos B, averiguou-se quais destes eram positivos e/ou negativos para CD27 e IgD (através da divisão do gráfico em quadrantes). A população CD27⁺IgD⁺ foi considerada como sendo Linfócitos B de memória (*unswitched*). A partir da população CD27⁺IgD⁺, foi aplicado um novo gráfico avaliando a presença/ausência de CD38 e CD24, de forma a distinguir os Linfócitos B de Transição (CD38^{High}CD24^{High}) e os Linfócitos B naive. Dentro da população CD27⁺IgD⁻, as células foram avaliadas relativamente à presença/ausência de CD38, de forma a distinguir os Plasmablastos dos Linfócitos B de memória (*Switched*) – dentro destes últimos, estão incluídos Linfócitos B da Zona Marginal (MZ) e Linfócitos B de memória *Unswitched* IgD⁻IgM⁺.

Foram caracterizadas as seguintes subpopulações: Linfócitos B totais (CD45⁺CD19⁺); Linfócitos B de transição (CD45⁺CD19⁺IgD⁺CD27⁻CD24⁺⁺CD38⁺⁺); Linfócitos B Naive (CD45⁺CD19⁺IgD⁺CD27⁻); Linfócitos B de memória *Unswitched* (CD45⁺CD19⁺IgD⁺CD27⁺) - inclui Linfócitos B da Zona marginal); Linfócitos B de memória *switched* (CD45⁺CD19⁺IgD⁻CD27⁺) - inclui Linfócitos B de memória *unswitched* IgM⁺IgD⁻; plasmablastos (CD45⁺CD19⁺IgD⁻CD27⁺CD38⁺⁺) e Linfócitos B CD27⁻IgD⁻. As percentagens obtidas para as diferentes subpopulações de Linfócitos B foram obtidas considerando o número de eventos dos Linfócitos B (totais) como 100%. Os valores absolutos para todas as populações celulares foram obtidos a partir das contagens de Linfócitos totais do hemograma (numa estratégia de plataforma dupla).

4.1.2. Linfócitos T

A estratégia de *gating* para análise das subpopulações de Linfócitos T está demonstrada no Anexo 5.

O processo de análise de dados começou com a seleção dos Linfócitos, a partir das propriedades físicas (gráfico SSC-A Vs FSC-A). A partir do gate obtidos (Linfócitos), selecionou-se somente os Linfócitos correspondentes a single cells (gráfico FSC-H Vs FSC-A) – e dentro destes, os correspondentes a Linfócitos T, a partir do gráfico CD45 Vs CD3 (CD45⁺CD3⁺). Dentro dos Linfócitos T, foi aplicada a opção de formação de quadrantes no gráfico CD4 Vs CD8, dos quais foi dado ênfase às seguintes populações: 1) Linfócitos Th CD4⁺; 2) Linfócitos Tc CD8⁺ e; 3) Linfócitos T duplo negativos (CD4⁻CD8⁻). A partir dos Linfócitos Th CD4⁺ e Tc CD8⁺, determinou-se a porção correspondente a Linfócitos T foliculares – TFh CD4⁺ e TF CD8⁺ -, a partir do gráfico CXCR5 Vs PD-1 (CXCR5⁺PD-1⁺). Dentro de cada uma das subpopulações descritas, foi determinada a porção de células ativadas, a partir do gráfico HLA-DR Vs CD38 (HLA-DR⁺CD38⁺).

Foram caracterizadas as seguintes subpopulações: Linfócitos T (CD45⁺CD3⁺), Linfócitos Th CD4⁺ (CD45⁺CD3⁺CD4⁺), Linfócitos Th CD4⁺ ativados (CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD38⁺HLA-DR⁺), Linfócitos Tfh CD4⁺ (CD45⁺CD3⁺CD4⁺PD-1⁺CXCR-5⁺), Linfócitos Tfh CD4⁺ ativados (CD45⁺CD3⁺CD4⁺PD-1⁺CXCR-5⁺CD38⁺HLA-DR⁺), Linfócitos Tc CD8⁺ (CD45⁺CD3⁺CD8⁺), Linfócitos Tc CD8⁺ ativados (CD45⁺CD3⁺CD8⁺CD38⁺HLA-DR⁺), Linfócitos Tf CD8⁺ (CD45⁺CD3⁺CD8⁺PD-1⁺CXCR-5⁺), Linfócitos Tf CD8⁺ ativados (CD45⁺CD3⁺CD8⁺PD-1⁺CXCR-5⁺CD38⁺HLA-DR⁺), Linfócitos duplo negativos (CD45⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻) e Linfócitos duplo negativos ativados (CD45⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻CD38⁺HLA-DR⁺).

As percentagens das diferentes subpopulações de Linfócitos T foram obtidas considerando o número de eventos da população-mãe de onde cada uma destas adveio como 100% (valores gerados automaticamente pelo programa FlowJo aquando da criação de um novo *gate*). Os valores absolutos para todas as populações celulares foram obtidos a partir das contagens de Linfócitos totais do hemograma (numa estratégia de plataforma dupla).

4.2. Patologia Molecular

4.2.1. Extração de ADN

Foi realizada extração de ADN a partir de amostras de plasma EDTA com o Pure Link Genomic ADN mini kit (Invitrogen), através de técnica manual. O protocolo encontra-se no Anexo 7.

4.2.2. qPCR - TTV

A deteção e quantificação do TTV foi realizado através da técnica de qPCR.

Esta técnica passa pela preparação de uma mistura de reação (20 µL por reação), que inclui diversos elementos: 1) uma sonda TaqMan (AMTPTU), de sequência 5' TCA AGG GCG AAT TCG GCG T 3'. Esta é flanqueada por um repórter 5' – FAM (6-carboxyfluorescein) -, e por um quencher 3' – TAMRA (6-carboxi-tetrametilrodamina); 2) dois primers, um forward (AMTS) – 5' GTG CCG IAG GTG AGT TTA 3' - e um reverse (AMTAS) -5' ACG CCG CGC AGT CC 3'; 3) uma master Mix Comercial, a TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os primers e sonda utilizados são dirigidos a um segmento presente na região UTR do TTV.

Cada amostra foi pipetada em triplicado (5 µL por reação), e na 3ª réplica de cada amostra, foi adicionado 2µL de controlo interno - plasmídeo pCR2.1 TTV TA278_ 81 280, contendo a sequência viral alvo (TTV), numa concentração de 2×10^5 cópias/mL. As amostras foram analisadas em duplicado, e por série de PCR foi utilizado um controlo do controlo interno (CCI), um controlo negativo, e um controlo positivo. O CCI foi pipetado num poço contendo apenas mistura reacional; o CN consistiu em água ARNse e ADNse free; por fim, o CP consistiu no mesmo plasmídeo usado como controlo interno, em duas concentrações diferentes - 2×10^3 cópias/mL e 2×10^4 cópias/mL. Para o cálculo da carga viral de TTV, foram realizadas diluições seriadas de 1/10 do plasmídeo pCR2.1 TTV TA278_ 81 280, com obtenção de 3 concentrações diferentes - 2×10^6 cópias/mL, 2×10^5 cópias/mL, 2×10^4 cópias/mL). Cada uma destas concentrações foi pipetada em duplicado, e a partir destes 3 pontos, obteve-se uma curva padrão.

O termociclador utilizado foi o 7500 Fast Real-Time PCR versão “Sequence Detection Software versão 1.3 – 7500Fast System SDS software” (Applied Biosystems). O programa de PCR dividiu-se em 3 etapas. Na etapa 1, o termociclador foi programado para 50°C (durante 3 minutos); na etapa 2, ocorre um pré-aquecimento a 95°C (10 minutos), para ativação da Taq polimerase; e na etapa 3, ocorrem 45 ciclos de amplificação. Cada um destes ciclos começa por uma desnaturação inicial a 95°C (15 segundos), seguida de uma fase a 55°C (30 segundos), e acabado numa fase a 72°C (31 segundos).

Dado que cada amostra foi pipetada em duplicado, os valores utilizados para análise estatística representam a média das cargas virais obtidas nas duas réplicas.

O limiar de deteção desta técnica corresponde a 1000 cópias/mL. Amostras com um valor de carga superior a 1000 cópias/mL apresentam resultados consistentes quando analisadas diversas vezes. Por oposição, amostras com valor de carga abaixo das 1000 cópias/mL nem sempre apresentam um resultado consistente, incorrendo-se ainda no risco desta carga não ser detetada pela técnica. Não obstante, amostras com carga viral detetável abaixo deste valor, foram consideradas positivas.

4.2.3. qPCR – CMV

A detecção do CMV foi realizada através da técnica de qPCR.

Esta técnica passa pela preparação de uma mistura de reação (20 µL por reação), que inclui diversos elementos: 1) uma Master Mix comercial, a Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs); 2) uma sonda TaqMan, de sequência 5' TCG ACG TCA CCG TGG 3'. Esta é flanqueada por um repórter 5' – FAM (6-carboxyfluorescein) -, e por um *quencher* 3' – MGB Eclipse; 3) dois *primers*, um *forward* – 5' CCC TCC GCG AAG CTC TTT 3' – e um *reverse* – 5' CAG GTC CTC TTC CAC GTC AGA 3'.

Os eluídos utilizados para a detecção de CMV são os mesmos utilizados para a detecção e quantificação de TTV. As amostras cujo CI amplificou nas corridas de qPCR de TTV (indicativo de ausência de inibidores), foram pipetadas em duplicado (5 µL por reação). As amostras cujo CI não amplificou nas corridas de qPCR de TTV, foram pipetadas em triplicado (5 µL por reação), e na 3ª réplica de cada amostra, foi adicionado 2µL de controlo do CP, contendo a sequência viral alvo (CMV). Foram utilizados, em duplicado, um controlo do controlo interno (CCI), um controlo negativo, e um controlo positivo. O CCI foi pipetado num poço contendo apenas mistura reacional; o CN consistiu em água ARNse e ADNse free; por fim, o CP consistiu no mesmo fragmento usado como controlo interno, numa concentração menor.

O termociclador utilizado foi o 7500 Fast Real-Time PCR versão “Sequence Detection Software versão 1.3 – 7500Fast System SDS software” (Applied Biosystems). O programa de PCR divide-se em 2 etapas. Na etapa 1, ocorre um pré-aquecimento a 95°C (10 minutos), para ativação da Taq polimerase; na etapa 2, ocorrem 40 ciclos de amplificação. Cada um destes ciclos começa por uma desnaturação inicial a 95°C (15 segundos), seguida de uma fase a 60°C (1 minuto).

4.3 Imunoserologia

A partir de amostras de soro, foi realizada a determinação quantitativa dos níveis de anticorpos IgM e IgG específicos anti-CMV humano (hCMV). Para este fim, foi aplicada a técnica de Quimioluminiscência (CLIA), realizada no LIAISON® XL Analyzer. Foram utilizados 2 kits diferentes: LIAISON® CMV IgM II (Ref. 310755) e LIAISON® CMV IgG II (Ref. 310745). Estes ensaios incluem diversos reagentes, nomeadamente partículas magnéticas revestidas por antígeno de hCMV inativado (estirpe AD 169) e anticorpos monoclonais de ratinho anti-IgG e anti-IgM humana conjugados com um derivado do isoluminol.

4.4. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism versão 10.0.0 para Windows (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com). Os resultados encontram-se apresentados em tabelas, gráficos e medidas de tendência central (nas variáveis contínuas da amostra).

O Teste de Qui-quadrado foi utilizado para avaliar diferenças nas variáveis categóricas entre diferentes grupos, tais como a prevalência de casos positivos e negativos de TTV, ao longo dos vários *time points* da gravidez.

Em função do tipo de distribuição dos dados, após ser testada a sua normalidade com o teste de D'Agostino-Pearson, foram utilizados testes não paramétricos, que têm em conta a mediana (e não a média). Os diversos testes utilizados encontram-se descritos de seguida.

Para as comparações de variáveis contínuas entre 2 grupos foi utilizado o Teste não paramétrico de Mann Whitney. Este teste foi utilizado para avaliar diferenças nas subpopulações celulares B e T e na virémia de TTV entre mulheres seropositivas e seronegativas para CMV. Também foi utilizado para avaliar diferenças nas subpopulações celulares B e T entre mulheres positivas e negativas para TTV.

Foram ainda utilizados dois testes para as comparações de variáveis contínuas entre 3 ou mais grupos. Neste caso, a avaliação da dinâmica das subpopulações celulares B e T ao longo da gravidez (nas grávidas às quais foi possível obter amostras nos 3 *time points* definidos) foi efetuada com recurso ao Teste de Friedman, um teste não paramétrico que permite a análise de dados emparelhados.

O Teste de Kruskal-Wallis, também não paramétrico, analisa dados de 3 ou mais grupos, não emparelhados, e permitiu avaliar a dinâmica da carga viral do TTV ao longo da gravidez.

Por fim, os estudos de correlação entre variáveis contínuas foram efetuados com recurso ao Teste da correlação de Spearman. Este teste foi utilizado, por exemplo, nos estudos de correlação entre os valores de carga viral e de TTV e as contagens das subpopulações celulares B e T.

A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0.05$.

Parte III – Resultados

1. Dados Clínicos e Demográficos das participantes

Foram recrutadas 35 grávidas, das quais houve 5 *drop-outs* após o 1º trimestre. À data da elaboração deste projeto, 16 participantes concluíram a sua gestação, pelo que foi possível colher amostras dos 3 trimestres nestas mulheres. À data da elaboração desta monografia, as restantes participantes tinham apenas colhido amostras do 1º trimestre. A continuação do estudo em que esta monografia se integra permitirá a conclusão das colheitas do 2º e 3º trimestres destas mulheres, e a sua análise, conforme o plano do estudo.

Às participantes deste estudo, foram recolhidos diversos dados clínicos e demográficos. As idades dentro do grupo de mulheres recrutadas estenderam-se entre os 25 e os 43 anos. Foi ainda recolhida informação sobre o peso e o índice de massa corporal (IMC) no 1º trimestre, assim como dados sobre o índice obstétrico, que inclui 4 parâmetros: nº de partos pré-termo, nº de partos a termo, nº de Abortos/interrupções/gravidezes ectópicas e nº de nados vivos. Estes valores apresentam-se na (tabela 2).

Tabela 2. Características Demográficas da população do estudo

<i>Parâmetro</i>	Grávidas recrutadas no 1.ºTrimestre (n=35)
<i>Idade (anos)</i>	33,00 [30,25-37,00]
<i>Peso (Kg)</i>	62,05 [55,00-72,00]*
<i>IMC</i>	23,14 [21,54-26,26]*
<i>Categorias IMC</i>	
IMC < 18.5	1 (3,13%)*
18.5 ≥ IMC ≥ 24.9	21 (65,63%)*
IMC >24.9	10 (31,25%)*
<i>Índice Obstétrico</i>	
<i>Partos termo</i>	7 (22,58%)**
<i>Partos pré-termo</i>	0 (0,00%)**
<i>Abortos/interrupções/gravidezes ectópicas</i>	12 (38,79%)**
<i>Nados vivos</i>	7 (22,58%)**
	N.º médio de partos / nados-vivos = 1.9
<i>Mulheres Primíparas</i>	15 (48,39%)

Variáveis contínuas apresentadas como mediana e intervalo interquartil. **IMC**, índice de massa corporal, * n=32; **n=31.

A partir do grupo inicial de mulheres recrutadas, foi possível acompanhar toda a gravidez de 16 participantes, com recolha de amostras nos três *time points* pré-definidos. A tabela 3 engloba a caracterização de dados demográficos deste subgrupo, incluindo informação sobre o parto, e o recém-nascido. Todos os partos foram partos de termo, com nados vivos. Entre os recém-nascidos, 9 são do sexo feminino (60%) e 6 são do sexo masculino (40%), com pesos entre 2378 e 4054g.

Tabela 3. Características Demográficas da população do estudo avaliada nos 3 trimestres de gravidez

<i>Parâmetro</i>	Grávidas recrutadas no 1.º Trimestre (n=16)
<i>Idade (anos)</i>	33,00 [31,00-35,50]
<i>Peso (Kg)</i>	64.70 [56.38-72.00]
<i>IMC</i>	23.50 [22.21-27.32]
<i>Categorias IMC</i>	
IMC < 18.5	1 (6.25%)
18.5 ≥ IMC ≥ 24.9	9 (56.25%)
IMC >24.9	6 (37.50%)
<i>Índice Obstétrico</i>	
<i>Partos termo</i>	5 (31,25%)
<i>Partos pré-termo</i>	0 (0,00%)
<i>Abortos/interrupções/gravidezes ectópicas</i>	6 (37,50%)
<i>Nados vivos</i>	5 (31,25%)
	N.º médio de partos / nados-vivos = 2
<i>Mulheres Primíparas</i>	7 (43,75%)
<i>Tempo de gestação no parto (semanas)</i>	39 [38 - 40]
<i>Tipo de parto</i>	
<i>Cesariana</i>	7 (46.67%)*
<i>Eutócico</i>	5 (33.33%)*
<i>Ventosa</i>	2 (13.33%)*
<i>Fórceps</i>	1 (6.67%)*
<i>Peso do bebé ao nascimento, g</i>	3080 [2586-3360]*
<i>Sexo do bebé</i>	
<i>M/F</i>	6 (40%) / 9 (60%) *

Variáveis contínuas apresentadas como mediana e intervalo interquartil. **IMC**, índice de massa corporal.

* n=15.

2. Subpopulações B e T ao longo da Gravidez

2.1. Compartimento B

Com o intuito de avaliar a dinâmica das diferentes subpopulações B ao longo de gravidez, foi realizada uma análise emparelhada de todas as grávidas avaliadas nos 3 trimestres. Na Tabela 4, estão apresentados os valores de Mediana e intervalos interquartis dos valores das diferentes subpopulações B, avaliadas ao longo dos 3 trimestres de gravidez. Também estão apresentados os valores p obtidos na análise emparelhada, através do teste de Friedman.

Tabela 4. Compartimento B – avaliação dos valores percentuais e contagens absolutas das subpopulações estudadas

População (%)	1º Trimestre (n=16)	2º Trimestre (n=16)	3º Trimestre (n=16)	Valores-P
<i>Linfócitos B</i>	7,96 [6,83-8,98]	7,405 [6,093-8,303]	6,055 [5,245-8,935]	0,0013
<i>Linfócitos B de Transição</i>	1,97 [1,36-2,81]	1,230 [0,8975-2,158]	0,8950 [0,6175-1,808]	0,0221
<i>Linfócitos B naïve</i>	59,15 [51,99-65,82]	65,26 [49,29-70,63]	56,80 [49,97-68,40]	0,5698
<i>Linfócitos B Memória Unswitched</i>	18,30 [11,55-27,23]	17,60 [11,05-25,43]	19,45 [13,88-23,68]	0,4046
<i>Linfócitos B Memória Switched</i>	15,13 [9,69-21,12]	13,84 [9,008-20,82]	16,93 [12,15-23,13]	0,1332
<i>Plasmablastos</i>	0,68 [0,30-0,99]	0,49 [0,40-0,69]	0,68 [0,48-1,07]	0,0874
<i>Linfócitos B CD27-IgD⁺ (DN)</i>	2,65 [2,16-3,27]	2,77 [1,66-3,72]	2,79 [2,07-3,84]	0,9840
População (Células/μl)	1º Trimestre (n=14)	2º Trimestre (n=14)	3º Trimestre (n=14)	Valores-P
<i>Linfócitos B (Células/μl)</i>	143,7 [100,2-178,7]	128,0 [89,7-155,6]	112,1 [90,6-155,5]	0,2231
<i>Linfócitos B de Transição</i>	3,3 [1,3-4,9]	1,7 [1,1-3,8]	1,1 [0,7-3,5]	0,0083
<i>Linfócitos B naïve</i>	81,4 [56,8-109,0]	78,9 [57,2-101,5]	66,6 [55,4-89,8]	0,2231
<i>Linfócitos B Memória Unswitched</i>	25,7 [13,2-37,7]	19,7 [14,1-26,5]	23,6 [12,2-26,8]	0,4244
<i>Linfócitos B Memória Switched</i>	19,2 [12,5-39,2]	20,1 [11,2-26,4]	17,2 [13,8-31,4]	0,8071
<i>Plasmablastos</i>	0,9 [0,6-1,3]	0,7 [0,5-1,1]	0,9 [0,5-1,3]	0,5258
<i>Linfócitos B CD27-IgD⁺ (DN)</i>	3,5 [2,8-4,9]	3,8 [1,8-4,7]	3,0 [2,1-4,3]	0,1454

Em relação aos valores percentuais das subpopulações B (ao longo da gravidez), observou-se uma diminuição gradual nos Linfócitos B totais (em relação ao total de Linfócitos) e de Linfócitos B de Transição (dentro do compartimento B), sendo esta diminuição estatisticamente significativa entre o 1º e 3º trimestres. Nas restantes subpopulações B estudadas, não foram observadas variações estatisticamente significativas. Os gráficos resultantes desta análise estão apresentados na figura 5 (a-g).

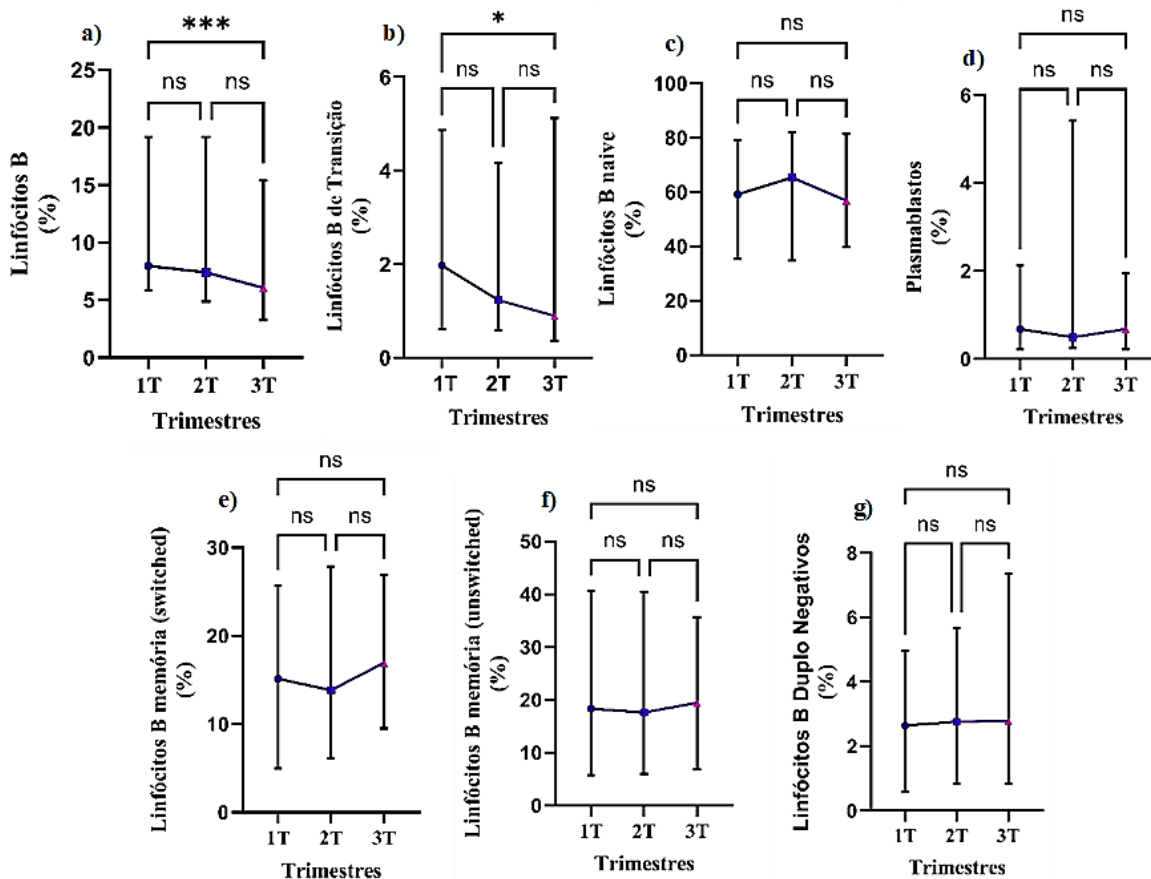


Figura 5. Subpopulações B ao longo da gravidez (valores percentuais).

a) Linfócitos B totais (** $p=0,0013$). **b)** Linfócitos B de Transição (* $p=0,0221$). **c)** Linfócitos B naive ($p=0,5698$). **d)** Plasmablastos ($p=0,0874$). **e)** Linfócitos B memória com *switch* de isótipo ($p=0,1332$). **f)** Linfócitos B memória sem *switch* de isótipo ($p=0,4046$). **g)** Linfócitos B Duplo negativos (CD27⁻IgG⁻) ($p=0,9840$). Teste de Friedman.

NS- Não significativo; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

Nos valores absolutos das subpopulações B (ao longo da gravidez), obtidos a partir dos hemogramas efetuados em cada participante ($n=14$), numa estratégia de plataforma dupla, também se observa uma diminuição gradual nos Linfócitos B de Transição. Esta diminuição é estatisticamente significativa entre o 1º e 3º trimestre. Nas restantes subpopulações B estudadas, não foram observadas variações estatisticamente significativas. Os gráficos resultantes desta análise estão apresentados na figura 6 (a-g).

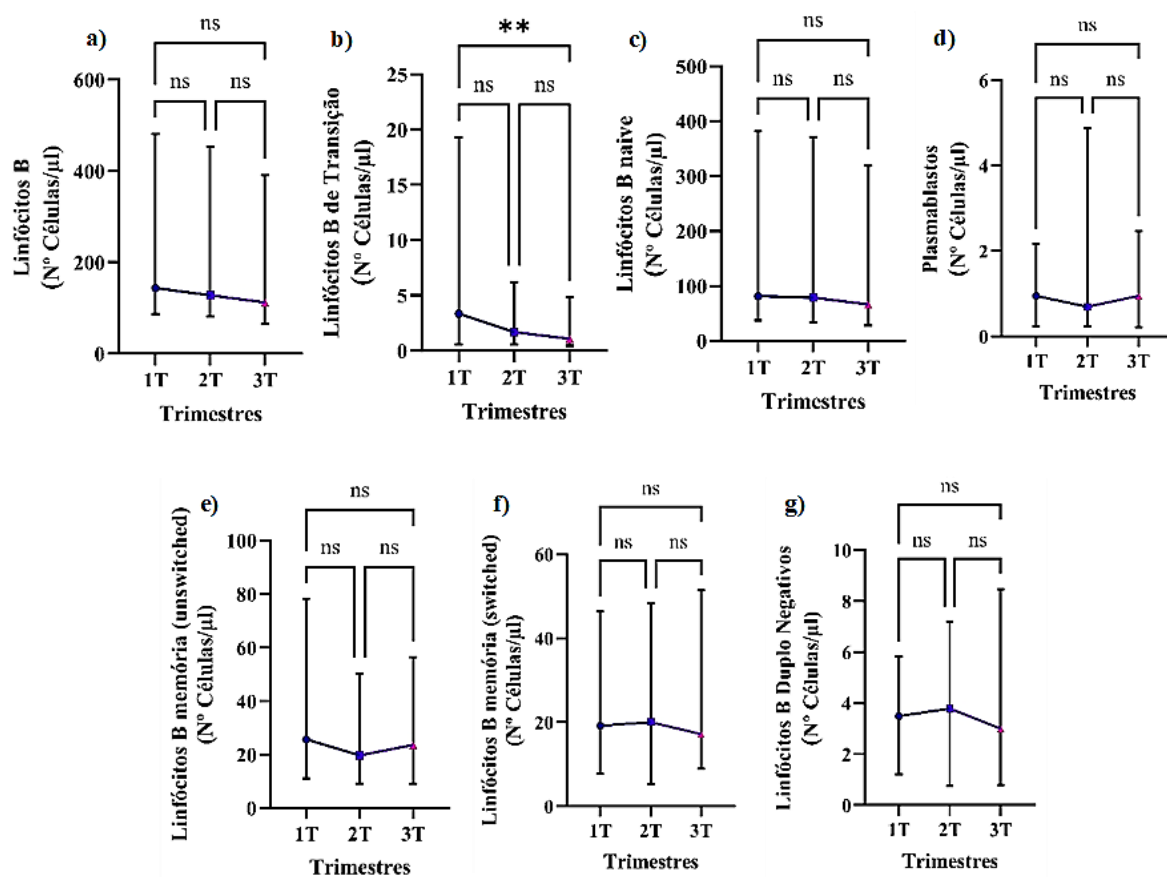


Figura 6. Subpopulações B ao longo da gravidez (contagens absolutas).

a) Linfócitos B totais ($p=0,2231$). **b)** Linfócitos B de Transição (** $p=0,0083$). **c)** Linfócitos B naive ($p=0,2231$). **d)** Plasmablastos ($p=0,5258$). **e)** Linfócitos B memória sem *switch* de isótipo ($p=0,4244$). **f)** Linfócitos B memória com *switch* de isótipo ($p=0,8071$). **g)** Linfócitos B Duplo negativos (CD27-IgG-) ($p=$). Teste de Friedman. NS- Não significativo; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

2.2. Compartimento T

Foi igualmente avaliada a dinâmica de diferentes subpopulações de células T ao longo de gravidez, comparando-se os valores observados em grávidas ao longo dos 3 trimestres de gestação. Na Tabela 5, estão apresentados os valores de Mediana e intervalos interquartis para as diferentes subpopulações T estudadas, ao longo dos 3 trimestres.

Tabela 5. Compartimento T – avaliação dos valores percentuais e contagens absolutas das subpopulações estudadas

População (%)	1º Trimestre (n=16)	2º Trimestre (n=16)	3º Trimestre (n=16)	Valores-P
Linfócitos T	73,65 [60,38-76,93]	75,55 [70,25-77,80]	76,95 [70,78-81,75]	0,0063
Linfócitos T CD4+	60,85 [57,13-67,68]	62,00 [53,48-68,88]	60,80 [54,48-68,10]	0,5385
Linfócitos T CD4+ ativados	2,41 [1,54-2,85]	2,21 [1,54-3,17]	2,96 [2,31-6,23]	0,0990
Linfócitos Tfh CD4+	6,90 [4,97-8,24]	6,43 [5,12-7,93]	5,41 [3,79-7,47]	0,3452
Linfócitos Tfh CD4+ ativados	8,22 [7,60-10,36]	7,82 [5,56-10,60]	11,10 [6,78-15,78]	0,0874
Linfócitos T CD8+	30,95 [26,95-32,00]	31,05 [25,60-34,55]	29,60 [25,48-35,85]	0,1738
Linfócitos T CD8+ ativados	6,00 [3,81-9,96]	6,30 [4,29-11,58]	7,72 [5,57-16,18]	0,1054
Linfócitos Tf CD8+	2,04 [1,39-2,72]	2,07 [1,40-2,64]	2,00 [1,48-3,10]	0,9394
Linfócitos Tf CD8+ ativados	38,60 [28,68 - 48,83]	34,45 [29,88-52,08]	42,75 [32,55-56,10]	0,3050
Linfócitos T duplos negativos	6,85 [4,11-9,38]	5,34 [3,52-7,24]	6,06[3,35-7,52]	0,0011
Linfócitos T duplo negativos ativados	6,76 [5,00-13,43]	12,40 [9,10-16,55]	17,35 [11,88-22,75]	0,0019
População (Células/ µl)	1º Trimestre (n=14)	2º Trimestre (n=14)	3º Trimestre (n=14)	Valores-P
Linfócitos T	1118,0 [964,2-1423,0]	1146,0 [1025,0- 1588,0]	1425,0 [1008,0- 1713,0]	0,2231
Linfócitos T CD4+	684,8 [611,7-835,1]	750,2 [620,7-866,9]	804,8 [668,7-1037,0]	0,2574
Linfócitos T CD4+ ativados	16,1 [10,7-21,3]	16,6 [9,8-20,5]	24,8 [19,9-33,0]	0,0047
Linfócitos Tfh CD4+	46,0 [36,5-57,4]	51,7 [38,6-59,8]	44,0 [35,1-71,5]	0,3951
Linfócitos Tfh CD4+ ativados	3,8 [3,3-4,3]	3,3 [2,6-5,0]	4,2 [3,6-5,9]	0,3951
Linfócitos T CD8+	322,7 [260,2-424,3]	358,1 [279,4-416,5]	381,3 [281,9-514,5]	0,1092
Linfócitos T CD8+ ativados	18,3 [10,1-36,5]	23,8 [13,5-33,4]	35,3 [21,7-48,4]	0,0302
Linfócitos Tf CD8+	7,2 [4,7-9,4]	6,7 [5,4-8,4]	7,4 [5,3-14,7]	0,9311
Linfócitos Tf CD8+ ativados	2,4 [1,7-4,0]	2,8 [2,2-3,4]	2,9 [2,2-4,0]	0,8071
Linfócitos T duplos negativos	75,7 [35,9-111,5]	59,3 [39,0-89,6]	81,7 [32,7-125,5]	0,9311
Linfócitos T duplo negativos ativados	6,3 [2,7-10,6]	6,8 [3,9-12,3]	11,8 [4,9-18,6]	0,0764

Em relação aos valores percentuais das subpopulações T (ao longo da gravidez), observa-se um aumento nos Linfócitos T totais e nos Linfócitos T Duplamente Negativos ativados, sendo estas diferenças estatisticamente significativas entre o 1º e 3º trimestres. Observou-se ainda uma diminuição estatisticamente significativa nos Linfócitos T Duplamente Negativos totais, entre o 1º e

2º trimestres. Nas restantes subpopulações T descritas, não foram observadas variações estatisticamente significativas. Os gráficos resultantes desta análise estão apresentados na figura 7 (a-k).

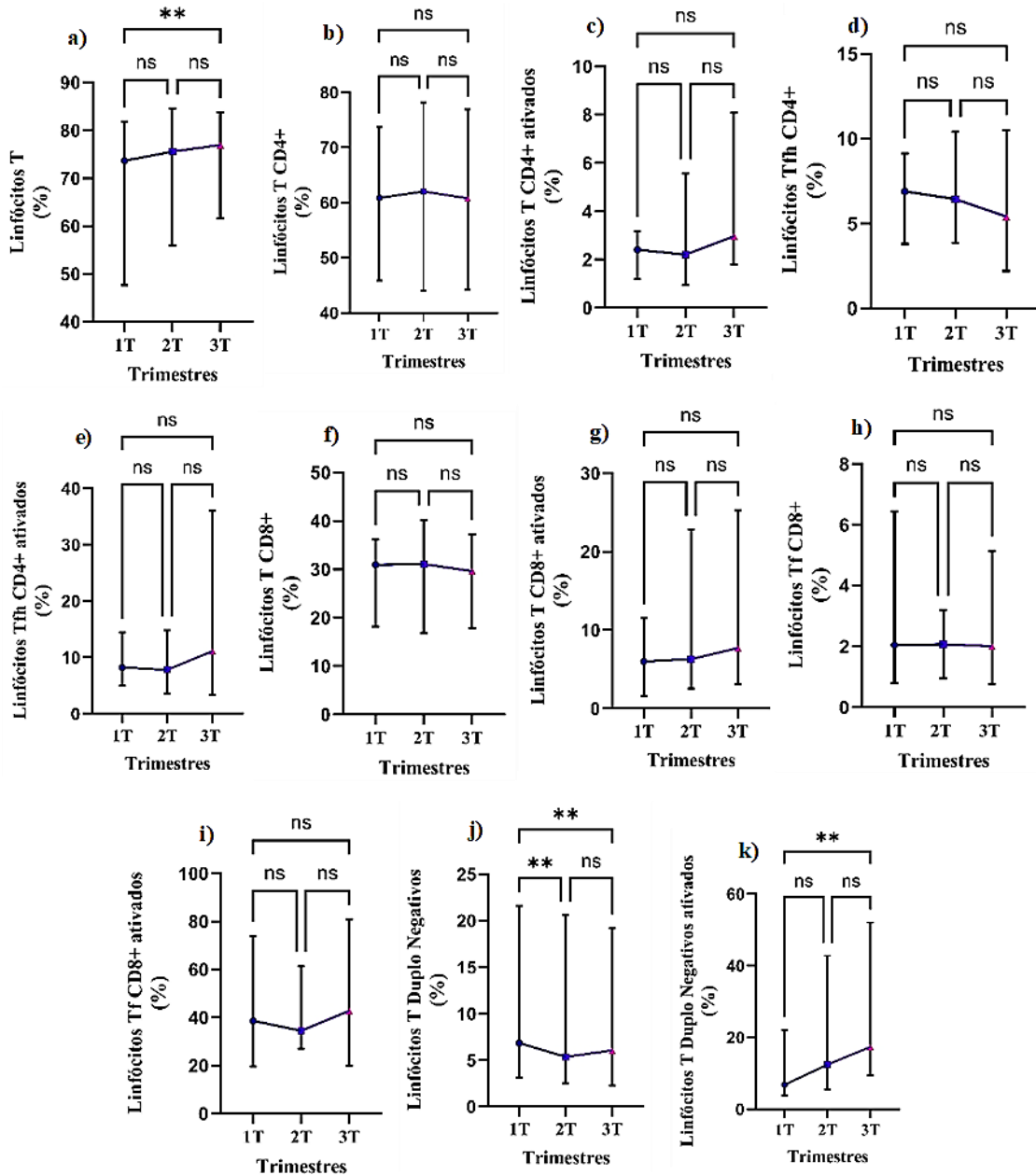


Figura 7. Subpopulações T ao longo da gravidez (valores percentuais).

a) Linfócitos T totais (** $p=0,0063$). **b)** Linfócitos T CD4+ ($p=0,5385$). **c)** Linfócitos T CD4+ ativados ($p=0,0990$). **d)** Linfócitos Tfh CD4+ ($p=0,3452$). **e)** Linfócitos Tfh CD4+ ativados ($p=0,0874$). **f)** Linfócitos T CD8+ ($p=0,1738$). **g)** Linfócitos T CD8+ ativados ($p=0,1054$). **h)** Linfócitos Tf CD8+ ($p=0,9394$). **i)** Linfócitos Tf CD8+ ativados ($p=0,3050$). **j)** Linfócitos T Duplo negativos (** $p=0,0011$). **k)** Linfócitos T Duplo negativos ativados (** $p=0,0019$). Teste de Friedman. NS- Não significativo; **Tf**- T foliculares; **Tfh** – T foliculares helper; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $<0,001$

Por outro lado, e em relação à dinâmica nas contagens absolutas das subpopulações T (ao longo de gravidez), observou-se um aumento gradual nos valores absolutos de Linfócitos T CD8+ ativados,

que apresentou significância estatística entre o 1º e 3º trimestres de gravidez. Um padrão semelhante observou-se nos valores absolutos de Linfócitos T CD4+ ativados, que, por seu lado, apresentaram um aumento estatisticamente significativo no 3º trimestre de gravidez, comparando os valores com os observados quer no 1º, quer no 2º trimestre. Não se verificaram outras diferenças estatisticamente significativas nas restantes subpopulações T descritas estudadas. Os gráficos resultantes desta análise estão apresentados na figura 8 (a-k).

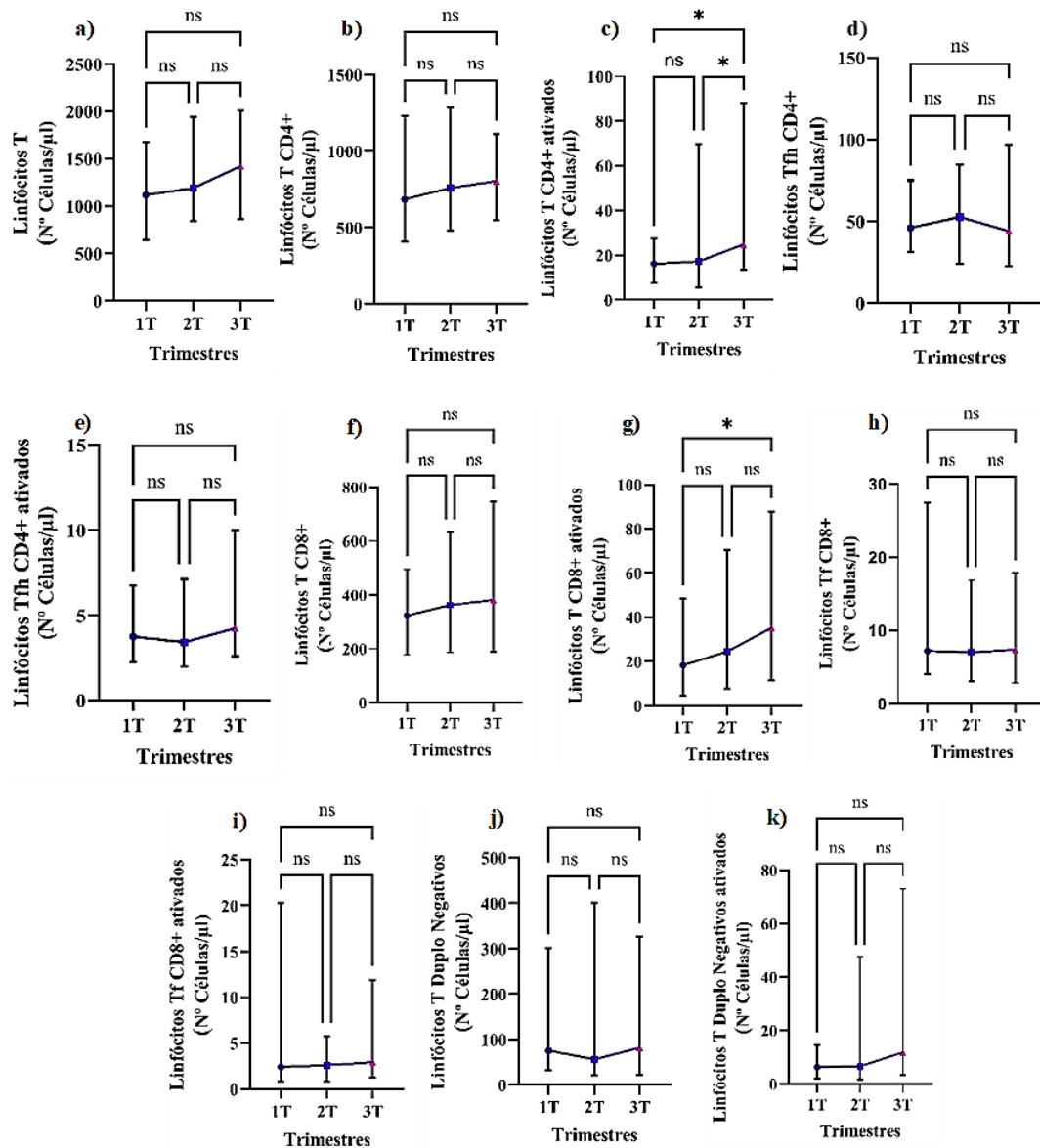


Figura 8. Subpopulações T ao longo da gravidez (contagens absolutas).

a) Linfócitos T totais ($p=0,2231$). **b)** Linfócitos T CD4+ ($p=0,2574$). **c)** Linfócitos T CD4+ ativados (** $p=0,0047$). **d)** Linfócitos Tfh CD4+ ($p=0,3951$). **e)** Linfócitos Tfh CD4+ ativados ($p=0,3951$). **f)** Linfócitos T CD8+ ($p=0,1092$). **g)** Linfócitos T CD8+ ativados (* $p=0,0302$). **h)** Linfócitos Tf CD8+ ($p=0,9311$). **i)** Linfócitos Tf CD8+ ativados ($p=0,8071$). **j)** Linfócitos T Duplo negativos ($p=0,9311$). **k)** Linfócitos T Duplo negativos ativados ($p=0,0764$). Teste de Friedman.

NS- Não significativo; Tf- T foliculares; Tfh - T foliculares helper; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

3. Torque Teno Vírus

3.1. TTV ao longo da gravidez – Carga Viral e Prevalência

Desde logo, a partir da análise dos dados demográficos, verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas na idade e no IMC entre grávidas com e sem carga viral de TTV no 1º trimestre, não se verificando igualmente qualquer correlação entre estas variáveis (i.e., idade, IMC e carga de TTV no primeiro trimestre).

Com o intuito de avaliar a dinâmica do TTV durante a gravidez, foi realizada uma análise que comparou a sua prevalência ao longo dos 3 trimestres de gravidez, considerando as grávidas que foi possível acompanhar em todos os *time points* (n=16) (figura 9 a).

Apesar de não se verificarem diferenças estatisticamente significativas entre os três trimestres, verificou-se uma maior prevalência de mulheres com carga viral detetável (positivas para TTV), no 1º trimestre (11/16, 68.75%), contra 62.5% no 2º trimestre e 56.25% no 3º trimestre.

A dinâmica do TTV também foi avaliada através da análise não emparelhada dos valores de carga viral detetável (cópias/mL) para TTV, ao longo da gravidez (figura 9 b). Porém, estas também não apresentaram variações estatisticamente significativas entre os três trimestres.

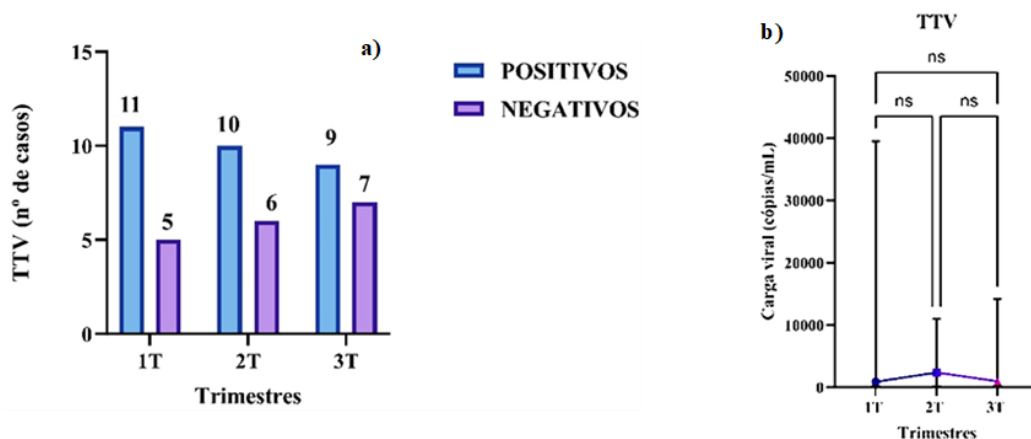


Figura 9. Dinâmica da prevalência e carga viral do TTV ao longo da gravidez

a) Tabela de Contingência representativa da prevalência do TTV ao longo da gravidez ($p=0,7659$). Teste de Chi-square. **b)** Carga viral do TTV ao longo da gravidez ($p=0,7299$). Teste de Kruskal-Wallis
TTV- Torque teno virus; NS – Não significativo

3.2. Torque Teno Vírus e Subpopulações celulares B e T: interações no 1º trimestre de gravidez

Apesar de não se terem verificado variações significativas nos valores de TTV ao longo dos 3 trimestres de gravidez, foi realizada uma avaliação da possível relação entre o TTV e as diferentes subpopulações B e T estudadas, uma vez que este vírus tem sido apontado como um eventual marcador de imunocompetência. Para este estudo, foi considerado o total de mulheres recrutadas no 1.º trimestre. Na tabela 6, está representada a prevalência do TTV, assim como a mediana e intervalo interquartil dos valores de carga viral para este vírus (no 1º trimestre).

Tabela 6. Prevalência e carga viral de TTV no 1º trimestre de Gravidez

1º Trimestre (n=35)	Nº de Positivos	23
	Nº de Negativos	12
	Carga Viral, Cópias/mL	853,7 [332,5-2774]
	Mediana [Intervalo interquartil]	

Através da análise realizada, não se verificou qualquer correlação estatisticamente significativa entre as cargas virais de TTV (cópias/mL) e os valores absolutos (nº células/ μ L) e relativos (%) das diferentes populações B estudadas no total de mulheres recrutadas no 1º trimestre. No entanto, e nas mulheres com cargas virais mais elevadas, parece haver uma tendência para apresentarem percentagens mais baixas de Linfócitos B naive ($r=-0,3706$, $p=0,0817$, fig.10 a); e percentagens mais elevadas de Linfócitos B de memória com *switch* ($r=0,3587$, $p=0,0928$, fig. 10 b).

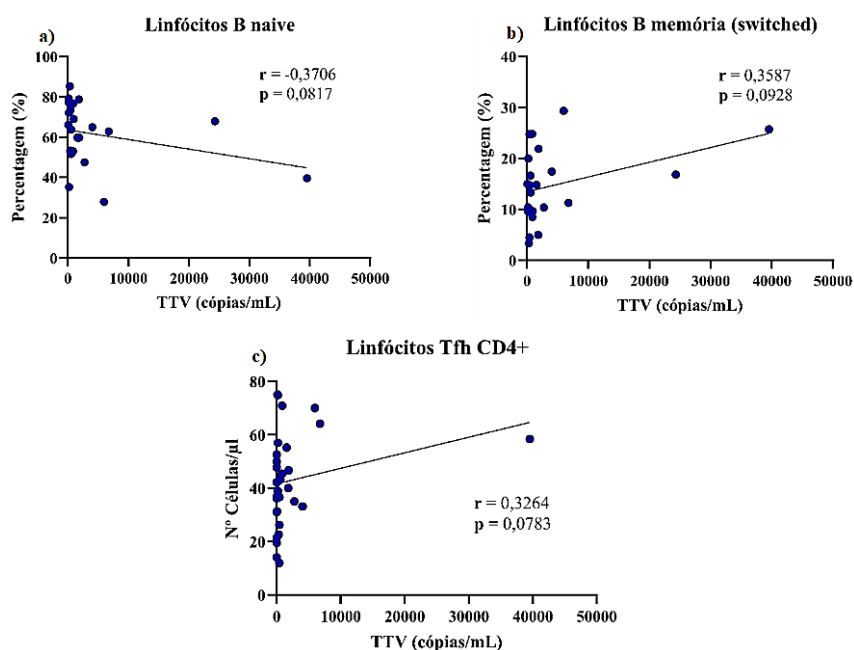


Figura 10. Correlação entre carga viral de TTV e subpopulações celulares.

a) Correlação entre carga viral de TTV e a percentagem de Linfócitos B naive; b) Correlação entre carga viral de TTV e a percentagem de Linfócitos B de memória com *switch* de isótipo; c) Correlação entre carga viral de TTV e os valores absolutos de Linfócitos Tfh.

Uma abordagem similar foi realizada com as células T, nas quais não se verificou novamente qualquer correlação entre as cargas virais de TTV (cópias/mL) e os valores absolutos (n° células/ μ L) e relativos (%) das populações T estudadas no total de mulheres recrutadas no 1° trimestre. Apenas se verificou uma tendência para mulheres com cargas virais de TTV mais elevadas apresentarem valores absolutos de Linfócitos Tfh CD4+ mais elevados ($r=0.3264$; $p=0.0783$, fig. 10 c).

De seguida, e considerando como positivas as mulheres com carga viral de TTV detetável, avaliou-se a possibilidade de existirem diferenças nas contagens de diversas subpopulações B e T, entre mulheres positivas e negativas para este vírus (no 1° trimestre de gravidez).

Na análise comparativa das diferentes subpopulações B entre os dois grupos, observa-se que as mulheres positivas para TTV no 1° trimestre ($n=23$) apresentam percentagens mais baixas de Linfócitos B duplamente negativos ($p=0.0373$), por comparação com as mulheres negativas para TTV ($n=12$) neste período (fig. 11. a-g). Apesar de não se alcançar a significância estatística, os valores absolutos dos Linfócitos B duplamente negativos também parecem estar diminuídas em mulheres positivas para TTV ($n=20$, $p= 0,0546$), por comparação com mulheres negativas para TTV ($n=10$) (fig. 12. a-g).

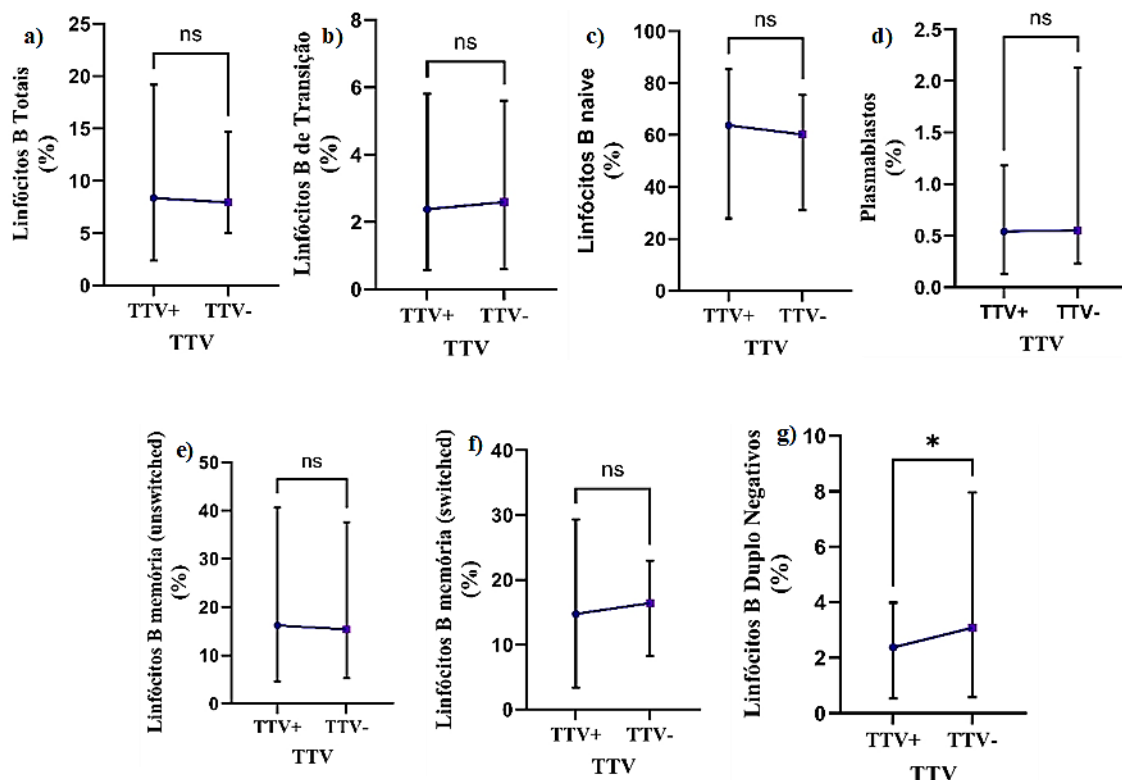


Figura 11. Valores percentuais de Subpopulações B em mulheres com e sem virémia TTV detetável B.

a) Linfócitos B totais ($p= 0,6012$). **b)** Linfócitos B de Transição ($p= 0,7771$). **c)** Linfócitos B Naive ($p= 0,3765$). **d)** Plasmablastos ($p= 0,4346$). **e)** Linfócitos B memória sem *switch* de isótipo ($p= 0,9800$). **f)** Linfócitos B memória com *switch* de isótipo ($p= 0,5484$). **g)** Linfócitos B Duplo negativos (* $p= 0,0373$). Teste de Mann Whitney
NS – não significativo; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

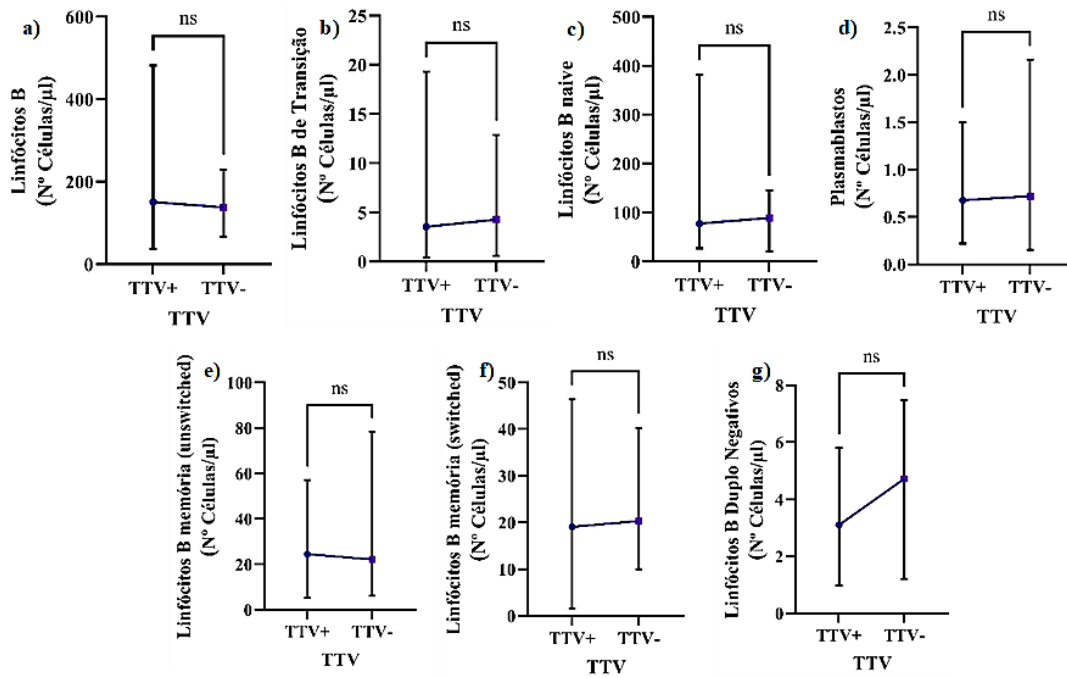


Figura 12. Contagens absolutas de Subpopulações B em mulheres com e sem virémia TTV detetável.

a) Linfócitos B totais ($p=0,8121$). **b)** Linfócitos B de Transição ($p=0,8458$). **c)** Linfócitos B naive ($p>0,9999$). **d)** Plasmablastos ($p=0,8373$). **e)** Linfócitos B memória sem *switch* de isótipo ($p=0,6885$). **f)** Linfócitos B memória com *switch* de isótipo ($p=0,8798$). **g)** Linfócitos B Duplo negativos ($p=0,0546$). Teste de Mann Whitney
 NS – não significativo; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

Na análise comparativa das diferentes subpopulações T, não se observou qualquer diferença com significado estatístico entre mulheres positivas para TTV e mulheres negativas para TTV – quer nos valores absolutos, como nos valores percentuais.

4. Citomegalovírus

4.1. Estudo serológico de CMV ao longo da gravidez

Na tabela 7, apresentam-se os dados relativos à avaliação serológica da infecção por CMV em cada uma das participantes deste estudo, ao longo dos 3 *time points* definidos (n=16). Para além da prevalência de anticorpos positivos (IgM e IgG anti-CMV), estão igualmente apresentados os valores de mediana e os intervalos interquartil dos valores positivos de IgG anti-CMV (U/mL), em cada um dos trimestres. Para efeitos de cálculo estatístico, o limite superior de quantificação do ensaio (i.e., 180 U/mL) foi considerado para todos os resultados positivos que se apresentaram acima deste valor (i.e., >180 U/mL). A partir desta tabela, é possível observar que entre as grávidas seronegativas no 1º trimestre, não houve seroconversão, uma vez que não houve deteção de IgGs anti-CMV no 2º e 3º trimestres.

Avaliando os subgrupos de mulheres em função do status serológico do CMV, no 1º trimestre, não se identificaram diferenças estatisticamente significativas nos valores de IMC e nas idades, entre as mulheres seropositivas e seronegativas de CMV deste estudo. No entanto, mulheres seropositivas parecem apresentar valores de IMC tendencialmente mais elevados (p= 0,0699). No entanto, não se verificaram também quaisquer correlações entre estas variáveis e os níveis séricos de IgG anti-CMV.

Tabela 7. Serologia CMV – Prevalência de casos positivos e níveis de IgG ao longo da gravidez

	IgM	IgG
1º Trimestre (n=16)		
<i>Nº de Positivos</i>	0 (0%)	13 (81.25%)
<i>Nº de Negativos</i>	16 (100%)	3 (18.75%)
<i>Concentração sérica (U/mL)</i> <i>mediana [IQ]</i>	-	86,20 [71,65-109,0]
2º Trimestre (n=16)		
<i>Nº de Positivos</i>	N/A	13 (81.25%)
<i>Nº de Negativos</i>		3 (18.75%)
<i>Concentração sérica (U/mL)</i> <i>mediana [IQ]</i>	-	98,70 [74,15-108,0]
3º Trimestre (n=16)		
<i>Nº de Positivos</i>	N/A	13 (81.25%)
<i>Nº de Negativos</i>		3 (18.75%)
<i>Concentração sérica (U/mL)</i> <i>mediana [IQ]</i>	-	84,70 [61,10-114,5]

Na tabela 8, apresentam-se os dados relativos à avaliação serológica da infecção por CMV de todas as mulheres grávidas com dados do 1º trimestre (n=35). Através deste, observa-se que a prevalência de mulheres seropositivas para IgG anti-CMV, no 1º trimestre, foi de 71.4%.

Tabela 8. Serologia CMV – Prevalência de casos positivos e níveis de IgG no 1.º trimestre de gravidez

<i>1º Trimestre</i> (n=35)	IgM	IgG
<i>Nº de Positivos</i>	0 (0%)	25 (71.4%)
<i>Nº de Negativos</i>	35 (100%)	10 (28.6%)
<i>Concentração sérica (U/mL)</i> <i>mediana [IQ]</i>	0	86,20 [63,80-108,5]

O doseamento das IgMs anti-CMV foi apenas realizado no 1º trimestre, com o intuito de identificar eventuais quadros de infecção primária e/ou infecção secundária/remota do CMV. No entanto, todas as amostras analisadas são negativas para IgM.

As amostras seropositivas para CMV foram ainda avaliadas quanto à presença de ADN de CMV em circulação, através de PCR em tempo real qualitativo. No entanto, todas estas amostras apresentaram resultado não detetável, pelo que não ocorreu nenhum episódio de reinfeção/reativação.

4.2. Citomegalovírus e Subpopulações celulares B e T: interações no 1º trimestre de gravidez

Realizou-se uma análise com o intuito de avaliar uma possível correlação entre o CMV e as diferentes subpopulações B e T estudadas, mais precisamente entre estas subpopulações e os níveis de IgG anti-CMV. Para este estudo, foi considerado o total de mulheres recrutadas no 1.º trimestre (n=35).

Através da análise realizada, não se verificou qualquer correlação estatisticamente significativa entre os níveis de IgG anti-CMV (U/mL) e os valores absolutos (nº células/µL) e relativos (%) das diferentes populações B e T estudadas, no total de mulheres recrutadas no 1º trimestre

De seguida, e reconhecendo da literatura algumas descrições de alterações imunes entre indivíduos seropositivos e seronegativos para CMV, fomos avaliar se, durante o primeiro trimestre de gravidez, existem alterações em diversas subpopulações B e T, em função deste contacto com o vírus.

No que se refere ao compartimento B, não se verificaram quaisquer diferenças estatisticamente significativas para os valores relativos (%) das subpopulações estudadas, entre grávidas seropositivas (n=25) e seronegativas (n=10) para IgG anti-CMV (fig.13, a-g).

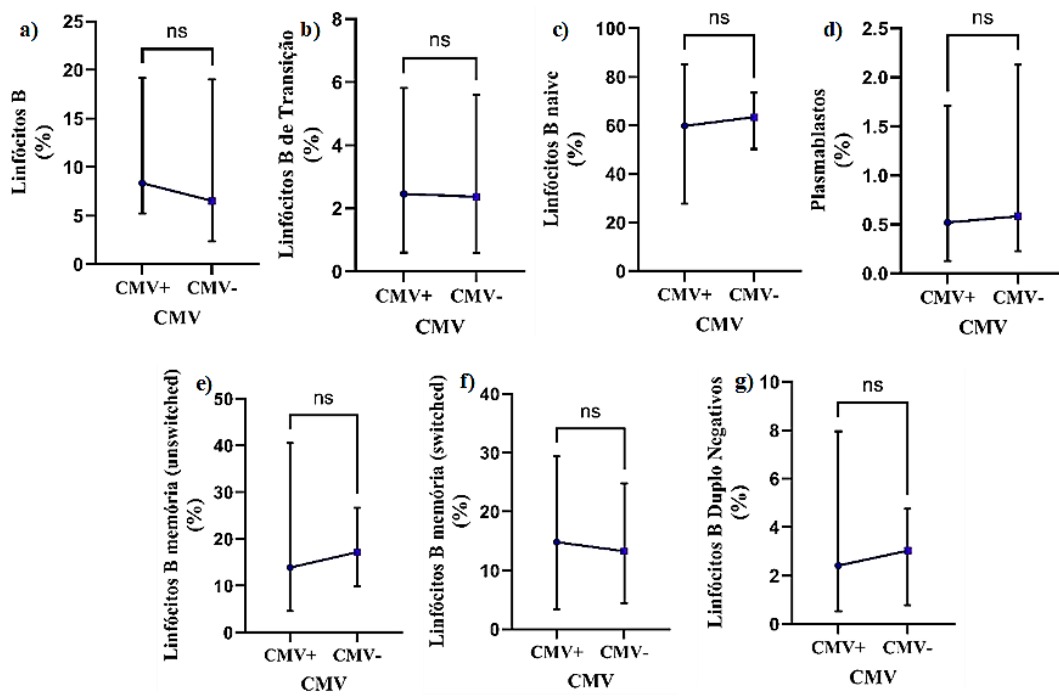


Figura 13. Valores percentuais de Subpopulações B em mulheres seropositivas e seronegativas para CMV, no 1º trimestre de gravidez.

a) Linfócitos B totais (p= 0,1540). b) Linfócitos B de Transição (p= 0,9346). c) Linfócitos B naive (p= 0,7543). d) Plasmablastos (p= 0,2433) e) Linfócitos B de memória sem switch (p= 0,6478). f) Linfócitos B de memória com switch (p= 0,5773) g) Linfócitos B Duplo negativos (p= 0,2865). Teste de Mann Whitney. NS – não significativo; * p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001

Também não se observaram diferenças estatisticamente significativas para os valores absolutos (nº células/ μ L) das subpopulações B estudadas, apesar de se ter verificado uma tendência para contagens absolutas mais elevadas de células B de memória com *switch* em mulheres seropositivas (n=23), por comparação com mulheres seronegativas para CMV (n=7) (p=0.0690, fig.14 a-g).

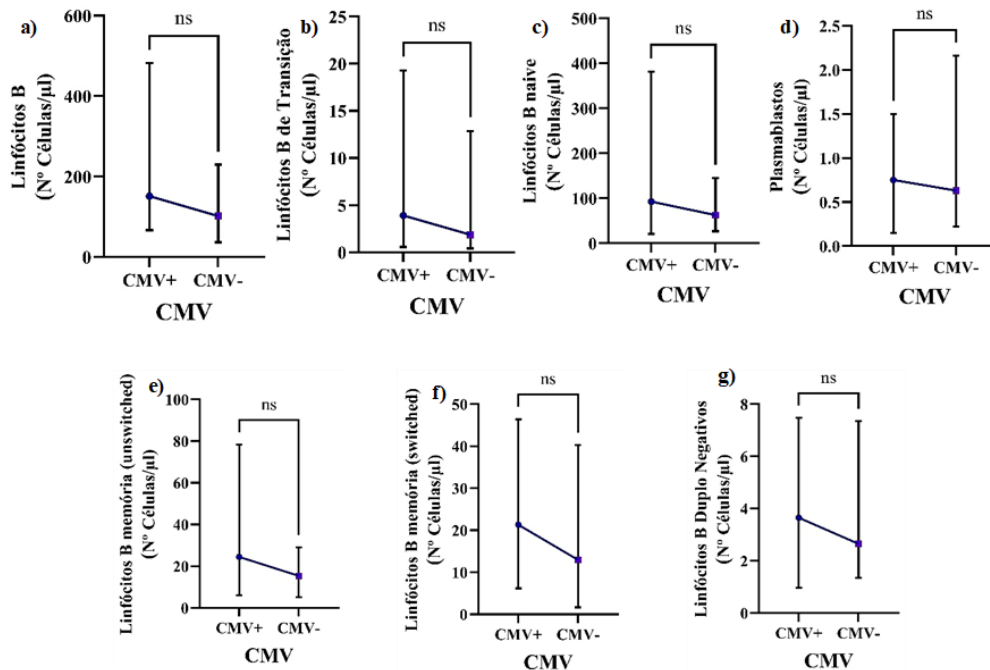


Figura 14. Contagens absolutas de Subpopulações B em mulheres seropositivas e seronegativas para CMV, no 1º trimestre de gravidez.

a) Linfócitos B totais (p= 0,1183). b) Linfócitos B de Transição (p= 0,4131). c) Linfócitos B naive (p= 0,3107). d) Plasmablastos (p= 0,8384) e) Linfócitos B de memória sem switch (p= 0,0846). f) Linfócitos B de memória com switch (p= 0,0690) g) Linfócitos B Duplo negativos (p= 0,2259). Teste de Mann Whitney. NS – não significativo; * p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001

No que se refere ao compartimento T, verificou-se que mulheres seropositivas para IgG anti-CMV (n=25) apresentam, por comparação a mulheres seronegativas (n=10), percentagens mais baixas de Linfócitos T CD4 (p=0.0081), estando este compartimento enriquecido em Linfócitos Tfh CD4 (p=0.0074). Além disto, mulheres seropositivas ainda apresentam percentagens maiores de Linfócitos T CD8+ (p=0.0072) e de Linfócitos T CD8+ ativados (p=0.0030, fig.15. a-k). Em relação aos valores absolutos, e por comparação com mulheres seronegativas (n=7), volta a existir uma tendência para valores mais elevados de Linfócitos Tfh CD4 (p=0.0614) em mulheres seropositivas (n=23), além de se observar neste último grupo uma maior contagem de Linfócitos T CD8+ ativados (p= 0,0137) e Linfócitos Tf CD8+ (p= 0,0373, fig.16. a-k).

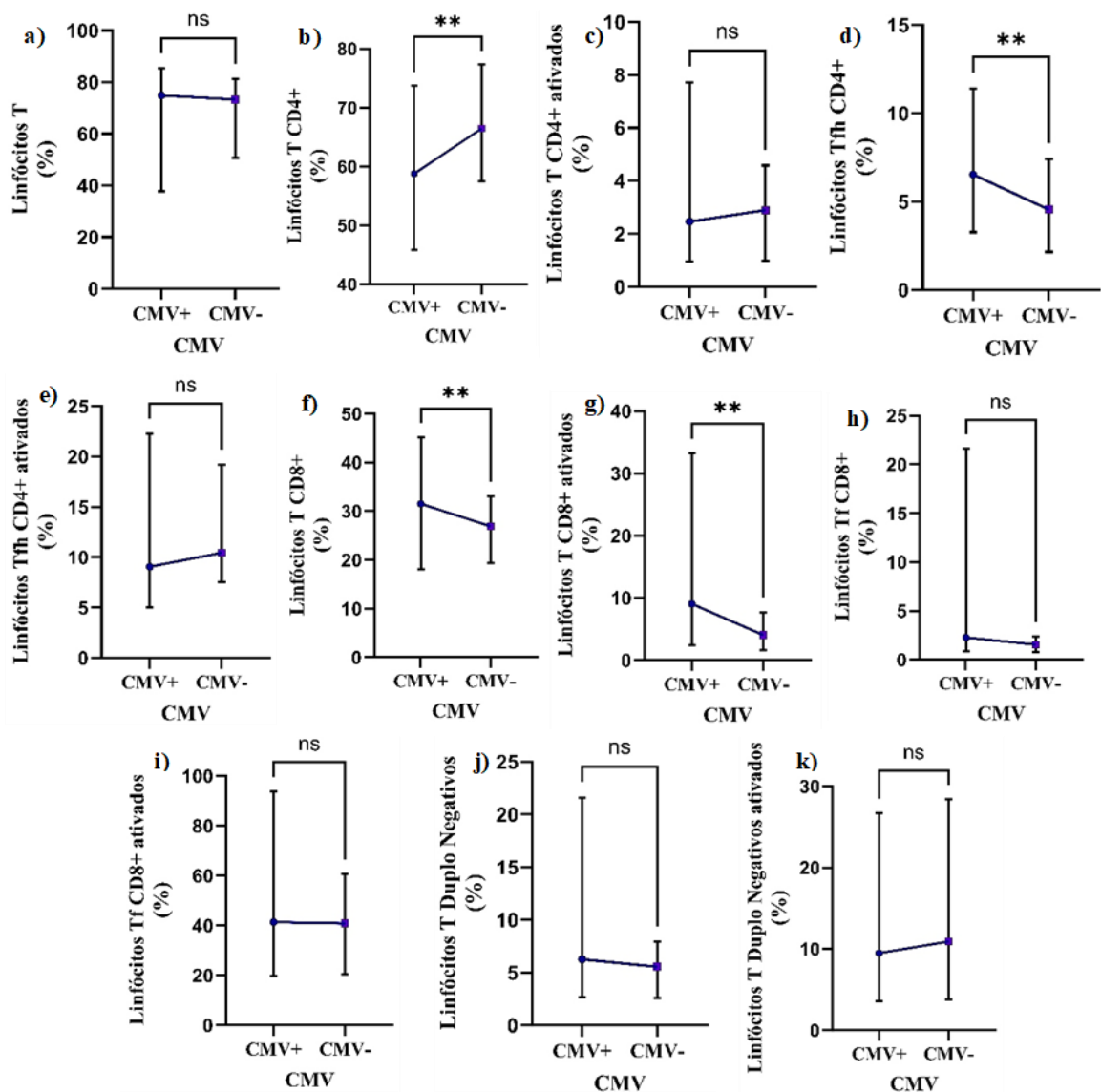


Figura 15. Valores percentuais de Subpopulações T em mulheres seropositivas e seronegativas para CMV no 1º trimestre de gravidez.

a) Linfócitos T totais (p= 0,9358). b) Linfócitos T CD4+ (**p= 0,0081). c) Linfócitos T CD4+ ativados (p= 0,8717). d) Linfócitos Tfh CD4+ (**p= 0,0074). e) Linfócitos Tfh CD4+ ativados (p= 0,5349). f) Linfócitos T CD8+ (**p= 0,0072). g) Linfócitos T CD8+ ativados (**p= 0,0030). h) Linfócitos Tf CD8+ (p= 0,0533). i) Linfócitos Tf CD8+ ativados (p= 0,7936). j) Linfócitos T Duplo negativos (p= 0,1761). k) Linfócitos T Duplo negativos ativados (p= 0,7936). Teste de Mann Whitney Tfh- T foliculares helper; Tf- T foliculares; NS – não significativo; * p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001

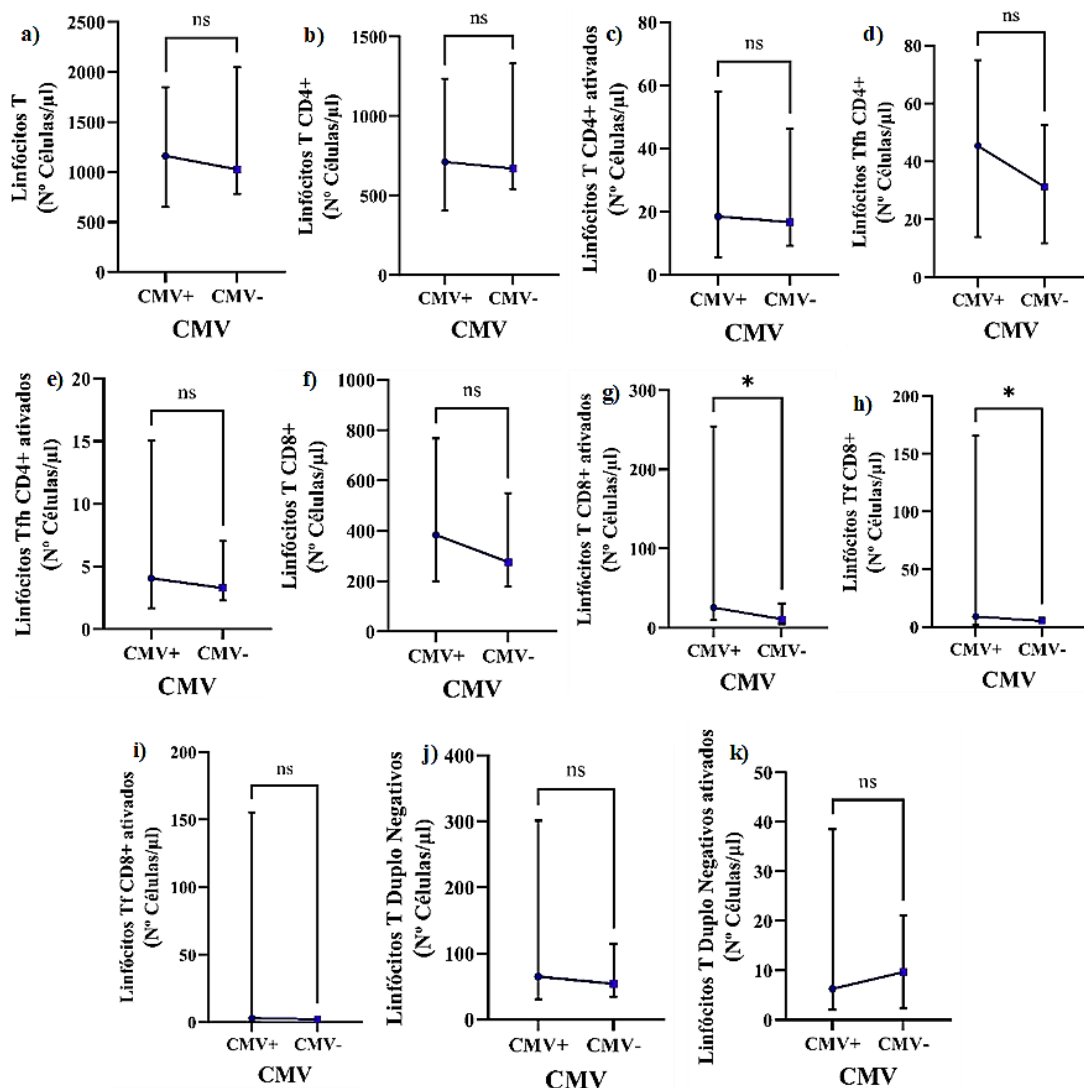


Figura 16. Contagens absolutas de Subpopulações B em mulheres seropositivas e seronegativas para CMV, no 1º trimestre de gravidez.

a) Linfócitos T totais ($p=0,5323$). **b)** Linfócitos T CD4+ ($p=0,9618$). **c)** Linfócitos T CD4+ ativados ($p>0,9999$). **d)** Linfócitos Tfh CD4+ ($p=0,0614$). **e)** Linfócitos Tfh CD4+ ativados ($p=0,2107$). **f)** Linfócitos T CD8+ ($p=0,1068$). **g)** Linfócitos T CD8+ ativados ($*p=0,0137$). **h)** Linfócitos Tf CD8+ ($*p=0,0373$). **i)** Linfócitos Tf CD8+ ativados ($p=0,2075$). **j)** Linfócitos T Duplo negativos ($p=0,3598$). **k)** Linfócitos T Duplo negativos ativados ($p=0,9618$). Teste de Mann Whitney **Tfh**- T foliculares helper; **Tf**- T foliculares; **NS** – não significativo; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

Também foi avaliada uma eventual associação entre a infecção por CMV na infecção por TTV, no 1º trimestre de gravidez. Através da análise realizada, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na prevalência nem nas cargas virais (cópias/mL) de TTV entre grávidas seropositivas e seronegativas para CMV. No entanto, parece haver uma tendência para cargas virais de TTV mais elevadas em mulheres seropositivas ($p=0,0623$) (fig.17).

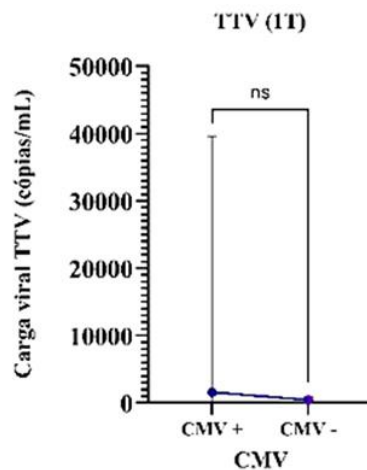


Figura 17. Cargas virais de TTV em mulheres seropositivas e seronegativas para CMV, no 1º trimestre de gravidez (p= 0,0623. Teste de Mann Whitney. NS - Não significativo)

Por último, foi avaliado uma possível associação entre a infecção por TTV e a resposta imune humoral dirigida contra o CMV, no 1º trimestre de gravidez. Uma grávida é considerada positiva para TTV na presença de carga viral (Cópias/mL) detetável. Através da análise realizada, não se verificam diferenças estatisticamente significativas nos níveis de IgG anti-CMV (U/mL), entre grávidas positivas (n=17) e negativas para TTV (n=8). No entanto, e observando o gráfico, parece haver uma tendência para mulheres sem carga viral de TTV detetável apresentarem maiores níveis de IgG anti-CMV (p=0,0951, fig. 18)

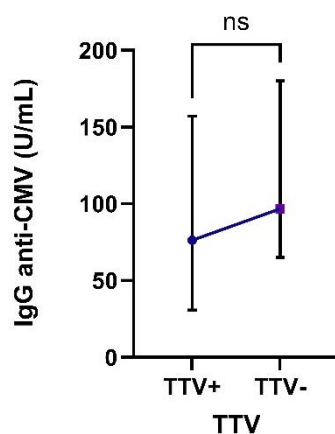


Figura 18. Níveis de anticorpos IgG anti-CMV em mulheres positivas e negativas para TTV. Teste de Mann Whitney. NS - Não significativo

Parte IV – Discussão

A gravidez é um período determinante para o desenvolvimento do feto, mas também uma etapa desafiante para a gestante. Durante a gravidez, o sistema imune materno passa enfrenta vários desafios, uma vez que tem de tolerar um (ou mais) fetos semi-alogénicos; e em simultâneo, ser capaz de defender mãe e feto de possíveis agressões que venham a ocorrer durante este período. Ao longo do tempo, vários estudos têm sido realizados com o intuito de caracterizar as dinâmicas do sistema imune ao longo da gravidez: quer na interface materno-fetal, como a nível sistémico. (10, 71, 74, 75)

Vários estudos tiveram já como objetivo a caracterização do perfil imune durante a gravidez, tendo sido descritas alterações características deste período - nomeadamente uma eventual intensificação do sistema imune inato, verificando-se aumento nas contagens de células inatas como os monócitos, os neutrófilos, ou as DCs plasmacitóides, assim como promoção das respostas associadas a estas células, durante a gravidez. (74-77, 81)

Por oposição, a resposta imune adaptativa parece estar bastante controlada neste período. Watanabe e colaboradores demonstraram que os Linfócitos B totais apresentam valores diminuídos durante toda a gravidez (por comparação a mulheres não grávidas). E que estes tendem a ir diminuído durante a 1ª metade da gravidez, começando a aumentar gradualmente após este ponto. (152) Valores diminuídos de Linfócitos B também foram observados noutros estudos. Já o estudo de Carvalho Schettini e colaboradores reportou valores de Linfócitos B totais diminuídos no 2º e 3º trimestres de gestação. (75) Estudos já efetuados no laboratório de Imunologia da NMS e outros autores, que acompanharam mulheres entre o 3º trimestre de gravidez e o período pós-parto, observaram uma diminuição de Linfócitos B totais e de diversas das suas subpopulações na gravidez, comparando com os valores de mulheres não grávidas. Em concreto, parecem diminuir em circulação as células B de memória, com e sem *switch*, os plasmablastos, e alguns tipos de células Bregs. Em paralelo, aumentam neste período as percentagens de Linfócitos B naive. (76, 81)

No presente estudo, apesar de não terem sido comparadas, em paralelo, mulheres não grávidas, foram avaliadas oscilações de todas estas subpopulações B ao longo de toda a gravidez, nas mesmas mulheres, tendo sido possível observar que há uma diminuição gradual e progressivo nas percentagens de Linfócitos B totais (em relação ao total de Linfócitos) e nos valores percentuais e absolutos de Linfócitos B de transição, entre o 1º e o 3º trimestre. Estes dados ajudam a sustentar os dados já apresentados noutros estudos, tendo-se apontado algumas hipóteses de explicação por detrás das alterações descritas, nomeadamente a redução seletiva da linfopoiese, por ação do estradiol; a inibição da ativação dos Linfócitos B foliculares naive, como consequência da inibição da função dos

Linfócitos T efetores, por ação da progesterona; ou processos de migração para a placenta, onde as células B se podem diferenciar em células Bregs.

Apesar destas observações, tem sido sugerido uma melhoria da resposta imune humoral no 3º trimestre de gestação, com um aumento dos Linfócitos Tfh circulantes, proporcional ao aumento dos níveis de anticorpos para certos vírus (i.e., VHB e CMV), e aumento dos níveis séricos de citocinas, como a IL-21 (produzida pelos Linfócitos Tfh). (39) No presente estudo, não foram observadas oscilações nos valores de Linfócitos T foliculares circulantes (quer CD4+, como CD8+). No entanto, e não tendo valores de referência, não pode ser aferido se estes estão ou não diminuídos (face a condições normais).

Existe alguma falta de consenso em relação aos estudos efetuados em Linfócitos T. Carvalho e colaboradores reportaram percentagens de Linfócitos T CD4+ e CD8+ aumentadas no 2º e 3º trimestres, (75) enquanto o estudo de Luppi e colaboradores, com mulheres no 3º trimestre de gestação, apresentarem valores diminuídos de Linfócitos T CD4+ e valores aumentados de Linfócitos T CD8+, sendo o aumento das células T CD8+ mais evidente durante o parto. (153) Estudos anteriores tinham já descrito que diversas subpopulações T apresentam valores absolutos diminuídos durante toda a gravidez, em comparação com mulheres não grávida. E estes valores tendem a ir diminuído durante a 1ª metade da gravidez, começando a aumentar gradualmente após este ponto. Uma exceção a esta dinâmica são os Linfócitos T CD8+: Linfócitos T CD8+ supressores apresentam mesmo um aumento nas suas contagens em comparação com mulheres não grávidas, no início da gravidez. Após este período, as contagens de células T CD8+ supressores diminuem gradualmente durante a restante gestação. Os Linfócitos T CD8+ citotóxicos apresentam uma diminuição nos seus valores logo no início da gravidez, aumentando gradualmente durante o restante período de gestação. (152)

No entanto, e apesar destas discrepâncias, já foi demonstrada uma diminuição da expressão de genes de citotoxicidade e defesa celular por parte de células como os Linfócitos T CD8+ e células NK durante a gravidez, assim como uma redução na atividade de Linfócitos T CD4+ e plasmócitos. (74-77, 81)

No presente estudo, foi avaliado o compartimento T circulante ao longo dos 3 trimestres da gravidez. Entre as populações celulares estudadas, incluem-se os Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, destacando-se ainda subpopulações de células, como os Linfócitos T foliculares, até aqui só abordados no 3º trimestre em estudos anteriores; ou o status de ativação das células T, pouco explorando anteriormente em contexto de gravidez, de forma longitudinal. A partir dos dados obtidos neste estudo, verificou-se uma diminuição nas percentagens de Linfócitos T Duplamente negativos (CD4⁻ CD8⁻), entre o

primeiro e o segundo trimestres de gravidez, acompanhado por um aumento progressivo dos seus níveis de ativação ao longo da gravidez. Reconhecendo que esta subpopulação celular é rica em células T $\gamma\delta$, que se encontram de forma importante na interface materno-fetal, as oscilações observadas podem ser indicadoras de maior migração celular inicial para esta interface. Por outro lado, o aumento progressivo da ativação destas células pode associar-se a eventuais funções destas no fim da gravidez, que possam vir a desencadear o parto. Também se observa um aumento nas contagens absolutas de Linfócitos T CD4⁺ ativados no último trimestre da gravidez; e um aumento gradual e progressivo nas contagens absolutas de Linfócitos T totais e de Linfócitos T CD8⁺ ativados. Assim, é possível observar que os valores de algumas subpopulações T vão aumentando durante a gravidez – quer seja ao longo de todo este período, quer ocorra sobretudo na segunda metade da gravidez. Foi sugerido que esta dinâmica do compartimento T possa compensar em algum grau a diminuição de Linfócitos B e de células NK em circulação já descritos, e também aqui reportados. Ou seja, estas adaptações podem assim significar a limitação do componente humoral, mais propício a reconhecimento de antígenos do feto, havendo uma compensação da vigilância imunológica com uma crescente ativação de células T, que também estão eventualmente ligadas a processos desencadeantes do trabalho de parto. Estudos anteriores reportaram de facto que o aumento prematuro da frequência ou do estado de ativação das células T parecem associar-se a processos patológicos de parto pré-termo. (154)

O TTV é um vírus ubíquo, com uma prevalência muito elevada e que aparenta ser adquirido pelo ser humano logo durante a infância. Este vírus é considerado um dos componentes mais prevalentes e representativos do viroma humano, e também é considerado um vírus órfão, uma vez que, e até ao momento, não existem evidências que associem a sua infeção com manifestações clínicas específicas. Nos últimos anos, este vírus tem sido apontado como um potencial biomarcador do status imune no contexto de transplante, nos quais se observou que níveis elevados de carga viral de TTV aparentam corresponder a um status de imunossupressão. (82-85)

Assim, propusemo-nos explorar de que forma a sua avaliação poderia complementar a abordagem imunológica da grávida.

Na realidade, o TTV já foi estudado em grávidas, com os principais estudos realizados a procurar sobretudo associações entre a prevalência e os níveis de carga viral de TTV (a nível sistémico e vaginal) e condições adversas em contexto gestacional, como o parto pré-termo. Entre os achados mais relevantes, descreve-se a ausência de associações entre a carga viral de TTV e partos pré-termo. No entanto, se considerarmos a prevalência do TTV em amostras de soro, ou em amostras vaginais, encontram-se descritas algumas associações com a possibilidade de ocorrência de partos pré-termo.

Tanto quanto nos é dado a conhecer, o presente estudo é o primeiro que avalia a dinâmica do TTV durante a gravidez, assim como a eventual relação deste vírus com a dinâmicas das diversas subpopulações celulares B e T, até aqui não abordadas em conjunto. (86, 101, 104)

Neste estudo, os valores de carga viral do TTV e a prevalência do vírus não variaram de forma significativa ao longo da gravidez. Ainda assim, o número de mulheres com carga viral detetável parece diminuir ao longo deste período. Esta diminuição na prevalência pode de algum modo relacionar-se e/ou traduzir o que foi observado nas populações celulares, ou seja, um aumento gradual de certas populações do compartimento T, em concreto das populações de células T ativadas, que traduzirão um possível aumento da sua capacidade de resposta. Na verdade, o TTV tem sido estudado exatamente como biomarcador do status imune. (82-84) Apesar de não se verificarem correlações significativas com a carga viral, estas oscilações na prevalência de TTV durante a gravidez parecem acompanhar as oscilações do sistema imune durante o mesmo período. Obviamente, estas oscilações no compartimento T, em populações de Linfócitos T CD4+ e CD8+ ativados, muito importantes para a montagem das respostas antivirais, podem exatamente controlar a replicação viral de forma mais eficaz nos estádios mais tardios da gravidez.

Considerando apenas a análise no 1º trimestre, com uma população mais alargada, observa-se que nas grávidas com TTV detetável, os valores de Linfócitos B duplos negativos (DN, CD27- IgD-) se encontram diminuídos. Esta subpopulação B ainda está pouco estudada, apesar de já estar descrita a sua expansão em indivíduos mais idosos e ou em contexto de doenças autoimunes (i.e., Lupus eritematoso sistémico) e infecciosas. Existem já evidências de que esta população possa ter um papel em respostas antivirais, o que pode corroborar a associação aqui descrita, supondo-se que uma diminuição da função assegurada pelas células B DN possa promover a replicação do vírus. (155)

Também no 1º trimestre, parece existir uma correlação tendencialmente negativa entre a carga viral de TTV e as percentagens de Linfócitos B naive. Apesar de os valores percentuais não refletirem os valores absolutos das diferentes subpopulações, esta correlação parece igualmente reforçar o potencial do TTV enquanto biomarcador do status imune. No entanto, observa-se em paralelo uma correlação tendencialmente positiva entre a carga viral de TTV e as percentagens de Linfócitos B de memória com *switch* de isótipo ou as contagens de Linfócitos Tfh CD4+. Estes achados não permitem concluir de que forma o TTV é modulado pela resposta humoral, sendo necessário explorar estes achados mais em detalhe. No entanto, e considerando o acima exposto, a eventual evolução paralela dos valores de Linfócitos Tfh e do aumento das cargas virais de TTV, poderá indiciar um menor impacto da função B para o controlo do TTV, uma vez que são as células Tfh que governam a diferenciação B. (156) Estudos anteriores descrevem correlações negativas entre os níveis de carga

viral de TTV e os valores absolutos de Linfócitos T (totais, CD4+ e CD8+) e de Linfócitos B (totais), em indivíduos sujeitos a transplante. Na população estudada no presente trabalho, não se verificaram estes achados. Porém, há que considerar o potencial impacto de fatores como as terapias imunossupressoras, a que são sujeitos os indivíduos transplantados, e que pode potencializar também um aumento muito significativo nas cargas virais de TTV observadas nestes doentes. Ou seja, é possível que estas correlações não existam na grávida por o seu eventual nível de imunossupressão ser consideravelmente inferior. Desta forma, a utilização do TTV como biomarcador de imunossupressão pode não ter sensibilidade em valores de carga viral mais baixos, como os observados na gravidez, o que pode dificultar a sua aplicação neste contexto. (83, 84)

O Citomegalovírus é um vírus pertencente à família Betaherpesvírus, com capacidade de entrar em latência dentro das células infetadas, podendo ocorrer reativações em condições particulares, como as que comprometem o normal funcionamento do sistema imune (nomeadamente, no caso de doentes sujeitos a transplante ou mesmo na gravidez). Este vírus é a principal causa de infeção congénita, destacando-se como principal agente de malformações congénitas associadas a infeção nos países desenvolvidos, a principal causa não genética de SHNL (perda auditiva neurosensorial) e um dos principais causadores de incapacidade neurológica. (109-112)

Dada a importância do Citomegalovírus na infeção congénita, têm-se realizado estudos com o intuito de avaliar de que modo a infeção por CMV interfere com os vários elementos do sistema imune, e que respostas e mecanismos apresentam um efeito protetor, com conseqüente bloqueio da transmissão do CMV ao feto. Populações celulares como os Linfócitos T $\gamma\delta$, ou mesmo os Linfócitos T CD8+ e os Linfócitos T CD4+ estão expandidos na infeção por CMV, não só em grávidas e recém-nascidos infetados, como noutras populações (nomeadamente em pessoas sujeitas a transplante). Estes dados apontam para o papel assumido por estas populações na resposta antiviral contra o vírus. Também está descrita, em grávidas, uma mobilização de Linfócitos B de memória durante a infeção primária a CMV, quer Linfócitos B de memória ativados, quer Linfócitos B de memória atípicos (CD27-CD21-). (90-105, 155) Por último, existem ainda evidências de que uma menor taxa de transmissibilidade do CMV ao feto está associada a valores mais elevados de Linfócitos T com capacidade proliferativa (principalmente células T CD4+), uma característica dos Linfócitos T de memória central; e a valores mais elevados de Linfócitos T de memória efetora, cujo fenótipo reverte de CD45RO+ para CD45RA+. Do ponto de vista da resposta humoral, a menor transmissibilidade da infeção também parece associar-se à deteção precoce de anticorpos neutralizantes (i.e., contra o complexo gH/gL/pUL128-131), à presença de níveis mais elevados de IgGs anti-CMV, no início da

gravidez (i.e., contra o antígeno pp150); e à aivez elevada ou intermédia das IgGs anti-CMV, no início da gravidez. (119-121, 125-128, 130-133)

Neste estudo, não foi avaliada a taxa de transmissibilidade do CMV ao feto, por não terem sido identificadas infeções primárias ou reativações. No entanto, e dividindo as grávidas em mulheres seropositivas e seronegativas, encontram-se diferenças em diversas subpopulações B e T no 1º trimestre de gravidez. Até à data, nenhum estudou abordou as diferentes subpopulações B na infeção por CMV, nem os Linfócitos T foliculares, pelo que este estudo é pioneiro ao identificar, nas mulheres seropositivas para CMV, valores mais elevados de Linfócitos Tfh CD4+, Linfócitos T CD8+, Linfócitos T CD8+ ativados e Tfc CD8+, bem como uma tendência para valores mais elevados de Linfócitos B de memória com *switch* de isótipo. Estas mulheres apresentam ainda diminuição das percentagens de Linfócitos T CD4+. As alterações descritas observam-se principalmente no compartimento T, o que era de algum modo expectável, estando já descrita uma expansão de Linfócitos T CD8+ na infeção por CMV. Além disso, e sendo esta uma infeção viral, a resposta imune celular, da qual fazem parte elementos celulares como os Linfócitos T CD8+, é essencial. De forma paralela, a presença elevada de Linfócitos Tfc CD8+ é expectável em situações de infeção crónica, tal como a infeção por CMV, que devido às suas características, permanece no organismo infetado (alternando fases de reativação e latência). (41-43)

Por outro lado, a maior presença de Linfócitos Tfh CD4+ também sugerem a ação complementar da resposta humoral contra a infeção viral, considerando a importância dos Linfócitos Tfh CD4+ na formação do centro germinativo, e no controlo da diferenciação B. Por último, a presença elevada de Linfócitos B de memória com *switch* pode ser sustentada pelo facto de em infeções crónicas virais, como é o caso do CMV, ocorrer uma expansão de plasmócitos e de Linfócitos B de memória, com o output destas células a ser superior em condições de cronicidade relativamente à infeção aguda. (155) Entre os Linfócitos B de memória detetados no decorrer de uma infeção crónica, ocorre tipicamente a expansão de uma subpopulação designada de atípica, que é duplamente negativa (CD27-IgD-). Curiosamente, não observámos diferenças nesta população entre mulheres seronegativas e seropositivas, ao contrário do que se observou acima com o TTV.

Neste estudo, observaram-se ainda achados interessantes relativamente ao CMV, nomeadamente uma tendência para os valores de carga viral do TTV serem superiores em mulheres seropositivas para CMV, não havendo, contudo, correlação entre os níveis de IgGs anti-CMV e os valores de carga viral do TTV. Um possível motivo poderá dever-se a diversas subpopulações T terem valores aumentados em mulheres seropositivas (por comparação com mulheres seronegativas), sendo que o TTV apresenta tropismo para Linfócitos T – e que um aumento nos valores deste compartimento pode

traduzir um aumento na *pool* de células que o TTV infeta. (156) Ainda se observaram, em mulheres com TTV não detetável, valores tendencialmente superiores de IgGs anti-CMV, pelo que o TTV aparenta potencial como indicador da resposta imune humoral num todo.

Para terminar, há que discutir ainda as limitações do estudo, sendo a principal dificuldade de recrutamento no período em que decorreu o estudo, e que não permitiu uma coorte de maiores dimensões, que daria certamente maior robustez nos achados descritos, ou até a identificação de outros dados relevantes. De facto, às participantes do estudo, não foi possível identificar qualquer infeção ativa por CMV, o que limitou a eventual identificação de alterações imunes nesse contexto ou mesmo o impacto e a relação da infeção ativa por CMV com o TTV, considerando o potencial deste último como biomarcador do status imunológico. Por outro lado, o facto de não ter sido ainda possível o recrutamento de mulheres não grávidas saudáveis é também uma limitação, já que estas mulheres serviriam como elemento de controlo, cujos valores para as diferentes variáveis analisadas neste estudo serviriam como referência e termo de comparação. Por último, este estudo analisou sobretudo elementos da resposta adaptativa ao longo da gravidez, e sua relação com a infeção por CMV e TTV, mas seria certamente relevante abordar em paralelo outras populações celulares imunes, nomeadamente da resposta inata, como é o caso das células NK e células dendríticas, o que se pretende vir a determinar com a continuação do projeto.

Parte V – Conclusão

O presente estudo apresenta dados preliminares que aprofundam e corroboram os dados já existentes sobre as oscilações nos perfis imunes que ocorrem durante a gravidez – mais concretamente, as oscilações existentes na resposta imune adaptativa, que aparentam uma diminuição de subpopulações B e um aumento (em paralelo) de subpopulações T no decurso da gravidez. Estas oscilações podem estar relacionadas com os níveis de TTV, considerando a eventual diminuição da sua prevalência ao longo da gravidez.

Foi ainda possível avaliar a relação das infeções por CMV e por TTV com as variações nos compartimentos celulares T e B. A infeção por CMV mostra um impacto predominantemente no compartimento T, com expansão de diversas das suas subpopulações, como é o caso das células T citotóxicas. A relação do TTV com os compartimentos B e T não foi tão clara. No compartimento B, destaca-se a diminuição de células B DN em mulheres com carga viral positiva e uma correlação negativa entre a carga viral do TTV e Linfócitos B naive. No entanto, o TTV correlaciona-se positivamente com Linfócitos Tfh CD4+ e Linfócitos B de memória. Assim, o potencial do TTV como biomarcador do status imune na grávida carece ainda de ser mais explorado.

Em suma, apesar deste estudo ter permitido a recolha de dados preliminares relevantes, é essencial dar-lhe continuidade de forma a abarcar uma coorte de maiores dimensões, com inclusão de mulheres não grávidas, de forma a ampliar a avaliação imune efetuada e investigar mais aprofundadamente as relações aqui descritas com o background viral.

Bibliografia

1. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2018;14(S2):49. doi:10.1186/s13223-018-0278-1
2. What Are the Organs of the Immune System? Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2020. Accessed October 6, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279395/>
3. Stevens CD, Miller LE. (2017) *Clinical Immunology and Serology: A Laboratory Perspective*. 4th Edition. F.A. Davis Company.
4. Levinson W. *Review of Medical Microbiology and Immunology*. (2016) 14th Edition. McGraw-Hill Education
5. Goldman L, Schafer A. (2019). *Goldman-Cecil Medicine*. 26th Edition. Elsevier.
6. Sherwood ER, Burelbach KR, McBride MA, et al. Innate Immune Memory and the Host Response to Infection. *The Journal of Immunology*. 2022;208(4):785-792. doi:10.4049/jimmunol.2101058
7. Poniewierska-Baran A, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. The role of innate lymphoid cells in selected disease states – cancer formation, metabolic disorder and inflammation. *Arch Med Sci*. 2021;17(1):196-206. doi:10.5114/aoms.2019.89835
8. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. (2022) *Cellular and Molecular Immunology*. 10th Edition. Elsevier.
9. Chen L, Deng H, Cui H, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2018;9(6):7204-7218. doi:10.18632/oncotarget.23208
10. Mark TW, Saunders ME, Jett BD. (2014) *Primer to The Immune Response*. 2th Edition. Elsevier.
11. Rosales C, Uribe-Querol E. Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9042851. doi:10.1155/2017/9042851
12. Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schröder HW, Frew AJ, Weyand C, eds. *Clinical Immunology: Principles and Practice*. 4th edition. Elsevier Saunders; 2013.
13. Kloc M, Uosef A, Ubelaker HV, Kubiak JZ, Ghobrial RM. Macrophages and stem/progenitor cells interplay in adipose tissue and skeletal muscle: a review. *Stem Cell Investigation*. 2023;10(0). doi:10.21037/sci-2023-009
14. Rezaei N. (2022) *Encyclopedia of Infection and Immunity Volume I*. 1st Edition. Elsevier.
15. McBrien CN, Menzies-Gow A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Frontiers in Medicine*. 2017;4. Accessed January 15, 2024. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2017.00093>
16. Nagasawa M, Spits H, Ros XR. Innate Lymphoid Cells (ILCs): Cytokine Hubs Regulating Immunity and Tissue Homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(12):a030304. doi:10.1101/cshperspect.a030304

17. Vargas MCF. Innate Immunity and Autoimmune Diseases. In: Innate Immunity in Health and Disease. IntechOpen; 2020. doi:10.5772/intechopen.91366
18. Vivier E, Artis D, Colonna M, et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*. 2018;174(5):1054-1066. doi:10.1016/j.cell.2018.07.017
19. Chapel H, Haeney M, Misbah S, Snowde N. (2014) *Essentials of Clinical Immunology*. 6th Edition. Wiley Blackwell
20. Eagar TN, Miller SD. Helper T-Cell Subsets and Control of the Inflammatory Response. In: *Clinical Immunology*. Elsevier; 2019:235-245.e1. doi:10.1016/B978-0-7020-6896-6.00016-8
21. Lee AJ, Ashkar AA. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Front Immunol*. 2018;9:2061. doi:10.3389/fimmu.2018.02061
22. Milush JM, López-Vergès S, York VA, et al. CD56negCD16+NK cells are activated mature NK cells with impaired effector function during VIH-1 infection. *Retrovirology*. 2013;10(1):158. doi:10.1186/1742-4690-10-158
23. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. (2016) *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. 5th edition. Elsevier.
24. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR. (2017) *Roitt's Essential Immunology*. 13th Edition. Wiley Blackwell.
25. Mutar Mahdi B. Introductory Chapter: Concept of Human Leukocyte Antigen (HLA). In: Mutar Mahdi B, ed. *Human Leukocyte Antigen (HLA)*. IntechOpen; 2019. doi:10.5772/intechopen.83727
26. Madhok A, deSouza A, Galande S. Understanding immune system development: An epigenetic perspective. In: *Epigenetics of the Immune System*. Elsevier; 2020:39-76. doi:10.1016/B978-0-12-817964-2.00003-4
27. Fonseca S, Pereira V, Lau C, Teixeira M dos A, Bini-Antunes M, Lima M. Human Peripheral Blood Gamma Delta T Cells: Report on a Series of Healthy Caucasian Portuguese Adults and Comprehensive Review of the Literature. *Cells*. 2020;9(3):729. doi:10.3390/cells9030729
28. Vogt S, Mattner J. NKT Cells Contribute to the Control of Microbial Infections. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:718350. doi:10.3389/fcimb.2021.718350
29. Awong G, Zúñiga-Pflücker JC. Development of Human T Lymphocytes. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier; 2014:B978012801238300115X. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.00115-X
30. Cordes M, Canté-Barrett K, van den Akker EB, et al. Single-Cell Immune Profiling Reveals Novel Thymus-Seeding Populations, T Cell Commitment, and Multi-Lineage Development in the Human Thymus. *Immunology*; 2022. doi:10.1101/2022.02.18.481026

31. Laydon DJ, Bangham CRM, Asquith B. Estimating T-cell repertoire diversity: limitations of classical estimators and a new approach. *Phil Trans R Soc B*. 2015;370(1675):20140291. doi:10.1098/rstb.2014.0291
32. Tai Y, Wang Q, Korner H, Zhang L, Wei W. Molecular Mechanisms of T Cells Activation by Dendritic Cells in Autoimmune Diseases. *Front Pharmacol*. 2018;9:642. doi:10.3389/fphar.2018.00642
33. Xia F, Qian CR, Xun Z, et al. TCR and CD28 Concomitant Stimulation Elicits a Distinctive Calcium Response in Naive T Cells. *Front Immunol*. 2018;9:2864. doi:10.3389/fimmu.2018.02864
34. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*. 2020;10(3):727-742.
35. O'Neill RE, Cao X. Co-stimulatory and co-inhibitory pathways in cancer immunotherapy. In: *Advances in Cancer Research*. Vol 143. Elsevier; 2019:145-194. doi:10.1016/bs.acr.2019.03.003
36. Dong L, He Y, Cao Y, et al. Functional differentiation and regulation of follicular T helper cells in inflammation and autoimmunity. *Immunology*. 2021;163(1):19-32. doi:10.1111/imm.13282
37. Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity*. 2019;50(5):1132-1148. doi:10.1016/j.immuni.2019.04.011
38. Arosa AF, Cardoso EM, Pacheco FC. (2012) *Fundamentos de Imunologia*. 2ª Edição. Lidel
39. Monteiro C, Kasahara TM, Castro JR, et al. Pregnancy favors the expansion of circulating functional follicular helper T Cells. *Journal of Reproductive Immunology*. 2017;121:1-10. doi:10.1016/j.jri.2017.04.007
40. Lv Y, Ricard L, Gaugler B, Huang H, Ye Y. Biology and clinical relevance of follicular cytotoxic T cells. *Front Immunol*. 2022;13:1036616. doi:10.3389/fimmu.2022.1036616
41. Perdomo-Celis F, Taborda NA, Rugeles MT. Follicular CD8+ T Cells: Origin, Function and Importance during VIH Infection. *Front Immunol*. 2017;8:1241. doi:10.3389/fimmu.2017.01241
42. Alonso GT, Fomin DS, Rizzo LV. Human follicular helper T lymphocytes critical players in antibody responses. *Einstein (São Paulo)*. 2021;19:eRB6077. doi:10.31744/einstein_journal/2021RB6077
43. Valentine KM, Mullins GN, Davalos OA, Seow LW, Hoyer KK. CD8 follicular T cells localize throughout the follicle during germinal center reactions and maintain cytolytic and helper properties. *Journal of Autoimmunity*. 2021;123:102690. doi:10.1016/j.jaut.2021.102690
44. Wegrzyn AS, Kedzierska AE, Obojski A. Identification and classification of distinct surface markers of T regulatory cells. *Frontiers in Immunology*. 2023;13. Accessed September 26, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.1055805>

45. Nedoszytko B, Lange M, Sokołowska-Wojdyło M, et al. The role of regulatory T cells and genes involved in their differentiation in pathogenesis of selected inflammatory and neoplastic skin diseases. Part I: Treg properties and functions. *Postepy Dermatol Alergol*. 2017;34(4):285-294. doi:10.5114/ada.2017.69305
46. Wu Z, Zheng Y, Sheng J, et al. CD3+CD4-CD8- (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. *Front Immunol*. 2022;13:816005. doi:10.3389/fimmu.2022.816005
47. Brandt D, Hedrich CM, TCR $\alpha\beta$ +CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells in autoimmunity, *Autoimmun Rev* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.02.001>
48. Li H, Tsokos GC. Double-negative T cells in autoimmune diseases. *Curr Opin Rheumatol*. 2021;33(2):163-172. doi:10.1097/BOR.0000000000000778
49. Velikkakam T, Gollob KJ, Dutra WO. Double-negative T cells: Setting the stage for disease control or progression. *Immunology*. 2022;165(4):371-385. doi:10.1111/imm.13441
50. Villegas-Valverde CA, Kokuina E, Breff-Fonseca MC. Determination of Reference Values for Double-Negative T Lymphocytes in Cuban Adults. *MEDICC rev*. 2021;22:48-50. doi:10.37757/mr2020.v22.n4.7
51. Parker ME, Ciofani M. Regulation of $\gamma\delta$ T Cell Effector Diversification in the Thymus. *Frontiers in Immunology*. 2020;11. Accessed January 17, 2024. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00042>
52. Kabelitz D, Serrano R, Kouakanou L, Peters C, Kalyan S. Cancer immunotherapy with $\gamma\delta$ T cells: many paths ahead of us. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(9):925-939. doi:10.1038/s41423-020-0504-x
53. Hu Y, Hu Q, Li Y, et al. $\gamma\delta$ T cells: origin and fate, subsets, diseases and immunotherapy. *Sig Transduct Target Ther*. 2023;8(1):1-38. doi:10.1038/s41392-023-01653-8
54. Zhou Y, Zhang Y, Han J, Yang M, Zhu J, Jin T. Transitional B cells involved in autoimmunity and their impact on neuroimmunological diseases. *J Transl Med*. 2020;18(1):131. doi:10.1186/s12967-020-02289-w
55. Punt J, Stranford S, Jones P, Owen J. (2019) *Kuby Immunology*. 8th Edition. W. H. Freeman and Company.
56. Watanabe A, Su KY, Kuraoka M, et al. Self-tolerance curtails the B cell repertoire to microbial epitopes. *JCI Insight*. 2019;4(10). doi:10.1172/jci.insight.122551
57. Mats B. Translating transitions - how to decipher peripheral human B cell development. *J Biomed Res*. 2015;29(4):264. doi:10.7555/JBR.29.20150035
58. Cariappa A, Chase C, Liu H, Russell P, Pillai S. Naive recirculating B cells mature simultaneously in the spleen and bone marrow. *Blood*. 2007;109(6):2339-2345. doi:10.1182/blood-2006-05-021089
59. Palm AKE, Kleinau S. Marginal zone B cells: From housekeeping function to autoimmunity? *Journal of Autoimmunity*. 2021;119:102627. doi:10.1016/j.jaut.2021.102627

60. Rothstein TL, Griffin DO, Holodick NE, Quach TD, Kaku H. Human B-1 cells take the stage: Human B-1 cells take the stage. *Ann NY Acad Sci.* 2013;1285(1):97-114. doi:10.1111/nyas.12137
61. Kageyama Y, Katayama N. Ontogeny of human B1 cells. *Int J Hematol.* 2020;111(5):628-633. doi:10.1007/s12185-019-02775-y
62. Nera KP, Kyläniemi MK, Lassila O. Regulation of B Cell to Plasma Cell Transition within the Follicular B Cell Response. *Scand J Immunol.* 2015;82(3):225-234. doi:10.1111/sji.12336
63. Young C, Brink R. The unique biology of germinal center B cells. *Immunity.* 2021;54(8):1652-1664. doi:10.1016/j.immuni.2021.07.015
64. Inoue T, Moran I, Shinnakasu R, Phan TG, Kurosaki T. Generation of memory B cells and their reactivation. *Immunol Rev.* 2018;283(1):138-149. doi:10.1111/imr.12640
65. Seifert M, Przekopowicz M, Taudien S, et al. Functional capacities of human IgM memory B cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(6). doi:10.1073/pnas.1416276112
66. Akkaya M, Kwak K, Pierce SK. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(4):229-238. doi:10.1038/s41577-019-0244-2
67. Chekol Abebe E, Asmamaw Dejenie T, Mengie Ayele T, Dagne Baye N, Agegnehu Teshome A, Tilahun Muche Z. The Role of Regulatory B Cells in Health and Diseases: A Systemic Review. *JIR.* 2021;Volume 14:75-84. doi:10.2147/JIR.S286426
68. Mauri C. Novel Frontiers in Regulatory B cells. *Immunol Rev.* 2021;299(1):5-9. doi:10.1111/imr.12964
69. Rezaei N. (2022) *Encyclopedia of Infection and Immunity Volume I.* 1st Edition. Elsevier.
70. Shang J, Zha H, Sun Y. Phenotypes, Functions, and Clinical Relevance of Regulatory B Cells in Cancer. *Front Immunol.* 2020;11:582657. doi:10.3389/fimmu.2020.582657
71. Obrowski M. Normal Pregnancy: A Clinical Review. *AJPN.* 2016;1(1). doi:10.19080/AJPN.2016.01.555554
72. Costantine MM. Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy. *Front Pharmacol.* 2014;5. doi:10.3389/fphar.2014.00065
73. Eke AC. An update on the physiologic changes during pregnancy and their impact on drug pharmacokinetics and pharmacogenomics. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology.* 2022;33(5):581-598. doi:10.1515/jbcpp-2021-0312
74. Aghaeepour N, Ganio EA, Mcilwain D, et al. An immune clock of human pregnancy. *Sci Immunol.* 2017;2(15):eaan2946. doi:10.1126/sciimmunol.aan2946

75. de Carvalho Schettini J, Gomes T, Júnior C, Heráclio S, Coelho I, Torres L. Evaluation of Immunological Parameters in Pregnant Women: Low Levels of B and NK Cells. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2019;41(04):213-219. doi:10.1055/s-0039-1683903
76. Kövér Á, Lampé R, Szabó K, Tarr T, Papp G. A Comprehensive Investigation into the Distribution of Circulating B Cell Subsets in the Third Trimester of Pregnancy. *JCM.* 2022;11(11):3006. doi:10.3390/jcm11113006
77. Liu X, Zhu L, Huang Z, et al. A dynamic peripheral immune landscape during human pregnancy. *Fundamental Research.* Published online June 2022:S2667325822002813. doi:10.1016/j.fmre.2022.06.011
78. Valencia-Ortega J, Saucedo R, Peña-Cano MI, Hernández-Valencia M, Cruz-Durán JG. Immune tolerance at the Maternal-placental interface in healthy pregnancy and pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res.* 2020;46(7):1067-1076. doi:10.1111/jog.14309
79. Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(8):469-482. doi:10.1038/nri.2017.64
80. Dutta S, Sengupta P, Haque N. Reproductive immunomodulatory functions of B cells in pregnancy: B cells are critical players in pregnancy that fine-tune immune tolerance and response, by crosstalks with gestational hormones. *International Reviews of Immunology.* 2020;39(2):53-66. doi:10.1080/08830185.2019.1674299
81. Lima J, Martins C, Leandro MJ, et al. Characterization of B cells in healthy pregnant women from late pregnancy to post-partum: a prospective observational study. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2016;16(1):139. doi:10.1186/s12884-016-0927-7
82. Mouton W, Conrad A, Bal A, et al. Torque Teno Vírus Viral Load as a Marker of Immune Function in Allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients. *Víruses.* 2020;12(11):1292. doi:10.3390/v12111292
83. Querido S, Martins C, Gomes P, et al. Kinetics of Torque Teno Vírus Viral Load Is Associated with Infection and De Novo Donor Specific Antibodies in the First Year after Kidney Transplantation: A Prospective Cohort Study. *Víruses.* 2023;15(7):1464. doi:10.3390/v15071464
84. Fernández-Ruiz M, Albert E, Giménez E, et al. Monitoring of alphatorquevírus ADN levels for the prediction of immunosuppression-related complications after kidney transplantation. *American Journal of Transplantation.* 2019;19(4):1139-1149. doi:10.1111/ajt.15145
85. Spezia PG, Focosi D, Baj A, et al. TTV and other anellovíruses: The astonishingly wide spread of a viral infection. *Aspects of Molecular Medicine.* 2023;1:100006. doi:10.1016/j.amolm.2023.100006
86. Kyathanahalli C, Snedden M, Hirsch E. Human Anellovíruses: Prevalence and Clinical Significance During Pregnancy. *FrontVirol.* 2021;1:782886. doi:10.3389/fviro.2021.782886

87. Kaczorowska J, van der Hoek L. Human anelloviruses: diverse, omnipresent and commensal members of the virome. *FEMS Microbiology Reviews*. 2020;44(3):305-313. doi:10.1093/femsre/fuaa007
88. Väisänen E, Kuisma I, Mäkinen M, et al. Torque Teno Virus Primary Infection Kinetics in Early Childhood. *Viruses*. 2022;14(6):1277. doi:10.3390/v14061277
89. Saback FL, Gomes SA, De Paula VS, Da Silva RRS, Lewis-Ximenez LL, Niel C. Age-specific prevalence and transmission of TT virus. *J Med Virol*. 1999;59(3):318-322. doi:10.1002/(SICI)1096-9071(199911)59:3<318::AID-JMV10>3.0.CO;2-Q
90. Gerner P, Oettinger R, Gerner W, Falbrede J, Wirth S. Mother-to-infant transmission of TT virus: prevalence, extent and mechanism of vertical transmission. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2000;19(11):1074.
91. Tyschik EA, Shcherbakova SM, Ibragimov RR, Rebrikov DV. Transplacental transmission of torque teno virus. *Virology*. 2017;14(1):92. doi:10.1186/s12985-017-0762-0
92. Mutlu D, Abacioğlu H, Altunyurt S. [Investigation of transplacental transmission of TT virus in mother--newborn pairs]. *Mikrobiyol Bul*. 2007;41(1):71-77.
93. Komatsu H, Inui A, Sogo T, Kuroda K, Tanaka T, Fujisawa T. TTV infection in children born to mothers infected with TTV but not with VHB, HCV, or VIH. *J Med Virol*. 2004;74(3):499-506. doi:10.1002/jmv.20204
94. Iso K, Suzuki Y, Takayama M. Mother-to-infant transmission of TT virus in Japan. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2001;75(1):11-19. doi:10.1016/S0020-7292(01)00450-7
95. Matsubara H. Existence of TT virus ADN and TTV-like mini virus ADN in infant cord blood: mother-to-neonatal transmission. *Hepatology Research*. 2001;21(3):280-287. doi:10.1016/S1386-6346(01)00115-2
96. Ohto H, Ujiie N, Takeuchi C, et al. TT virus infection during childhood. *Transfusion*. 2002;42(7):892-898. doi:10.1046/j.1537-2995.2002.00150.x
97. McCann A, Ryan FJ, Stockdale SR, et al. Viromes of one year old infants reveal the impact of birth mode on microbiome diversity. *PeerJ*. 2018;6:e4694. doi:10.7717/peerj.4694
98. Fogli M, Torti C, Malacarne F, et al. Emergence of Exhausted B Cells in Asymptomatic VIH-1-Infected Patients Naïve for HAART is Related to Reduced Immune Surveillance. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012;2012:1-10. doi:10.1155/2012/829584
99. Westman G, Schoofs C, Ingelsson M, Järhult JD, Muradrasoli S. Torque teno virus viral load is related to age, CMV infection and HLA type but not to Alzheimer's disease. *Sawtell NM, ed. PLoS ONE*. 2020;15(1):e0227670. doi:10.1371/journal.pone.0227670
100. Schauder DM, Cui W. Transition of T Cells from Effector to Memory Phase. In: *Encyclopedia of Immunobiology*. Elsevier; 2016:353-362. doi:10.1016/B978-0-12-374279-7.08013-9

101. Morselli S, Foschi C, Laghi L, et al. Torquetenovirus in pregnancy: Correlation with vaginal microbiome, metabolome and pro-inflammatory cytokines. *Front Microbiol.* 2022;13:998849. doi:10.3389/fmicb.2022.998849
102. Kyathanahalli C, Snedden M, Singh L, et al. Maternal plasma and salivary anelloviruses in pregnancy and preterm birth. *Front Med.* 2023;10:1191938. doi:10.3389/fmed.2023.1191938
103. Sloan P, Rodriguez C, Bedell BA, et al. Alphatorquevirus is the most prevalent virus identified in blood from a matched Maternal-infant preterm cohort. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.* 2022;35(9):1636-1642. doi:10.1080/14767058.2020.1763298
104. Tozetto-Mendoza TR, Bongiovanni AM, Minis E, et al. Torquetenovirus Titer in Vaginal Secretions from Pregnant and Postpartum Women: Association with Absence of *Lactobacillus crispatus* and Levels of Lactic Acid and Matrix Metalloproteinase-8. *Reprod Sci.* 2020;27(11):2075-2081. doi:10.1007/s43032-020-00227-1
105. Stevens, C. and Miller, L., 2017. *Clinical Immunology & Serology : a laboratory perspective.* 4th ed. Philadelphia: F.A. Davis Company
106. Forte E, Zhang Z, Thorp EB, Hummel M. Cytomegalovirus Latency and Reactivation: An Intricate Interplay With the Host Immune Response. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:130. doi:10.3389/fcimb.2020.00130
107. Chaudhry MZ, Casalegno-Garduno R, Sitnik KM, et al. Citomegalovirus inhibition of extrinsic apoptosis determines fitness and resistance to cytotoxic CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117(23):12961-12968. doi:10.1073/pnas.1914667117
108. Patro ARK. Subversion of Immune Response by Human Citomegalovirus. *Front Immunol.* 2019;10:1155. doi:10.3389/fimmu.2019.01155
109. Ferreira MF, Pereira H, Cardoso OC, Oliveira C, Pereira MC, Couto J. Infecção por Citomegalovirus na Gravidez: Em que Ponto Estamos? *Gaz Med.* Published online December 30, 2022:341-347. doi:10.29315/gm.v1i1.601
110. Leruez-Ville M, Foulon I, Pass R, Ville Y. Citomegalovirus infection during pregnancy: state of the science. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2020;223(3):330-349. doi:10.1016/j.ajog.2020.02.018
111. Britt WJ. Maternal Immunity and the Natural History of Congenital Human Citomegalovirus Infection. *Viruses.* 2018;10(8):405. doi:10.3390/v10080405
112. Society CP. Update on congenital Citomegalovirus infection: Prenatal prevention, newborn diagnosis, and management | Canadian Paediatric Society. Accessed September 20, 2023. <https://cps.ca/en/documents/position/update-on-congenital-Citomegalovirus-infection-prenatal-prevention-newborn-diagnosis-and-management>

113. Kirschen GW, Burd I. Modeling of vertical transmission and pathogenesis of Citomegalovirus in pregnancy: Opportunities and challenges. *Front Virol.* 2023;3:1106634. doi:10.3389/fviro.2023.1106634
114. Congenital CMV Infection | CDC. Published September 29, 2022. Accessed September 6, 2023. <https://www.cdc.gov/cmvc/clinical/congenital-cmv.html>
115. Davis NL, King CC, Kourtis AP. Citomegalovirus infection in pregnancy: Citomegalovirus Infection in Pregnancy. *Birth Defects Research.* 2017;109(5):336-346. doi:10.1002/bdra.23601
116. Plotogea M, Isam AJ, Frincu F, et al. An Overview of Citomegalovirus Infection in Pregnancy. *Diagnostics.* 2022;12(10):2429. doi:10.3390/diagnostics12102429
117. Jackson SE, Redeker A, Arens R, et al. CMV immune evasion and manipulation of the immune system with aging. *GeroScience.* 2017;39(3):273-291. doi:10.1007/s11357-017-9986-6
118. Hamilton ST, Scott G, Naing Z, et al. Human Citomegalovirus-Induces Cytokine Changes in the Placenta with Implications for Adverse Pregnancy Outcomes. Rogers LK, ed. *PLoS ONE.* 2012;7(12):e52899. doi:10.1371/journal.pone.0052899
119. Schleiss MR. Citomegalovirus in the Neonate: Immune Correlates of Infection and Protection. *Clinical and Developmental Immunology.* 2013;2013:1-14. doi:10.1155/2013/501801
120. Gerna G, Fornara C, Furione M, Lilleri D. Congenital Human Citomegalovirus Infection: A Narrative Review of Maternal Immune Response and Diagnosis in View of the Development of a Vaccine and Prevention of Primary and Non-Primary Infections in Pregnancy. *Microorganisms.* 2021;9(8):1749. doi:10.3390/microorganisms9081749
121. Lilleri D, Gerna G. Maternal immune correlates of protection from human Citomegalovirus transmission to the fetus after primary infection in pregnancy. *Rev Med Virol.* 2017;27(2):e1921. doi:10.1002/rmv.1921
122. Noyola DE, Fortuny C, Muntasell A, et al. Influence of congenital human Citomegalovirus infection and the NKG2C genotype on NK-cell subset distribution in children: Immunity to infection. *Eur J Immunol.* 2012;42(12):3256-3266. doi:10.1002/eji.201242752
123. Lilleri D, Fornara C, Furione M, Zavattoni M, Revello MG, Gerna G. Development of Human Citomegalovirus-Specific T Cell Immunity during Primary Infection of Pregnant Women and Its Correlation with Virus Transmission to the Fetus. *J INFECT DIS.* 2007;195(7):1062-1070. doi:10.1086/512245
124. Revello MG, Lilleri D, Zavattoni M, et al. Lymphoproliferative Response in Primary Human Citomegalovirus (HCMV) Infection Is Delayed in HCMV Transmitter Mothers. *J INFECT DIS.* 2006;193(2):269-276. doi:10.1086/498872

125. Fornara C, Cassaniti I, Zavattoni M, et al. Human Citomegalovirus–Specific Memory CD4+ T-Cell Response and Its Correlation With Virus Transmission to the Fetus in Pregnant Women With Primary Infection. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;65(10):1659-1665. doi:10.1093/cid/cix622
126. Mele F, Fornara C, Jarrossay D, et al. Phenotype and specificity of T cells in primary human Citomegalovirus infection during pregnancy: IL-7Rpos long-term memory phenotype is associated with protection from vertical transmission. Nikolich-Zugich J, ed. *PLoS ONE*. 2017;12(11):e0187731. doi:10.1371/journal.pone.0187731
127. Zhang Y, Zhu B, Niu H, et al. The Adjuvant Effects of Rapamycin, Metformin and Aspirin on the T-Cell Immunological Memory Induced by Tuberculosis Subunit Vaccine. *In Review*; 2022. doi:10.21203/rs.3.rs-1552119/v1
128. Shin MS, Park HJ, Young J, Kang I. Implication of IL-7 receptor alpha chain expression by CD8+ T cells and its signature in defining biomarkers in aging. *Immun Ageing*. 2022;19(1):66. doi:10.1186/s12979-022-00324-6
129. Lilleri D, Fornara C, Revello MG, Gerna G. Human Citomegalovirus–Specific Memory CD8 + and CD4 + T Cell Differentiation after Primary Infection. *J INFECT DIS*. 2008;198(4):536-543. doi:10.1086/590118
130. Lilleri D, Kabanova A, Revello MG, et al. Fetal Human Citomegalovirus Transmission Correlates with Delayed Maternal Antibodies to gH/gL/pUL128-130-131 Complex during Primary Infection. Tse H, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e59863. doi:10.1371/journal.pone.0059863
131. Huang Y, Tang J, Wang H, et al. Pre-existing Maternal IgG antibodies as a protective factor against congenital Citomegalovirus infection: A mother-child prospective cohort study. *eBioMedicine*. 2022;77:103885. doi:10.1016/j.ebiom.2022.103885
132. Leruez-Ville M, Sellier Y, Salomon LJ, Stirnemann JJ, Jacquemard F, Ville Y. Prediction of Fetal Infection in Cases With Citomegalovirus Immunoglobulin M in the First Trimester of Pregnancy: A Retrospective Cohort. *Clinical Infectious Diseases*. 2013;56(10):1428-1435. doi:10.1093/cid/cit059
133. Semmes EC, Miller IG, Wimberly CE, et al. Maternal Fc-mediated non-neutralizing antibody responses correlate with protection against congenital human Citomegalovirus infection. *Journal of Clinical Investigation*. 2022;132(16):e156827. doi:10.1172/JCI156827
134. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *CP in Immunology*. 2018;120(1). doi:10.1002/cpim.40
135. Goetz C, Hammerbeck C, Bonnevier J. *Flow Cytometry Basics for the Non-Expert*. Springer International Publishing; 2018. doi:10.1007/978-3-319-98071-3
136. Sun J, Kroeger JL, Markowitz J. Introduction to Multiparametric Flow Cytometry and Analysis of High-Dimensional Data. In: Markowitz J, ed. *Translational Bioinformatics for Therapeutic Development*. Vol 2194. *Methods in Molecular Biology*. Springer US; 2021:239-253. doi:10.1007/978-1-0716-0849-4_13

137. An Introduction to Compensation for Multicolor Assays on Digital Flow Cytometers. Published online 2009. https://www.flowcytometry.bmc.med.uni-muenchen.de/best-practice-faq/acquisition/compensation_techbulletin.pdf
138. Cosma A. The Nightmare of a Single Cell: Being a Doublet. *Cytometry*. 2020;97(8):768-771. doi:10.1002/cyto.a.23929
139. Martínez-Gallo M, García-Prat M. Flow Cytometry Applied to the Diagnosis of Primary Immunodeficiencies. In: Loewy Z, ed. *Innovations in Cell Research and Therapy*. IntechOpen; 2020. doi:10.5772/intechopen.89743
140. Sanz I, Wei C, Jenks SA, et al. Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Front Immunol*. 2019;10:2458. doi:10.3389/fimmu.2019.02458
141. Yi JS, Rosa-Bray M, Staats J, et al. Establishment of normative ranges of the healthy human immune system with comprehensive polychromatic flow cytometry profiling. Unutmaz D, ed. *PLoS ONE*. 2019;14(12):e0225512. doi:10.1371/journal.pone.0225512
142. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(3):191-200. doi:10.1038/nri3158
143. Saeed KBA, Ahmad NS. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Applications in Diagnostic Microbiology. *Int J Med Students*. 2013;1(1):28-36. doi:10.5195/ijms.2013.22
144. Coleman WB, Tsongalis GJ. Laboratory Approaches in Molecular Pathology—The Polymerase Chain Reaction. In: *Diagnostic Molecular Pathology*. Elsevier; 2017:15-23. doi:10.1016/B978-0-12-800886-7.00002-9
145. Shen CH. Amplification of Nucleic Acids. In: *Diagnostic Molecular Biology*. Elsevier; 2019:215-247. doi:10.1016/B978-0-12-802823-0.00009-2
145. E MoldovanM MoldovanControls in Real-Time Polymerase Chain Reaction Based Techniques. *Acta Marisiensis Seria Medica*. 2020;66:79-82
146. Roche Applied Science. Technical Note No. LC 15/2002. Selection of Housekeeping Genes. <https://www.gene-quantification.de/roche-housekeeping.pdf>
147. Haselbeck AH, Im J, Prifti K, Marks F, Holm M, Zellweger RM. Serology as a Tool to Assess Infectious Disease Landscapes and Guide Public Health Policy. *Pathogens*. 2022;11(7):732. doi:10.3390/pathogens11070732
148. Azim MAU, Hasan M, Ansari IH, Nasreen F. Chemiluminescence Immunoassay: Basic Mechanism and Applications. *Bangladesh J Nuclear Med*. 2018;18(2):171-178. doi:10.3329/bjnm.v18i2.35240

149. Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Auto Immun Highlights*. 2017;8(1):9. doi:10.1007/s13317-017-0097-2
150. Koivunen ME, Krogsrud RL. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *Lab Med*. 2006;37(8):490-497. doi:10.1309/MV9RM1FDLWAUWQ3F
151. Ma T, Zhang M, Wan Y, Cui Y, Ma L. Preparation of an Acridinium Ester-Labeled Antibody and Its Application in GoldMag Nanoparticle-Based, Ultrasensitive Chemiluminescence Immunoassay for the Detection of Human Epididymis Protein 4. *Micromachines*. 2017;8(5):149. doi:10.3390/mi8050149
152. Watanabe M, Iwatani Y, Kaneda T, et al. Changes in T, B, and NK Lymphocyte Subsets During and After Normal Pregnancy. *American J Rep Immunol*. 1997;37(5):368-377. doi:10.1111/j.1600-0897.1997.tb00246.x
153. Luppi P, Haluszczak C, Trucco M, Deloia JA. Normal Pregnancy is Associated with Peripheral Leukocyte Activation. *American J Rep Immunol*. 2002;47(2):72-81. doi:10.1034/j.1600-0897.2002.1o041.x
154. Miller D, Gershater M, Slutsky R, Romero R, Gomez-Lopez N. Maternal and fetal T cells in term pregnancy and preterm labor. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(7):693-704. doi:10.1038/s41423-020-0471-2
155. Beckers L, Somers V, Fraussen J. IgD⁻CD27⁻ double negative (DN) B cells: Origins and functions in health and disease. *Immunology Letters*. 2023;255:67-76. doi:10.1016/j.imlet.2023.03.003
156. Gore EJ, Gard L, Niesters HGM, Van Leer Buter CC. Understanding torquetenovirus (TTV) as an immune marker. *Frontiers in Medicine*. 2023;10. Accessed January 26, 2024. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2023.1168400>

Anexos

Anexo 1 – Aprovação do projeto pela comissão de Ética da NMS|FCM-UNL (CEFCM)



Decisão final sobre o projeto

“Exploring B-cells in pregnancy: old players, new functions”

A Comissão de Ética da NMS|FCM-UNL (CEFCM) decidiu, aprovar por unanimidade, do ponto de vista ético, a 2ª Adenda ao projeto de investigação intitulado *“Exploring B-cells in pregnancy: old players, new functions”* (nº 167/2021/2ª Adenda/CEFCM), submetido pelo Investigador Principal, Prof. Doutor Luís Miguel Borrego, no âmbito do Doutoramento em Ciências da Saúde da NOVA Medical School, do Doutorando Miguel Ângelo Dias.

Lisboa, 19 de janeiro de 2022

O Presidente da Comissão de Ética,

(Professor Doutor Diogo Pais)

TO WHOM IT MAY CONCERN

The Ethics Research Committee of NMS|FCM-UNL (CEFCM) has unanimously approved, the 2nd Addendum to the research project entitled *“Exploring B-cells in pregnancy: old players, new functions”* (No. 167/2021/ 2nd Addendum/CEFCM) submitted by the Principal Investigator, Luís Miguel Borrego, MD, PhD, in the scope of the PhD Programme in Health Sciences at NOVA Medical School, of the PhD student Miguel Ângelo Dias.

Lisbon, January 19, 2022

The Chairman of the Ethics Research Committee,

(Diego Pais, MD, PhD)

Anexo 2 – Aprovação do projeto pela comissão de Ética para a Saúde do Hospital da Luz



Comissão de Ética para a Saúde

Hospital da Luz

Exmo. Sr. Prof. Luis Borrego
Serviço de ImunoAlergologia
Hospital da Luz Lisboa

Ref. CES/15/2022/ME

08 de Março de 2022

ASSUNTO: Exploring B-cells in pregnancy: old players, new functions - adenda

A Comissão de Ética para a Saúde do Hospital da Luz, informa que analisou e aprovou a adenda ao estudo –“Exploring B-cells in pregnancy: old players, new functions” do qual é V. Exa. Investigador principal.

Pel' A Comissão de Ética para a Saúde

Manuela Escumalha, Presidente

Anexo 3 – Consentimento informado



Consentimento Informado

Nome do Estudo: “Exploring B-cells in pregnancy: old players, new functions”

Investigador Principal: Prof. Doutor Luís Miguel Borrego

Nº Mecanográfico: 12376

Morada do local onde decorre o estudo: Hospital da Luz Lisboa, Avenida Lusíada, 100
1500-650 Lisboa

Contacto de Emergência: +351 21 710 44 00

INFORMAÇÃO AO DOENTE

Está a ser convidada a participar num estudo que está a decorrer nos Serviços de Ginecologia-Obstetrícia e Imunoalergologia do Hospital da Luz Lisboa.

Antes de decidir se quer participar, é importante que compreenda o motivo da realização deste estudo, o modo como a sua informação será utilizada, o que é que o estudo envolve e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos. Por favor leia atentamente esta informação e coloque todas as perguntas que entender. Poderá discutir este estudo com outras pessoas, como o seu médico de família e/ou a sua família, se o desejar. Tome o tempo que precisar.

A decisão de participar ou não neste estudo não afetará de modo nenhum o direito aos cuidados médicos que lhe são prestados, presentemente ou no futuro, nesta instituição.

QUAL É O OBJETIVO DESTE ESTUDO?

O sistema imunológico materno desempenha um papel exigente durante a gravidez, equilibrando a vigilância imunológica com a tolerância do feto. Em gestações bem-sucedidas

ocorrem importantes adaptações imunológicas, embora seja ainda necessária uma caracterização mais abrangente, particularmente no caso das células B e seus marcadores relacionados.

O objetivo deste estudo é caracterizar subconjuntos de células B circulantes, células T foliculares e marcadores de função das células B ao longo da gestação em mulheres grávidas saudáveis. Como objetivo secundário pretende-se avaliar o impacto da vacinação a *Bordetella pertussis* (bactéria que provoca a tosse convulsa), bem como o impacto da infeção por TTV e CMV (com potencial de transmissão congénita), sobre os parâmetros mencionados anteriormente, para melhor compreender os mecanismos subjacentes e as alterações que ocorrem em mulheres grávidas vacinadas e/ou com infeção concomitante.

Dentro das análises de rotina do 1º, 2º e 3º trimestres da gravidez, solicitadas pelo seu médico Obstetra, o estudo consiste na colheita de uma amostra de sangue para determinar as subpopulações de células B e T e outros marcadores serológicos. A amostra de sangue será enviada para os Laboratório de Imunologia e Microbiologia da NOVA Medical School/Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

O estudo irá incluir 100 grávidas saudáveis até final de dezembro de 2024, bem como um grupo controlo de 30 mulheres saudáveis, em idade fértil, não grávidas, a recrutar durante o mesmo período. Os dados obtidos serão alvo de divulgação e publicação.

PORQUE ESTOU A SER CONVIDADO/A A PARTICIPAR NESTE ESTUDO?

Os critérios de inclusão que justificam o convite efetuado à doente são:

- Grávida com idade compreendida entre os 18 e os 40 anos
- Ausência de história de diabetes, hipertensão ou doença autoimune e tabagismo nos 6 meses anteriores à coleta de sangue periférico
- Sem toma de qualquer medicamento (exceto vitaminas e suplementos de ferro)
- Sem complicações durante a gravidez.

Em relação ao grupo controlo, são critérios de inclusão que justificam o convite efetuado à doente:

- Mulher com idade compreendida entre os 18 e os 40 anos
- Ausência de história de diabetes, hipertensão ou doença autoimune e tabagismo nos 6 meses anteriores à coleta de sangue periférico
- Sem toma de qualquer medicamento (exceto vitaminas e suplementos de ferro)
- Não grávida.

TENHO QUE PARTICIPAR NESTE ESTUDO?

Terá toda a liberdade para recusar-se a participar no estudo ou retirar o seu consentimento, suspendendo a participação em qualquer momento. A participação é voluntária e a sua recusa em participar não envolverá qualquer penalização ou perda de benefícios. A recusa ou abandono não colocarão, de modo algum, em risco o direito a receber tratamento ou assistência médica, presentemente ou no futuro, nesta instituição.

O QUE É QUE ENVOLVE A MINHA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO?

No âmbito deste estudo, a doente tem como dever permitir e colaborar na colheita de sangue para avaliação de subpopulações de células B e T e marcadores serológicos, após ter cumprido todos os critérios de inclusão e nenhum critério de exclusão e assinado este Consentimento Informado.

QUAIS SÃO OS POSSÍVEIS RISCOS E BENEFÍCIOS DE PARTICIPAR NESTE ESTUDO?

Riscos

Não são expectáveis riscos, uma vez que apenas se vai colher uma amostra de sangue, que já teria de colher de qualquer maneira para avaliação de rotina da sua gravidez.

Benefícios

Aumentar o nosso conhecimento acerca das dinâmicas imunológicas do compartimento das células B durante a gravidez normal e como isso afeta os processos normais de vacinação em mulheres grávidas saudáveis.

QUAIS SÃO OS CUSTOS POR PARTICIPAR NESTE ESTUDO?

Não terá custos acrescidos por participar neste estudo, no entanto também não haverá qualquer remuneração por participar neste estudo.

COMO SERÁ MANTIDA A MINHA CONFIDENCIALIDADE NESTE ESTUDO?

Os registos são confidenciais e da responsabilidade dos investigadores. Os doentes serão identificados por número de série, ficando a identidade dos doentes envolvidos e os dados recolhidos apenas na posse da equipa de investigação. O nome das doentes não será identificado em nenhum relatório ou publicação decorrente deste estudo. A informação recolhida será analisada como parte deste estudo. Esta informação poderá ser analisada por pessoas ou entidades autorizadas pelo investigador, de forma anonimizada, pela Comissão de Ética deste hospital, pelas Autoridades de Saúde, sob supervisão do seu médico, com o objetivo



de confirmar a veracidade dos dados do estudo. Estes dados poderão ser comunicados a Autoridades Regulamentares. Os dados serão guardados durante o tempo exigido por lei.

A QUEM DEVO COLOCAR QUESTÕES SOBRE O ESTUDO?

O Médico Investigador poderá esclarecer qualquer dúvida que tenha. Os contactos são:

E-mail: luis.miguel.borrego@hospitaldaluz.pt

Telefone: +351 217 104 400

Gismed Learning Health, SA
Rua Carlos Alberto da Mota Pinto, 17 - 9º - 1070-313 Lisboa - Portugal
T. +351 351 213 138 260 - F. +351 213 530 292 - E. learninghealth@luzsaude.pt
Capital Social: 50.000€ - Registo da C.R.C. de Lisboa e Contribuinte nº 513 620 04

LUZ SAÚDE

CONSENTIMENTO INFORMADO

Ao assinar este Documento, declaro que:

- Li a informação descrita neste documento e foi-me dado tempo para refletir na minha participação no estudo;
- Tive oportunidade de colocar questões e obtive as respetivas respostas;
- Recebi uma cópia assinada e datada deste Consentimento Informado.

Nome Completo da Participante: _____

Data: _____

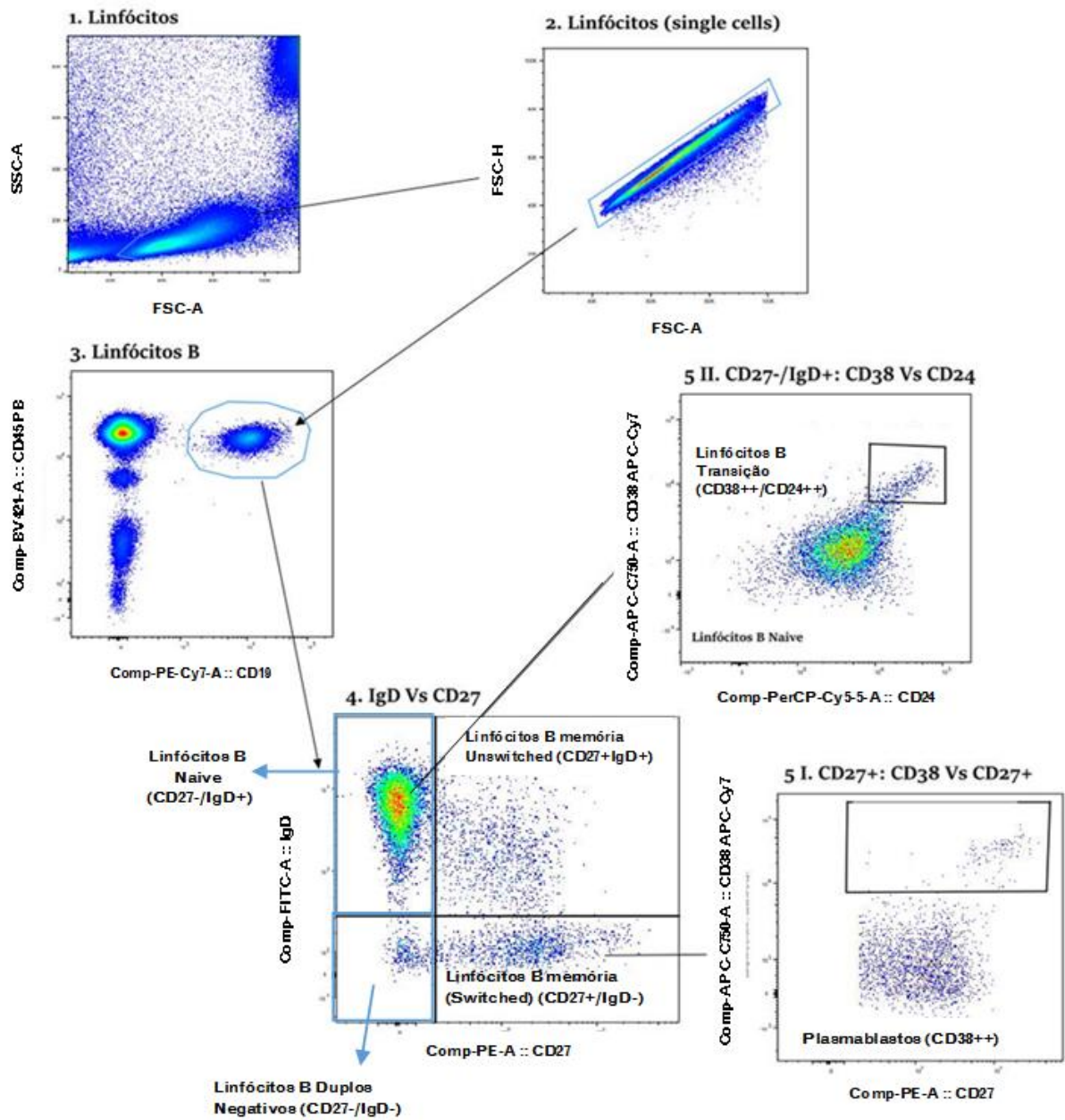
Assinatura: _____

Nome Completo do Médico Investigador: _____

Data: _____

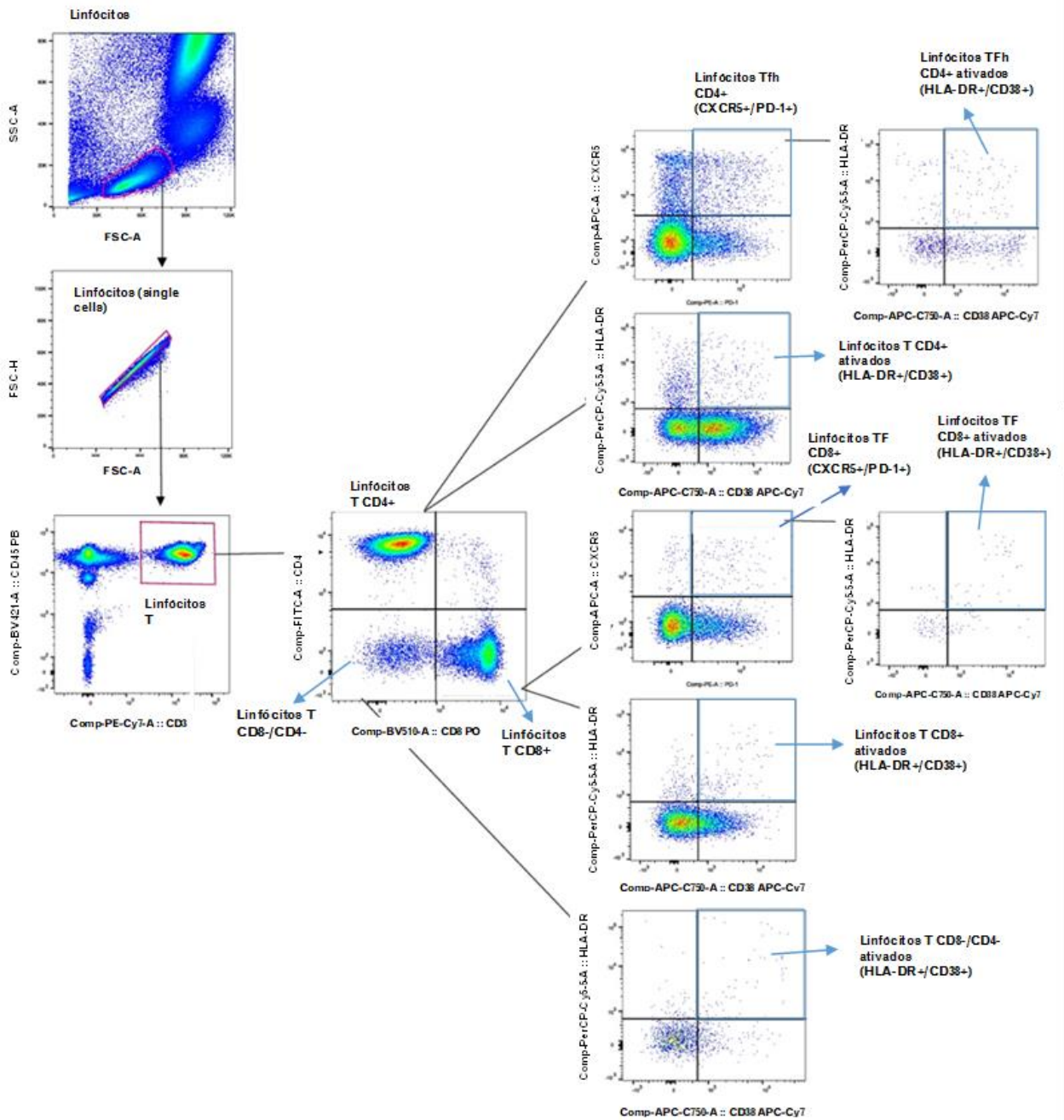
Assinatura: _____

Anexo 4 – Estratégia de Gate para a identificação de Linfócitos B



Análise de dados no software FlowJo (BD Biosciences).

Anexo 5 – Estratégia de Gate para a identificação de Linfócitos T



Análise de dados no software FlowJo (BD Biosciences).

Anexo 6 – Protocolo de Caracterização de Linfócitos B e T (tubos ExBio)

Materiais

Tubos ACS – Ref. ED7704 – Exbio

Tubos ACT – Ref. ED7705 – Exbio

Excel Lyse – Ref. ED7066 – Exbio

BD FACS Flow – Ref. 336911

BD FACS Lysing – Ref. 349202

BD Cell Fix – Ref. 340181

Anticorpos monoclonais adicionais:

- PD-L1 BV510

Preparação e armazenamento

Excel Lyse

Conservar a 4°C.

Diluir 10X com água destilada (i.e., 10mL em 90mL de água destilada). Deixar estar à temperatura ambiente antes de usar.

BD FACS Lysing

Conservar a 4°C.

Diluir 10X com água destilada (i.e., 10mL em 90mL de água destilada). Deixar estar à temperatura ambiente antes de usar.

BD Cell Fix

Conservar a 2-25°C.

Diluir 10X com água destilada (i.e., 10mL em 90mL de água destilada).

BD FACS Flow

Pronto a usar.

Aparelho de leitura

BD FACS Canto II

Material e reagentes adicionais

Equipamento de Laboratório (pipetas e micropipetas 20-200uL, ponteiras, vortex, centrífuga refrigerada, tubos de citometria BD – Ref. 352052, água bidestilada, BD FACS Flow – Ref. 336911).

PROCEDIMENTO

a) Preparação da suspensão de células

1. Identificar um tubo de hemólise e colocar 500uL de sangue.
2. Lavar as células uma vez com 2 mL de FACS Flow
 - a. juntar 2 mL de FACS Flow
 - b. centrifugar os tubos a 1500 rpm (400 x g) durante 5 minutos
 - c. rejeitar o sobrenadante

b) Marcação – Tubo B – ASC

1. Retirar os tubos ASC necessários do respetivo saco e fechá-lo bem.
2. Identificar cada tubo com o código do respetivo doente (1 tubo por doente).
3. Juntar a cada tubo 100uL da amostra, previamente lavada.
4. Juntar a cada tubo 2,5ul do anticorpo PD-L1 BV510.
5. Vortexar intensivamente, pelo menos durante 7 segundos.
6. Incubar 20 minutos no escuro, à temperatura ambiente.
7. Juntar 2 mL de solução de Excel lyse diluída, vortexar, e incubar 10 minutos no escuro, à temperatura ambiente.
8. Centrifugar os tubos a 1200 rpm (400 x g) durante 5 minutos.
9. Rejeitar o sobrenadante.
10. Juntar 2 ml FACS Flow, vortexar.
11. Centrifugar os tubos a 1200 rpm (400 x g) durante 5 minutos.
12. Rejeitar o sobrenadante e ressuspender com 300uL de FACS Flow.
13. Adquirir no citómetro a totalidade da amostra.

c) Marcação – Tubo T – ACT

1. Retirar os tubos ACT necessários do respetivo saco e fechá-lo bem.
2. Identificar cada tubo com o código do respetivo doente (1 tubo por doente).
3. Juntar a cada tubo 100uL da amostra, previamente lavada.
4. Vortexar intensivamente, pelo menos durante 7 segundos.
5. Incubar 20 minutos no escuro, à temperatura ambiente.
6. Juntar 2 mL de solução de Excel lyse diluída, vortexar, e incubar 10 minutos no escuro, à temperatura ambiente.
7. Centrifugar os tubos a 1200 rpm (400 x g) durante 5 minutos.
8. Rejeitar o sobrenadante.
9. Juntar 2 ml FACS Flow, vortexar.
10. Centrifugar os tubos a 1200 rpm (400 x g) durante 5 minutos.
11. Rejeitar o sobrenadante e ressuspender com 300uL de FACS Flow.
12. Adquirir no citómetro a totalidade da amostra.

Anexo 7 – Protocolo de Extração de ADN em amostras biológicas

Purelink Genomic ADN MiniKit' REF: K182002, Invitrogen

NOTA: quando se abrir o Kit, reconstituir as Soluções de Lavagem I e II com etanol absoluto, de acordo com as instruções que vêm nos frascos.

1. Ligar Termobloco a 55PC
2. Em tubo eppendorff 1,5 ml: pipetar 200mL de amostra
3. Adicionar 200 BL de Tampão de lise
4. Adicionar 20 VIL de Proteinase K
5. Agitar bem, no vortex, fazer um spin-down
6. Incubar 10 min. a 55PC
7. Adicionar 200 VIL de etanol absoluto
8. Agitar bem, no vortex, fazer um spin-down
9. Transferir todo o volume obtido para a coluna de extração com cuidado para não molhar o bordo da coluna
10. Centrifugar a coluna com o respetivo tubo de recolha a 10 000g, 2 min.
11. Colocar a coluna em tubo de recolha novo, fornecido pelo kit.
12. Pipetar 450 BL de Solução de lavagem I
13. Centrifugar a coluna com o respetivo tubo de recolha a 10 000g, 2 min.
14. Colocar a coluna em tubo de recolha novo, fornecido pelo kit
15. Pipetar 450 BL de Solução de lavagem II
16. Centrifugar a coluna com o respetivo tubo de recolha a 10 000g, 2 min.
17. Colocar a coluna em tubo de recolha novo, fornecido pelo kit.
18. Centrifugar a coluna com o respetivo tubo de recolha a 17 000g, 3 min
19. Colocar a coluna no respetivo epp de 1,5mL
20. Pipetar 50 BL de Solução de Eluição no centro da coluna
21. Incubar 5 min., à T.A.

22. Centrifugar a coluna com o respetivo tubo eppendorff a 17 000g, 3 min
23. Recuperar o eluído e colocá-lo de novo na coluna
24. Incubar 5 min., à T.A.
25. Centrifugar a coluna com o respetivo tubo eppendorff a 17 000g, 3 min
26. Deitar a coluna fora, e congelar o extraído a -20°C



NOVA

UNIVERSIDADE NOVA
DE LISBOA



Gravidez, Imunomodulação e Infecção por CMV
MADALENA GODINHO BARATA
MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

2024