

Maria João Gomes Monteiro Lopes Baptista

Caracterização fenotípica de linfócitos T e de células NK: acção da IL-2

Mestrado em Oncologia
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
Universidade do Porto
2000/2002



Instituto Português de Oncologia
Francisco Gentil



UNIVERSIDADE DO PORTO



Jefferson
Medical
College

Caracterização fenotípica de linfócitos T e de células NK: acção da IL-2

Maria João Gomes Monteiro Lopes Baptista

PORTO, 2002

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU
DE MESTRE APRESENTADA AO INSTITUTO
DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
DA UNIVERSIDADE DO PORTO

ÍNDICE

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Summary	vi
Índice de figuras	vii
Índice de quadros	ix
Introdução	2
1- Hematopoiese.....	2
1.1- Ontogénese dos linfócitos T.....	2
1.2- Ontogénese das células NK.....	5
2- Morfologia dos linfócitos T e das células NK.....	7
3- Identificação fenotípica dos linfócitos T.....	8
4- Identificação fenotípica das células NK.....	10
5- Caracterização dos antígenos associados aos linfócitos T e às células NK.....	11
5.1- Antígenos de adesão e de activação.....	11
5.2- Receptores de citocinas.....	13
5.3- Antígenos de linhagem NK.....	15
6- Citotoxicidade mediada por linfócitos T e por células NK.....	19
7- Transplantação hematopoiética e imunoterapia com IL-2.....	22
Objectivos	25
Materiais e métodos	27
1- Grupos estudados.....	27
2- Processamento das CPSP.....	28
2.1- Mobilização e colheita.....	28
2.2- Criopreservação.....	28
2.3- Activação das CPSP com IL-2.....	28
3- Imunofenotipagem.....	30
3.1- Técnica de marcação.....	30
3.2- Citometria de fluxo.....	31
3.2.1- Aquisição.....	31
3.2.2- Análise.....	32

3.2.2.1- Análise das populações leucocitárias.....	32
3.2.2.2- Análise dos linfócitos T.....	34
3.2.2.3- Análise das células NK.....	36
3.4- Análise estatística.....	38
Resultados	40
1- Caracterização dos grupos estudados.....	40
2- Representatividade das populações leucocitárias.....	42
2.1- Percentagens das populações linfocitárias dos sangues periféricos.....	42
2.2- Concentrações das populações linfocitárias dos sangues periféricos.....	43
2.3- Percentagens das populações leucocitárias das CPSP.....	43
2.4- Comparação das percentagens das populações linfocitárias e das células NK dos sangues periféricos e das CPSP dos doentes.....	44
3- Caracterização fenotípica dos linfócitos T.....	46
3.1- Fenótipo dos linfócitos T dos sangues periféricos.....	46
3.2- Fenótipo dos linfócitos T das CPSP.....	49
3.3- Comparação do fenótipo dos linfócitos T dos sangues periféricos e das CPSP de doentes.....	51
4- Caracterização fenotípica das sub-populações de células NK.....	53
4.1- Fenótipo das sub-populações de células NK dos sangues periféricos.....	53
4.1.1- Fenótipo das sub-populações de células NK dos sangues periféricos dos dadores.....	53
4.1.2- Fenótipo das sub-populações de células NK dos sangues periféricos dos doentes.....	55
4.1.3- Comparação das sub-populações de células NK dos sangues periféricos dos dadores e dos doentes.....	57
4.2- Fenótipo das sub-populações de células NK das CPSP.....	58
4.2.1- Fenótipo das sub-populações de células NK das CPSP dos dadores.....	58
4.2.2- Fenótipo das sub-populações de células NK das CPSP dos doentes.....	60
4.2.3- Comparação das sub-populações de células NK das CPSP dos dadores e dos doentes.....	62
4.3- Comparação do fenótipo das sub-populações de células NK dos sangues periféricos e das CPSP dos doentes.....	63
5- Efeito da incubação com IL-2 nas CPSP.....	65

5.1- Representatividade das populações leucocitárias após a incubação com IL-2.....	65
5.2- Alterações fenotípicas nos linfócitos T após a incubação com IL-2.....	66
5.3- Alterações fenotípicas nas células NK após a incubação com IL-2.....	70
5.3.1- Fenótipo das sub-populações de células NK das CPSP dos dadores, após a incubação com IL-2.....	71
5.3.2- Fenótipo das sub-populações de células NK das CPSP dos doentes, após a incubação com IL-2.....	73
5.3.3- Comparação das sub-populações de células NK, dos dadores e dos doentes, nas CPSP, após a incubação com IL-2.....	77
Discussão	80
Referências Bibliográficas	91
Anexo 1	103

AGRADECIMENTOS

Gostaria de principiar por agradecer à Exma. Sra. Prof. Doutora Isabel Leal Barbosa pelo seu empenho na orientação deste trabalho e pelo seu, sempre presente, incentivo.

Um sincero agradecimento aos Directores dos Serviços de Imuno-Hemoterapia, Exma. Sra. Dra. Alzira Carvalhais, e da UTM, Exmo. Sr. Dr. Pedro Pimentel por me facultarem todos os meios necessários para a realização deste trabalho e também pelo constante interesse e disponibilidade dispensados. Queria ainda agradecer ao Exmo. Sr. Dr. Francisco Pacheco a atenção facultada a este trabalho aquando Director do Serviço de Imuno-Hemoterapia.

Ao Exmo. Sr. Prof. Doutor Guimarães dos Santos queria aqui deixar o meu apreço e admiração pela dinamização do Mestrado em Oncologia. Gostaria ainda aqui de lembrar, o contributo de todo o corpo docente e não docente deste Mestrado e do IPO do Porto. Um especial obrigada à Exma. Sra. Dra. Maria Fragoso pela orientação durante o estágio no Departamento de Oncologia Médica.

A todos os elementos do Serviço de Imuno-hemoterapia, e principalmente aos colaboradores do Laboratório de Criobiologia, o meu muito obrigada pela pronta ajuda e pelo ambiente de trabalho proporcionado. Gostaria de salientar o auxílio da Exma. Sra. Dra. Susana Roncon na elaboração deste trabalho e do Exmo. Sr. Dr. Agostinho Almeida na análise de alguns dos casos.

Gostaria de agradecer a toda a equipa da UTM, e em especial ao Exmo. Sr. Dr. Fernando Campilho pelas efusivas discussões e pelo tempo dedicado na revisão dos textos.

À Liga Portuguesa Contra o Cancro- Núcleo Regional do Norte agradeço a bolsa concedida que me permitiu realizar este Mestrado.

Por último gostaria de agradecer a todos aqueles que mesmo sem saberem contribuíram para que este trabalho se realizasse.

Mais uma vez a todos o meu muito obrigada.

RESUMO

A transplantação autóloga de células progenitoras do sangue periférico (CPSP) como tratamento das doenças hematológicas constitui uma abordagem terapêutica amplamente instituída. Contudo, e na tentativa de melhorar o prognóstico destas patologias, surgiram nos últimos anos, protocolos de imunoterapia nos quais se procede à estimulação do enxerto com IL-2. No IPO do Porto desenvolveu-se um protocolo de activação *in vitro* de progenitores hematopoiéticos periféricos autólogos com IL-2, sendo este trabalho fruto de algumas das avaliações realizadas no decorrer da sua aplicação.

No presente estudo incubaram-se as CPSP com IL-2, por um período de 24 horas, e avaliaram-se as alterações fenotípicas induzidas nos linfócitos T e nas subpopulações de células NK. Compararam-se dois grupos de indivíduos, um de dadores e outro de doentes, e ainda se analisaram fenotipicamente as referidas populações nos sangues periféricos.

Com este trabalho constatou-se que a mobilização das CPSP não alterou relevantemente o fenótipo destas células, quer dos dadores quer dos doentes, no que concerne à expressão de antigénios de activação, adesão, receptores de citocinas e de linhagem NK. No que respeita ao efeito da estimulação com IL-2 evidenciou-se, em ambos os grupos estudados, um aumento importante na percentagem de linfócitos T e de células NK, CD56++ e CD56+, a exprimirem CD69. No grupo dos dadores, ainda destacou-se uma diminuição na percentagem de células NK CD56++ e CD56+ a exprimirem CD122 e um aumento na percentagem de células CD56++ a exprimirem CD117.

Assim, este estudo permitiu definir painéis de expressão antigénica dos linfócitos T e das células NK de sangues periféricos e de CPSP, antes e após incubação com IL-2. Foi ainda possível comprovar a estimulação induzida por esta citocina, pois o aumento da expressão de CD69 nos linfócitos T e nas células NK evidência um estadio de activação e como tal um suposto aumento da actividade citotóxica.

SUMMARY

Peripheral blood progenitor cell (PBPC) autologous transplantation has been used as a treatment of haematological diseases and is a well established therapeutical approach. However, in a attempt to improve the prognosis of these pathologies, recently new imunotherapy protocols have been developed, in which the grafts are stimulated with IL-2. In IPO Porto an *in vitro* IL-2 activation of autologous peripheral haematopoietic progenitors protocol was developed and this project is the result of some of the evaluations made during the process.

In the present study, PBPC were incubated with IL-2 for a period of 24 hours and the phenotypical changes induced in T lymphocytes and in NK cells subpopulations were evaluated. Two groups of individuals were compared, one being healthy donors and the other patients. The phenotypical changes referred to before were also analised in the peripheral bloods.

In this study it was observed that the PBPC mobilization did not change the cell phenotype, either in donors or in patients with regards to activation, adhesion, cytokine receptors and NK lineage antigens expression. In relation to the IL-2 stimulation effect, an important increase in the percentages of T lymphocytes and NK cells (CD56++ and CD56+) expressing CD69 was detected in both groups. In the donor group, a decrease in CD122+CD56++ and CD122+CD56+ NK cell percentages and an increase in CD117+CD56++ NK cell percentages were also noticed.

This study allowed blood and PBPC T lymphocyte and NK cells antigenic expression patterns to be defined before and after IL-2 incubation. It was also possible to show the stimulation induced by this cytokine. The increase in T lymphocyte and NK cell numbers expressing CD69 represents an activation status, probably associated with an increase in cytotoxic activity.

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1- Esquema da ontogénese dos linfócitos T.....	4
Fig. 2- Esquema da ontogénese das células NK.....	6
Fig. 3- Diagrama esquemático do complexo receptor das células T/CD3.....	8
Fig. 4- Esquema da ligação da IL-2 ao seu receptor de alta afinidade.....	14
Fig. 5- Esquema do reconhecimento e da lise das células alvo pelo LTC.....	20
Fig. 6- Exemplo da análise sequencial realizada para o estudo das populações leucocitárias.....	33
Fig. 7- Exemplo da análise sequencial realizada para o estudo dos linfócitos T.....	35
Fig. 8- Exemplo da análise sequencial realizada para o estudo das células NK.....	37
Fig. 9- Diferenças fenotípicas entre os linfócitos T, dos sangue periféricos, dos dadores e dos doentes.....	48
Fig. 10- Diferenças fenotípicas entre os linfócitos T, das CPSP, dos dadores e dos doentes.....	50
Fig. 11- Diferenças fenotípicas entre os linfócitos T dos sangues periféricos e das CPSP, dos doentes.....	51
Fig. 12- Diferenças fenotípicas entre as células CD56++ e CD56+ dos sangues periféricos dos dadores.....	55
Fig. 13- Diferenças fenotípicas entre as células CD56++ e CD56+ dos sangues periféricos dos doentes.....	57
Fig. 14- Diferenças fenotípicas das células CD56++ e CD56+ dos sangues periféricos dos dadores e dos doentes.....	58
Fig. 15- Diferenças fenotípicas entre as células CD56++ e CD56+ das CPSP dos dadores.....	60
Fig. 16- Diferenças fenotípicas entre as células CD56++ e CD56+ das CPSP dos doentes.....	62
Fig. 17- Diferenças fenotípicas, entre dadores e doentes, das células CD56++ e CD56+ das CPSP.....	63
Fig. 18- Diferenças fenotípicas entre as sub-populações de células NK dos sangues periféricos e das CPSP, dos doentes.....	64

Fig. 19- Efeito da incubação com IL-2 no fenótipo dos linfócitos T das CPSP dos dadores.....	67
Fig. 20- Efeito da incubação com IL-2 no fenótipo dos linfócitos T das CPSP dos doentes.....	68
Fig. 21- Diferenças fenotípicas entre os linfócitos T das CPSP dos dadores e dos doentes, após a incubação com IL-2.....	69
Fig. 22- Efeito da incubação com IL-2 no fenótipo das células CD56++ das CPSP dos dadores.....	71
Fig. 23- Efeito da incubação com IL-2 no fenótipo das células CD56+ das CPSP dos dadores.....	72
Fig. 24- Diferenças fenotípicas entre as células CD56++ e CD56+ das CPSP dos dadores, após a incubação com IL-2.....	73
Fig. 25- Efeito da incubação com IL-2 no fenótipo das células CD56++ e CD56+ das CPSP dos doentes.....	75
Fig. 26- Diferenças fenotípicas entre as células CD56++ e CD56+ das CPSP dos doentes, após a incubação com IL-2.....	76
Fig. 27- Diferenças fenotípicas entre as células CD56++ das CPSP dos dadores e dos doentes, após a incubação com IL-2.....	77
Fig. 28- Diferenças fenotípicas entre as células CD56+ das CPSP dos dadores e dos doentes, após a incubação com IL-2.....	78

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1- Combinações de anticorpos monoclonais utilizados na imunofenotipagem e respectivos volumes usados.....	30
Quadro 2- Caracterização dos diferentes grupos estudados.....	40
Quadro 3- Percentagens das populações linfocitárias dos sangues periféricos dos dadores e dos doentes.....	42
Quadro 4- Concentrações (nº de células/ μ l) das populações linfocitárias dos sangues periféricos de dadores e de doentes.....	43
Quadro 5- Percentagens das populações leucocitárias das CPSP dos dadores e dos doentes.....	44
Quadro 6- Expressão de antigénios de activação, adesão e receptores de citocinas (a) e de linhagem NK (b) nos linfócitos T dos sangues periféricos dos dadores e dos doentes.....	47
Quadro 7- Expressão de antigénios de activação, adesão e receptores de citocinas (a) e de linhagem NK (b) nos linfócitos T das CPSP dos dadores e dos doentes.....	49
Quadro 8- Expressão de antigénios de linhagem NK (a) e de activação, adesão e receptores de citocinas (b) nas sub-populações de células NK dos sangues periféricos dos dadores.....	54
Quadro 9- Expressão de antigénios de linhagem NK (a) e de activação, adesão e receptores de citocinas (b) nas sub-populações de células NK dos sangues periféricos dos doentes.....	56
Quadro 10- Expressão de antigénios de linhagem NK (a) e de activação, adesão e receptores de citocinas (b) nas sub-populações de células NK das CPSP dos dadores.....	59
Quadro 11- Expressão de antigénios de linhagem NK (a) e de activação, adesão e receptores de citocinas (b) nas sub-populações de células NK das CPSP dos doentes.....	61
Quadro 12- Percentagens das populações linfocitárias nas CPSP após a incubação com IL-2.....	65

Quadro 13- Expressão de antigénios de activação, adesão e receptores de citocinas (a) e de linhagem NK (b) nos linfócitos T das CPSP dos dadores e dos doentes após a incubação com IL-2.....	66
Quadro 14- Expressão de antigénios de linhagem NK (a) e de activação, adesão e receptores de citocinas (b) nas sub-populações de células NK das CPSP dos dadores após a incubação com IL-2.....	70
Quadro 15- Expressão de antigénios de linhagem NK (a) e de activação, adesão e receptores de citocinas (b) nas sub-populações de células NK das CPSP dos doentes após a incubação com IL-2.....	74

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1- Hematopoiese

Nos indivíduos saudáveis, produzem-se diariamente um grande número de células sanguíneas diferenciadas. Todas as células sanguíneas maduras derivam de células estaminais localizadas na medula óssea.¹ Estas células apresentam características de auto-renovação e de diferenciação, ou seja, sofrem uma série de divisões e originam as diferentes células maduras, contudo estes mecanismos ainda não foram completamente desvendados. A compreensão das complexas relações envolvidas na produção das distintas células sanguíneas têm evoluído graças aos estudos desenvolvidos por hematologistas, imunologistas e radiobiologistas.² Hoje em dia é possível distinguir precursores dos diferentes tipos de células, como por exemplo linfócitos T, células NK, neutrófilos, eritrócitos, etc, e agrupá-los como provenientes de diferentes linhagens celulares, linhagem linfoide, mieloide, eritroide, embora nem todas estejam perfeitamente estabelecidas.

1.1- Ontogénese dos linfócitos T

As células de linhagem linfoide desempenham um importante papel na vigilância imunológica de alterações do próprio, assim como nas infecções por microorganismos. Segundo a teoria da vigilância imunológica de Burnet o aparecimento das células tumorais dependeria da falência deste sistema.³ Da linhagem linfoide, os linfócitos T e os linfócitos B foram os mais estudados. As suas capacidades de reconhecer antígenos, e os mecanismos inerentes a estes fenómenos foram exaustivamente investigados e hoje são reconhecidos como componentes celulares da imunidade adaptativa.⁴ Assim, os linfócitos T e B estão implicados nos processos imunes accionados após prévia sensibilização, sendo esta conseguida por vacinação, por doença ou por contactos inaparentes.⁴ Os linfócitos T são usualmente divididos em duas sub-populações de acordo com o tipo de receptor de células T (TCR), sendo

denominados linfócitos T $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$), correspondendo a 90-95% dos linfócitos T do sangue periférico, e linfócitos T $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$), que correspondem aos restantes 5-10%.⁵ Os linfócitos T $\alpha\beta$ ainda se sub-dividem em duas populações, classificadas pela expressão dos antígenos CD4 e CD8, linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+.⁵

A presença, no compartimento periférico, de linfócitos T maduros e funcionais, é o culminar de vários estádios de diferenciação ocorridos no timo. As células estaminais migram para o timo, onde se deslocam do córtex para a medula e daí para a periferia, num processo que demora aproximadamente três dias. Durante o desenvolvimento intra-tímico, os timócitos adquirem maturidade funcional, como demonstram as mudanças na expressão de antígenos da sua superfície celular.⁶ As células que alcançam o timo estão comprometidas com a linhagem T, no entanto, esta afirmação é controversa pois esta predisposição não é irreversível, ainda que estas células apresentem cadeias constantes 3 ϵ no seu citoplasma. Por estas razões, tanto são consideradas células estaminais como células pró-T. No timo, o primeiro estádio de diferenciação ocorre no córtex, onde adquirem CD2, denominando-se então, timócitos pró-T. A alteração seguinte, ainda no córtex, é a expressão citoplasmática dos dois tipos de TCR, observando-se a diferenciação em células TCR $\alpha\beta$ e TCR $\gamma\delta$, sendo estes timócitos designados por células pré-T. Nas células TCR $\alpha\beta$ observa-se a concomitante expressão de CD4 e CD8. Já na medula, verifica-se a exteriorização do CD3 e do respectivo TCR, $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. Posteriormente as células TCR $\alpha\beta$ ou perdem a expressão de CD4 ou a de CD8. Neste estádio terminou a diferenciação T, sendo estas células consideradas linfócitos T maduros.⁷ Na periferia observam-se duas sub-populações de linfócitos T: TCR $\alpha\beta$, a maioria, e TRC $\gamma\delta$.⁵ A sub-população TCR $\alpha\beta$ divide-se ainda em duas sub-populações, uma CD2+, CD3+ e CD4+ e outra CD2+, CD3+ e CD8+ (Fig. 1). A primeira, linfócitos T CD4+, corresponde a cerca de 65% dos linfócitos TCR $\alpha\beta$ e estabelece ligações com as regiões não polimórficas do complexo major de histocompatibilidade (MHC) classe II (HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ,...). A segunda, linfócitos T CD8+, corresponde aos restantes 35% e interage com as regiões não polimórficas da molécula de MHC classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C,...).^{6,8}

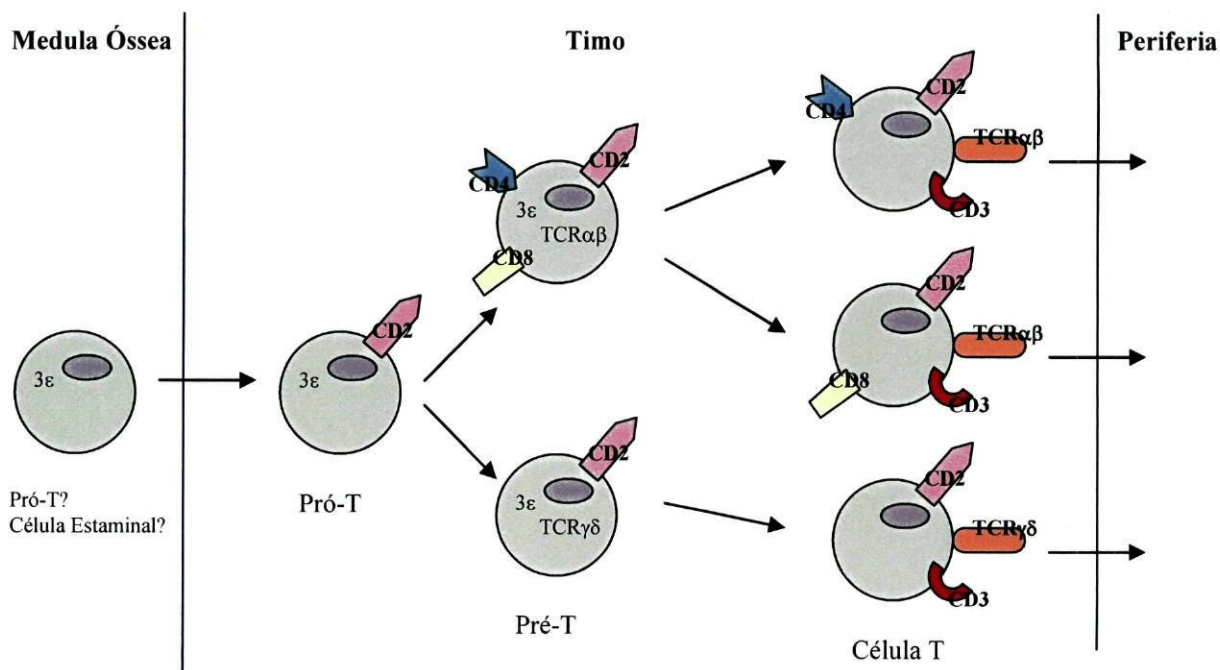


Fig. 1- Esquema da ontogénese dos linfócitos T.

Durante a diferenciação dos timócitos no timo, verificam-se dois importantes eventos. Um, que das células pró-T que alcançam o timo, aproximadamente 90% não atingem a periferia pois entram em apoptose. O segundo, que durante este processo os timócitos “aprendem” a reconhecer os antígenos através da respectiva classe de MHC. Segundo o modelo instrutivo, a diferenciação em linfócitos CD4+ ou em CD8+ processa-se de acordo com a classe de MHC que contacta com o TCR, ou seja, se o TCR se ligar a um MHC de classe I, o timócito perderá a expressão de CD4, originando um linfócito CD8+, no caso de a ligação se efectuar com um MHC classe II, originar-se-á um linfócito CD4+. O modelo estocástico propõe que a selecção dos linfócitos CD4+ e CD8+ é independente do contacto com as duas classes de MCH, processando-se a perda do respectivo antígeno de modo aleatório.⁹

1.2- Ontogénese das células NK

As células “natural killer” (NK), desempenham o seu papel de defesa num conjunto de processos que se convencionou designar por imunidade inata. Estas células fazem parte da primeira linha de defesa do organismo graças à sua actividade citolítica e à sua capacidade de secreção de citocinas imuno-reguladoras e correspondem a cerca de 15% do total de linfócitos periféricos.¹⁰ As células NK estão implicadas em várias actividades como a destruição de células tumorais, a resistência a infecções víricas, a regulação da hematopoiese e a fenómenos de doença enxerto contra hospedeiro.^{11,12}

As células NK foram caracterizadas pela expressão de CD56 e há cerca de 15 anos, confirmou-se a existência de duas sub-populações de células NK, identificadas pela diferente densidade de expressão de CD56. A maioria das células NK humanas, aproximadamente 90%, apresentam uma baixa intensidade de expressão de CD56 e são conhecidas por CD56+, as restantes células, cerca de 10%, exprimem intensamente o antigénio CD56 e denominam-se CD56++.¹⁰ Estudos preliminares indicam que a sub-população CD56++ e a CD56+ apresentam diferentes padrões de expressão de antigénios de superfície, sugerindo que a caracterização detalhada das moléculas expressas por cada uma das sub-populações contribuirá para clarificar a relação existente entre ambas.¹³

A origem das células NK é ainda desconhecida. Estas células não se consideram como provenientes de uma linhagem celular independente pois desconhece-se a sua célula progenitora, o local onde ocorre a sua diferenciação e os rearranjos genéticos envolvidos.¹⁴ Contudo é possível distinguir células NK maduras de outros linfócitos, reconhecer alguns dos seus progenitores, não comuns a outras linhagens celulares, e constatar o envolvimento da medula óssea e a não dependência do timo no seu desenvolvimento. Por tal, coloca-se a hipótese de as células NK representarem uma terceira linhagem de linfócitos.¹⁴ No entanto, as funções exercidas pelas células NK e pelos linfócitos T estão interligadas e por vezes medeiam fenómenos idênticos, além de partilharem a expressão de alguns antigénios, sugerindo uma relação no seu desenvolvimento e a existência de um precursor comum.⁴

De acordo com modelos *in vitro*, a diferenciação das células NK poderia ser dividida em três estádios. O primeiro estágio seria representado por um célula progenitora CD34+, sem expressão de antigénios de linhagem e com expressão do

receptor de tirosina cinase (Flt3) e do receptor do “stem cell factor” (c-kit)(CD117). A acção do ligando Flt3 e ou do ligado c-kit conduziria à diferenciação numa nova célula com expressão do receptor da IL-15, mantendo-se a expressão de CD34. Por sua vez a IL-15 seria responsável pela maturação originando a célula funcional CD56⁺⁺. A relação ontogénica entre as células CD56⁺⁺ e CD56⁺ ainda não foi estabelecida. Como tal, sugerem-se três possibilidades de maturação para as células CD56⁺: a existência de um precursor independente para as células CD56⁺, a influência de um sinal que induza um precursor comum a diferenciar-se em CD56⁺ ou a maturação das células CD56⁺⁺ em células CD56⁺ (Fig. 2).¹⁰

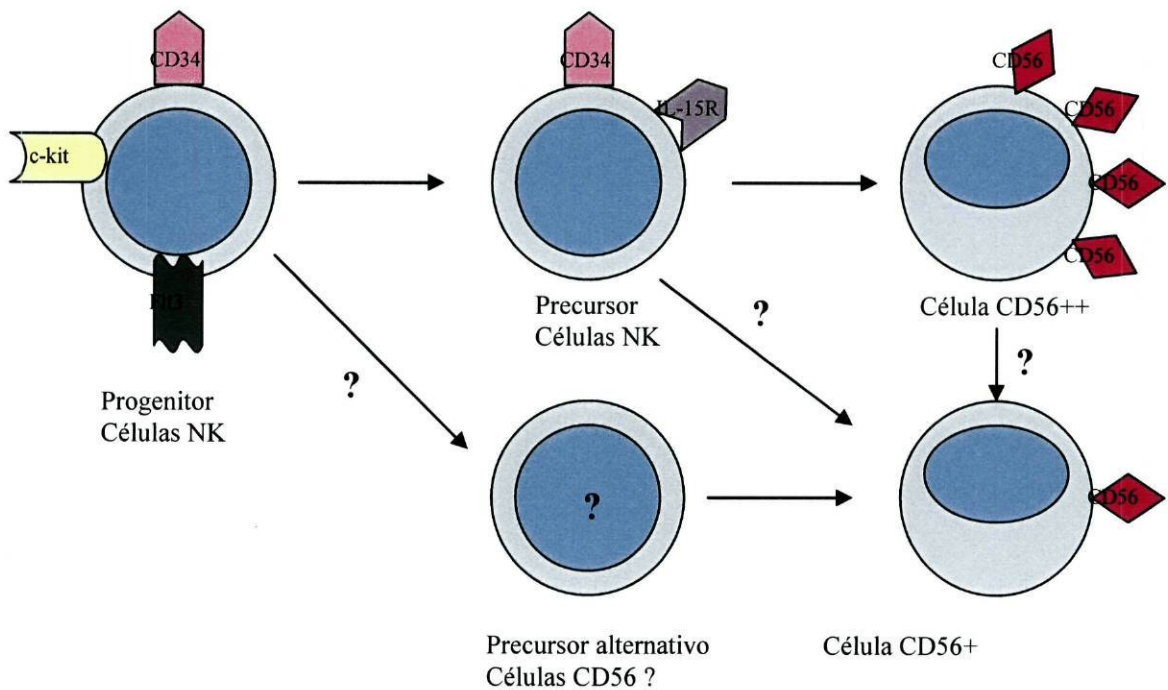


Fig. 2- Esquema da ontogénese das células NK.

2- Morfologia dos linfócitos T e das células NK

Morfologicamente, os linfócitos T maduros são pequenas células, de núcleo bem definido com cromatina condensada e com um citoplasma onde se visualizam muito poucos organelos. Após activação antigénica, o seu volume aumenta, a cromatina nuclear torna-se menos densa e no citoplasma visualizam-se várias mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso.¹⁵ Assim no sangue periférico observam-se dois tipos de linfócitos T, os pequenos linfócitos e os grandes linfócitos, também denominados linfócitos grande granulares.⁵ Os linfócitos T com morfologia de linfócito grande granular (LGG), correspondem a menos de 5% dos linfócitos CD4+ e 30 a 50% dos linfócitos CD8+.⁵

As células NK são linfócitos grande granulares que apresentam um citoplasma abundante, razão citoplasma/núcleo elevada, núcleo arredondado e grânulos azurófilos. Contudo, também podem ser agranulares e o seu tamanho pode ser semelhante ao de alguns linfócitos T. Estas características estruturais estão relacionadas com as subpopulações CD56+ e CD56++.¹⁶ As primeiras apresentam morfologia de linfócitos grande granulares e as segundas exibem ou não este tipo de morfologia.¹⁷ Desconhece-se se estas diferenças morfológicas estão relacionadas com a heterogeneidade das células NK maduras ou se reflectem estadios de diferenciação ou de activação.¹⁶

3- Identificação fenotípica dos linfócitos T

Todos os linfócitos T maduros expressam à sua superfície o complexo TCR/CD3, e como tal a presença de CD3 à superfície celular é utilizada para identificar este tipo de linfócitos. A porção extra-citoplasmática das cadeias α e β do TCR é constituída por dois domínios semelhantes às imunoglobulinas. A porção transmembranar da cadeia α é formada por dois resíduos de aminoácidos carregados positivamente enquanto que a cadeia β apenas apresenta um, sendo o domínio intracelular de ambas as cadeias pequeno. As cadeias α e β do TCR estão associadas com o complexo CD3.

O complexo CD3 consiste em três proteínas da super-família das imunoglobulinas, CD3 γ , CD3 δ e CD3 ϵ , e num dímero de polipeptidos CD3 ζ (CD247). As moléculas do complexo CD3 contém na sua porção intracitoplasmática imunoreceptores ITAM (“tyrosine-based activation motifs”) que são responsáveis pela transdução de sinais de activação após a interacção do TRC com os antigénios (Fig. 3).⁴

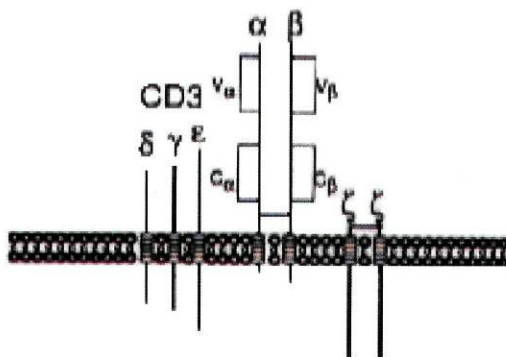


Fig. 3- Diagrama esquemático do complexo receptor das células T/CD3. Adaptado de Kipps TJ. Functions of T lymphocytes: T-cell receptors for antigen. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, editors. Williams hematology. 5th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1995. p. 938-45.

A molécula CD4 é uma glicoproteína expressa à superfície celular sendo a porção extracelular desta molécula constituída por quatro domínios imunoglobulínicos. A molécula CD8 também é uma glicoproteína. O CD8 é constituído por duas cadeias

unidas por ligações dissulfeto, que originam homodímeros α/α ou heterodímeros α/β . Quer o CD8 α , quer o CD8 β possuem um domínio imunoglobulínico na sua região variável da porção N-terminal extracelular, sendo portanto membros da super-família das imunoglobulinas.^{18,19} A expressão, nos linfócitos T, dos antígenos CD4 e CD8, caracteriza duas sub-populações, linfócitos T auxiliares (“helper”)(CD4+) e linfócitos T citotóxicos (CD8+). As moléculas CD4 e CD8 são estruturalmente distintas embora ambas actuem como co-receptoras na interacção MHC/TCR,²⁰ potenciando a transdução do sinal do TCR pois aumentam a afinidade do complexo TCR para o MHC e recrutam moléculas sinalizantes como a Lck (uma cinase da tirosina).²¹ Como as moléculas CD4 e CD8 diferem na especificidade da ligação ao MHC, os linfócitos CD4 apenas reconhecem antígenos apresentados pelo MHC classe II e os linfócitos CD8 os apresentados pelo MHC classe I.²⁰ Esta especificidade de ligação aos dois tipos de MHC também se traduz nas distintas funções exercidas por estas duas sub-populações de linfócitos.

4- Identificação fenotípica das células NK

As células NK são vulgarmente caracterizadas pela presença de CD56 e pela ausência de CD3. A molécula CD56 é uma isoforma da molécula de adesão das células neuronais (N-CAM).⁴ Esta molécula é uma glicoproteína de membrana pertencente à super-família das imunoglobulinas. A sua porção extra-celular é constituída por cinco domínios semelhantes a imunoglobulinas e por dois segmentos de fibronectina tipo III. Verifica-se que após activação a densidade de CD56 nas células NK aumenta.¹⁵ O antígeno CD56 parece não participar directamente na lise das células alvo, contudo recentes publicações sugerem que o CD56 poderá mediar a adesão homotípica das células NK às linhas celulares tumorais CD56+.¹¹ O antígeno CD56 é regulado positivamente nas células NK CD56+ após activação *in vivo* e *in vitro*. Como tal, a densidade de expressão à superfície celular de CD56 não permite distinguir as células NK CD56++ naïve das células CD56+ activadas.¹⁷ O CD56 também é expresso em linfócitos T maduros.²²

As células NK também são caracterizadas pela expressão do antígeno CD16 (FcγRIII). Este antígeno é uma glicoproteína e é o receptor de baixa afinidade para a IgG.²³ Este antígeno está envolvido num dos mecanismos de activação das células NK sendo expresso nestas células numa forma transmembranar. O CD16 é uma molécula de adesão homofílica pertencente à super família das imunoglobulinas. Este associa-se não covalentemente a homodímeros e a heterodímeros da família de moléculas de sinalização ζ, formando o complexo oligomérico do receptor das células NK que medeia a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC).²⁴ A maioria das células NK, cerca de 90%, exprimem elevados níveis de CD16, correspondendo à sub-população CD56+, as restantes 10% exprimem pouco ou não exprimem o antígeno CD16 e correspondem à população CD56+.²⁵ Como tal, a ausência de CD3 e a presença de CD56 e/ou de CD16 são os critérios correntemente usados na identificação das células NK no homem, ainda que nem o antígeno CD16 nem o antígeno CD56 identifiquem todas as células NK humanas.^{5,17}

5- Caracterização dos antígenos associados aos linfócitos T e às células NK

5.1- Antígenos de adesão e de activação

Quer as células NK quer os linfócitos T exprimem à sua superfície moléculas de adesão e de activação. Alguns destes antígenos, nomeadamente o CD2, o CD7 e o CD28 pertencem à super-família das imunoglobulinas.

A molécula de CD2 é expressa em praticamente todos os linfócitos T e em todas as células NK, nestas últimas observa-se a sua expressão em cerca de 80% das células.^{26,27} O CD2 é uma glicoproteína transmembranar do tipo I e está implicado na adesão e na activação de células T. O domínio terminal amina (domínio 1) da molécula de CD2 é semelhante à região variável da imunoglobulina e está envolvido na adesão pois medeia a ligação entre a molécula de CD2 e os antígenos CD58, CD48 e CD59. O domínio 2 também consiste num domínio imunoglobulínico e contém um epítipo relacionado com a activação que facilita a activação das células T.²⁷

A molécula de CD7 é uma glicoproteína de superfície e é um dos primeiros marcadores de diferenciação expresso nos linfócitos T imaturos. As células NK e os linfócitos T maduros também expressam CD7, sendo que cerca de 80% das células NK exprimem CD7.^{11,28} O CD7 tem um único domínio variável imunoglobulínico no terminal amina, seguido por uma região rectilínea adjacente à membrana, uma região hidrofóbica membranar e por um domínio citoplasmático de 39 resíduos.²⁸ O CD7 poderá estar envolvido na adesão e na activação dos linfócitos T e das células NK. Nas células T $\alpha\beta$, a ligação ao CD7 conduz ao rápido aumento da concentração de cálcio intracelular, induz respostas proliferativas, modula a adesão das células T e aumenta a expressão dos receptores de IL-2 e a secreção de IL-2. Nas células NK, a ligação ao CD7 induz a proliferação celular e a produção de IFN- γ e aumenta a capacidade de lisarem as células alvo e a adesão à fibronectina via integrinas $\beta 1$. Numerosos estudos *in vitro* sugerem que o CD7 desempenha um papel regulador, nomeadamente na activação dos linfócitos T e das células NK e na produção de citocinas.²⁹

Entre as diferentes moléculas de adesão conhecidas, os leucócitos exprimem quatro integrinas CD11/CD18 as quais contêm uma sub-unidade $\beta 2$ comum e sub-

unidades α distintas. As integrinas conhecidas são o “lymphocyte function associated antigen-1” (LFA-1)(CD11a/CD18), a “macrophage antigen-1” (Mac-1)(CD11b/CD18), o p150,95 (CD11c/CD18) e a recentemente descrita $\alpha\beta 2$ (o pressuposto CD11d/CD18).³⁰

O CD11a emparelhado com o CD18 e forma o heterodímero $\alpha\beta 2$ da integrina, usualmente denominado LFA-1. O LFA-1 é o principal responsável pela adesão entre leucócitos durante as respostas imunes e também intervém na transmigração endotelial dos leucócitos. Os seus ligandos são “Intracelular adhesion molecule-1” (ICAM-1)(CD54), “Intracelular adhesion molecule-2” (ICAM-2)(CD102) e “Intracelular adhesion molecule-3” (ICAM-3)(CD50).³⁰

O CD11c é expresso por mais de 80% das células NK e está praticamente ausente nos linfócitos T, onde é expresso por menos de 20% das células. Quando associado ao CD18, o CD11c forma um heterodímero $\alpha\beta 2$ da integrina, designado p150,95. Os ligandos do p150,95 são o fibrinogénio e o iC3b. Assim, este antigénio promove a aderência ao fibrinogénio e às partículas revestidas por iC3b.³¹

O CD28 é o homodímero de uma glicoproteína unido por uma ligação dissulfito, expresso na maioria dos linfócitos T. O CD28 é uma potente molécula co-estimuladora na activação de linfócitos T.^{32,33} Aquando a sua ligação observa-se um aumento da proliferação e a secreção de múltiplas citocinas, especialmente IL-2. A IL-2 liga-se aos receptores da IL-2 recém sintetizados induzindo os linfócitos T a iniciarem novo ciclo celular.^{33,34} Os ligandos do CD28 são as moléculas CD80 e CD86 presentes nas células apresentadoras de antigénios. O CD28 medeia sinais co-estimulatórios que regulam a indução da resposta antigénica dos linfócitos T, assim como previne e reverte fenómenos de tolerância. A ligação da molécula CD28 pode não ser obrigatória para a activação primária dos linfócitos T mas é essencial para a expansão *in vivo* e *in vitro*. Este antigénio é mais expresso em linfócitos CD4+ do que em linfócitos CD8+.³⁵ Contudo, a subpopulação de linfócitos CD8+ pode ser classificada de acordo com a expressão ou não de CD28. Os linfócitos CD8+ CD28+ são a única população presente no sangue do cordão umbilical e são células quer de memória quer naive. Contrariamente, os linfócitos CD8+ CD28- são células de memória, produzem TNF- α e IFN- γ e contém muita perforina e granzima A. De acordo com estas características foi proposto que as células CD8+ CD28- derivam das células CD8+ CD28+.³⁵

Nas células NK o CD28 praticamente não é expresso.³² No entanto estudos como os de Galea-Lauri pressupõem que as células NK exprimem uma variante de CD28 e que este está envolvido na activação destas células.³⁶

O HLA-DR e os restantes antigénios pertencentes ao sistema HLA desempenham um papel principal na apresentação dos antigénios processados às células T. O HLA-DR é uma região não polimórfica da molécula de HLA classe II. Este antigénio é uma glicoproteína transmembranar composta por duas sub-unidades, uma α e outra β , de respectivamente 36 e 27KDa. Apenas algumas células expressam HLA-DR constitutivamente, de que são exemplos: linfócitos B, células dendríticas, células de Langerhans e algumas células endoteliais; contudo após activação o HLA-DR também está presente à superfície dos linfócitos T e das células NK. A expressão do HLA-DR é regulada positivamente pela acção de citocinas e pelo contacto célula a célula. A principal citocina que inicia os eventos nucleares que conduzem ao aumento da expressão de HLA-DR é o IFN- γ .³⁷

5.2- Receptores de citocinas

Actualmente conhecem-se vários receptores de citocinas agrupados em cerca de seis superfamílias. Estes receptores estão envolvidos na actividade das células hematopoiéticas. Os receptores da IL-2 e o CD117 desempenham importantes papéis na diferenciação e activação de linfócitos T e de células NK.³⁸

O receptor de alta afinidade da IL-2 é um heterotrímero constituído por três glicoproteínas: cadeia α (CD25)(p55), cadeia β (CD122)(p75) e cadeia γ (CD132)(p64) (Fig. 4). A cadeia α funciona apenas como um componente de ligação não possuindo a capacidade de transduzir sinais.³⁹⁻⁴³ Quando expresso isoladamente, o CD25 apresenta baixa afinidade para a IL-2, tal como o CD132.^{39,43} Aparentemente a única sub-população de linfócitos que exprime constitutivamente o receptor de elevada afinidade para a IL-2 são as células NK CD56++. Estas células em presença de baixas doses de IL-2 apresentam uma elevada resposta proliferativa, observando-se a sua expansão *in vivo* e *in vitro*.¹⁰ As células NK CD56+ só exprimem o receptor de alta afinidade de IL-2 após indução e mesmo assim pouco proliferam em resposta a doses elevadas de IL-

2.¹⁰ Os linfócitos T quando activados exprimem a cadeia α (CD25), que se associada às cadeias β (CD122) e γ (CD132) formará o receptor de elevada afinidade da IL-2.²⁰

Todas as células NK, CD56⁺⁺ e CD56⁺, exprimem o receptor de afinidade intermédia da IL-2, IL-2R $\beta\gamma$.¹⁰ Este receptor é composto pelo CD122 (IL-2R β) e pelo CD132 (IL-2R γ). O CD122 pertence à família dos receptores de citocinas, contribui para o aumento da afinidade receptor/IL-2 e sinaliza a transdução para o crescimento celular. A expressão de CD122 observa-se em vários tipos de células, como por exemplo células NK, linfócitos T e B, monócitos, macrófagos, sendo esta expressão aumentada por estímulos extracelulares: mitogénios e antigénios.⁴⁴ Contudo o receptor de afinidade intermédia da IL-2, apenas é expresso constitutivamente pelas células NK e pelos linfócitos T com morfologia de linfócito grande granular (LGG).⁵ Nas células NK a saturação do receptor de afinidade intermédia da IL-2, com elevadas concentrações de IL-2 (1 a 10 nM), traduz-se num aumento da actividade citotóxica destas células mas não conduz à sua proliferação.⁴⁵

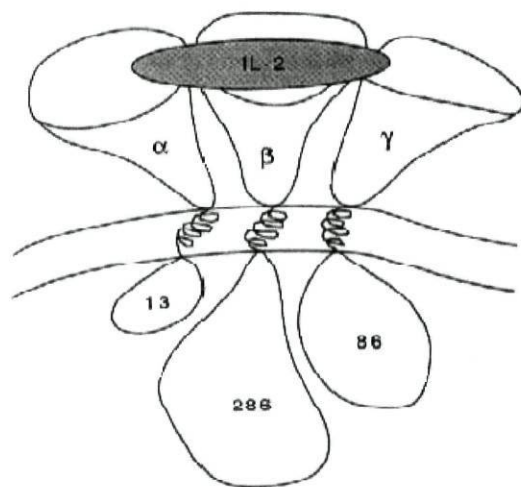


Fig. 4- Esquema da ligação da IL-2 ao seu receptor de alta afinidade. Adaptado de Smith KA, et al. Lowest dose interleukin-2 immunotherapy. Blood 1993;81:1414-23.

O c-kit, ou CD117 é um receptor da família das cinases da tirosina. Este antigénio está presente nas células progenitoras da medula óssea, estando praticamente ausente nas células maduras.^{46,47} As células NK CD56⁺⁺ exprimem este receptor, cuja ligação ao ligando do c-kit (KL) aumenta a proliferação induzida pela IL-2.¹⁰ Já as células NK CD56⁺ não exprimem c-kit e praticamente não proliferam em presença de

doses elevadas de IL-2.¹⁰ Esta evidência corrobora a hipótese das células CD56++ serem menos diferenciadas que as CD56+ e de talvez serem suas precursoras.⁴⁵

Estudos em células isoladas da medula óssea, CD34+, referem que a IL-2 estimula a diferenciação da linhagem NK, embora conduza a uma diminuta proliferação. A acção conjunta da IL-2 com o KL, contrariamente, resulta na elevada expansão das células NK sem contudo induzir diferenciação.⁴⁷ O KL quando em combinação com a IL-15 conduz a uma significativa expansão das células NK a partir das células hematopoiéticas progenitoras CD34+, mas sozinho não afecta a diferenciação das células NK.⁴⁸

5.3- Antígenos de linhagem NK

O termo “receptores de células NK” refere-se, vulgarmente, ao conjunto de receptores de estimulação e de inibição expressos pelas células NK, mas nalguns casos estes receptores também são expressos noutros tipos de células.^{49,50} Os mecanismos através dos quais as células NK reconhecem uma célula alvo, e a subsequente activação ou inibição da sua actividade citolítica, são complexos e não inteiramente conhecidos. A ligação das moléculas de MHC classe I aos receptores NK (NKR) é crucial para a distinção entre células normais e células transformadas ou estranhas ao organismo. Existem NKRs que desempenham funções inibidoras e outros com funções estimuladoras.⁵¹⁻⁵⁴ Até à data, nos humanos, reconhecem-se três super-famílias de NKRs: a super-família dos receptores de células “killer” semelhantes às imunoglobulinas (KIR), a super-família das lecitinas tipo C (KLR) e a família dos receptores de citotoxicidade natural (NCRs).¹⁰

Os KIR são glicoproteínas de membrana de tipo II e reconhecem as moléculas de HLA-A, HLA-B e HLA-C, são exemplos destes receptores o CD158a e o NK β 1.¹⁰ Os KIR podem ser divididos de acordo com o número de domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulinas que possuem, dois (p58) e três (p70 e p140), assim como pela actividade que desempenham, activação ou inibição.⁵⁵

Os KLR são glicoproteínas de membrana do tipo II.⁵⁵ Nesta super-família estão incluídos os receptores CD69, CD94, CD161 e NKG2. Estes receptores estão implicados no reconhecimento do HLA-E.^{10,56}

Os ligandos para a família dos NCRs ainda se desconhecem. Recentemente foram descritas outras classes de NKRs sendo uma das quais os transcritos semelhantes às imunoglobulinas (ILTs).^{10,57}

Apesar da heterogeneidade estrutural das distintas famílias de NKRs os mecanismos pelos quais induzem a activação ou a inibição da função citotóxica das células NK são comuns. Assim, os receptores de inibição possuem dois “tyrosine-based inhibition motifs” (ITIM) na porção citoplasmática. Após a ligação do receptor à célula alvo os resíduos de tirosina do ITIM são fosforilados e recrutam as fosfatases SHP1 e ou SHP2 as quais são responsáveis pela inibição da actividade NK. Os NKRs de activação actuam via um péptido transdutor associado, KARAP/DAP-12, o qual é caracterizado por um “tyrosine based activation motif” (ITAM) intracitoplasmático.^{55,58,59}

A molécula de CD158a pertence à família dos KIRs e é uma glicoproteína transmembranar, com duas cadeias semelhantes a imunoglobulinas de 50 e 58 kDa. É expressa nas células NK e em alguns linfócitos T e medeia a activação ou a inibição da função citolítica, consoante as cadeias envolvidas, após a ligação a moléculas HLA-C das células alvo.^{60,61} A molécula de 58 kDa possui, na sua porção citoplasmática, um ITIM, estando por isso relacionada com fenómenos inibitórios da função citolítica. Em contraste, a molécula de 50 kDa apresenta um domínio citoplasmático pequeno, sem ITIM, e aquando a ligação com os seus ligandos conduz à activação dos mecanismos citotóxicos das células onde se encontra presente.⁶²

O NK β 1 é uma glicoproteína de 70 kDa e possui três domínios imunoglobulínicos na porção extracelular. Este antigénio é um NKRs e pertencente à super-família das imunoglobulinas (KIR). Observa-se a sua expressão em algumas células NK e numa pequena fracção de linfócitos T. O NK β 1 interage com moléculas de HLA-B, com o epítipo Bw4, das células alvo e inibe a citotoxicidade celular possivelmente pela transmissão de sinais negativos.^{63,64}

O CD69 é um dos primeiros antigénios de superfície adquirido durante a activação dos linfócitos. A sua expressão é induzida numa grande variedade de células hematopoiéticas como linfócitos T activados e B, células NK, neutrófilos e eosinófilos e é expresso constitutivamente em timócitos maduros, monócitos e plaquetas. O CD69 é uma proteína integral do tipo II, constituída por duas cadeias unidas por ligações dissulfito e pertence à super-família do tipo C-lecitinas. A expressão do CD69 é

regulada pelo TNF- α e pode ser induzida nos linfócitos T pela trombina.⁶⁵ Nas células NK, o CD69 é rapidamente expresso após activação e induz a proliferação celular via tirosina cinase e medeia a activação da actividade citolítica.^{65,66} Uma vez expresso nos linfócitos T, o CD69 funciona como uma molécula co-estimuladora induzindo a proliferação e a citotoxicidade celular.⁶⁶ A expressão de CD69 nos linfócitos T é muito precoce e medeia a selecção positiva de linfócitos CD4+ e de linfócitos CD8+.⁶⁷ Borrego et al, descreveram o envolvimento do CD69 na produção de TNF- α e na expressão de outros antígenos de activação como o CD25 e CD54 através de um mecanismo dependente da mobilização de cálcio. Também demonstraram que a citotoxicidade mediada pelo CD69 pode ser inibida pelo receptor do CD94.⁶⁶

O antígeno CD94 é selectivamente expresso nas células NK e num pequeno número de linfócitos T, CD8+/ $\alpha\beta$ + ou $\gamma\delta$ +.^{68,69} O antígeno CD94, uma proteína de 25 kDa, forma complexos com glicoproteínas de 43 ou 39 kDa através de ligações covalentes. O heterodímero CD94/p43 forma o receptor responsável pela inibição da actividade citolítica das células NK enquanto que o heterodímeros CD94/p39 induz a activação dos mecanismos citotóxicos. A NKG2A e o NKG2B são algumas das moléculas p43 e o NKG2C e o NKG2E são exemplos de moléculas p39.^{24,70-72} A ligação do receptor CD94 aumenta a proliferação das células NK CD56++ em resposta à IL-2 e à IL-15, contudo nas células CD56+ a ligação deste receptor não se traduz no aumento da resposta proliferativa. Também a produção de IFN- γ é estimulada nas células NK CD56++ pela ligação do receptor CD94 em presença de IL-2, não se verificando este efeito nas células NK CD56+.²⁴

O antígeno CD161 (ou NKR-P1A) é uma glicoproteína de membrana tipo II com propriedades características das lecitinas tipo C (KLR). Apresenta-se na forma de um homodímero de duas cadeias, p40 e p44, unidas por duas ligações dissulfito. Este antígeno é expresso sobretudo em células NK maduras, embora esteja presente em alguns linfócitos CD4+ ou CD8+ e ainda numa porção de linfócitos TCR $\gamma\delta$.⁷³ Resultados preliminares indicam que o CD161, em algumas células NK, poderá regular a actividade citolítica induzida pelos receptores p50 (CD158a). O mecanismo pelo qual estes receptores regulam a activação das células NK ainda é desconhecido, mas observou-se que a ligação do CD161 conduz à mobilização de cálcio intercelular e ao influxo de cálcio extracelular, sugerindo o envolvimento de proteínas com ligação à

guanósina trifosfato.⁷³ Também Cerny et al relataram que a ligação do CD161 induz a fosforilação da tirosina indicando o possível papel das cinases da família Src.⁷³

As sub-populações de células NK apresentam distintas expressões de alguns NKR's como KIRs, heterodímero CD94-NKG2A e ILT-2. As células NK CD56++ não exprimem ou exprimem poucos KIRs e ILTs e expressam muito CD94-NKG2A, verificando-se o contrário para as células NK CD56+.²⁵

Para além dos receptores NK estas células exprimem outros receptores tais como o CD57 e enzimas associados à função citotóxica. O CD57 é o determinante carbohidratado sulfatado de um glicoproteína das células neuronais.⁷⁴ O antígeno CD57 foi usado no passado como um marcador de células NK. Este antígeno é expresso em apenas 50 a 60% das células NK periféricas e só 50% dos linfócitos periféricos que o exprimem são células NK, sendo os restantes 50% linfócitos T.¹¹ A maior parte destes linfócitos T são CD8+ e uma pequena parte são linfócitos CD4+/CD45RO. Em alguns modelos animais, provou-se a intervenção do CD57 em fenómenos de adesão célula a célula, contudo as principais funções mediadas por este antígeno são ainda desconhecidas.⁷⁵

As células com características de linfócitos grande granulares, de que são exemplos alguns linfócitos T e células NK, possuem grânulos citosólicos. Estes grânulos contêm moléculas com capacidade citolítica como: perforina, granzima A e granzima B. A granzima B é uma protease e é a principal responsável pela indução da fragmentação do DNA das células alvo nos processos citotóxicos mediados pelas células NK e pelos linfócitos T. Esta granzima quebra membros da família ICE/ced3 da protease da cisteína iniciando uma cascata apoptótica. A granzima B e a granzima A actuam em sinergismo observando-se o aumento das respectivas actividades citolíticas e nucleolíticas quando presentes concomitantemente.⁷⁶⁻⁷⁹

6- Citotoxicidade mediada por linfócitos T e por células NK

As populações de linfócitos citotóxicos (LC), compostas pelos linfócitos T citotóxicos (LTC) e pelas células NK, desempenham um papel crucial na defesa do organismo. Os principais alvos dos linfócitos citotóxicos são células tumorais do próprio ou células que foram infectadas por patogénicos intracelulares. Quer os LTC, quer as células NK, utilizam os mesmos mecanismos líticos, no entanto, desenvolveram diferentes estratégias para o reconhecimento das células alvo.⁸⁰

Os LC apresentam como característica comum a presença de grânulos citosólicos. Estes grânulos são constituídos por diferentes componentes, de que são exemplos a perforina, proteína formadora de poros de estrutura semelhante às proteínas do complemento, e as granzimas, pertencentes à família das esterases da serina. O mecanismo pelo qual os linfócitos citotóxicos lisam as células alvo está já estabelecido. Inicialmente ocorre a estabilização da ligação célula citotóxica/célula alvo conseguida através de moléculas de adesão expressas à superfície celular dos LC, de que são exemplos o LFA-1 (CD11a/CD18) e CD2.¹¹ Após a conjugação do linfócito citotóxico com a célula alvo, os grânulos citoplasmáticos orientam-se para o local da célula onde ocorreu essa ligação. Uma fracção desses grânulos é excitada e o seu conteúdo lítico atinge as células alvo. Neste ponto, o linfócito pode separar-se da célula e actuar noutra alvo e o processo lítico prossegue por acção do conteúdo dos grânulos (Fig. 5). A perforina polimeriza na membrana celular da célula alvo e origina a formação de poros que alteram o equilíbrio osmótico pois permitem a entrada de água e iões para o citosol da célula alvo provocando o seu entumescimento e posterior lise. As granzimas desencadeiam uma cascata de caspases que culminam na degradação do ADN, num processo similar ao ocorrido no fenómeno apoptótico induzido pela ligação ao Fas.⁷⁶

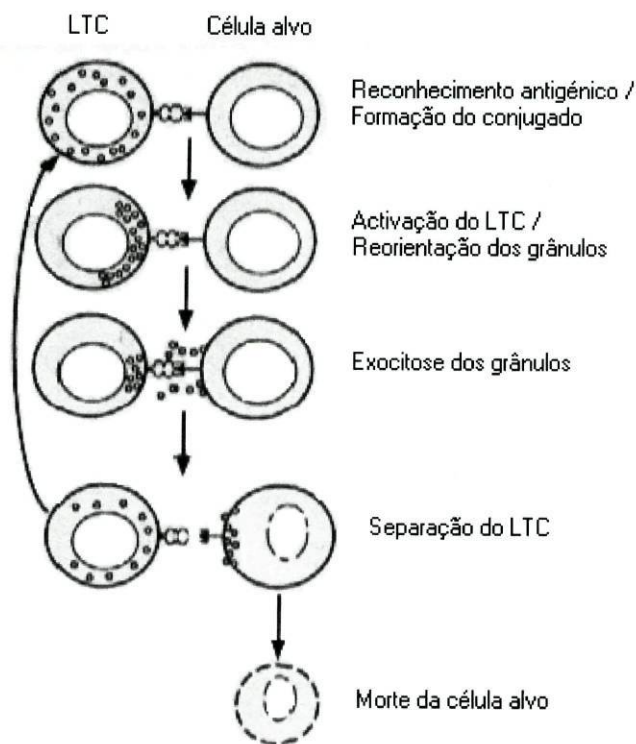


Fig. 5- Esquema do reconhecimento e da lise das células alvo pelo LTC. Adaptado de Clayberger C, Krensky AM. T-cell immunity. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, et al, editors. Hematology, basic principles and practice. 3th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 90-100.

Os linfócitos T citotóxicos também expressam ligandos do Fas podendo accionar a apoptose por esta via, mas o processo via exocitose granular ocorre preferencialmente.⁹ A ligação ao Fas induz a trimerização das moléculas Fas presentes à superfície das células alvo, o que as leva a associarem-se com uma molécula transdutora que recruta e activa a caspase 8 ou 10. As moléculas de Fas (CD95) são um tipo de receptores do TNF (“tumor necrosis factor”) assim como o são os TNFR-1 (CD120a). Este último tipo de receptores acciona a apoptose de modo idêntico ao receptor Fas, o TNF libertado pelos linfócitos liga-se ao TNFR-1 provocando a sua trimerização. Posteriormente estes receptores associam-se com proteínas adaptadoras que desencadeiam a cascata de caspases.⁸¹

Recentemente foi caracterizada uma nova população de linfócitos T citotóxicos, as células NKT. Estas células são caracterizadas pela expressão do rearranjo TCRV α 24JQ e de NK1.1, e podem exprimir CD4 ou CD8.⁸² A sua acção é

independente do MHC e exercem actividade citotóxica quer via ligando Fas (CD178) quer pelo mecanismo dependente da perforina.⁸³

O reconhecimento das células alvo pelas células NK pode ser realizado de dois modos distintos. As células NK têm a capacidade de reconhecer anticorpos e de assim accionarem um mecanismo denominado ADCC. Uma vez estabelecida a ligação IgG-CD16 o mecanismo citotóxico dependente da perforina e das granzimas é iniciado através da activação de ITAM.⁸¹ As células NK CD56++ exprimem pouco CD16 e como tal a citotoxicidade dependente de anticorpos é menor que nas células NK CD56+, que exprimem muito CD16.

Uma segunda forma das células NK reconhecerem as células alvo é através da diferente expressão de moléculas de MHC classe I por parte das células alvo, de facto, as células NK possuem na sua superfície os NKRs que interactuam com epítomos de MHC classe I. Algumas destas moléculas quando reconhecem esses epítomos enviam sinais negativos à célula, impedindo o fenómeno de citotoxicidade, são os denominados receptores de inibição. Assim se uma célula não exprimir ou exprimir moléculas de MHC classe I diferentes das células do organismo, a ligação com os receptores de inibição não se desencadeará, accionando-se o mecanismo citotóxico. As células NK possuem diversos receptores de inibição, sendo suficiente a não ligação de um destes para accionar todo processo. Outras moléculas, após o reconhecimento do MHC enviam sinais positivos, são os receptores de activação. Estas moléculas recrutam tirosinas cinases conduzindo à activação do fenómeno citotóxico. Até ao momento desconhece-se como é regulado o balanço activação/inibição, particularmente como actua o HLA-C, uma vez que se pode ligar quer a receptores de activação quer a receptores de inibição presentes numa mesma célula NK.^{81,84}

A evolução dotou-nos de duas populações de linfócitos citotóxicos que medeiam funções semelhantes, linfócitos T citotóxicos e células NK. Contudo os mecanismos que as activam são distintos e como tal desempenham as suas acções em estádios diferentes da resposta imune. As células NK respondem mais rapidamente que os linfócitos T pois não necessitam de reconhecer antigénios, logo constituem a primeira linha de defesa do organismo a agentes estranhos, controlando a infecção até o iniciar da acção dos linfócitos T. A acção destes últimos, embora demore alguns dias a exercer-se apresenta elevada especificidade.

7- Transplantação hematopoiética e imunoterapia com IL-2

O transplante autólogo de progenitores hematopoiéticos, de medula óssea ou de sangue periférico, é realizado em doentes com hemopatias malignas, uma vez que permite a recuperação hematológica após a administração de quimioterapia de alta dose. Este tipo de transplantes são uma alternativa aos transplantes alogénicos, com as vantagens de terem uma maior aplicabilidade, não necessitam de dador compatível e a idade limite aconselhada é maior, além de estarem associados a uma menor mortalidade.⁸⁵⁻⁸⁷ As células progenitoras do sangue periférico (CPSP) utilizadas em transplantes autólogos e alogénicos são mobilizadas com factores de crescimento como por exemplo o “Granulocyte Colony Stimulation Factor”(G-CSF), e são colhidas por aferese antes do condicionamento mieloblástico. O número de transplantes autólogos de CPSP têm aumentado nos últimos anos pois verifica-se uma recuperação hematológica mais rápida do que a obtida com células progenitoras de medula.^{85,86} Apesar da instituição da terapêutica de alta dose, as taxas de recaídas dos transplantes autólogos são mais elevadas do que as observadas para os alogénicos, pois o próprio enxerto poderá conter células tumorais.⁸⁷⁻⁸⁹ Assim foram desenvolvidos protocolos experimentais de imunoterapia tendo em vista a eliminação da doença residual mínima (DRM) e o aumento da eficácia do tratamento.⁸⁹ A IL-2 é um dos agentes imunomoduladores mais testado e com sucessos comprovados em tumores sólidos e em doenças hematológicas, como leucemias agudas, linfomas não Hodgkin, doença de Hodgkin e mielomas múltiplos.^{88,90,91} A estimulação das CPSP *in vitro* com IL-2 poderá gerar efectores anti-tumorais citotóxicos os quais quando re-infundidos poderão mediar efeito enxerto contra tumor (GVT).⁹²

A IL-2 foi o primeiro modificador da resposta biológica licenciado como droga anti-tumoral.^{43,93} Esta interleucina é uma glicoproteína de 15,5 kDa produzida por linfócitos T activados e é responsável pela proliferação, pela produção de citocinas (são exemplos IFN- γ , TNF- α e a IL-1) e pelas actividades citolíticas das células T e NK.^{94,95}

A incubação de linfócitos *in vitro* com IL-2 origina células citotóxicas denominadas células LAK (“lymphokine activated killer”). Estas células possuem a capacidade de lisar células tumorais por um mecanismo não dependente do MHC. Aquando o seu aparecimento *in vitro* a partir de CPSP autólogas, erradicam as células tumorais.⁹⁶ A infusão de IL-2 *in vivo* mantém a actividade destas células, continuando a

sua função anti-tumoral a exercer-se, permitindo a eliminação da doença residual após o transplante.⁹⁶

As células NK são também, importantes efectoras na resposta imune contra as células tumorais residuais pós transplante. A cultura, por um curto período de tempo, destas células com IL-2, na ausência de outros estímulos traduz-se no rápido aumento da sua actividade citolítica.¹¹ Aparentemente, após o contacto com a IL-2, as células NK alteram a especificidade para com as células alvo, pois verifica-se que estas células lisam eficazmente células resistentes à acção de células NK não estimuladas.¹¹ No que respeita à indução da proliferação das células NK pela IL-2 os resultados obtidos por diferentes grupos nem sempre são concordantes. Alguns observaram um aumento do número de células NK após a incubação com IL-2^{97,98} e outros não,⁹⁹ dependendo das condições em que se processa a incubação como o tempo de incubação, a concentração de IL-2 e a presença de outras citocinas.

OBJECTIVOS

OBJECTIVOS

A Unidade de Transplante de Medula em colaboração com o Serviço de Imuno-Hemoterapia do IPO-Porto desenvolveram o projecto “Imunoterapia com interleucina-2 após transplantação de progenitores hematopoiéticos periféricos autólogos activados por interleucina-2 em doentes com hemopatias malignas”. Este projecto foi aprovado pela Comissão de Ética do referido centro e foi subsidiado pela Lusotransplante. Neste, foi proposto avaliar o efeito da IL-2 *in vitro* e *in vivo* na reconstituição hematopoiética e a toxicidade relacionada com o tratamento em doentes com hemopatias malignas de mau prognóstico submetidos a autotransplante.

O presente trabalho está integrado no projecto acima referido e o principal objectivo foi avaliar as alterações fenotípicas de linfócitos T e de células NK e respectivas sub-populações CD56++ e CD56+ das CPSP após a estimulação *in vitro* com IL-2. Para tal estudamos, nas citadas células dos dadores e dos doentes, a expressão de um conjunto de antígenos tais como: moléculas de adesão e de activação, receptores de citocinas e antígenos de linhagem NK.

Numa primeira abordagem caracterizaram-se fenotipicamente as referidas células dos sangues periféricos dos dadores e dos doentes com o intuito de definir a expressão dos antígenos seleccionados em cada um dos grupos.

Com estas determinações pretendíamos:

- Comparar, entre os grupos, a expressão antigénica das células dos sangues periféricos e das CPSP.
- Compreender as diferenças entre as células dos sangues periféricos e as CPSP dos doentes, possivelmente induzidas pela mobilização com G-CSF.
- Avaliar o efeito da IL-2 no fenótipo das CPSP em ambos os grupos.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Grupos estudados

Neste trabalho estudaram-se três grupos distintos: “dadores de sangue periférico”, “dadores de CPSP” e “doentes”. O grupo “doentes” consistiu num conjunto de oito indivíduos com hemopatias malignas, seleccionados segundo os critérios definidos no projecto “Imunoterapia com interleucina-2 após transplantação de progenitores hematopoiéticos periféricos autólogos activados por interleucina-2, em doentes com hemopatias malignas” descrito em anexo (Anexo I). Neste grupo avaliaram-se os sangues periféricos pré-transplante, colhidos antes do início do condicionamento, as CPSP pré-incubação com IL-2 e as CPSP após incubação com IL-2, de ressaltar dois doentes, nos quais apenas se estudaram as referidas CPSP.

No grupo “dadores de CPSP” analisaram-se as CPSP antes e após a incubação com IL-2, este grupo foi constituído por 8 indivíduos saudáveis, dadores de CPSP para alotransplante. Este grupo funcionou como grupo controlo e foram utilizadas CPSP obtidas após descongelamento de colheitas de dadores para controlo de qualidade.

O grupo “dadores de sangue periférico” consistiu em 11 dadores voluntários do Banco de Sangue do IPO-Porto. Foram estudadas as primeiras dádivas dos referidos indivíduos.

2- Processamento das CPSP

2.1- Mobilização e Colheita

As CPSP foram mobilizadas para o sangue periférico pelo G-CSF, aos doentes foi administrada uma dose de 10 µg/kg/dia e aos dadores uma dose de 12 µg/kg/dia. A partir do quinto dia de mobilização e durante três dias consecutivos, procedeu-se à colheita das CPSP por citaferase (COBE-Spectra, Hemoportugal) de forma a obter um número mínimo de 4×10^6 células CD34+ por kg peso do doente (segundo protocolos instituídos no IPO-Porto, Serviço de Imuno-Hemoterapia/Unidade de Transplantes de Medula).

O condicionamento e o transplante foram conduzidos segundo o protocolo descrito em anexo (Anexo I).

2.2.- Criopreservação

As CPSP foram criopreservadas até ao dia da sua utilização. Assim, foram diluídas a uma concentração de 100 a 200×10^6 leucócitos/ml num meio de albumina humana (Albumina Humana 5%, Octapharma) com uma concentração final de 10% de DMSO (B BRAUN). Utilizaram-se sacos de congelação (Gambro). Imediatamente após, foram submetidos a uma congelação programada num congelador programável (Planer Kryo 10, LINDE SOGÁS) e foram colocados em tanques de azoto líquido a -190°C .

2.3- Activação das CPSP com IL-2

Antes do transplante, as CPSP foram incubadas com IL-2 por um período de 24 horas, numa estufa a 37°C a 5% de CO_2 . Para tal, no dia -1 do transplante parte das

CPSP foram descongeladas (geralmente 2/3, a restante permanece congelada como reserva) e foram rapidamente diluídas em meio X-VIVO (BIO-WHITTAKER) suplementado com L-glutamina) (200mM, 10ml/1l) (GIBCO™, Alfacene) e heparina (50U/ml) (Heparina Leo, Leo Pharmaceutical Products). A concentração celular foi ajustada para valores compreendidos entre 5×10^6 e 10×10^6 cel./ml e a IL2 (PROLEUKIN, CHIRON) foi adicionada de forma a obter 1000 UI/ml.

No grupo dos doentes, utilizaram-se sacos de 3l (Lifecell, BAXTER), no grupo dos dadores de PBPC como se tratava de uma escala experimental, usaram-se sacos de 500 ml (Lifecell, BAXTER).

No grupo dos doentes, no final da incubação, procedeu-se ainda à concentração celular por métodos semi-automáticos num processador celular (COBE 2991) até um volume de 300 a 500ml, de forma a obter um volume passível de ser infundido.

Foram retiradas alíquotas das culturas para contagem celular e imunofenotipagem.

3- Imunofenotipagem

Neste trabalho avaliou-se a expressão de diferentes marcadores celulares em linfócitos T e em células NK. Na imunofenotipagem utilizou-se o método de lise eritrocitária e lavagem e as células foram marcadas com quatro combinações de anticorpos monoclonais conjugados com diferentes fluorocromos.

As marcações dos sangues periféricos foram efectuadas num período de 24 horas após a colheita e as marcações das CPSP realizaram-se imediatamente após a descongelação e no final da incubação com IL-2.

Quadro 1 - Combinações de anticorpos monoclonais utilizados na imunofenotipagem e respectivos volumes usados.

FITC	Vol.	Clone	PE	Vol.	Clone	PC5	Vol.	Clone	APC	Vol.	Clone
CD7 ²	5	DK24	CD2 ²	5	MT910	CD56 ⁷	4	N901	CD3 ¹	3	SK7
CD57 ¹	10	HNK-1	CD11c ⁸	10	BU15	CD56 ⁷	4	N901	CD3 ¹	3	SK7
CD94 ³	10	HP-3D9	NK β 1 ¹	10	DX9	CD56 ⁷	4	N901	CD3 ¹	3	SK7
CD158a ¹	10	HP-3E4	CD161 ¹	10	DX12	CD56 ⁷	4	N901	CD3 ¹	3	SK7
CD11a ⁸	10	25.3.1	HLA-DR ¹	10	L243	CD56 ⁷	4	N901	CD3 ¹	3	SK7
CD16 ⁴	10	JK.32	CD69 ¹	10	L78	CD56 ⁷	4	N901	CD3 ¹	3	SK7
CD117 ⁵	10	NU-ckit	CD25 ¹	10	2A3	CD56 ⁷	4	N901	CD3 ¹	3	SK7
CD122 ⁶	10	MIK- β 1	CD3 ²	10	UCHT1	CD56 ⁷	4	N901	CD45 ¹	5	2D1
CD45 ¹	10	2D1	CD34 ¹	10	My10	CD19 ^{*1}	10	SJ25C1	CD3 ¹	3	SK7
CD4 ²	5	MT310	CD28 ¹	10	L293	CD8 ^{**1}	10	SK1	CD3 ¹	3	SK7
CD122 ⁶	10	MIK- β 1	CD25 ¹	10	2A3	CD4 ^{*1}	10	SK3	CD8 ¹	5	SK1
CD94 ³	10	HP-3D9	Granz. B ⁶	5	GB11	CD56 ⁷	4	N901	CD3 ¹	3	SK7

Legenda: FITC- fluoresceína, PE- ficoeritrina, PC5- ficocianina, APC- alofocianina, *- PerCP Cy5.5, **- PerCP.1- Becton Dickinson, 2- Dako, 3- Pharmingen, 4- Immune Source, 5- Cytognos, 6- CLB, 7- Immunosort, 8- Immunotech. Vol.- Volume em μ l.

3.1- Técnica de Marcação

Os volumes de anticorpo monoclonal mencionados no Quadro 1 referem-se aos volumes utilizados na marcação de 5 a 10×10^5 células. Após a adição dos respectivos anticorpos monoclonais, as células permaneceram a temperatura ambiente no escuro,

por um período de 15 minutos, de forma a garantir a completa ligação do anticorpo à superfície celular. De seguida, foram sujeitas, durante 10 minutos e nas mesmas condições de temperatura e obscuridade, à acção de um reagente de lise de eritrócitos, FACS™ *Lysing Solution* (2 ml)(BD- ENZIfarma). Decorrido este tempo, as células foram centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos e os sobrenadantes foram rejeitados, garantindo desta forma a completa remoção dos anticorpos não ligados. Finalmente fixaram-se as células com 300 µl de CELLFix™ (BD- ENZIfarma).

Para a marcação intracitoplasmática com granzima B, após a incubação com os restantes anticorpos (CD94, CD56 e CD3) e da lise dos eritrócitos, as células foram permeabilizadas com 100 µL de meio de fixação (solução A; Caltag Laboratories) durante 15 minutos, no escuro, a temperatura ambiente. Seguiu-se uma lavagem com FACSSlow (BD- ENZIfarma), centrifugação a 1500 r.p.m. durante 5 minutos, e rejeição do sobrenadante. As células foram então, ressuspensas em 100 µl de meio de permeabilização (solução B; Caltag Laboratories) e incubadas com o anticorpo granzima B durante 15 minutos. Findo este tempo, procedeu-se a uma lavagem com FACSSlow e à fixação com CELLFix™ (como descrito anteriormente).

3.2- Citometria de fluxo

3.2.1- Aquisição

A avaliação da expressão dos marcadores celulares foi realizada por citometria de fluxo. Utilizou-se um FACS Calibur (BD- ENZIfarma) equipado com dois lasers, um de Árgon e outro de Néon, o que permitiu a visualização simultânea de quatro fluorescências. O software usado na aquisição das amostras foi o CELLQuest 3.3 (BD- ENZIfarma).

Para cada amostra adquiriram-se 90000 eventos do total de células, garantindo assim a representatividade de cada uma das populações estudadas: linfócitos T, células NK, CD56++ e CD56+.

3.2.2- Análise

A análise da expressão dos antígenos foi efectuada no programa PAINT-A-GATE™ PRO 3.0.0 (BD- ENZIfarma). As diferentes populações estudadas foram seleccionadas por sucessivas regiões. De seguida, referem-se as estratégias utilizadas para o estudo de cada população.

3.2.2.1- Análise das populações leucocitárias

Com a combinação CD45/CD34/CD19/CD3 pretendia-se, por um lado seleccionar os leucócitos através da expressão de CD45 e assim eliminar restos celulares e garantir uma maior pureza nas regiões analisadas, e por outro lado determinar as percentagens de linfócitos T (CD3+) e B (CD19+), e de células progenitoras (CD34+). No “dot plot” CD45/”Side Scatter” (CD45/SSC) fez-se uma região nas células CD45 positivas, nesta região, no “dot plot” “Forward Scatter”/”Side Scatter” (FSC/SSC) seleccionou-se a região dos linfócitos e nesta região avaliou-se a expressão de CD34, CD19 e CD3 (Fig. 6).

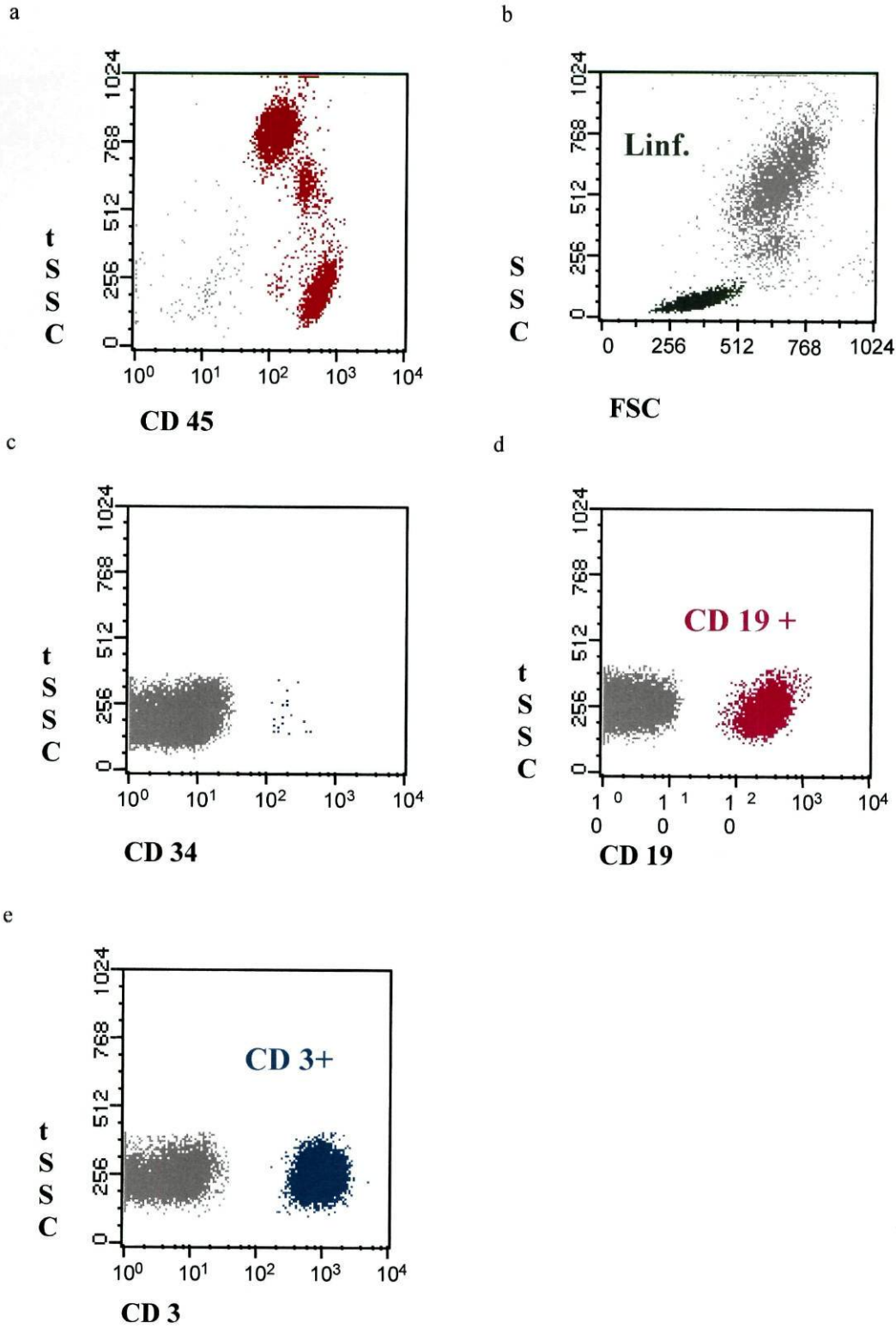


Fig. 6- Exemplo da análise sequencial realizada para o estudo das populações leucocitárias. a) Seleção das células CD45+. b) Região dos linfócitos. c) Seleção das células CD34+. d) Seleção das células CD19+. e) Seleção das células CD3+.

3.3.2.2- Análise dos linfócitos T

A população de linfócitos T foi identificada pela expressão de CD3. Assim, no “dot plot” FSC/SSC seleccionou-se a região dos linfócitos (Fig. 7.a), nesta região e já no “dot plot” CD3/SSC fez-se uma nova região nas células CD3 positivas (Fig. 7.b), de forma a poder estudar a expressão dos restantes marcadores celulares.

Nas células marcadas com a combinação CD122/CD25/CD4/CD8, não se caracterizou a população de linfócitos T baseada na expressão de CD3, mas sim na expressão de CD4 e de CD8. Efectuou-se uma região na região dos linfócitos (FSC/SSC), e nesta região, no “dot plot” CD4/SSC seleccionaram-se as células CD4 positivas e no “dot plot” CD8/SSC seleccionaram-se as células CD8 positivas, sendo depois avaliada a expressão de CD122 e de CD25 em cada uma das sub-populações CD4 e CD8.

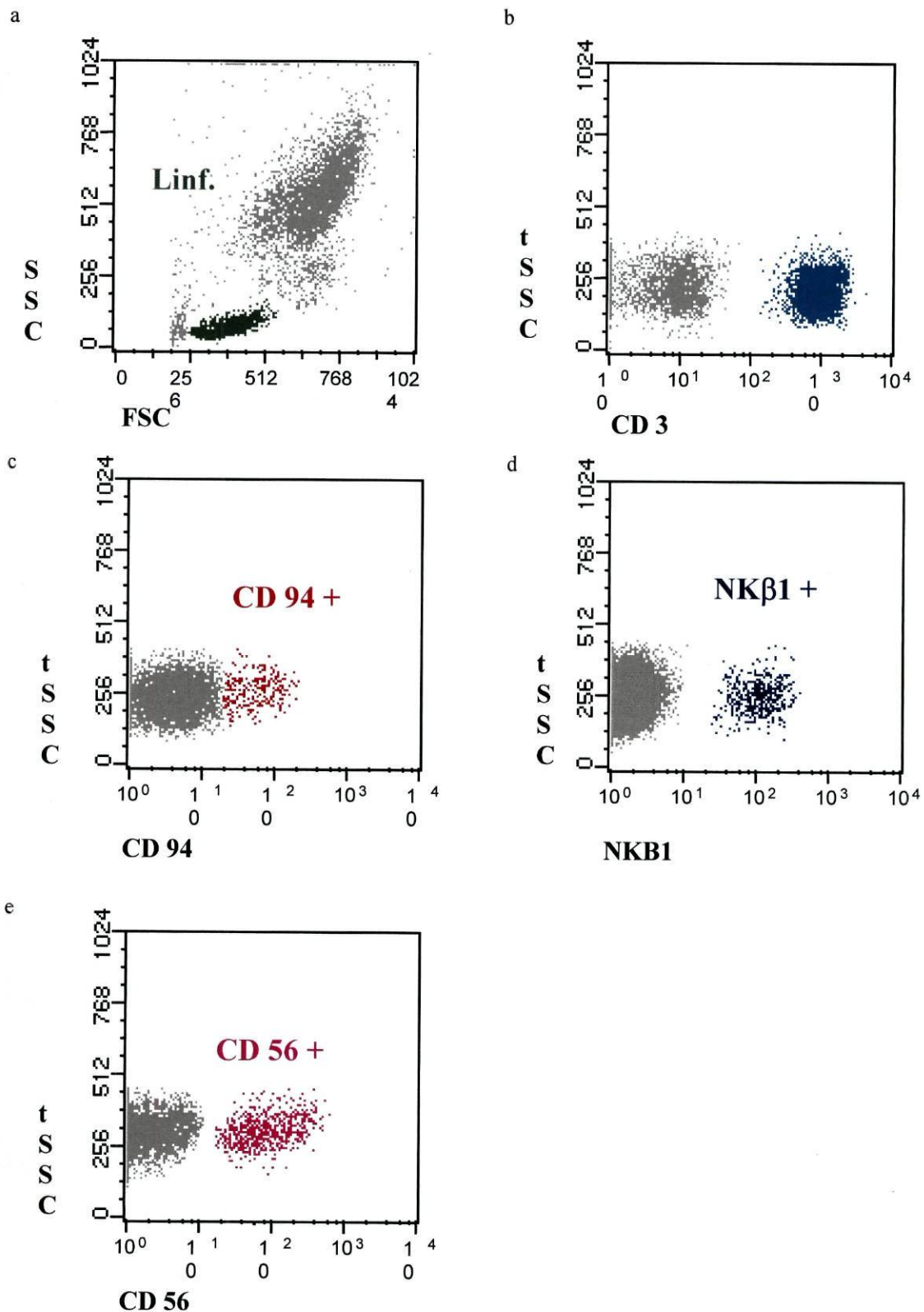


Fig. 7- Exemplo da análise sequencial realizada para o estudo dos linfócitos T. a)- Região dos linfócitos. b)- Seleção das células CD3+. c)- Seleção das células positivas para FL1, neste caso as células CD94+. d)- Seleção das células positivas para FL2, neste caso as células NKβ1+. e)- Seleção das células positivas para FL3, neste caso as células CD56+.

3.3.2.3- Análise das células NK

As sub-populações de células NK, foram identificadas pela não expressão de CD3 e pela intensidade de expressão, forte e fraca, de CD56, respectivamente CD56++ e CD56+. Então, definiu-se a região dos linfócitos no “dot plot” FSC/SSC (Fig 8a), nesta região no “dot plot” CD3/SSC escolheram-se as células negativas para CD3 (Fig. 8b). Já no “dot plot” CD56/SSC seleccionaram-se as células positivas para CD56, entre estas definiram-se duas regiões, as células NK CD56++ (expressam CD56 com muita intensidade) e as células NK CD56+ (expressam CD56 com pouca intensidade) (Fig. 8c). Nestas duas sub-populações de células NK estudou-se a expressão dos restantes marcadores.

A quantificação da percentagem total de células NK, de células NK CD56++ e de células NK CD56+ foi referida como a mediana das percentagens obtidas em cada ensaio.

A combinação CD122/CD3/CD56/CD45, permitiu a seleccionar as células positivas para CD45 antes da definição das regiões anteriormente descritas, deste modo eliminaram-se e quantificaram-se os restos celulares.

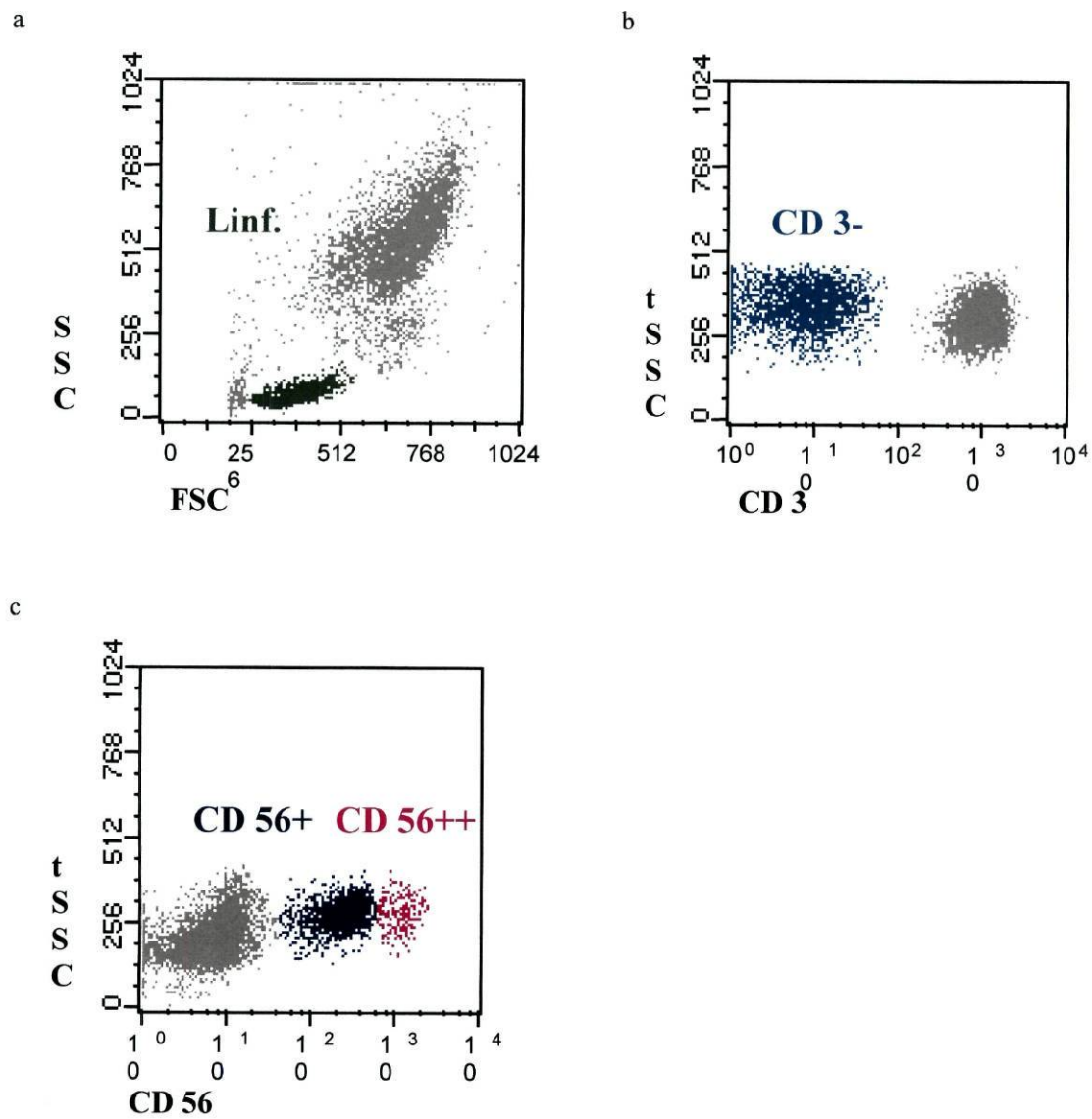


Fig. 8- Exemplo da análise sequencial realizada para o estudo das células NK. a)- Região dos linfócitos. b)- Selecção das células CD3-. c)- Selecção das células CD56++ e CD56+.

3.4- Análise estatística

Neste trabalho os valores das populações e sub-populações em estudo, bem como dos antigénios expressos são apresentados, salvo indicação do contrário, em percentagens das medianas, sendo referido o valor mínimo e máximo.

Nos grupos estudados: doentes, dadores de CPSP e dadores de sangue periférico, compararam-se as idades e os sexos recorrendo respectivamente ao teste de Mann-Whitney e ao teste de X^2 .

Na análise das populações celulares e da expressão de antigénios utilizaram-se o teste de Wilcoxon e o teste de Mann-Whitney, respectivamente para dados emparelhados e para dados não emparelhados, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

RESULTADOS

1- Caracterização dos grupos estudados

No Quadro 2 caracterizaram-se os grupos estudados no que respeita ao número de indivíduos, à mediana das idades e ao sexo; no grupo dos doentes também se referem as patologias.

Quadro 2- Caracterização dos diferentes grupos estudados.

GRUPO	DIAGNÓSTICO	Nº	SEXO Masc/Fem	IDADE- Mediana (min-max)
Doentes	LNH	3	5/3	40 Anos (19-54)
	DH	2		
	LMA	2		
	MM	1		
Dadores CPSP	-----	8	6/2	37 Anos (24-54)
Dadores SP	-----	11	4/7	23 Anos (18-42)

Legenda: LNH- Linfoma não Hodgkin, DH- Doença de Hodgkin, LMA- Leucemia Mieloide Aguda, MM- Mieloma Múltiplo. Nº- Número.

Como se pode observar, dos oito doentes estudados, três padeciam de Linfoma não Hodgkin (LNH), dois de Doença de Hodgkin (DH), dois de Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e um de Mieloma Múltiplo (MM). Cinco doentes eram do sexo masculino e três eram do sexo feminino. Verificou-se que a mediana de idades foi de 40 anos (19-54 anos).

Estudaram-se oito dadores de CPSP, sendo seis do sexo masculino e dois do sexo feminino, as suas idades variaram entre os 24 e os 42 anos, com mediana de 37 anos.

No grupo dos dadores de sangue, foram incluídos 11 indivíduos, quatro do sexo masculino e sete do sexo feminino, a mediana de idades foi de 23 anos (dos 18 aos 42 anos).

O número de indivíduos incluído nos grupos controlo, devido a dificuldades de amostragem, não foi o dobro do número de doentes. Contudo, a homogeneidade entre grupos, no que respeita a idades e sexo, foi garantida (sem diferenças estatisticamente significativas).

2- Representatividade das populações leucocitárias

2.1- Percentagens das populações linfocitárias dos sangues periféricos

Nos sangues periféricos, dos grupos dos doentes e dos dadores, quantificaram-se as percentagens das populações de linfócitos, linfócitos T, linfócitos B, células NK, e das sub-populações de células NK: CD56++ e CD56+. Procedeu-se ainda, à análise comparativa entre grupos.

Quadro 3- Percentagens das populações linfocitárias dos sangues periféricos dos doentes e dos dadores.

	Linf.	Linf. T	Linf. B	Céls. NK	CD56++	CD56+
Dadores	31,8 (21,3-51,4)	72,6 (63,8-81,3)	12,4 (8,3-24,3)	2,5 (0,9-5,3)	6,2 (3,0-14,8)	93,8 (82,5-97,1)
Doentes	16,7 (13,9-18,3)	66,7 (46,4-96,2)	3,8 (0,0-27,72)	1,6 (0,3-2,6)	10,4 (2,7-26,5)	88,6 (73,5-97,3)
p	0,001

Legenda: Linf.- % de linfócitos na região dos leucócitos. Linf. T- % de linfócitos T na região dos linfócitos. Linf. B- % de linfócitos B na região dos linfócitos. Céls. NK- % de células NK na região dos leucócitos. CD56++- % de células NK CD56++ na região das células NK. CD56+- % de células NK CD56+ na região das células NK, p- Valor de p obtido para a comparação entre dadores e doentes.

Como se pode observar no Quadro 3, nos dadores os linfócitos T foram a população linfocitária predominante, 72,6% do total de linfócitos, seguindo-se os linfócitos B, 12,4% do total de linfócitos e as células NK, 2,5% do total de leucócitos, analiticamente 7,9% do total de linfócitos. A sub-população de células NK, CD56++, corresponde a 6,2% do total de células NK e a sub-população CD56+ a 93,8%. No grupo dos doentes observamos uma menor percentagem de linfócitos, 16,7%, do que no grupo dos dadores, 31,8%, sendo que as restantes populações linfocitárias estavam presentes em idênticas percentagens nos dois grupos. Assim, quando comparados os grupos, dadores e doentes, apenas se verificaram diferenças estatisticamente significativas na percentagem de linfócitos.

2.2- Concentrações das populações linfocitárias dos sangues periféricos

Nos sangues periféricos, uma vez que se conhece a concentração de leucócitos (nº de células/ μl), foi possível determinar o número absoluto de linfócitos e das suas sub-populações.

Quadro 4- Concentrações (nº células/ μl) das populações linfocitárias dos sangues periféricos dos dadores e dos doentes.

	Linf.	Linf. T	Linf. B	Céls. NK	CD56++	CD56+
Dadores	2030 (1200-3300)	1652 (845-2183)	264 (99-803)	168 (80-304)	10 (5-27)	159 (70-290)
Doentes	510 (410-1210)	363 (212-1160)	16 (5-191)	45 (19-84)	4 (2-7)	42 (20-80)
p	0,001	0,003	0,003	0,002	0,009	0,002

Legenda: p- Valor de p obtido para a comparação entre dadores e doentes.

A comparação das concentrações celulares dos dois grupos revelou que todas as populações e sub-populações foram significativamente menores nos doentes que nos dadores. Como a percentagem de linfócitos foi menor nos doentes, possivelmente conduziu a que as concentrações das sub-populações também diminuíssem, traduzindo-se numa diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

2.3- Percentagens das populações leucocitárias das CPSP

Nas CPSP a concentração das populações leucocitárias e de células NK foi variável pois depende de múltiplos factores como: número de volémias efectuadas, eficiência da aferese etc. Assim, determinou-se a proporção das distintas populações no grupo dos doentes e no grupo dos dadores, e averiguaram-se as diferenças. Foi ainda analisada a percentagem de progenitores hematopoiéticos (células CD34+).

Quadro 5- Percentagens das populações leucocitárias das CPSP dos dadores e dos doentes.

	Linf.	Linf. T	Linf. B	Céls. Prog.	Céls. NK	CD56++	CD56+
Dadores	54,6 (19,2-66,8)	66,7 (55,2-71,7)	22,4 (12,0-32,6)	1,3 (0,1-2,5)	2,8 (0,6-4,4)	6,9 (1,9-10,6)	93,1 (89,4-98,1)
Doentes	34,4 (30,3-79,2)	68,5 (36,6-81,1)	15,6 (0,8-55,6)	0,8 (0,1-2,3)	2,7 (1,0-7,7)	8,9 (4,6-23,9)	91,1 (76,1-95,4)
p	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Legenda: Linf.- % de linfócitos na região dos leucócitos. Linf. T- % de linfócitos T na região dos linfócitos. Linf. B- % de linfócitos B na região dos linfócitos. Céls. Prog.- % de células CD34+ na região dos linfócitos, Céls. NK- % de células NK na região dos leucócitos. CD56+- % de células CD56+ na região das células NK. CD56++- % de células CD56++ na região das células NK. p- Valor de p obtido para a comparação entre dadores e doentes.

Nos dadores, os linfócitos T foram a população linfocitária predominante, 66,7% do total de linfócitos. Os linfócitos B foram a segunda população mais representada, 22,4% dos linfócitos, seguida pelas células NK, 2,8% do total de leucócitos, analiticamente 5,1% do total de linfócitos. A sub-população CD56++ correspondeu a 6,9% das células NK e a sub-população CD56+ a 93,1%.

Como se pode observar no Quadro 4, a proporção das populações e sub-populações estudadas não diferiu nos dois grupos. No entanto, verifica-se a tendência dos doentes apresentarem menos linfócitos e linfócitos B e mais células CD56++ do que os dadores.

2.4- Comparação das percentagens das populações linfocitárias e das células NK dos sangues periféricos e das CPSP dos doentes

Nos doentes, compararam-se as percentagens das diferentes populações e sub-populações dos sangues periféricos (Quadro 3) e das CPSP (Quadro 5). Deste modo, detectar-se-ia a possível influência do G-CSF, utilizado para a mobilização das células progenitoras, na proporção das distintas populações e sub-populações. De ressaltar o facto das CPSP serem analisadas após congelação e descongelação e os sangues

periféricos a fresco, o que por si só implica possíveis alterações na distribuição das populações por perda selectiva de algumas populações.

Verificou-se que a percentagem de linfócitos foi maior nas CPSP, 34,4% que no sangue periférico, 16,7% ($p=0,028$), mas que a proporção de linfócitos T e B, assim como a de células NK e sub-populações, manteve-se idêntica após a mobilização (Quadro 3 e Quadro 5).

Nos dadores não foi possível efectuar esta comparação uma vez que os dadores incluídos no grupo dos dadores de sangues periféricos não foram os mesmos dos incluídos no grupo dos dadores de CPSP.

3- Caracterização fenotípica dos linfócitos T

3.1- Fenótipo dos linfócitos T dos sangues periféricos

Nos sangues periféricos, dos dadores e dos doentes, foram avaliadas as principais sub-populações de linfócitos T, linfócitos CD4+ e linfócitos CD8+, e foi determinada a razão CD4/CD8. Os dadores apresentaram uma razão de 1,7 (0,9-3,7) que é considerada normal e os doentes apresentaram uma razão invertida 0,7 (0,4-1,4), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$).

A maioria dos linfócitos T dos dadores expressaram CD28, e cerca de 30% expressaram CD11a e CD25. Aproximadamente 40% dos linfócitos CD4+ exprimiram CD25, enquanto que os linfócitos CD8+ não apresentaram expressão deste marcador, assim como o CD28 que foi mais expresso nos linfócitos CD4+ do que nos CD8+. Os restantes antigénios apresentados no Quadro 6a), praticamente não foram expressos. Os antigénios de linhagem NK (Quadro 6b) quase não foram expressos pelos linfócitos T, apenas se observou a expressão de CD16, de CD56 e de CD161 em 25% destas células.

Foi feita a análise comparativa das percentagens de células positivas para cada antigénio, nos dadores e nos doentes. Como se pode observar no Quadro 6, os linfócitos T dos doentes apresentaram alterações em relação a alguns dos antigénios de activação, adesão e receptores de citocinas e de linhagem NK. As sub-populações de linfócitos, CD4+ e CD8+, dos dadores e dos doentes expressaram de igual modo os antigénios de citocinas CD25 e CD122. A Fig. 9 salienta as diferenças estatisticamente significativas dos linfócitos T de dadores e de doentes.

Quadro 6- Expressão de antígenos de activação, adesão e receptores de citocinas (a) e de linhagem NK (b) nos linfócitos T dos sangues periféricos dos dadores e dos doentes.

a

	Dadores	Doentes	p
CD11a	34,4 (25,6-54,4)	57,8 (45,7-83,4)	0,003
CD11c	3,4 (0,9-15,3)	14 (1,6-22,2)	ns
CD25	28,5 (14,8-49,7)	10,4 (3,5-23,9)	0,015
CD28	88,2 (71,3-92,3)	60,5 (38,8-87,8)	0,016
CD122	0,2 (0,0-6,0)	0,2 (0,0-0,7)	ns
HLA-DR	10,4 (4,3-20,2)	49,6 (22,9-78,4)	0,001
CD4+CD25+	42,2 (21,9-99,9)	25 (5,1-57,6)	ns
CD4+CD28+	57 (40,4-73,0)	37,5 (20,6-53,4)	0,013
CD4+CD122+	0,3 (0,0-1,8)	0,6 (0,1-1,1)	ns
CD8+CD25+	4,4 (1,3-92,6)	4,8 (1,8-12,1)	ns
CD8+CD28+	23,3 (13,9-31,9)	19,7 (16,4-31,4)	ns
CD8+CD122+	11,1 (0,8-23,0)	2 (0,3-17,6)	ns

b

	Dadores	Doentes	p
CD16	0,1 (0,0-1,1)	0,2 (0,1-0,6)	ns
CD56	24,2 (4,2-45,0)	21,6 (8,8-53,5)	ns
CD57	11,6 (4,9-19,7)	32,8 (12,9-52,8)	0,012
CD69	1,1 (0,6-12,2)	5,6 (2,6-8,7)	0,007
CD94	5,5 (2,9-14,0)	5,1 (2,3-7,7)	ns
CD158a	0,9 (0,2-6,3)	1 (0,3-6,6)	ns
CD161	24,7 (12,9-32,1)	29,3 (15,6-48,2)	ns
NKB1	0,9 (0,2-4,4)	0,7 (0,2-2,8)	ns
Granz B	13,7 (5,8-38,3)	52,9 (18,7-74,4)	0,015

Legenda: p- Valor de p obtido para a comparação entre as células dos dadores e dos doentes.

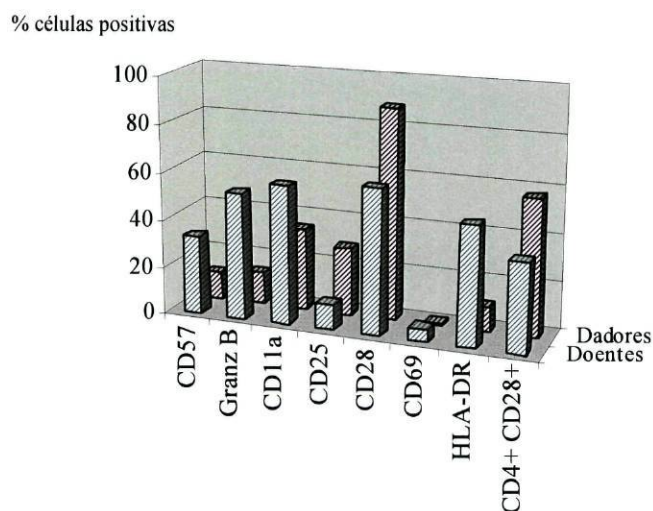


Fig. 9- Diferenças fenotípicas entre os linfócitos T, dos sangues periféricos, dos dadores e dos doentes.

Nos dadores, 11,6% dos linfócitos T exprimiram CD57 e 1,1% exprimiram CD69, nos doentes estes antígenos foram expressos numa maior percentagem de células respectivamente em 32,8% e 5,6%. A granzima B foi expressa em 13,7% dos linfócitos T dos dadores e em 52,9% dos linfócitos T dos doentes. 34,4% dos linfócitos dos dadores e 57,8% dos linfócitos T dos doentes exprimiram CD11a. Nos linfócitos T dos dadores a expressão de HLA-DR foi de 10,4%, significativamente menor que nos linfócitos dos doentes onde se observou a expressão deste antígeno em 49,6% das células. Verificou-se, então que os linfócitos T dos doentes exprimiram mais CD57, CD69, granzima B, CD11a e HLA-DR que os dos dadores.

O CD25 e o CD28 foram expressos respectivamente em 10,4 e 60,5% dos linfócitos T dos doentes e em 28,5 e 88,2% dos linfócitos T dos dadores. De destacar que foi na sub-população de linfócitos CD4+ que observamos a diferente expressão de CD28 entre grupos. Assim observamos uma menor percentagem de linfócitos T do grupo dos doentes a apresentarem CD28 do que do grupo dos dadores.

3.2- Fenótipo dos linfócitos T das CPSP

Nas CPSP, constatamos que os dadores apresentavam uma razão CD4/CD8 normal 1,4 (0,9-2,2), contudo nos doentes observamos a inversão desta razão, 0,8 (0,2-1,2); sendo estas diferenças estatisticamente significativas ($p=0,036$).

Quadro 7- Expressão de antígenos de activação, adesão e receptores de citocinas (a) e de linhagem NK (b) nos linfócitos T das CPSP dos dadores e dos doentes.

a

	Dadores	Doentes	p
CD11a	41 (22,5-74,8)	60,2 (25,3-83,9)	ns
CD11c	7,1 (3,6-99,4)	10,4 (2,8-31,2)	ns
CD25	17 (2,2-49,6)	16,1 (5,5-37,6)	ns
CD28	85,6 (70,2-92,4)	69,2 (36,2-90,8)	ns
CD122	1,4 (0,7-13,7)	4,2 (0,2-11,6)	ns
HLA-DR	16 (5,1-31,6)	49,2 (24,4-70,9)	0,002
CD4+ CD25+	29,7 (11,8-51,6)	10 (3,1-46,2)	ns
CD4+ CD28+	45,6 (39,1-65,0)	40,6 (13,1,8-48,7)	ns
CD4+ CD122+	1,2 (0,6-2,8)	0,4 (0,0-0,9)	0,003
CD8+ CD25+	5,2 (3,1-9,3)	3,7 (0,4-9,8)	ns
CD8+ CD28+	30,6 (18,1-40,0)	21 (15,8-40,8)	ns
CD8+ CD122+	7,2 (2,3-11,6)	1,4 (0,1-16,6)	ns

b

	Dadores	Doentes	p
CD16	0,6 (0,2-3,2)	5,9 (1,5-12,8)	0,002
CD56	20,8 (9,1-31,9)	17,4 (4,6-37,8)	ns
CD57	12,4 (7,6-21,0)	23,1 (12,9-41,1)	0,009
CD69	3,9 (2,1-7,6)	10,5 (3,2-17,8)	0,016
CD94	5,3 (4,4-12,6)	10,9 (5,4-30,5)	0,036
CD158a	2,7 (2,0-5,8)	6,4 (1,1-13,5)	ns
CD161	12,6 (4,7-29,12)	14,9 (8,5-56,8)	ns
NKB1	1,1 (0,2-2,4)	10,2 (1,0-20,7)	0,003
Granz B	14,8 (12,0-33,2)	39,5 (28,8-67,3)	0,002

Legenda: p- Valor de p obtido para a comparação entre as células dos dadores e dos doentes.

Como se observa no Quadro 7, a maioria dos linfócitos T das CPSP dos doadores exprimiram CD28 enquanto que cerca de 40% exprimiram CD11a. Na sub-população CD4+, aproximadamente 30% das células exprimiram CD25 e 45,6% exprimiram CD28. Cerca de 30% dos linfócitos CD8+ exprimiram CD28. O CD56 foi pouco expresso nos linfócitos T, apenas 20% destas células o exprimiram. Os restantes antigénios do Quadro 7a) e os antigénios de linhagem NK praticamente não foram expressos nos linfócitos T das CPSP dos doadores.

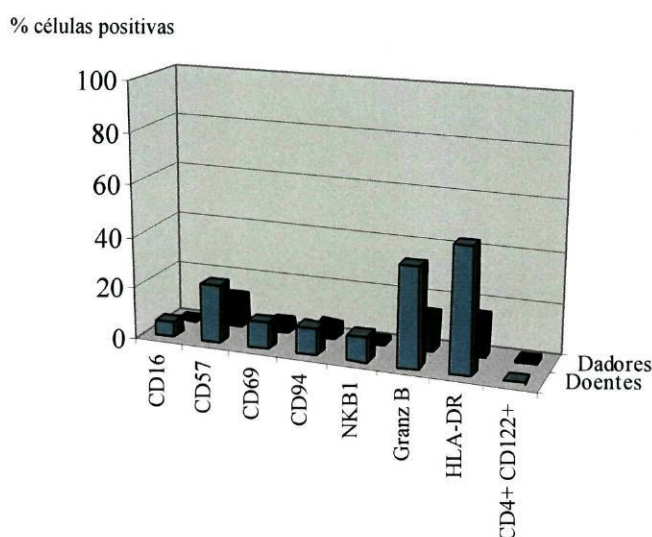


Fig. 10- Diferenças fenotípicas entre os linfócitos T, das CPSP, dos doadores e dos doentes.

Quando comparada a expressão antigénica dos linfócitos T, dos doadores e dos doentes (Fig. 10), verificou-se que os linfócitos T dos doentes estavam mais activados que os linfócitos T dos doadores, pois apresentavam maior expressão de CD69, respectivamente 10,5% e 3,9% e de HLA-DR, respectivamente 49,2% e 16,0%. Na sub-população CD4+ dos doadores, 5,2% dos linfócitos exprimiram CD122, enquanto que apenas 3,7% desses linfócitos dos doentes o exprimiram.

Quanto aos receptores de linhagem NK, em geral foram expressos numa maior percentagem de células dos doentes do que dos doadores. Assim, o antigénio CD16 foi expresso em 0,6% dos linfócitos T dos doadores e em 5,9% dos linfócitos dos doentes. 12,4% dos linfócitos dos doadores exprimiram CD57 e nos doentes foi expresso em 23,1%. O CD94 e o NKβ1 foram expressos em respectivamente, 5,3 e 1,1% dos linfócitos T dos doadores e em 10,9 e 10,2% dos linfócitos dos doentes. No que respeita à

granzima B, foi expressa por 14,8% dos linfócitos T dos dadores e por 39,5% dos linfócitos dos doentes.

Os restantes antigénios estudados, CD11a, CD11c, CD25, CD28, CD122, CD56, CD158a e CD161 foram expressos de forma semelhante nos linfócitos T dos dois grupos. Nos restantes antigénios estudados, nas duas sub-populações de linfócitos T, CD4+ e CD8+, também não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre grupos.

3.3- Comparação do fenótipo dos linfócitos T dos sangues periféricos e das CPSP dos doentes

A mobilização das células progenitoras para o sangue periférico foi conseguida com a administração de G-CSF. A ação deste factor de crescimento poderá conduzir a alterações nas características fenotípicas das diferentes linhagens celulares, e como tal nos linfócitos T. Compararam-se por isso, os fenótipos dos linfócitos T dos sangues periféricos e das CPSP dos doentes. Nos dadores não se procedeu a esta comparação, pois os dadores dos sangues periféricos não foram os mesmos que os das CPSP.

No que concerne à razão CD4/CD8, não se observaram variações significativas nas sub-populações de linfócitos T, CD4+ e CD8+. Esta razão encontrava-se invertida, quer no sangue periférico, quer nas CPSP, respectivamente 0,7 (0,4-1,4) e 0,8 (0,2-1,2).

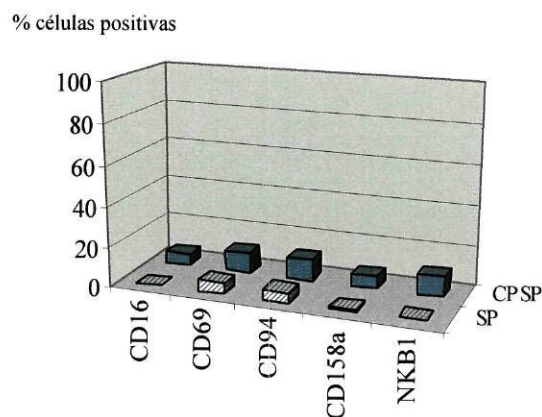


Fig. 11- Diferenças fenotípicas entre os linfócitos T, dos sangues periféricos e das CPSP, dos doentes.

Entre os linfócitos das CPSP e dos sangues periféricos, apenas se observaram diferenças fenotípicas na expressão de antígenos de linhagem NK. Deste grupo de antígenos observou-se que o CD16, CD69, CD94, CD158a e NK β 1 foram expressos em, nomeadamente, 5,9; 10,5; 10,9; 6,4 e 10,2% dos linfócitos T das CPSP e em: 0,2; 5,6; 5,1; 1,0; e 0,7% dos linfócitos T do sangue periférico, ($p=0,028$ para todas as comparações referidas anteriormente). Verificou-se portanto, que grande parte dos antígenos de linhagem NK estudados foram expressos em maior percentagem nos linfócitos T das CPSP, ainda que sempre, numa pequena percentagem de células (Fig. 11).

A expressão dos restantes antígenos, CD11a, CD11c, CD28, HLA-DR, CD56, CD57, CD161 e granzima B nos linfócitos T, bem como a expressão de CD25, CD28 e CD122 nas subpopulações CD4⁺ e CD8⁺, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos sangues periféricos e nas CPSP.

4- Caracterização fenotípica das sub-populações de células NK

4.1- Fenótipo das sub-populações de células NK dos sangues periféricos

As células NK, como referido na introdução, dividem-se em duas sub-populações, caracterizadas pela diferente intensidade de expressão do antígeno CD56: células CD56++ (forte intensidade de CD56) e células CD56+ (fraca intensidade de CD56). A expressão dos distintos antígenos foi analisada separadamente em cada uma das sub-populações, e foram comparados os grupos dos dadores e dos doentes.

4.1.1- Fenótipo das sub-populações de células NK dos sangues periféricos dos dadores

Nos sangues periféricos dos dadores, a maioria das células CD56++ exprimiram os antígenos de linhagem NK, CD94 e CD161. Os antígenos de adesão CD2, CD11a e CD11c foram expressos em praticamente todas estas células, o CD122 também, assim como o CD7. O CD25 e o antígeno de activação HLA-DR foram expressos apenas em algumas células (Quadro 8).

Nas células CD56+, os antígenos de linhagem NK, CD16, CD94, CD161 e granzima B foram expressos na maioria das células enquanto que o CD57 foi expresso por metade destas células. Tal como nas células CD56 ++, os antígenos de adesão CD2, CD11a e CD11c foram expressos em praticamente todas as células CD56+, bem como o CD122 e o CD7 (Quadro 8).

Quadro 8- Expressão de antígenos de linhagem NK (a) e de ativação, adesão e receptores de citocinas (b) nas sub-populações de células NK dos sangues periféricos dos dadores.

a

	CD56++	CD56+	p
CD16	3,3 (0,0-94,3)	91,8 (0,0-99,8)	0,009
CD57	1,8 (0,0-9,9)	47,3 (19,6-69,5)	0
CD69	0,8 (0,0-21,6)	2,1 (0,8-18,7)	ns
CD94	96,6 (86,4-100,0)	56 (19,4-85,7)	0
CD158a	2,4 (0,0-10,8)	30,6 (7,8-63,6)	0
CD161	59,5 (16,5-97,7)	80,3 (58,2-94,0)	0,02
NKB1	2,3 (0,0-7,4)	12,8 (0,4-48,3)	0,001
Granz B	14,3 (0,0-59,4)	85,7 (50,1-97,3)	0

b

	CD56++	CD56+	p
CD2	93,9 (0,0-97,5)	83,6 (0-98,4)	ns
CD7	90,9 (0,0-100,0)	97 (0-99,1)	ns
CD11a	100 (100,0-100,0)	99,8 (97,9-100,0)	0,001
CD11c	97,6 (83,5-100,0)	69,7 (36,8-86,3)	0
CD25	23,9 (1,7-79,2)	1,7 (0,0-5,3)	0,001
CD117	0,3 (0,0-11,5)	0,8 (0,0-3,8)	ns
CD122	95,6 (6,1-100,0)	86,8 (0,5-99,6)	ns
HLA-DR	32,2 (0,0-60,2)	2,3 (0,2-28,7)	0,008

Legenda: p- Valor de p obtido para a comparação entre células CD56++ e CD56+.

A Fig. 12 ilustra as diferenças estatisticamente significativas entre as células CD56+ e CD56++ dos dadores. Os antígenos de linhagem NK, CD16, CD57, CD158a, CD161, NK β 1 e granzima B foram expressos em mais células CD56+, respectivamente 91,8; 47,3; 30,6; 80,3; 12,8 e 85,7%, do que em células CD56++, que apresentaram respectivamente 3,3; 1,8; 2,4, 59,5; 2,3; 14,3%, salientando-se a grande diferença na expressão dos antígenos CD16 e granzima B. De todos os antígenos de linhagem NK, só o CD94 foi mais expresso nas células CD56++ (96,6%) do que nas CD56+ (56%).

Os antígenos CD11c, CD25, e HLA-DR foram expressos em mais células CD56++ (97,6; 23,9 e 33,2%) do que em células CD56+ (69,7; 1,7 e 2,3%).

Deste estudo constata-se que as células CD56++ expressaram menos antígenos de linhagem NK que as células CD56+, com a excepção do CD94 e do CD161.

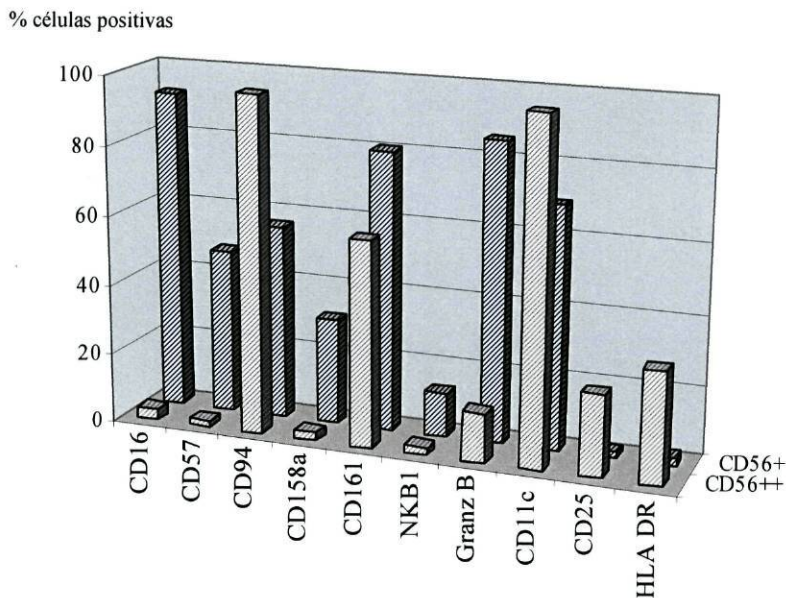


Fig. 12- Diferenças fenotípicas entre as células CD56++ e CD56+ dos sangues periféricos dos doentes.

4.1.2- Fenótipo das sub-populações de células NK dos sangues periféricos dos doentes

O Quadro 9 documenta a expressão dos antígenos estudados nas sub-populações de células NK, dos sangues periféricos dos doentes.

Na sub-população CD56++, o antígeno CD94, foi expresso em praticamente todas as células e os antígenos CD161 e granzima B em cerca de 40% das células dos doentes. Os antígenos de adesão estudados, CD2, CD11a e CD11c foram expressos pela maioria das células CD56++, tal como o CD122, e o HLA-DR. O CD25 foi expresso por algumas células.

As células CD56+ apresentaram uma elevada expressão de antígenos de linhagem NK. Praticamente todas células foram positivas para o CD16, CD94, CD161 e granzima B e algumas exprimiram CD57 e CD158a. Os antígenos de adesão CD2, CD11a e CD11c foram expressos em quase todas as células, bem como o CD7. O CD122 e o HLA-DR exprimiram-se em algumas destas células (Quadro 9).

Quadro 9- Expressão de antígenos de linhagem NK (a) e de activação, adesão e receptores de citocinas (b) nas sub-populações de células NK dos sangues periféricos dos doentes.

a

	CD56++	CD56+	p
CD16	2,9 (0,0-23,5)	76,9 (0,1-90,0)	0,025
CD57	1 (0,0-2,5)	43 (35,6-69,3)	0,004
CD69	5,6 (0,0-15,3)	12 (2,4-47,0)	ns
CD94	98 (72,7-100,0)	73,3 (46,4-93,6)	0,025
CD158a	3,4 (0,0-10,8)	34 (9,7-68,5)	0,006
CD161	40,6 (10,8-100,0)	73,3 (57,6-87,0)	ns
NKB1	2,1 (0,0-5,0)	16,3 (3,8-41,5)	0,01
Granz B	34,5 (0,0-75,7)	79,1 (0,0-94,7)	0,047

b

	CD56++	CD56+	p
CD2	91,1 (64,3-97,4)	73,4 (56,4-80,6)	0,037
CD7	93,3 (82,9-100,0)	91,9 (79,6-97,8)	ns
CD11a	100 (96,9-100,0)	99,9 (96,9-100,0)	ns
CD11c	90,1 (79,7-97,4)	77,5 (62,6-81,1)	0,016
CD25	30 (0,0-64,9)	6,5 (0,5-12,5)	ns
CD117	0 (0,0-2,6)	6,1 (0,3-10,9)	ns
CD122	91,8 (80,0-94,1)	39,1 (10,8-57,3)	ns
HLA-DR	72,4 (35,2-100,0)	27,7 (20,0-73,6)	0,037

Legenda: p- Valor de p obtido para a comparação entre células CD56++ e CD56+.

Na Fig. 13 estão salientadas as diferenças estatisticamente significativas entre as sub-populações NK dos sangues periféricos dos doentes. Verificou-se que, dos antígenos de linhagem NK estudados, o CD16, CD57, CD158a, NK β 1 e granzima B foram expressos em mais células CD56+ (73,9; 43,0; 34,0; 16,3 e 79,1%) do que em células CD56++ (2,9; 1,0; 3,4; 2,1 e 34,5%). Já o CD94 foi mais expresso nas células CD56++ que nas CD56+, 98,0% e 78,3% (Fig. 13).

Os antígenos de adesão CD2 e CD11c e de activação HLA-DR foram expressos numa maior percentagem de células CD56++ (91,1; 90,1 e 72,4%) do que em células CD56+ (73,4; 77,5 e 27,7%).

Resumindo, as células NK CD56++ dos doentes encontravam-se menos activadas e expressaram menos antigénios de linhagem NK do que as células CD56+, apenas o CD94 foi mais expresso nas CD56++.

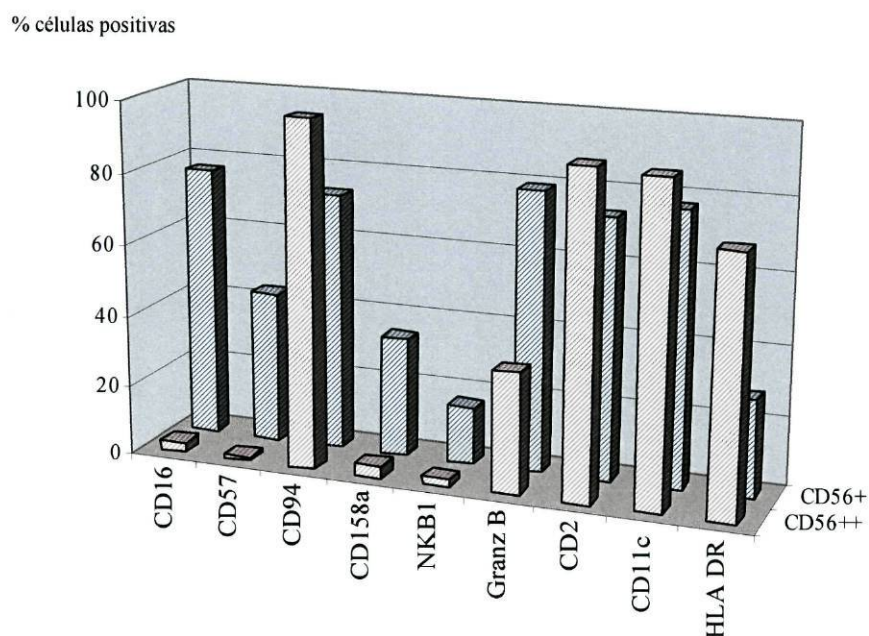


Fig. 13- Diferenças fenotípicas entre as células CD56++ e CD56+ dos sangues periféricos dos doentes.

4.1.3- Comparação das sub-populações de células NK dos sangues periféricos dos dadores e dos doentes

Quando comparadas as sub-populações de células periféricas dos sangues periféricos dos doentes e dos dadores, apenas se observaram diferenças estatisticamente significativas na expressão de antigénios de activação. Como demonstra a Fig. 14, o HLA-DR foi mais expresso nas células NK dos doentes, quer na sub-população CD56+, 27,7%, quer na sub-população CD56++, 72,4%, do que nos dadores, 2,3% nas células CD56+, ($p=0,003$) e 32,2 % nas CD56++, ($p=0,007$). A expressão do CD69 nas células CD56+ foi maior nos doentes, 12%, do que nos dadores, 2,1%, ($p= 0,021$). Nas células CD56++, o CD11c foi mais expresso nos dadores, 97,6%, do que nos doentes, 90,1%,

($p= 0,035$). Os valores mínimos e máximos da mediana das percentagens encontram-se referidos nos Quadros 8 e 9.

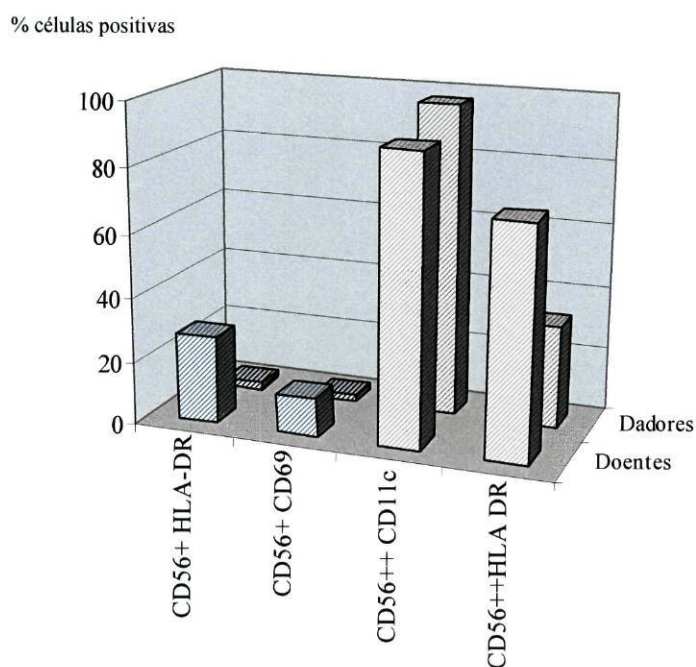


Fig. 14- Diferenças fenotípicas das células CD56++ e CD56+ dos sangues periféricos dos doadores e dos doentes.

Quer nos doadores, quer nos doentes, observaram-se tendências comuns na expressão antigénica. Assim verificou-se uma maior expressão de antígenos de linhagem NK nas células CD56+, excepto o CD94 que foi mais expresso nas CD56++. Já o HLA-DR e o CD11c foram mais expressos nas células CD56++ que nas CD56+.

4.2- Fenótipo das sub-populações de células NK das CPSP

4.2.1- Fenótipo das sub-populações de células NK das CPSP dos doadores

A análise fenotípica das sub-populações NK nas CPSP dos doadores é apresentada no Quadro 10. Como se pode observar, o antígeno CD94 foi expresso em quase todas as células CD56++ e os antígenos CD161 e granzima B em cerca de 20%

das células, os restantes antígenos de linhagem NK não foram expressos. Ainda nesta sub-população, a presença de CD2, CD7, CD11a, CD11c e CD122 foi uma constante, e a de HLA-DR foi aproximadamente de 40%.

Na sub-população CD56+, a granzima B foi expressa em quase todas as células, os antígenos CD16, CD57 e CD161 em cerca de 60% e o CD94 e o CD158a em cerca de 35%. A maioria destas células exprimiu ainda CD2, CD7, CD11a e CD11c, e cerca de 40% exprimiram CD122.

Quadro 10- Expressão de antígenos de linhagem NK (a) e de activação, adesão e receptores de citocinas (b) nas sub-populações de células NK das CPSP dos dadores.

a

	CD56 ++	CD56 +	p
CD16	7,2 (0,0-48,2)	68,7 (0,4-92,2)	0,012
CD57	0,3 (0,0-6,5)	62,4 (24,6-77,1)	0,001
CD69	4,8 (0,0-66,7)	5,8 (0,7-32,1)	ns
CD94	95,4 (75,0-97,5)	43,9 (15,2-67,7)	0,001
CD158a	3,4 (0,0-15,2)	30,5 (2,5-74,5)	0,005
CD161	21,4 (0,0-81,8)	58,1 (5,8-80,0)	ns
NKB1	2 (0,0-4,7)	13,9 (0,0-21,0)	0,045
Granz B	22,9 (12,3-44,1)	89,8 (82,1-95,5)	0,001

b

	CD56 ++	CD56 +	p
CD2	88,6 (0,0-96,0)	71 (0,4-91,4)	ns
CD7	86,3 (45,0-93,6)	92,6 (45,6-99,0)	ns
CD11a	99,2 (79,6-100,0)	94,7 (73,4-100,0)	ns
CD11c	91 (71,4-100,0)	75,8 (53,5-88,6)	0,021
CD25	0 (0,0-25,5)	1,2 (0,2-6,1)	ns
CD117	0 (0,0-2,4)	0,4 (0,2-2,0)	0,031
CD122	90,5 (82,3-100,0)	39,3 (0,1-94,1)	ns
HLA-DR	43 (20,7-78,5)	18,5 (3,4-50,2)	0,009

Legenda: p- Valor de p obtido para a comparação entre células CD56++ e CD56+.

Quando comparadas as sub-populações CD56++ e CD56+ (Fig. 15), verificaram-se diferenças estatisticamente significativas na expressão dos antígenos de

linhagem NK estudados, excepto no CD161. Assim, o CD16, CD57, CD158a, NK β 1 e granzima B foram mais expressos nas células CD56+ (68,75; 62,4; 30,5; 13,9 e 89,8%) que nas CD56++ (7,2; 0,3; 3,4; 2,0 e 22,9%). Só o CD94 foi expresso em mais células CD56++ (95,4%) do que em células CD56+ (43,9%).

Dos antigénios de activação avaliados, apenas o HLA-DR foi expresso de forma estatisticamente diferente nas CD56++ (43,0%) do que nas CD56+ (18,5%). O CD11c foi mais expresso nas CD56++ (91%) do que nas CD56+ (75,8%).

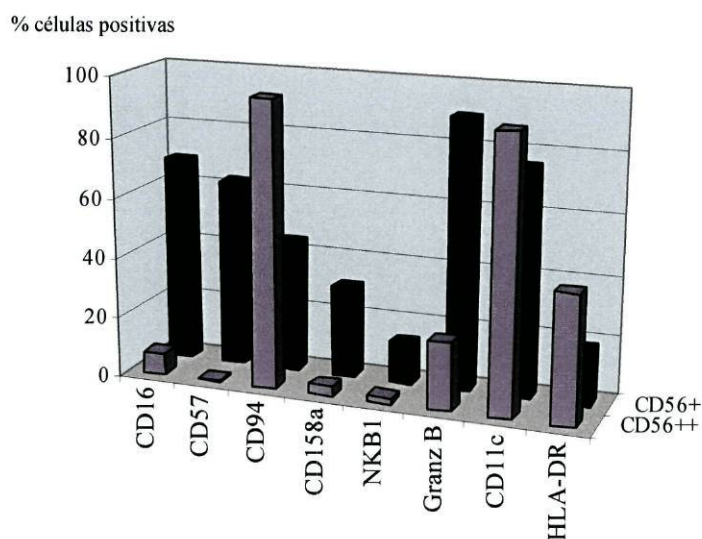


Fig. 15- Diferenças fenotípicas entre as células CD56++ e CD56+ das CPSP dos doentes.

4.2.2- Fenótipo das sub-populações de células NK das CPSP dos doentes

Nas CPSP dos doentes, os antigénios de linhagem NK foram expressos numa pequena percentagem de células CD56++, excepto o CD94 que foi expresso em mais de 90% e a granzima B que foi expressa em quase 40% das células. De referir também, a expressão por um quarto das células, de CD16. Nesta sub-população, os antigénios CD2, CD7, CD11a e CD11c foram expressos em praticamente todas as células e o CD122 e o HLA-DR em cerca de metade.

As células CD56+ exprimiram na sua maioria, CD94 e granzima B. A expressão de CD16, CD57 e CD161 verificou-se em cerca de metade das CPSP e o CD158a em sensivelmente 20%. Os antigénios de adesão CD2, CD11a e CD11c e o antigénio CD7

foram expressos numa grande percentagem de células, mais de 75% e o antígeno de activação HLA-DR foi expresso em cerca de 40% das células.

Quadro 11- Expressão de antígenos de linhagem NK (a) e de activação, adesão e receptores de citocinas (b) nas sub-populações de células NK das CPSP dos doentes.

a

	CD56++	CD56+	p
CD16	25,2 (7,8-41,4)	64,7 (35,2-95,2)	0,003
CD57	1,2 (0,0-13,5)	53,1 (25,7-73,3)	0,001
CD69	3,3 (1,5-6,6)	9,1 (3,2-44,7)	0,015
CD94	94,8 (73,5-99,0)	80,1 (52,0-94,7)	0,015
CD158a	2,3 (0,0-18,0)	22,2 (8,5-48,1)	0,008
CD161	14 (0,0-31,5)	49,5 (2,0-90,5)	ns
NKB1	3,7 (1,3-14,4)	14,8 (4,5-34,4)	0,015
Granz B	37,4 (6,0-88,9)	90,9 (71,0-96,4)	0,011

b

	CD56++	CD56+	p
CD2	93,7 (78,1-98,7)	80,3 (55,5-93,4)	ns
CD7	92,7 (75,3-96,5)	96,3 (82,6-100,0)	0,037
CD11a	99,4 (92,3-100,0)	89,5 (51,4-100,0)	ns
CD11c	91,3 (78,5-97,7)	76 (62,6-87,0)	0,011
CD25	2 (0,0-34,7)	1 (0,6-8,6)	ns
CD117	0 (0,0-7,1)	0,7 (0,2-2,5)	ns
CD122	50,8 (0,0-87,9)	5,9 (1,1-18,2)	ns
HLA-DR	59,6 (15,4-82,1)	44 (16,3-77,2)	ns

Legenda: p- Valor de p obtido para a comparação entre células CD56++ e CD56+.

Na Fig. 16 estão realçadas as diferenças estatisticamente significativas entre a expressão antigénica das células CD56++ e das células CD56+ presentes nas CPSP dos doentes. Observou-se que a expressão dos antígenos de linhagem NK, CD16, CD57, CD158a, NK β 1 e granzima B é maior nas células CD56+ (64,7; 53,1; 22,2; 14,8 e 90,9%) do que nas células CD56++ (25,2; 1,2; 2,3; 3,7 e 37,4%). Deste grupo de antígenos só o CD94 foi mais expresso nas CD56++ (94,8%) do que nas CD56+ (80,1%).

As células CD56++ exprimiram mais CD7 (92,7%) e CD11c (91,3%) do que as CD56+, respectivamente 80,3 e 76,0%. O CD69 foi expresso em mais células CD56+ (9,1%) do que em células CD56++ (3,3%).

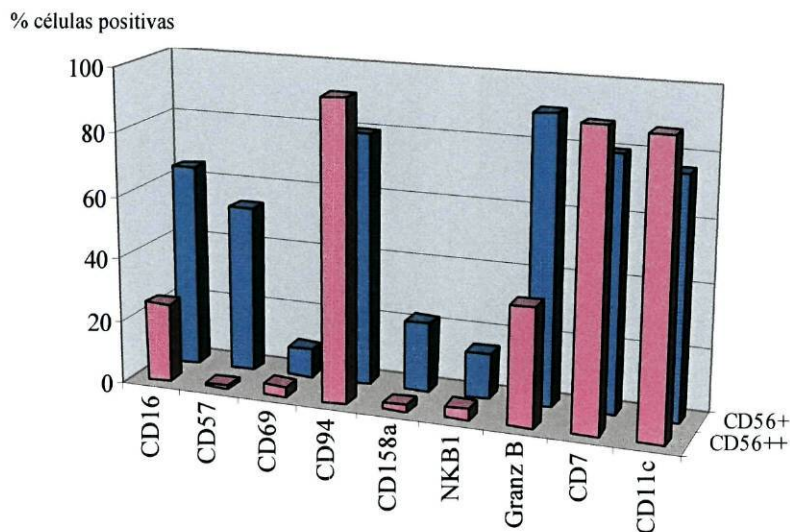


Fig. 16- Diferenças fenotípicas entre as células CD56++ e CD56+ das CPSP dos doentes.

4.2.3- Comparação das sub-populações de células NK das CPSP dos doadores e dos doentes

As diferenças estatisticamente significativas da expressão antigénica das células NK das CPSP dos doadores e dos doentes estão ilustradas na Fig. 17. Em ambas as sub-populações, o CD122 foi mais expresso nos doadores (90,5% nas CD56++ e 39,3% nas CD56+) do que nos doentes (50,8% nas CD56++ e 5,9% nas CD56+). Nas células CD56+, o CD94 foi mais expresso nos doentes (80,1%) do que nos doadores (43,9%). Estas células dos doentes ainda exprimiram mais HLA-DR (44,0%) do que as mesmas células dos doadores (18,5%).

Resumindo, quer as células NK das CPSP dos doentes, quer as dos doadores, apresentaram semelhanças na expressão de antígenos de linhagem NK. No entanto, as células CD56+ exprimiram mais estes antígenos do que as células CD56++, excepto o CD94 que foi mais expresso nas CD56++. O antígeno de adesão CD11c, foi mais expresso nas células CD56++ do que nas CD56+.

% células positivas

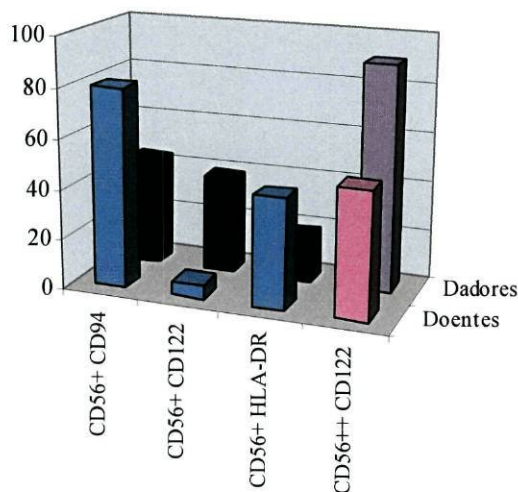


Fig. 17- Diferenças fenotípicas, entre doadores e doentes, das células CD56++ e CD56+ das CPSP.

4.3- Comparação do fenótipo das sub-populações de células NK dos sangues periféricos e das CPSP dos doentes

Como ilustra a Fig. 18, observaram-se pequenas variações no fenótipo das células CD56++ e CD56+ dos dois produtos biológicos. Assim, a granzima B foi ligeiramente mais expressa nas células NK das CPSP (37,4% das CD56++ e 90,9% das CD56+) do que nas dos sangues periféricos (34,5% das CD56++ e 79,15 das CD56+) ($p= 0,043$ e $p=0,028$). O CD11a foi expresso em 100,0% das células CD56++ dos sangues periféricos e em 99,4% das CPSP ($p=0,043$), nas células CD56+ dos sangues observou-se uma expressão de 99,9% e nas CPSP de 89,5% ($p=0,042$).

Pode-se concluir que, quer a sub-população CD56++, quer a CD56+, praticamente não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos sangues periféricos e nas CPSP.

% células positivas

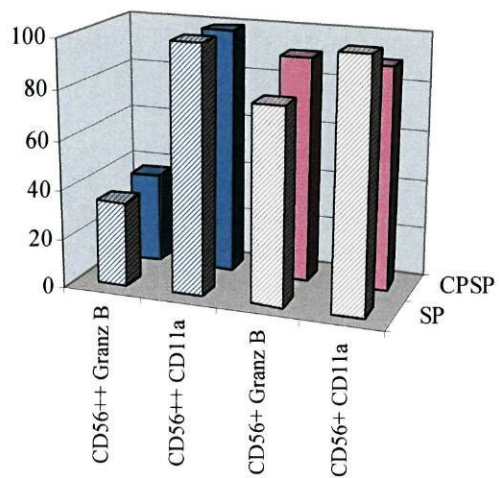


Fig. 18- Diferenças fenotípicas entre as sub-populações de células NK dos sangues periféricos e das CPSP dos doentes.

5- Efeito da incubação com IL-2 nas CPSP

5.1- Representatividade das populações leucocitárias após a incubação com IL-2

No Quadro 12 estão apresentadas as percentagens das populações leucocitárias, nas CPSP dos dadores e dos doentes, após a incubação com IL-2.

Quadro 12- Percentagens das populações leucocitárias nas CPSP após a incubação com IL-2.

	Linf.	Linf. T	Linf. B	Céls. Prog.	Céls. NK	CD56++	CD56+
Dadores	44,1 (26,5-76,1)	61 (51,9-67,4)	27,4 (23,7-33,7)	0,5 (0,3-1,8)	1,6 (1,3-4,0)	7 (4,0-9,2)	93,1 (90,8-96,3)
Doentes	32,2 (15,5-77,5)	66,7 (41,7-87,0)	14,3 (0,0-30,7)	0,9 (0,1-2,5)	2,7 (0,9-5,0)	12,8 (5,5-22,0)	87,6 (78,0-94,5)
p	ns	ns	0,011	ns	ns	ns	ns

Legenda : Linf.- % de linfócitos na região dos leucócitos, Linf. T- % de linfócitos T na região dos linfócitos, Linf. B- % de linfócitos B na região dos linfócitos, Cél. Prog.- % de células CD34+ na região dos linfócitos, Céls. NK- % de células NK na região dos leucócitos, CD56++- % de células NK CD56++ na região das células NK, CD56+- % de células NK CD56+ na região das células NK, p- Valores de p obtidos para a comparação entre dadores e doentes.

Nas CPSP dos dadores, após a incubação com IL-2, a população linfocitária predominante foi a de linfócitos T, cerca de 60%. Os linfócitos B representaram aproximadamente 30% do total de linfócitos e as células NK 1,6% do total de leucócitos, ou seja correspondem analiticamente a 3,6% do total de linfócitos. As células progenitoras apenas representaram 0,5% da região dos linfócitos. A comparação das populações e sub-populações das CPSP, dos dadores e dos doentes, após a incubação com IL-2 revelou que a representatividade das respectivas populações era idêntica, com a exceção dos linfócitos B cuja expressão foi menor nos doentes, 14,3%, que nos dadores, 27,4% (p=0,011).

Quando comparadas as populações e sub-populações estudadas antes (Quadro 5) e após a incubação com IL-2 (Quadro 12) , verificou-se que nos dadores a percentagem

de linfócitos T sofreu uma ligeira diminuição, de 66,7% para 61,0% ($p=0,018$) e que a de linfócitos B foi incrementada de 22,4% para 27,4% ($p=0,018$), nos doentes estas populações mantiveram-se inalteradas. As restantes populações e sub-populações não sofreram alterações com a incubação com IL-2, nem nos dadores nem nos doentes.

5.2- Alterações fenóticas nos linfócitos T após a incubação com IL-2

Quadro 13- Expressão de antígenos de activação, adesão e receptores de citocinas (a) e de antígenos de linhagem NK (b) nos linfócitos T das CPSP dos dadores e dos doentes após a incubação com IL-2.

a

	Dadores	Doentes	p
CD11a	35,8 (16,0-53,1)	59,7 (44,9-79,5)	0,003
CD11c	5,1 (3,5-9,7)	10,7 (3,2-29,7)	ns
CD25	14,4 (9,4-28,1)	21,2 (9,6-37,2)	ns
CD28	87,6 (82,8-96,9)	69,1 (37,6-77,7)	0,008
CD122	0,1 (0,0-1,6)	2,4 (0,1-9,9)	0,025
HLA-DR	15,6 (9,3-29,2)	44,8 (24,3-56,3)	0,002
CD4+ CD25+	24,2 (17,5-40)	34,3 (9,8-48,2)	ns
CD4+ CD28+	39,7 (28,1-50,9)	37,9 (0,0-45,3)	ns
CD4+ CD122+	0,3 (0,1-0,6)	0,3 (0,1-3,8)	ns
CD8+ CD25+	3 (1,4-7,2)	3,7 (1,2-7,2)	ns
CD8+ CD28+	37,9 (32,4-55,7)	29,1 (14,6-38,7)	0,009
CD8+ CD122+	0,3 (0,2-1,5)	0,5 (0,1-7,3)	ns

b

	Dadores	Doentes	p
CD16	0,3 (0,1-0,8)	5,1 (0,3-13,1)	0,005
CD56	10,1 (3,3-27,7)	16,2 (2,3-41,1)	ns
CD57	9,6 (2,2-15,2)	25,6 (15,7-62,0)	0,001
CD69	28,8 (17,5-48,2)	44,6 (15,6-62,9)	ns
CD94	7,1 (1,4-13,6)	8,3 (1,4-17,5)	ns
CD158a	1,9 (0,8-4,0)	7,4 (0,5-14,1)	0,021
CD161	12,6 (5,7-22,6)	18,1 (7,5-42,3)	ns
NKB1	1,2 (0,1-1,9)	8,5 (0,7-17,9)	0,008
Granz B	9,3 (2,6-20,1)	32,1 (23,4-67,2)	0,001

Legenda : p- Valor de p obtido para a comparação entre dadores e doentes.

Os linfócitos T das CPSP dos dadores, após a incubação com IL-2, exprimiram na sua maioria CD28 e cerca de 30% exprimiram CD11a. Na sub-população CD4+ o antígeno CD25 foi expresso em aproximadamente um quarto das células e o CD28 em cerca de 40%. Na sub-população CD8+, o CD28 também foi expresso em cerca de 40%. Os antígenos de linhagem NK quase não foram expressos pelos linfócitos T, com excepção do CD69 que foi expresso em cerca de 30% das células.

Nos dadores, quando comparadas as CPSP antes (Quadro 7) e após a incubação com IL-2 (Quadro 13), observa-se que a razão CD4/CD8 diminui de 1,4 para 0,9 ($p=0,018$), ou seja, houve uma perda selectiva de linfócitos CD4+. Verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa na expressão do CD122, CD16 e CD57, ainda que a percentagem de células positivas para estes marcadores antes da incubação com IL-2 já fosse inferior a 10%, variações respectivamente de 1,4-0,1% ($p=0,018$), 0,6-0,3% ($p=0,034$) e 12,4-9,6% ($p=0,043$). A expressão do CD122, diminuiu após a incubação, quer na sub-população CD4+, 1,2-0,3% ($p=0,018$), quer na sub-população CD8+, 7,2-0,3% ($p=0,018$).

Das alterações induzidas pela incubação com IL-2 no fenótipo do linfócitos T, salienta-se o aumento da percentagem de linfócitos a exprimirem o antígeno CD69, 3,9-28,8% ($p=0,018$) e o aumento de CD28 na sub-população CD8+, 30,6-37,9% ($p=0,018$).

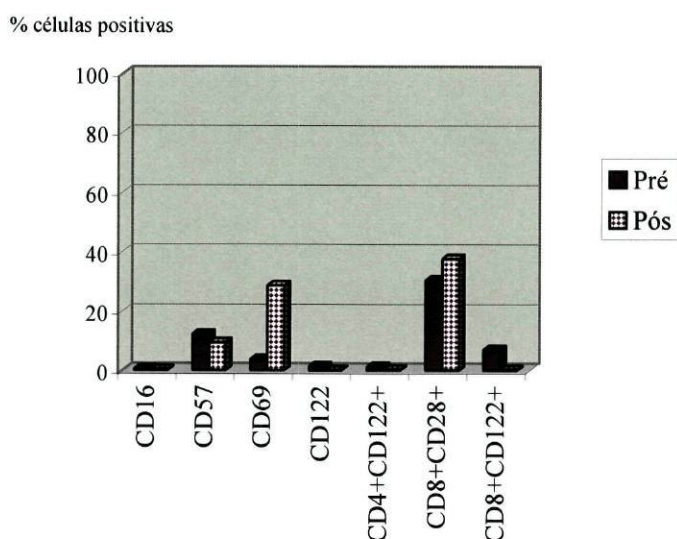


Fig. 19- Efeito da incubação com IL-2 no fenótipo dos linfócitos T das CPSP dos dadores.

A comparação anterior nos doentes apenas revelou um aumento na expressão de CD69, de 10,5% para 44,6% ($p=0,012$) e uma diminuição na expressão de CD122 na sub-população CD8+, de 1,4% para 0,5% ($p=0,043$) (Fig. 20). A expressão dos restantes antigénios estudados não foi alterada com a incubação com IL-2 (Quadro 7 e Quadro 13).

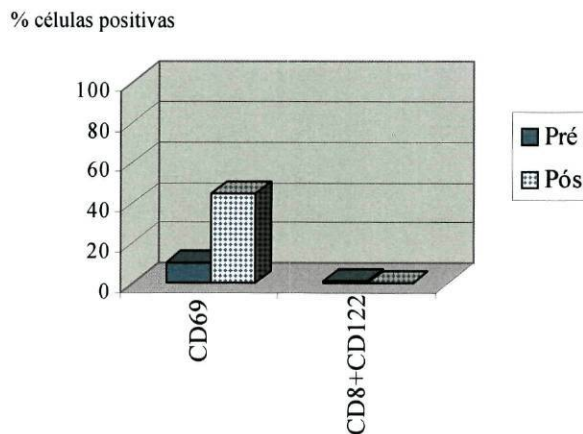


Fig. 20- Efeito da incubação com IL-2 no fenótipo dos linfócitos T das CPSP dos doentes.

Procedeu-se ainda, à comparação do fenótipo dos linfócitos T das CPSP dos dadores e dos doentes, após a incubação com IL-2 (Quadro 13). Como se pode observar, a expressão dos antigénios estudados foi diferente nos linfócitos T dos dois grupos. Assim, nos doentes a expressão de CD11a (59,7%), CD122 (2,4%) e HLA-DR (44,8%) foi maior que nos dadores, percentagens respectivamente iguais a 35,8%, 0,1% e 15,6%. Apenas o CD28 foi mais expresso nos dadores (87,6%) do que nos doentes (69,1%), essencialmente na sub-população CD8+ (dadores = 37,9%, doentes = 29,1%) (Fig. 21).

Quase todos os antigénios de linhagem NK, ainda que com pouca frequência, foram mais expressos pelos linfócitos T dos doentes, CD16 (5,1%), CD57 (25,6%), CD158a (7,4%), NK β 1 (8,5%) e granzima B (32,1%) do que pelos dos dadores, respectivamente 0,3%, 9,6%, 1,9%, 1,2% e 9,3%, (Fig. 21). Os restantes antigénios estudados nos linfócitos T, CD11c, CD25, CD56, CD69, CD94 e CD161 e nas sub-populações CD4+ e CD8+, CD25 e CD122, foram expressos em percentagens semelhantes nos dadores e nos doentes (Quadro 13).

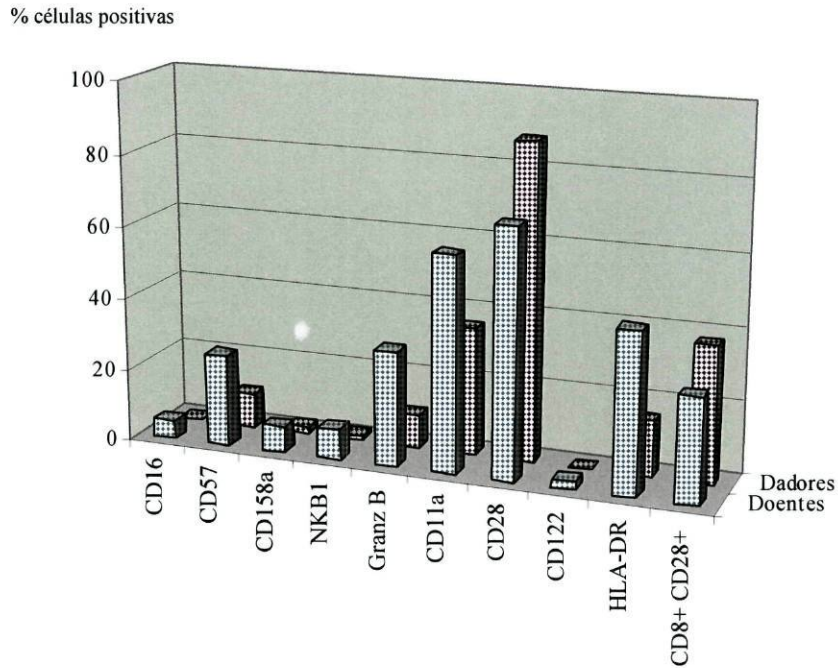


Fig. 21- Diferenças fenotípicas entre os linfócitos T das CPSP dos dadores e dos doentes, após a incubação com IL-2.

As diferenças observadas, entre dadores e doentes, nas CPSP após a incubação com IL-2, foram idênticas às observadas nas CPSP antes da incubação. Os doentes apresentaram maior expressão de CD16, CD57, NK β 1, granzima B e HLA-DR do que os dadores. A diferença observada entre dadores e doentes no que concerne à expressão de CD94, CD69 nos linfócitos T e de CD122 na sub-população CD4+ deixou de se observar. No entanto, verificaram-se novas diferenças, nomeadamente na expressão de CD158a, CD11a, CD28 e CD122.

5.3- Alterações fenotípicas nas células NK após a incubação com IL-2

5.3.1- Fenótipo das sub-populações de células NK das CPSP dos dadores, após a incubação com IL-2

A análise das CPSP dos dadores, após a incubação com IL-2, revelou que os antígenos CD94 e granzima B foram expressos pela quase totalidade das células NK CD56++ e o CD69 em cerca de 70%, enquanto que os restantes antígenos de linhagem NK, praticamente não foram expressos.

Quadro 14- Expressão de antígenos de linhagem NK (a) e de activação, adesão e receptores de citocinas (b), nas sub-populações de células NK das CPSP dos dadores após a incubação com IL-2.

a

	CD56++	CD56+	p
CD16	3,6 (0,0-29,1)	44,6 (0,0-79,4)	0,03
CD57	3 (0,0-9,4)	62,6 (25,7-83,0)	0,002
CD69	65,8 (42,5-95,2)	74,2 (52,7-92,2)	ns
CD94	91,6 (81,2-97,8)	36,7 (19,5-57,8)	0,002
CD158a	5,9 (0,0-11,3)	50,8 (12,0-73,4)	0,002
CD161	8,1 (0,0-71,7)	52,2 (0,0-79,6)	ns
NKB1	3,8 (0,0-6,8)	20 (0,6-31,5)	0,018
Granz B	84,9 (70,1-97,3)	93,4 (80,3-98,6)	ns

b

	CD56++	CD56+	p
CD2	90,2 (86,1-93,9)	68,8 (39,6-87,4)	0,003
CD7	89,8 (80,6-97,0)	96,3 (88,7-98,6)	ns
CD11a	98,6 (96,1-100,0)	93,8 (70,0-99,8)	ns
CD11c	92 (72,2-100,0)	66,8 (51,4-86,2)	0,009
CD25	2,3 (1,1-7,8)	2,2 (1,3-4,0)	ns
CD117	69,6 (23,0-90,2)	1,2 (0,2-4,4)	0,002
CD122	0 (0,0-9,7)	0 (0,0-20,0)	ns
HLA-DR	50,4 (35,3-78,0)	20,1 (3,1-49,2)	0,009

Legenda: p- Valor de p obtido para a comparação entre as células CD56++ e as células CD56+.

Os antígenos CD2, CD7, CD11a e CD11c continuaram presentes na maioria das células CD56⁺⁺, o CD117 foi expresso em cerca de 70% e o HLA-DR em cerca de 50% destas células.

Quanto à sub-população CD56⁺, observou-se uma grande expressão de antígenos de linhagem NK, os antígenos estudados foram expressos em mais de metade das células, com exceção para o NK β 1, que apenas foi expresso em 20% das células. Os antígenos CD7 e CD11a foram expressos em quase todas as células e verificou-se uma expressão de aproximadamente 70% de CD2 e CD11c. O HLA-DR foi expresso apenas em 20% das células.

Em cada uma das sub-populações de células NK dos doadores, comparou-se o fenótipo das CPSP antes (Quadro 10) e após (Quadro 14) a incubação com IL-2. Nas células CD56⁺⁺, observou-se um aumento da expressão de CD69, 4,8% para 65,8% ($p=0,028$), de granzima B, 22,9% para 84,9% ($p=0,018$) e de CD117, 0,0% para 69,6% ($p=0,018$). O CD122 deixou de estar presente após a incubação, inicialmente foi expresso em 90,5% das células e no final não foi expresso, 0,0% ($p=0,028$) (Fig. 22).

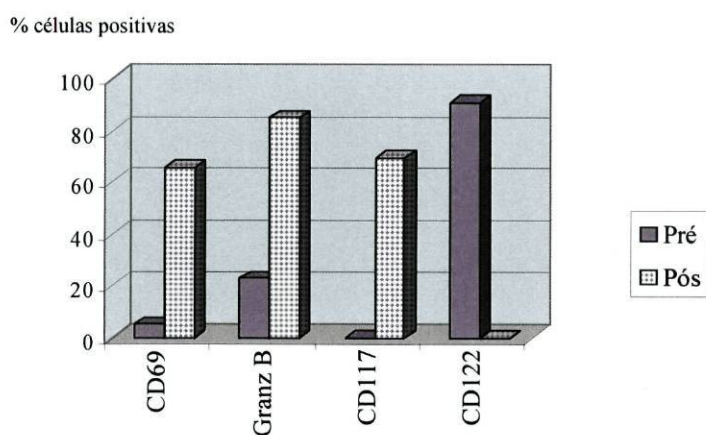


Fig. 22- Efeito da incubação com IL-2 no fenótipo das células CD56⁺⁺ das CPSP dos doadores.

Nas células CD56⁺ constatou-se igual tendência na expressão dos antígenos CD69 e CD122. A percentagem de células positivas para o CD69 aumentou de 5,8% para 74,2% ($p=0,018$) e para o CD122 diminuiu de 39,3% para 0,0% ($p=0,028$). A variação da expressão de NK β 1, ainda que pequena foi estatisticamente significativa, aumentou de 13,9% para 20,0% ($p=0,018$) (Fig. 23).

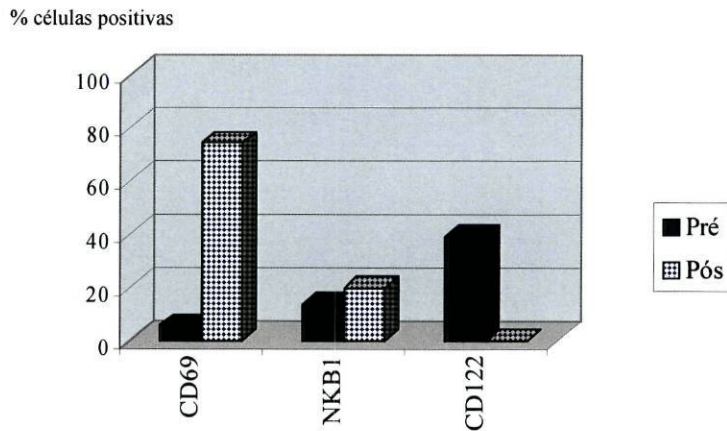


Fig. 23- Efeito da incubação com IL-2 no fenótipo das células CD56+ das CPSP dos dadores.

Como se pode observar no Quadro 14, as duas sub-populações de células NK apresentaram várias diferenças fenotípicas, especialmente na expressão de antígenos de linhagem NK. Os antígenos CD16, CD57, CD158a e NK β 1 foram mais expressos nas células CD56+ (44,6%; 62,6%; 50,8% e 20%) do que nas células CD56++ (3,6%; 3,0%; 5,9% e 3,8%). Desta linhagem de antígenos, apenas o CD94 foi mais expresso nas células CD56++ (91,6%) do que nas células CD56+ (36,7%).

As células CD56++ expressaram mais antígenos de activação e de adesão do que as CD56+. Assim, 90,2% das células CD56++ expressaram CD2, 92,0% expressaram CD11c, 69,6% CD117 e 50,4% HLA-DR, enquanto que os mesmos antígenos apenas foram expressos em respectivamente, 68,8%, 66,8%, 1,2% e 20,1% das células CD56+. A Fig. 24, salienta as diferenças estatisticamente significativas referidas.

Após a incubação das CPSP com IL-2 as diferenças observadas entre as células CD56++ e CD56+ foram semelhantes às encontradas antes deste tratamento. As células CD56++ exprimiram mais CD94, CD11c e HLA-DR e menos CD16, CD57, CD158a e NK β 1 do que as CD56+. Salienta-se que a expressão de CD16, foi apenas de 44,6% nas células CD56+ das CPSP após a incubação com IL-2, enquanto que antes da incubação este antígeno foi expresso por 91,8% destas células.

Alguns antígenos como o CD161 e a granzima B, que nas CPSP antes da incubação, haviam sido mais expressos nas células CD56+ do que nas CD56++, após a incubação foram expressos de igual modo nas duas populações. Também o CD25 que

antes da incubação foi menos expresso nas CD56+ do que nas CD56++, foi expresso de modo idêntico pelas duas sub-populações de NK, após a incubação.

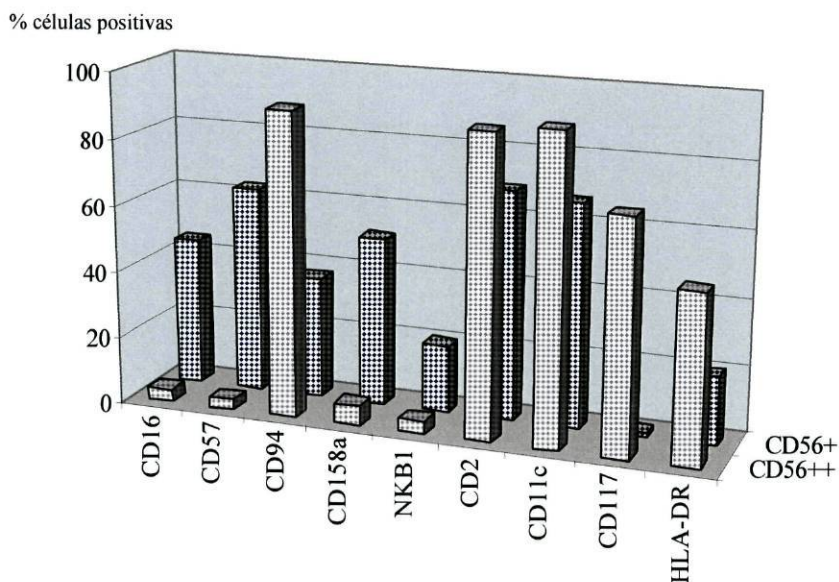


Fig. 24- Diferenças fenotípicas entre as células CD56++ e CD56+ das CPSP dos doadores, após a incubação com IL-2.

Após a incubação com IL-2, surgiram novas diferenças entre as células CD56+ e CD56++, nomeadamente o CD2 e o CD117 que foram mais expressos nas células CD56++. Ressalta-se, após a incubação com IL-2, a elevada expressão de CD117 nas células CD56++, cerca de 70%, e a sua ausência nas células CD56+ e em ambas as sub-populações antes da incubação.

5.3.2- Fenótipo das sub-populações de células NK das CPSP dos doentes, após incubação com IL-2

Após a incubação com IL-2, procedeu-se a nova análise fenotípica das células NK das CPSP dos doentes. A sub-população CD56++ exprimiu na sua maioria CD94. A granzima B foi expressa em cerca de 60% das células e o CD16 em cerca de 40%. Os antígenos CD2, CD7, CD11a e CD11c foram expressos em quase todas as células

CD56++, o CD69 em cerca de 45% e o HLA-DR em aproximadamente 30% das células (Quadro 15).

Nas células CD56+ os antígenos de linhagem NK foram muito expressos. Praticamente todas as células exprimiram CD16, CD94 e granzima B, o CD69 foi expresso por 70%, e o CD57 e o CD161 foram expressos em cerca de metade das células. Quanto aos restantes antígenos estudados, o CD2, CD7 e CD11a foram expressos pela maioria das células CD56+, o CD11c estava presente à superfície de aproximadamente 70% e o HLA-DR encontrava-se em cerca de 40% das células.

Quadro 15- Expressão de antígenos de linhagem NK (a) e de activação, adesão e receptores de citocinas (b) nas sub-populações de células NK das CPSP dos doentes após a incubação com IL-2.

a

	CD56++	CD56+	p
CD16	40 (2,6-43,4)	77,8 (64,6-89,1)	0,001
CD57	6,3 (1,4-18,9)	55,6 (32,6-80,5)	0,001
CD69	45,7 (19,8-85,9)	66,6 (46,5-87,8)	ns
CD94	95,2 (75,9-100,0)	77,6 (48,8-94,9)	0,015
CD158a	5,7 (2,6-21,4)	19,1 (7,3-52,5)	0,021
CD161	9,6 (0,0-42,9)	48,7 (2,4-73,7)	0,049
NKB1	2,8 (2,1-6,4)	14,3 (2,0-51,2)	ns
Granz B	64,1 (46,0-89,9)	90,8 (84,8-99,8)	0,005

b

	CD56++	CD56+	p
CD2	92,9 (78,9-97,9)	79,8 (64,5-94,5)	0,049
CD7	94,4 (85,9-96,2)	96 (88,8-100,0)	ns
CD11a	100 (95,6-100,0)	98 (46,8-100,0)	ns
CD11c	92,5 (74,8-96,9)	70,2 (50,2-92,1)	0,008
CD25	6,5 (2,8-19,1)	5,9 (0,8-23,6)	ns
CD117	0 (0,0-13,3)	0,2 (0,1-2,1)	ns
CD122	6,6 (0,0-15,0)	1,4 (0,0-12,7)	ns
HLA-DR	32 (14,5-76,7)	37,3 (24,9-67,9)	ns

Legenda: p- Valor de p obtido para a comparação entre as células CD56++ e as células CD56+.

Comparou-se o fenótipo das células CD56++ e CD56+ dos doentes antes (Quadro 11) e após (Quadro 15) a incubação com IL-2. Apenas se registaram variações na expressão de CD69. Na sub-população CD56++ a expressão de CD69 aumentou de 3,3% para 45,7% ($p=0,018$) e nas células CD56+ aumentou de 9,1% para 66,6% ($p=0,012$). A expressão de CD57 nas células CD56++ aumentou após a estimulação com IL-2, contudo os valores observados são extremamente baixos, ainda que estatisticamente significativos (1,2% - 6,3%, $p=0,018$).

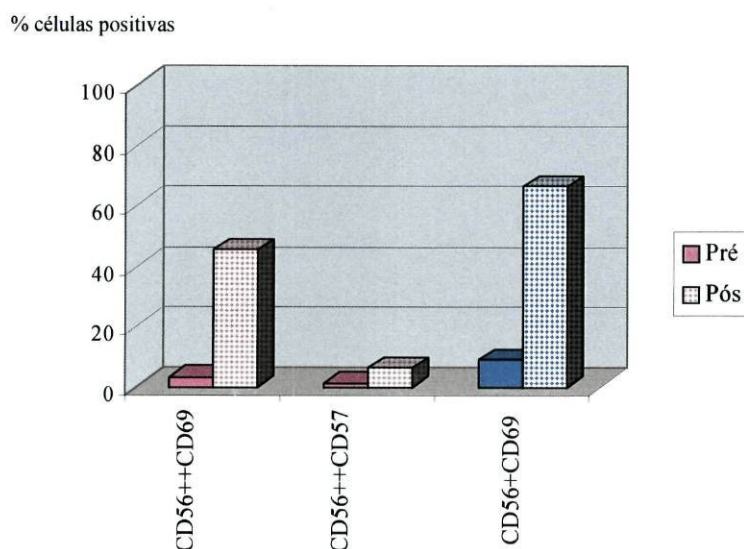


Fig. 25- Efeito da incubação com IL-2 no fenótipo das células CD56++ e CD56+ das CPSP dos doentes.

No Quadro 15 estão referidas as percentagens de células positivas para os antígenos estudados nas sub-populações CD56++ e CD56+ das CPSP de doentes, após a incubação com IL-2. Como se pode observar, quase todos os antígenos de linhagem NK (CD16, CD57, CD158a, CD161 e granzima B) foram mais expressos nas células CD56+ do que nas CD56++. Assim estes antígenos foram expressos por respectivamente 77,8%, 55,6%, 19,1%, 48,7% e 90,8% das células CD56+, e por respectivamente 40,0%, 6,3%, 5,7%, 9,6% e 64,1% das células CD56++. Somente o CD94 foi mais expresso nas células CD56++, 95,2%, do que nas CD56+, 77,6%.

A expressão dos antígenos CD2 e CD11c, foi maior nas células CD56++, respectivamente 92,9% e 92,5%, do que nas CD56+, 79,8% e 70,2%. Os restantes antígenos estudados foram expressos de forma semelhante pelas duas sub-populações.

A Fig. 26 ilustra as diferenças estatisticamente significativas entre as duas sub-populações.

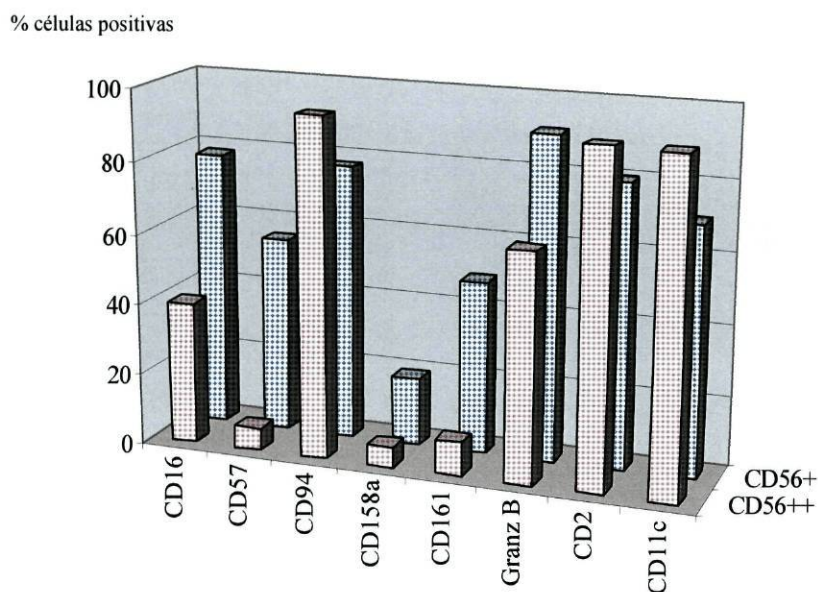


Fig. 26- Diferenças fenotípicas entre as células CD56++ e CD56+ das CPSP dos doentes, após a incubação com IL-2.

Praticamente todas as diferenças observadas entre as células CD56++ e CD56+ das CPSP antes da incubação com IL-2 mantiveram-se após a incubação, nomeadamente a maior expressão de CD16, CD57, CD158a e granzima B nas células CD56+ do que nas células CD56++ e a menor expressão de CD94, CD2 e CD11c nas células CD56+ do que nas CD56++.

Alguns antígenos foram expressos de forma diferente nas sub-populações de células NK das CPSP, antes da incubação com IL-2, respectivamente o antígeno NK β 1, mais expresso nas CD56+ e do HLA-DR, mais expresso nas CD56++, contudo após a incubação com IL-2 estas diferenças deixaram de se observar.

De todas as diferenças verificadas após a incubação com IL-2, apenas uma não havia sido observada antes da incubação. A expressão de CD161 foi maior nas células CD56+ do que nas células CD56++.

5.3.3- Comparação das sub-populações de células NK, dos dadores e dos doentes, nas CPSP, após a incubação com IL-2

Na Fig. 27, visualizam-se as diferenças estatisticamente significativas entre as células CD56++ das CPSP dos dadores e dos doentes, após a incubação com IL-2. As células CD56++ dos dadores exprimiram mais granzima B e CD117, respectivamente 84,9% e 69,6%, do que as dos doentes, 64,1% e 0,0%, ($p=0,018$) e ($p=0,002$), de salientar a total ausência de expressão de CD117 nas células dos doentes. Nos doentes, 40,0% das células CD56++ exprimiram CD16 e nos dadores apenas 3,6% delas o exprimiram ($p=0,018$). O CD25 foi mais expresso nas células dos doentes (6,5%) do que nas dos dadores (2,3%) ($p=0,035$).

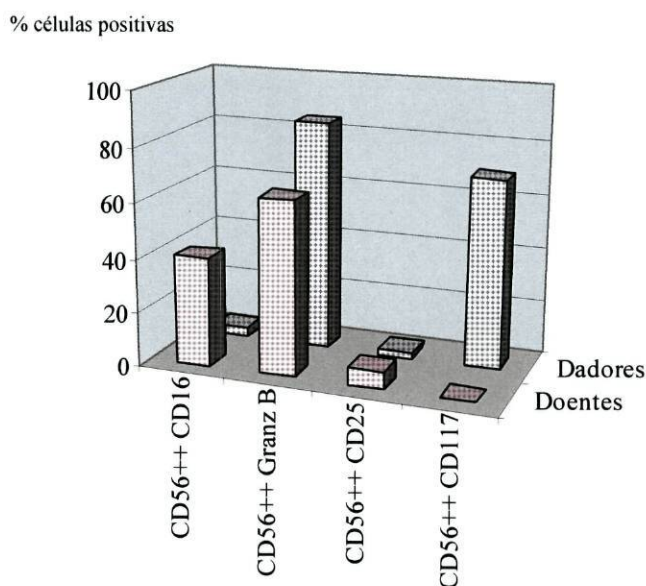


Fig. 27- Diferenças fenóticas entre as células CD56++ das CPSP dos dadores e dos doentes, após a incubação com IL-2.

A Fig. 28 realça as diferenças estatisticamente significativas entre as células CD56+ das CPSP, dos dadores e dos doentes, após a incubação com IL-2. Como se pode observar, as referidas células dos doentes exprimiram significativamente mais CD16 (77,8%), CD94 (77,6%), CD25 (8,9%) e HLA-DR (37,4%) do que as dos dadores, respectivamente, 44,6%, 36,7%, 2,2% e 20,1%; ($p=0,015$), ($p=0,008$),

($p=0,045$) e ($p=0,045$). Apenas o CD158a foi mais expresso nas células dos dadores (50,8%) do que nas dos doentes (19,1%) ($p=0,037$).

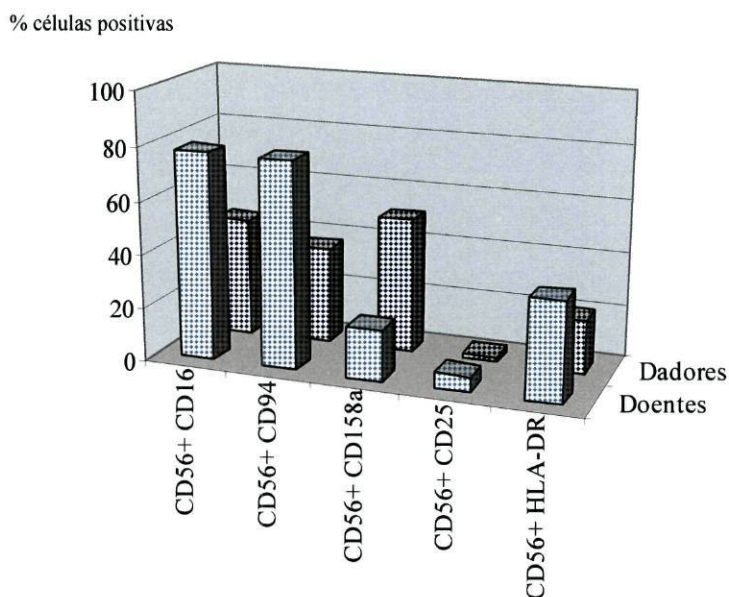


Fig. 28- Diferenças fenotípicas entre as células CD56+ das CPSP dos dadores e dos doentes, após a incubação com IL-2.

Sumarizando, a IL-2 conduziu a alterações fenotípicas nas células NK dos dadores e dos doentes, alterações essas nem sempre idênticas nos dois grupos. Assim, verificou-se que o CD117, que passa de uma expressão nula para uma expressão de cerca de 70% nos dadores, nos doentes a sua expressão continuou a ser nula após a estimulação com a IL-2. Tal como nos dadores (22,9%-84,9%), nos doentes, a expressão de granzima B nas células CD56++, aumentou (37,4% para 64,1%), no entanto o teste estatístico utilizado não considerou significativa esta variação. Não significativa foi também, a variação ocorrida para o CD122, cuja expressão diminuiu nas células CD56++ dos doentes de 50,8% para 6,6%, diminuição esta também observada nos dadores (90,5%-0,0%), embora neste grupo o teste estatístico utilizado a considerasse significativa.

A única variação comum, estatisticamente significativa, quer para os dadores, quer para os doentes, foi o incremento da expressão de CD69 nas células CD56++ e nas CD56+.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Nos últimos anos assistiu-se a uma rápida evolução da imunoterapia, tendo-se desenvolvido várias estratégias com o objectivo de eliminar DRM por estimulação das células NK e dos linfócitos T, entre as quais se destaca a utilização de IL-2, quer *in vivo*, quer *in vitro*.¹⁰⁰ Em ambos os casos, foi comprovada a acção desta citocina no aumento da sobrevida livre de doença após transplantes de medula óssea autólogos.⁹¹ Como para muitas das citocinas conhecidas, a precisa acção da IL-2 nos mecanismos anti-tumorais ainda não foi por completo desvendada, no entanto reconhece-se o seu papel no aumento da actividade citotóxica dos linfócitos T citotóxicos e das células NK.¹⁰¹ No presente estudo, pretendeu-se analisar o efeito *in vitro* desta citocina no fenótipo das células citotóxicas de CPSP de doentes e relacionar as possíveis alterações fenotípicas com a actividade funcional dos antigénios celulares avaliados.

Neste trabalho procedeu-se à caracterização fenotípica de linfócitos T e de sub-populações de células NK, CD56++ e CD56+, presentes em sangues periféricos e em CPSP, de dois grupos de indivíduos, dadores e doentes com hemopatias malignas. Tratou-se de um estudo sistemático onde se efectuaram diversas comparações entre grupos, e no caso das células NK, entre sub-populações. A aplicação de testes estatísticos a todas as determinações antigénicas, pode ser criticada, uma vez que habitualmente só são consideradas expressões positivas, expressões superiores a 10-15%. Assim, várias comparações que foram estatisticamente significativas poderão não ser discutidas, pois são relativas a expressões negativas.

Inicialmente avaliamos as populações linfocitárias dos sangues periféricos do grupo dos dadores e do dos doentes e procedemos à sua comparação. Podemos constatar que os dois grupos apresentaram percentagens semelhantes das populações linfocitárias estudadas, linfócitos T e B, células NK e respectivas sub-populações, e que essas percentagens são semelhantes às descritas na literatura.^{11,102-106} A única diferença encontrada entre grupos, refere-se à percentagem de linfócitos totais, consideravelmente menor nos doentes que nos dadores. Tal observação não é surpreendente, uma vez que o grupo de doentes é constituído por doentes com hemopatias malignas e como tal, com alterações hematológicas nas distintas linhagens celulares.

Nos dadores, as percentagens determinadas para cada uma das populações leucocitárias presentes nas CPSP (linfócitos T e B, células progenitoras, células NK e respectivas sub-populações) foram idênticas às observadas por outros grupos, exceptuando a menor percentagem de células NK.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷ Assim verificamos que os linfócitos T correspondiam a cerca de 70% dos linfócitos totais e que os linfócitos B correspondiam a aproximadamente 20%. As células NK representavam 5,1% dos linfócitos, sendo que destas cerca de 7% eram CD56++ e as restantes 93% eram CD56+. Nas CPSP, não observamos diferenças entre os grupos na percentagem de linfócitos totais. Contudo, quando comparada a percentagem de linfócitos totais nos sangues periféricos e nas CPSP dos doentes, verificamos que nas CPSP existiam mais linfócitos que nos sangues periféricos. Esta ocorrência deve-se ao processo de obtenção das CPSP, uma vez que durante as afereses colhem-se essencialmente células mononucleares.

O estudo dos linfócitos T em sangues periféricos de dadores, teve como objectivo encontrar um padrão normal de expressão para os diferentes antigénios incluídos no nosso painel. Assim, estudamos a expressão de CD11a, CD11c, CD25, CD28, CD122, HLA-DR, CD16, CD56, CD57, CD69, CD94, CD158a, CD161, NKβ1 e granzima B nos linfócitos T e a expressão de CD25, CD122 e CD28 nos linfócitos CD4+ e CD8+. Os valores de expressão antigénica observados nos linfócitos T do grupo dos dadores foram semelhantes aos descritos por outros grupos para indivíduos saudáveis, no entanto verificaram-se algumas excepções.^{11,23,30,32,37,39,66,75,84,103,104} Assim, como referido na literatura, verificamos que o CD25 foi expresso por cerca de 30% dos linfócitos^{39,103,104} e que o CD28 se encontrava presente na maioria destas células.^{32,104} O antigénio CD57 foi expresso por cerca de 10% dos linfócitos T tal como descrito por Funaro et al e por Rondelli et al.^{75,104} A expressão de CD16 pelos linfócitos T dos dadores foi praticamente nula; grupos como os de Dunne et al e Robertson et al e Tomasello et al, também observaram expressões vestigiais deste antigénio.^{11,23,103} A percentagem de linfócitos T a expressarem CD56 foi ligeiramente maior no nosso grupo de dadores, cerca de 24%, do que as verificadas por outros grupos. Dunne et al e Robertson et al apenas observaram menos de 5% dos linfócitos a expressarem CD56^{11,103} e Rondelli et al, observaram cerca de 15%.¹⁰⁴ No nosso estudo a expressão de CD11a encontrava-se diminuída no grupo de dadores comparativamente ao descrito, contudo a expressão deste antigénio é muito variável pois é regulado por estímulos

externos.¹⁰⁸ O CD122 não foi expresso nos linfócitos T dos dadores, no entanto está relatada a expressão constitutiva deste receptor em linfócitos CD8+CD56+, embora não em linfócitos CD4+.⁴⁴ Assim, como a população de linfócitos CD8+ correspondia a 34% dos linfócitos T dos dadores (dados não apresentados) seria de esperar que o CD122 fosse pelo menos expresso por essa percentagem de células. No entanto, Rondelli et al, também não observou a expressão deste antigénio nos linfócitos T dos sangues periféricos de um grupo de indivíduos saudáveis.¹⁰⁴ Os KIR e os KLC podem ser expressos em linfócitos T, contudo, a sua expressão está confinada a pequenas sub-populações.^{49,74} No nosso trabalho, uma vez que se estudaram estes NKR na população total de linfócitos T, os valores encontrados foram inferiores a 10-15%.

Quando comparada a expressão antigénica, dos linfócitos T dos sangues periféricos, dos dadores e dos doentes, verificamos que esta era semelhante para a maioria dos antigénios. Contudo observamos que os linfócitos T dos doentes expressaram menos CD28 e CD25 e mais CD57 do que os dos dadores e que razão CD4/CD8 se encontrava invertida neste grupo. Como os referidos antigénios são principalmente expressos, respectivamente, na sub-população CD4+ e na sub-população CD8+ poder-se-ão assim justificar as diferenças observadas entre os dois grupos.^{32,39,75} Ainda relativamente à expressão de CD28, constatamos que os linfócitos CD4+ dos dadores apresentam mais este antigénio à sua superfície do que os dos doentes, podendo estar a menor expressão de CD28 nos linfócitos CD4 dos doentes relacionada com alguma anergia linfocitária.¹⁰⁹ A presença de granzima B estava aumentada nos linfócitos T dos doentes. Como foi referido anteriormente, os doentes apresentam mais linfócitos CD8+ do que CD4+, o que justifica a maior detecção de granzima B nas células deste grupo. A expressão de HLA-DR foi maior nos linfócitos T dos doentes, sugerindo que estes se encontrariam activados.^{37,72}

A avaliação do fenótipo dos linfócitos T das CPSP dos dadores permitiu obter valores de referência para os antigénios avaliados e assim compará-los com os descritos por outros grupos. As expressões dos antigénios CD16, CD25, CD28 e CD122 nos linfócitos T do nosso grupo de dadores foram semelhantes às determinadas por Rondelli et al e por Dreger et al.^{104,107} Apenas obtivemos expressões ligeiramente diferentes para o CD56 e para o CD57. Entre 12 a 20% dos linfócitos T das CPSP do nosso grupo de dadores expressaram estes antigénios enquanto que Rondelli et al observaram 5% de linfócitos a exprimirem os referidos antigénios. Podemos inferir que o nosso grupo de

dadores possuiria mais linfócitos citotóxicos do que os do grupo estudado pelo citado autor.

Quando comparamos a expressão antigénica dos linfócitos T das CPSP dos dadores e dos doentes, observamos diferenças semelhantes às verificadas para os linfócitos dos sangues periféricos. Assim, observamos que os linfócitos T dos doentes expressaram mais CD57 e mais NKR do que os dos dadores. Estes antigénios são expressos maioritariamente pelos linfócitos CD8⁺.^{50,75,110} Como a razão CD4/CD8 se encontra invertida no grupo dos doentes, estes apresentam mais linfócitos CD8⁺ do que os dadores, logo observamos mais CD57 e NKR nestas células dos doentes. Pela mesma razão, a granzima B estava mais presente nos linfócitos T dos doentes do que nos dadores. A expressão dos antigénios CD25 e CD28 foi idêntica nas células dos doentes e dos dadores, contrariamente ao observado nas mesmas células dos sangues periféricos. No entanto, a expressão de CD28 foi ligeiramente superior nas células dos doentes, ainda que não estatisticamente significativa. O HLA-DR também foi mais expresso nas células dos doentes que nas dos dadores, como o observado quando comparados os linfócitos T dos sangues periféricos.

Os linfócitos T das CPSP e dos sangues periféricos dos doentes foram comparados verificando-se que a expressão dos antigénios estudados foi semelhante em ambos os produtos, apenas observamos diferenças na expressão de NKR. Os linfócitos T das CPSP exprimiram mais NKR e CD16 do que os dos sangues periféricos. O G-CSF poderá ser o responsável por estas alterações. Rondelli et al estudou o efeito deste factor de crescimento no fenótipo das células mononucleares do sangue periférico e constatou que este induzia a menor expressão de CD16, CD25, CD57 e CD122.¹⁰⁴ Relativamente à expressão de CD16 o nosso estudo concluí o oposto do estudo deste autor.

As células NK são usualmente divididas em duas sub-populações caracterizadas pela distinta intensidade de expressão do antigénio CD56. Assim, nos sangues periféricos dos dadores observam-se cerca de 90% de células NK a expressarem fracamente o antigénio CD56 e as restantes 10% a o expressarem intensamente.¹⁰ Tal como descrito por estes autores e observado no nosso estudo, estas duas sub-populações são fenotipicamente distintas. As células NK CD56⁺⁺ são CD25⁺HLA-DR⁺CD94⁺CD16⁻CD57⁻ e quase não expressam KIR e NKβ1, enquanto que as células CD56⁺ são CD16⁺CD57⁺CD25⁻HLA-DR⁻ e exprimem os KIR e KLR. Destaca-se que o CD94 é

mais expresso nas células CD56++ do que nas CD56+ e que a granzima B estava presente em mais células CD56+ do que em células CD56++. Verificamos, ainda, que praticamente todas as células NK, quer as CD56++ quer as CD56+, exprimiam CD2, CD7, CD11a e CD122, estando de acordo com os resultados publicados.^{10,11,13,25,59,103,111} No caso do CD7 e do CD11c, observamos, tal como Lima et al, que o CD7 é mais expresso na sub-população CD56+ do que na CD56++ e que o CD11c é mais expresso na CD56++ do que na CD56+, contudo estas diferenças não foram estatisticamente significativas no nosso grupo de doadores.¹³ Verificamos, ainda, que a expressão de HLA-DR nas células NK CD56++ foi maior do que nas CD56+, tal como descrito por Lima et al.¹³ No entanto, o nosso grupo de doadores apresentou expressões inferiores às encontradas por este grupo, para indivíduos saudáveis, e às determinadas no nosso grupo de doentes.¹³ Constatamos que o CD117 estava ausente à superfície das células NK CD56++ e CD56+ dos doadores e dos doentes, embora esteja descrito que as células CD56++ exprimem constitutivamente este antigénio.^{45,47,59,112}

O fenótipo da sub-população NK CD56++ foi idêntico nos sangues periféricos dos doadores e nos dos doentes. Apenas observamos diferenças na expressão de HLA-DR e de CD11c, mais células CD56++ dos doentes apresentaram HLA-DR à sua superfície e menos células destes indivíduos expressaram CD11c. No caso do CD11c, embora o teste estatístico considere a diferença entre os grupos significativa, as percentagens de células CD56++ que expressaram este antigénio foram muito elevadas em ambos os grupos, 97,6% nos doadores e 90,1% nos doentes. O fenótipo da sub-população NK CD56+ dos sangues periféricos dos doadores e dos doentes, embora semelhante, revelou diferenças na expressão de HLA-DR e CD69. Para o CD69 as variações observadas foram em percentagens inferiores a 10-15%. Resumindo, apenas a expressão de HLA-DR foi notoriamente diferente nos dois grupos, tal como constatado para a população CD56++ e para os linfócitos T.

Nas CPSP dos doadores e dos doentes avaliamos o fenótipo das sub-populações de células NK, CD56++ e CD56+. Neste produto a proporção das distintas sub-populações foi idêntica à observada nos sangues periféricos. O fenótipo das células CD56++ e das CD56+ das CPSP dos doadores foi muito semelhante ao das citadas células do sangue periférico, ou seja, as CD56++ são CD94+HLA-DR+CD16-CD57- e praticamente não exprimem outros KIR e KLR. As células CD56+ são CD16+CD57+CD25-HLA-DR- e exprimem KIR e KLR. As restantes semelhanças e diferenças na expressão antigénica das sub-populações CD56++ e CD56+ foram iguais

às verificadas para os sangues periféricos. De ressaltar o CD25 que não foi expresso na população CD56⁺⁺. O CD2, o CD7 e as integrinas estudadas foram expressas em praticamente todas as células NK, CD56⁺⁺ e CD56⁺, dos doentes e dos dadores ainda que os teste estatísticos utilizados assinalassem algumas diferenças significativas. Tal como nos sangues periféricos, o CD117 não foi expresso nas células NK CD56⁺⁺.

A comparação da sub-população NK CD56⁺⁺ das CPSP dos dadores e dos doentes demonstrou que o fenótipo das células dos dois grupos era semelhante. Só a expressão de CD122 foi maior nos dadores do que nos doentes. A mesma comparação nas células CD56⁺ revelou que também o CD122 foi expresso em mais células dos dadores do que dos doentes e que o CD94 e o HLA-DR foram expressos em menos células dos dadores do que dos doentes. Podemos então especular que as células NK dos dadores estariam mais receptivas ao estímulo da IL-2 do que as dos doentes pois uma maior percentagem de células apresentava o receptor desta interleucina à sua superfície.

No grupo dos doentes comparamos o fenótipo das duas sub-populações de células NK nos sangues e nas CPSP. Quer nas células CD56⁺⁺ quer nas CD56⁺ verificamos que mais células dos sangues periféricos do que das CPSP expressaram CD11a e que mais células das CPSP do que dos sangues periféricos continham granzima B, embora as percentagens observadas fossem muito próximas, em ambos os casos. Tal observação permite-nos afirmar que a acção do G-CSF e todo o processo de mobilização e colheita envolvido na obtenção de CPSP não modificou substancialmente o fenótipo das células NK. Miller et al, também constatou que o G-CSF praticamente não alterou a expressão fenotípica destas células, apenas observou uma diminuição na densidade de expressão de CD56.¹¹³ Este autor relata ainda, que este factor de crescimento diminui a proliferação e a actividade citotóxica das células NK mas que após a incubação com IL-2 durante 5 semanas as células retomam as suas características iniciais.¹¹³

Nas nossas condições de cultura, a incubação das CPSP dos dadores com IL-2 conduziu a uma ligeira diminuição de linfócitos T e a um pequeno aumento de linfócitos B, já nas CPSP dos doentes não alterou a representatividade das populações linfocitárias. Estas observações poderão ser justificadas pelo menor volume da cultura das células dos dadores. No entanto a comparação das CPSP de dadores e de doentes após a incubação apenas evidenciou diferenças na percentagem de linfócitos B presentes e não na de linfócitos T. A referir, ainda que não significativa, a diminuição

da percentagem de células progenitoras em ambos os grupos, principalmente no grupo dos dadores.

A IL-2 estimula a actividade citolítica dos linfócitos T e das células NK.^{69,94,95} Com o nosso estudo foi possível observar o efeito desta citocina na expressão de receptores celulares envolvidos nos mecanismos citotóxicos. Assim, após a incubação com IL-2, observamos uma maior percentagem de linfócitos T dos dadores e dos doentes, bem como de células NK dos dadores e dos doentes, a exprimirem CD69, ou seja, o CD69 foi expresso em mais células citotóxicas. Este antigénio é dos primeiros a ser expresso após activação e funciona como uma molécula co-estimuladora na proliferação celular e nos mecanismos citotóxicos.⁶⁶ O aumento da expressão de CD69 após a incubação com IL-2 confirma as acções atribuídas a esta citocina. Para além desta variação, observamos outras alterações fenotípicas, nas distintas células citotóxicas estudadas, sugestivas do papel desta citocina no aumento da actividade citolítica.

Nos linfócitos T dos dadores e dos doentes verificamos uma diminuição na expressão de CD122 nas células CD8+, contudo a percentagem de células que exprimiam este receptor antes da incubação já era muito reduzida (inferior a 10%). Nos linfócitos T dos dadores o CD122 também foi menos expresso nas células CD4+. Ainda nas CPSP dos dadores, os antigénios CD16 e CD57 detectaram-se numa menor percentagem de linfócitos T, embora as respectivas expressões fossem muito pequenas mesmo antes da incubação. A expressão de CD28 nos linfócitos CD8+ aumentou ligeiramente após a incubação com IL-2. Considerando a hipótese dos linfócitos CD8+CD28+ serem precursores dos linfócitos efectores, incluindo os linfócitos T citotóxicos, a IL-2 poderá ter induzido a diferenciação em linfócitos CD8+CD28+ que posteriormente poderão originar linfócitos CD8+CD28- citotóxicos.³⁵

Observamos que os resultados da comparação do fenótipo dos linfócitos T das CPSP dos dadores e dos doentes após a incubação com IL-2 foram semelhantes aos da comparação entre os mesmos grupos nas CPSP antes da incubação. Uma vez que os doentes possuíam mais linfócitos T citotóxicos (maioritariamente CD8+) do que os dadores, os antigénios CD16, CD57, CD158a, NK β 1 e granzima B foram mais expressos nos linfócitos T dos doentes do que dos dadores. Já o CD28 como é expresso essencialmente pela sub-população CD4+ foi menos expresso nos linfócitos T dos doentes do que nos dos dadores. Também constatamos que o HLA-DR foi sempre expresso num maior número de células dos doentes do que dos dadores,

independentemente da mobilização com G-CSF e da incubação com IL-2. Tal observação será provavelmente uma consequência dos mecanismos fisiológicos associados às patologias hematológicas deste grupo de indivíduos.⁷²

Nas células NK dos dadores, quer na sub-população CD56⁺⁺, quer na sub-população CD56⁺, observamos, após a incubação com IL-2, uma diminuição na percentagem de células a expressarem CD122. Assim como relatado por outros grupos, esta evidência poderá resultar da ligação da citocina com o seu receptor, tornando-o inacessível ao anticorpo utilizado na marcação fenotípica.⁴⁰ Na sub-população de células NK CD56⁺⁺ dos dadores verificamos ainda, o aumento da expressão de CD117 e de granzima B. Autores como Spitzer et al referiram que a IL-2 aumenta a actividade e a expressão de granzima B nas células NK, ou seja, aumenta a citotoxicidade celular destas células uma vez que a granzima B é responsável pela destruição do DNA das células alvo.^{43,76,79,114} No nosso trabalho, o aumento de granzima B após a incubação com IL-2 apenas se observou nas células CD56⁺⁺. Possivelmente as células CD56⁺⁺ são mais susceptível à acção desta citocina do que as células CD56⁺ uma vez que são as únicas a expressar constitutivamente o receptor de alta afinidade e afinidade intermédia da IL-2.^{10,115} O CD117 está presente nas células hematopoiéticas imaturas e também é expresso constitutivamente pelas células NK CD56⁺⁺, o que apoia a hipótese destas células serem precursoras das células NK CD56⁺.^{45,47} As células CD56⁺⁺ das CPSP do nosso grupo de dadores, contrariamente ao descrito, não apresentavam CD117. Contudo, após a incubação com IL-2 este antigénio foi expresso em 70% das células CD56⁺⁺. Podemos, por esta razão especular que as células NK CD56⁺⁺ presentes antes da incubação estariam num estado de maturação já avançado, não expressando por isso CD117. O aparecimento deste antigénio, após a incubação com IL-2, poderá estar associado à diferenciação das células progenitoras CD34⁺, em células CD56⁺⁺. Quanto às células CD56⁺⁺ analisadas antes da incubação, poderão ter sofrido um processo de maturação e evoluído para CD56⁺. Vários grupos conseguiram gerar células NK CD56⁺⁺ *in vitro* a partir de células progenitoras com o estímulo desta citocina. As condições requeridas variaram, desde o tempo de incubação, a concentração de IL-2, sendo que alguns relatam a necessidade de outros factores tais como células do estroma, IL-12, IL-15, SCF, etc.¹¹⁶⁻¹²³ De comum em todos os trabalhos salienta-se o estudo em células progenitoras isoladas. No nosso trabalho as CPSP foram incubadas com IL-2 sem prévia manipulação, ou seja, a presença de outros estímulos não foi controlada.

Nos doentes, após a incubação com IL-2, não verificamos o aumento de CD117 nas células CD56⁺⁺, contudo, observamos que o CD16 foi expresso em mais células dos doentes do que nas dos dadores. O CD16 não é normalmente expresso nas células NK CD56⁺⁺ mas está presente nas CD56⁺ e o aumento da sua expressão está relacionado com a maturação das células NK.^{12,59,124} Podemos especular, que as células CD56⁺⁺ dos doentes seriam mais diferenciadas do que as dos dadores e que o número de progenitores hematopoiéticos a responder ao estímulo da IL-2 seria menor. Assim, as células CD56⁺⁺ dos doentes, analisadas após a incubação não expressaram CD117 e o CD16 foi expresso em mais células (ainda que esta última diferença não fosse estatisticamente significativa), o que apoia a hipótese da IL-2 induzir a maturação das células CD56⁺⁺ em células CD56⁺. Nas CPSP dos doentes, na sub-população CD56⁺⁺, observamos, além do aumento de células a exprimirem CD69, um aumento na percentagem de células a exprimirem CD57. Contudo, esta expressão esteve confinada a uma reduzida percentagens de células.

Nas células NK CD56⁺ das CPSP dos dadores, a incubação com IL-2 conduziu, além do aumento do número de células a expressarem CD69 e CD122, a um aumento do número de células a expressarem NK β 1. Este KIR está associado a ITIM e medeia sinais inibitórios. A expressão de KIR nas células NK indica a maior aptidão para o desempenho de fenómenos citotóxicos, uma vez que estes receptores estão envolvidos no reconhecimento das células alvo.¹²⁵ Assim, a IL-2 induziu a expressão deste receptor nas células NK CD56⁺, possivelmente aumentando a capacidade citolítica destas células. A acção da IL-2 no aumento da expressão de KIR já fora descrita por outros grupos.^{71,125,126}

Com anteriormente referido, a incubação das células CD56⁺ das CPSP dos doentes com IL-2 apenas induziu a uma importante alteração fenotípica, o aumento na percentagem de células a expressarem CD69.

Anteriormente, comentamos as variações fenotípicas induzidas pela IL-2 nas células NK das CPSP. Como conclusão, podemos afirmar que quer as células dos dadores, quer as células dos doentes, responderam favoravelmente à acção da referida citocina; em todas as células verificamos a expressão de um antigénio de activação, o CD69. No entanto, não podemos deixar de salientar, que as células dos dadores apresentaram alterações indicativas de uma resposta mais acentuada ao estímulo citocínico. Entre estas, evidencia-se o aumento das percentagens de células CD56⁺⁺ a exprimirem CD117 e granzima B o que originou diferenças fenotípicas entre dadores e

doentes quando analisados os dois grupos após incubação com IL-2. Já o aumento da expressão de NK β 1 nas células CD56+ dos dadores não se traduziu numa diferença fenotípica entre grupos após a incubação, pois percentagens semelhantes das células dos doentes expressavam este KIR antes e após a incubação. A maior expressão de CD122, antes da incubação, nas células NK CD56++ e CD56+ dos dadores, relativamente às dos doentes, deixou de se observar. Este antigénio, após a incubação com IL-2, deixou de ser expresso por ambas as sub-populações das CPSP dos dadores, e nos doentes continuou a não ser expresso em ambas as sub-populações. O antigénio CD16, após a incubação com IL-2, foi expresso em mais células CD56++ e CD56+ dos doentes do que dos dadores. Aparentemente, as células NK dos doentes foram menos receptivas à acção da IL-2, observaram-se menos alterações fenotípicas possivelmente devido à menor expressão do receptor da IL-2, CD122.

Resumindo, podemos especular que nos dadores a IL-2 induziu a diferenciação das células progenitoras em células CD56++, e das células CD56++ em células CD56+. A apoiar esta teoria apontamos o aumento de CD117 na população CD56++ e a diminuição de CD122. No grupo dos doentes, pensamos que a acção desta citocina foi mais ténue. Esta apenas poderá ter conduzido à maturação das células NK, como comprova a maior expressão de CD16 em ambas as sub-populações dos doentes relativamente às dos dadores.

Os nossos resultados demonstram que a curta incubação *in vitro* das CPSP com IL-2 permite activar os linfócitos T e as células NK. Assim este trabalho corrobora estudos anteriores que apontam a IL-2 como uma potente efectora em protocolos de terapia celular envolvendo linfócitos T e células NK.^{90,100,127} No futuro, ensaios de citotoxicidade permitirão relacionar a activação destas células com o aumento da sua capacidade citotóxica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Abboud CN, Lichtman MA. Structure of the marrow. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, editors. Williams hematology. 5th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1995. p. 25-38.
- 2- Williams DA. Stem cell model of hematopoiesis. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, et al, editors. Hematology, basic principles and practice. 3th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 126-38.
- 3- Jan Klein. History of immunology. In: Immunology, the science of self-nonsel self discrimination. New York: John Wiley and Sons, Inc; 1982. p. 20-37
- 4- Cambiaggi A, Vivier E. Cellular aspects of lymphoid differentiation: T and NK cells. In: Degos L, Linch DC, Lowenberg B, editors. Textbook of malignant haematology. 1st ed. London: Martin Dunitz; 1999. p. 49-61.
- 5- Lydyard PM, Grossi CE. Cells, tissues and organs of the immune system. In: Roitt M, Brostoff J, Male D, editors. Immunology. 6th ed. Edinburgh: Mosby; 2001. p. 15-45.
- 6- Stobo JD. Lymphocytes. In: Stites DP, Stobo JD, Wells JV, editors. Basic and clinical immunology. 6th ed. Norwalk: Appleton & Lange; 1987. p. 65-81.
- 7- Lebien TW. Lymphocyte ontogeny and homing receptors. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, editors. Williams hematology. 5th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1995. p. 921-29.
- 8- Kipps TJ. Functions of T lymphocytes: T-cell receptors for antigen. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, editors. Williams hematology. 5th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1995. p. 938-45.
- 9- Clayberger C, Krensky AM. T-cell immunity. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, et al, editors. Hematology, basic principles and practice. 3th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 90-100.
- 10- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol. 2001;22:633-40.
- 11- Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. Blood 1990;76:2421-38.
- 12- Gaddy J, Broxmeyer HE. Cord blood CD16+56- cells with low lytic activity are possible precursors of mature natural killer cells. Cell. Immunol. 1997;180:132-42.
- 13- Lima M, Teixeira MA, Queirós ML, Leite M, Santos AH, Justiça B, et al. Immunophenotypic characterization of normal blood CD56^{lo} versus CD56^{hi} NK-cell subsets and its impact on the understanding of their tissue distribution and functional properties. Blood Cells, Molecules and Diseases 2001;27:731-43.???

- 14- Trinchieri G. Functions of natural killer cells. In: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ, editors. Williams hematology. 5th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1995. p. 956-59.
- 15- Kay NE, Douglas SD. Lymphocytes and plasma cells. In: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ, editors. Williams hematology. 5th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1995. p. 907-15.
- 16- Trinchieri G. Functions of natural killer cells. In: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ, editors. Williams hematology. 5th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1995. p. 956-59.
- 17- Robertson MJ. Natural killer cell clinical studies: surface antigens of human natural killer cells in health and disease. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al. Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 327-29.
- 18- Piatier-Tonneau D. CD4 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al. Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 49-54.
- 19- Nakauchi H. CD8 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al. Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 65-7.
- 20- Trowsdale J. Antigen presentation. In: Roitt M, Brostoff J, Male D, editors. Immunology. 6th ed. Edinburgh: Mosby; 2001. p. 105-18.
- 21- Monroe JG, King LB. Regulation of activation of B and T lymphocytes. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, et al, editors. Hematology, basic principles and practice. 3th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 100-14.
- 22- Verfaillie CM. Anatomy and physiology of hematopoiesis. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, et al, editors. Hematology, basic principles and practice. 3th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 139-54.
- 23- Tomasello E, Revello V, Poggi A. CD16 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al. Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 269-71.
- 24- Voss SD, Daley J, Ritz J, Robertson MJ. Participation of the CD94 receptor complex in costimulation of human natural killer cells. *J. Immunol.* 1998;160:1618-26.
- 25- Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56^{bright} subset. *Blood* 2001;97:3146-51.

- 26- Robertson MJ, Caligiuri MA, Manley TJ, Levine H, Ritz J. Human natural killer cell adhesion molecules- differential expression after activation and participation in cytotoxicity. *J. Immunol.* 1990;145:3194-201.
- 27- Kato K. CD2 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al. *Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens.* New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 39-43.
- 28- Bowen MA. CD7 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al. *Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens.* New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 62-3.
- 29- Lee DM, Patel DD, Haynes BF. CD7 Workshop: Study of the effects of CD7 monoclonal antibodies on proliferative responses and cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al. *Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens.* New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 64-5.
- 30- Hogg, N. CD11a workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al. *Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens.* New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 343-5.
- 31- Hogg, N. CD11c workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al. *Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens.* New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 347-8.
- 32- Azuma M, Oki S. CD28 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al. *Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens.* New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 71-3.
- 33- Hombach A, Wieczarkowicz A, Marquardt T, Heuser C, Usai L, Pohl C, et al. Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors : CD3 ζ signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 ζ signaling receptor molecule. *J. Immunol.* 2001;167:6123-31.
- 34- Marti F, Krause A, Post NH, Lyddane C, Dupond B, Sadelain M, et al. Negative-feedback regulation of CD28 costimulatory by a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP6. *J. Immunol.* 2001;166:197-206.
- 35- Fiorentini S, Licenziati S, Alessandri G, Castelli F, Caligaris S, Bonafede M, et al. CD11b expression identifies CD8⁺ CD28⁺ T lymphocytes with phenotype and function of both naive/memory and effector cells. *J. Immunol.* 2001;166:900-7.
- 36- Galea-Lauri J, Darling D, Gan S, Krivochtchaporov L, Kuiper M, Gaken J, et al. Expression of a variant of CD28 on a subpopulation of human NK cells: implications for B7-mediated stimulation of NK cells. *J. Immunol.* 1999;163:62-70.

- 37- Rodey GE, Lalezari P. HLA and neutrophil antigen and antibody systems. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, et al, editors. Hematology, basic principles and practice. 3th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 2220-41.
- 38- Bagby GC, Heinrich MC. Growth factors, cytokines, and the control of hematopoiesis. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, et al, editors. Hematology, basic principles and practice. 3th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 154-202.
- 39- Sasaki Y, Sugamura K. CD25 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al, editors. Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 802-4.
- 40- Nagler A, Lanier LL, Phillips JH. Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16 natural killer cells in vivo. *J. Exp. Med.* 1990;171:1527-33.
- 41- Wang H, Smith KA. The interleukin 2 receptor- functional consequences of its bimolecular structure. *J. Exp. Med.* 1987;166:1055-69.
- 42- Caligiuri MA, Zmuidzinis A, Manley TJ, Levine H, Smith KA, Ritz J. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes- identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J. Exp. Med.* 1990;171:1509-26.
- 43- Smith KA. Lowest dose interleukin-2 immunotherapy. *Blood* 1993;81:1414-23.
- 44- Oda K, Sugamura K. CD122 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al, editors. Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 830-2.
- 45- Matos ME, Schnier GS, Beecher MS, Ashman LK, Williams DE, Caligiuri MA. Expression of a functional c-kit receptor on a subset of natural killer cells. *J. Exp. Med.* 1993;178:1079-84.
- 46- Ashman LK, Cambareri AC, Nguyen L, Buhning HJ. CD117 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al, editors. Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 816-8.
- 47- Carson WE, Fehniger TA, Caligiuri MA. CD56^{bright} natural killer cell subsets: characterization of distinct functional responses to interleukin-2 and the c-kit ligand. *Eur. J. Immunol.* 1997;27:354-60.
- 48- Yu H, Fehniger TA, Fuchshuber P, Thiel KS, Vivier E, Carson WE, et al. Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34+ human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood* 1998;92:3647-57.

- 49- McMahon CW, Raulet DH. Expression and function of NK cell receptors in CD8+ T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2001;13:465-70.
- 50- Mingari MC, Moretta A, Moretta L. Regulation of KIR expression in human T cells: a safety mechanism that may impair protective T-cell responses. *Immunol. Today* 1998;19:153-7.
- 51- Bakker ABH, Phillips JH, Figdor CG, Lanier LL. Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK cells, $\gamma\delta$ T cells and antigen-specific CTL. *J. Immunol.* 1998;160:5239-45.
- 52- Sivori S, Vitale M, Bottino C, Marcenaro E, Sanseverino L, Parolini S, et al. CD94 functions as a natural killer cell inhibitory receptor for different HLA class I alleles: identification of the inhibitory form of the CD94 by the use of novel monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 1996;26:2487-92.
- 53- Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta A. Human NK-cell receptors. *Immunol. Today* 2000;21:420-2.
- 54- Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol. Today* 2000;21:228-34.
- 55- Battistini L, Borsellino G, Sawicki G, Poccia F, Salvetti M, Ristori G, et al. Phenotypic and cytokine analysis of human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells expressing NK cell receptors. *J. Immunol.* 1997;159:3723-30.
- 56- Natarajan K, Dimasi N, Wang J, Mariuzza RA, Margulies DH. Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination. *Annu. Rev. Immunol.* 2002;20:853-85.
- 57- Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, et al. CD56 bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56 dim NK cells. *Eur. J. Immunol.* 2001;31:3121-7.
- 58- André P, Brunet C, Guia S, Gallais H, Sampol J, Vivier E, et al. Differential regulation of killer cell Ig-like receptors and CD94 lectin-like dimers on NK and T lymphocytes from HIV-1-infected individuals. *Eur. J. Immunol.* 1999;29:1076-85.
- 59- Miller JS. Biology of natural killer cells in cancer and infection. *Cancer Invest.* 2002;20:1-14.
- 60- Warren HS, Kinnear BF. CD158a and b workshop panel report: Killer-inhibitory receptors and natural killer cell proliferation. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al, editors. *Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens*. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 292-4.
- 61- Tanaka J, Mori A, Ohta S, Yamamoto Y, Kobayashi S, Hashino S, et al. Expression of HLA-C-specific natural killer cell receptors (CD158a and CD158b) on peripheral

blood mononuclear cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Br. J. Haematol.* 2000;108:778-83.

62- Carretero M, Melero I, Pérez-Villar JJ, Navarro F, López-Botet M. CD158a and b workshop panel report: The HP-3E4 monoclonal antibody identifies different Ig-SF natural killer-cell receptors. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al, editors. *Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens*. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 294-5.

63- D'Andrea A, Chang C, Franz-Bacon K, et al. Molecular cloning of NK β 1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. *J. Immunol.* 1995;155:2306-10.

64- Gumpz JE, Valiante NM, Parham P, et al. Heterogenous phenotypes of expression of the NK β 1 natural killer cell class I receptor among individuals of different human histocompatibility leukocyte antigens types appear genetically regulates, but not linked to major histocompatibility complex haplotype. *J. Exp. Med.* 1996;183:1817-27.

65- Tomasello E. CD69 workshop panel report. 277-279. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al, editors. *Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens*. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 277-9.

66- Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Pena J, Solana R. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic affect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology* 1999;97:159-65.

67- Hare KJ, Jenkinson EJ, Anderson G. CD69 expression discriminates MHC-dependent and -independent stages of thimocyte positive selection. *J. Immunol.* 1999;162:3978-83.

68- López-Botet M. CD94 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al, editors. *Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens*. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 279-82.

69- Aramburu J, Balboa MA, Ramírez A, Silva A, Acevedo A, Sánchez-Madrid F. A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor- γ/δ^+ T lymphocytes, inhibition of the IL-2-dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J. Immunol.* 1990;144:3238-47.

70- Miller JS. The biology of natural killer cells in cancer, infection, and pregnancy. *Exp. Hematol.* 2001;29:1157-68.

71- Miller JS, McCullar V. Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood* 2001;98:705-13.

72- Besostri B, Beggiato E, Bianchi A, Mariani S, Coscia M, Peola S, et al. Increased expression of non-functional killer inhibitory receptor CD94 in CD8+ cells of myeloma patients. *Br. J. Haematol.* 2000;109:46-53.

- 73- Poggi A, Revello V, Nanni L, Costa P, Moretta L. CD161 (human NKR-P1A) workshop panel report In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al, editors. Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 307-12.
- 74- Ohkawa T, Seki S, Dobashi H, Koike Y, Habu Y, Ami K, et al. Systematic characterization of human CD8+ T cells with natural killer cell markers in comparison with natural killer cells and normal CD8+ T cells. *Immunology* 2001;103:281-90.
- 75- Funaro A, Malavasi F. CD57 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al, editors. Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 274-6.
- 76- Spitzer JH, Meadows GG. Modulation of perforin, granzyme A and granzyme B in murine natural killer (NK), IL-2 stimulated NK, and lymphokine-activated killer cells by alcohol consumption. *Cell. Immunol.* 1999;194:205-12.
- 77- Trapani JA. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol.* [serial online] 2001;2(12):reviews3014.1-3014.7. Available from: <http://genomebiology.com/2001/2/12/reviews/3014>. Accessed November 23.
- 78- Amezcua MA, D'Andrea A, Kubin M, Trinchieri G. Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human T and NK cells. *Cell. Immunol.* 1994;156:480-92.
- 79- Spaeny-Dekking EHA, Hanna WL, Wolbink AM, Wever PC, Kummer AJ, Swaak AJG, et al. Extracellular granzymes A and B in humans: detection of native species during CTL responses in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 1998;160:3610-6.
- 80- Valiante NM, Parham P. NK cells and CTL: opposite sides of the same coin. In: Moretta L, editor. *Molecular basis of NK cell recognition and function.* Chemical immunology. 2nd ed. Basel: KARGER; 1996. p. 147-63.
- 81- Male D. Cell-mediated cytotoxicity. In: Roitt M, Brostoff J, Male D, editors. *Immunology.* 6th ed. Edinburgh: Mosby; 2001. p. 163-72.
- 82- Metelitsa LS, Naidenko OV, Kant A. Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD11d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *J. Immunol.* 2001;167:3114-22.
- 83- Gogfrey DI, Hammond KJL, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol. Today* 2000;21:573-83.
- 84- Soloski MJ. Recognition of tumor cells by the innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 2001;13:154-62.
- 85- Ager S, Scott MA, Mahendra P, et al. Peripheral blood stem cell transplantation after high-dose therapy in patients with malignant lymphoma: a retrospective

- comparison with autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1995;16:79-83.
- 86- Nagler A, Ackerstein A, Or R, Naparstek E, Slavin S. Immunotherapy with recombinant human interleukin-2 and recombinant interferon- α in lymphoma patients postautologous marrow or stem cell transplantation. *Blood* 1997;89:3951-9.
- 87- Klingemann HG, Eaves CJ, Barnett MJ, Eaves AC, Hogge DE, Nantel SH, et al. Transplantation of patients with high risk acute myeloid leukemia in first remission with autologous marrow cultured in interleukin-2 followed by interleukin-2 administration. *Bone Marrow Transplant.* 1994;14:389-96.
- 88- Lauria F, Raspadori D, Ventura MA, Rondelli D, Zinzani PL, Gherlinzoni F, et al. Immunologic and clinical modifications following low-dose subcutaneous administration of rIL-2 in non-Hodgkin's lymphoma patients after autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1996;18:79-85.
- 89- Ozerol I, Ageitos A, Heimann DG, Talmadge JE. Impaired T and NK cell response of bone marrow and peripheral blood stem cell products to interleukin (IL)-2. *Int. J. Immunopharmacol.* 1999;21:509-521.
- 90- Margolin KA, Besien K, Wright C, Niland J, Champlin R, Fung HC, et al. Interleukin-2-activated autologous bone marrow and peripheral blood stem cells in the treatment of acute leukemia and lymphoma. *Biol. Blood and Marrow Transplant.* 1999;5:36-45.
- 91- Areman EM, Rhodes PL, Mazumder A, Meehan KR. Differential effects of IL-2 incubation on hemopoietic potential of autologous bone marrow and mobilized PBSC from patients with hematologic malignancies. *J. Hematother.* 1999;8:39-44.
- 92- Verma UN, Areman E, Dickerson SA, Kotula PL, Sacher R, Mazumder A. Interleukin-2 activation of chemotherapy and growth factor-mobilized peripheral blood stem cells for generation of cytotoxic effectors. *Bone Marrow Transplant.* 1995;15:199-206.
- 93- Bonig H, Laws HJ, Wundes A, Verheyen J, Hannen M, Kim Y-M, et al. In vivo cytokines responses to interleukin-2 immunotherapy after autologous stem cell transplantation in children with solid tumors. *Bone Marrow Transplant.* 2000;26:91-6.
- 94- Son Y, Dallal RM, Mailliard RB, Egawa S, Jonak ZL, Lotze MT. Interleukin-18 (IL-18) synergizes with IL-2 to enhance cytotoxicity, interferon- γ production, expansion of natural killer cells. *Cancer Res.* 2001;61:884-8.
- 95- Yu T, Caudell EG, Smid C, Grimm EA. IL-2 activation of NK cells: involvement of MKK1/2/ERK but not p38 kinase pathway. *J. Immunol.* 2000;164:6244-51.
- 96- Charak BS, Choudhary GD, Tefft M, Mazumder A. Interleukin-2 in bone marrow transplantation: preclinical studies. *Bone Marrow Transplant.* 1992;10:103-11.

- 97- Silva MRG, Parreira A, Ascensão JL. Natural killer cell numbers and activity in mobilized peripheral blood stem cell grafts: Conditions for in vitro expansion. *Exp. Hematol.* 1995;23:1676-81.
- 98- Satoh M, Seki S, Hahimoto W, Ogasawara K, Kobayashi T, Kumagai K, et al. Cytotoxic $\gamma\delta$ or $\alpha\beta$ T cells with a natural killer cell marker, CD56, induced from human peripheral blood lymphocytes by a combination of IL-12 and IL-2. *J. Immunol.* 1996;157:3886-92.
- 99- Frey M, Packianathan NB, Fehniger TA, Ross ME, Wang WC, Stewart CC, et al. Differential expression and function of L-Selectin on CD56^{bright} and CD56^{dim} natural killer cell subsets. *J. Immunol.* 1998;161:400-8.
- 100- Meehan KR, Badros A, Frankel SR, Cahill R, Areman E, Jenson M, et al. A pilot study evaluating interleukin-2-activated hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. *J. Hemotherapy* 1997;6:457-64.
- 101- Meehan KR, Verma UN, Cahill EM, Areman EM, Sacher RA, Foelber R, et al. Interleukin-2-activated hematopoietic stem cell transplantation for breast cancer: investigation of dose level with clinical correlates. *Bone Marrow Transplant.* 1997;20:643-51.
- 102- Candeias J, Ramos J, Barbosa IL. Subpopulações linfocitárias do sangue periférico, valores de referência por citometria de fluxo. *Arq. Medicina* 1993;7:7-14.
- 103- Dunne J, Lynch S, O'Farrelly C, Todryk S, Hegarty JE, Feighery C, et al. selective expansion and partial activation of human NK cells and NK receptor-positive T cells by IL-2 and IL-15. *J. Immunol.* 2001;167:3129-38.
- 104- Rondelli D, Raspadori D, Anasetti C, Bandini G, Re F, Arpinati M, et al. Alloantigen presenting capacity, T cell alloreactivity and NK function of G-CSF-mobilized peripheral blood cells. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22:631-7.
- 105- Shantaram SJ, Lynch JC, Pavletic SZ, Tarantolo SR, Pirruccello SJ, Kessinger A, et al. Decrease immune functions of blood cells following mobilization granulocyte colony-stimulating factor: association with donor characteristics. *Blood* 2001;98:1963-70.
- 106- Theilgaard-Monch K, Raaschou-Jensen K, Palm H, Schjodt K, Heilmann C, Vindelov L, et al. Flow cytometric assessment of lymphocyte subsets, lymphoid progenitors, and hematopoietic stem cells in allogeneic stem cell grafts. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28:1073-82.
- 107- Dreger P, Oberboster K, Schmitz N. PBPC grafts from healthy donors: analysis of CD34+ and CD3+ subpopulations. *Bone Marrow Transplant.* 1996;17:S22-7.
- 108- Rodríguez-Fernández JL, Gómez M, Luque A, Hogg N, Sánchez-Madrid F, Cabañas C. The interaction of activated integrin lymphocyte function-associated antigen 1 with ligand intercellular adhesion molecule 1 induces activation and redistribution of

focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 in T lymphocytes. *Mol. Biol. Cell.* 1999;10:1891-907.

109- Beverley P. Tumor immunology. In: Roitt M, Brostoff J, Male D, editors. *Immunology*. 6th ed. Edinburgh: Mosby; 2001. p. 289-302.

110- Uhrberg M, Valiante NM, Young NT, Lanier LL, Phillips JH, Parham P. The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94:NKGA2 receptors in T cells: clones sharing identical $\alpha\beta$ TCR rearrangements express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns. *J. Immunol.* 2001;166:3923-32.

111- Campbell JJ, Qin S, Unutmaz D, Soler D, Murphy KE, Hodge MR, et al. Unique subpopulations of CD56⁺ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J. Immunol.* 2001;166: 6477-82.

112- Carson WE, Haldar S, Baiocchi RA, Croce CM, Caligiuri MA. The c-kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the upregulation of bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994;91:7553-7.

113- Miller JS, Prosper F, McCullar V. Natural killer (NK) cells are functionally abnormal and NK cell progenitors are diminished in granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cell collections. *Blood* 1997;90:3098-105.

114- Gardiner CM, Reen DJ. Differential cytokine regulation of natural killer cell-mediated necrotic and apoptotic cytotoxicity. *Immunol.* 1998;93:511-7.

115- Robertson MJ, Manley TJ, Donahue C, Levine H, Ritz J. Costimulatory signals are required for optimal proliferation of human natural killer cells. *J. Immunol.* 1993;150:1705-14.

116- Mrózek E, Anderson P, Caligiuri MA. Role of interleukin-15 in the development of human CD56⁺ natural killer cells from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996;87:2632-40.

117- Yu H, Fehniger TA, Fuchsberger P, Thiel KS, Vivier E, Carson WE, et al. Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34⁺ human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood* 1998;92:3647-57.

118- Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001;97:14-32.

119- Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, et al. Interleukin 2 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 2000;408:57-63.

120- Lotzová E, Savary CA, Champlin RE. Genesis of human oncolytic natural killer cells from primitive CD34⁺CD33⁻ bone marrow progenitors. *J. Immunol.* 1993;150:5263-9.

- 121- Shibuya A, Negayoshi K, Nakamura K, Nakauchi H. Lymphokine requirement for the generation of natural killer cells from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995;85:3538-46.
- 122- Silva MRG, Hoffman R, Srour EF, Ascensao JL. Generation of human natural killer cells from immature progenitors does not require marrow stromal cells. *Blood* 1994;84:841-6.
- 123- Miller JS, Verfaillie C, McGlave P. The generation of human natural killer cells from CD34⁺/DR⁻ primitive progenitors in long-term bone marrow culture. *Blood* 1992;80:2182-7.
- 124- Caligiuri MA, Murray C, Robertson MJ, Wang E, Cochran K, Cameron C, et al. Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2. *J. Clin. Invest.* 1993;91:123-32.
- 125- Kogure T, Niizawa A, Hai LX, Fujinaga H, Shimada Y, Ochiai H, et al. Effect of interleukin 2 on killer cell inhibitory receptors in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2001;60:166-9.
- 126- Williams NS, Klem J, Puzanov IJ, Sivakumar PV, Bennett M, Kumar V. Differentiation of NK1.1⁺, Ly49⁺ NK cells from flt3⁺ multipotent marrow progenitor cells. *J. Immunol.* 1999;163:2648-56.
- 127- Sosman JA, Stiff P, Moss SM, Sorokin P, Martone B, Bayer R, et al. Pilot trial of interleukin-2 with granulocyte colony-stimulating factor for the mobilization of progenitor cells in advanced breast cancer patients undergoing high-dose chemotherapy: expansion of immune effectors within the stem-cell graft and post-stem-cell infusion. *J. Clin. Oncology* 2000;19:634-44.

ANEXO I

**IMUNOTERAPIA COM INTERLEUCINA-2 APÓS
TRANSPLANTAÇÃO DE PROGENITORES
HEMATOPOIÉTICOS PERIFÉRICOS AUTÓLOGOS
ACTIVADOS POR INTERLEUCINA-2 EM DOENTES COM
HEMOPATIAS MALIGNAS**

AUTORES:

**Pedro Pimentel, António Campos, Susana Roncón, Fernando
Campilho, Carlos Pinho Vaz, Isabel Barbosa, Alzira Carvalhais**

LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO:

Unidade de Transplantes de Medula

Serviço de Imuno-Hemoterapia

RESUMO

A eficácia da autotransplantação de progenitores hematopoiéticos autólogos no tratamento das hemopatias malignas está limitada pela alta taxa de recaída. Diversos estudos clínicos sugerem que a interleucina-2, induzindo a activação de células citotóxicas com acção sobre as células tumorais, pode reduzir a probabilidade de recaída, quando utilizada em fase de doença residual mínima. A incubação do enxerto de progenitores hematopoiéticos com interleucina-2 durante 24 horas induz a activação de células efectoras citotóxicas, não afecta o potencial hematopoiético do enxerto e potencia o efeito da interleucina-2 in vivo.

Neste estudo propomos avaliar a viabilidade, toxicidade, efeito na recuperação hematopoiética e imunológica e eficácia terapêutica da administração de interleucina-2, iniciada logo após infusão de autoenxerto pré-incubado com interleucina-2 in vitro durante 24 horas, e mantida durante 3 meses.

INTRODUÇÃO

Em doentes com hemopatias malignas avançadas, a transplantação autóloga de progenitores hematopoiéticos (autoTPH) é uma modalidade terapêutica com eficácia bem estabelecida.

A causa principal de insucesso em doentes submetidos a autoTPH é a recaída de doença, sendo esta significativamente mais elevada do que em doentes equivalentes submetidos a transplantação alogénica (aloTPH). A maior taxa de recaída após autoTPH poderá ser atribuída à reinfusão de células neoplásicas clonogénicas, à persistência de células resistentes ao tratamento de alta dose e/ou à ausência do efeito enxerto contra tumor que está presente após aloTPH.

Nas leucemias, linfomas, doença de Hodgkin e mieloma múltiplo a existência de um efeito imunológico enxerto contra tumor (EVT) após aloTPH está bem demonstrado^{i,ii,iii,iv,v}. A ausência deste processo na sequência da autoTPH constitui, assim, um factor importante para a maior taxa de recaída, comparativamente com a observada depois da aloTPH.

Diversos grupos têm ensaiado a possibilidade de induzir ou intensificar mecanismos imunológicos efectores contra células tumorais residuais, após quimioterapia de alta dose e autoTPH, altura em que a terapêutica imunológica poderá ser mais eficaz, considerando a fase de doença residual mínima obtida com a terapêutica de alta dose que antecede a autoTPH.

A eficácia da interleucina-2 (IL-2) tem sido investigada no tratamento de neoplasias não hematológicas e de hemopatias malignas, como agente imunomodulador. Em diversos estudos observaram-se respostas em doentes

com leucemia aguda, linfoma, e mieloma múltiplo refractários a tratamento convencional.^{vi,vii,viii,ix}

Diversos ensaios clínicos avaliaram o efeito da IL-2 em doentes com hemopatias malignas, após autoTPH.. Embora, na maioria dos casos, se tivesse observado um efeito imunológico significativo, as respostas terapêuticas observadas foram, na maioria dos casos, modestas e pouco convincentes.^{x,xi,xii,xiii,xiv}

Na maioria dos ensaios a IL-2 foi iniciada só depois de obtida a recuperação hematopoiética. Este facto poderá condicionar o eventual efeito terapêutico, considerando a fase tardia em que é introduzida.

Estudos pré-clínicos mostraram que a incubação de progenitores hematopoiéticos com IL-2 induz a produção de células citotóxicas capazes de eliminar as células malignas, por meios imunológicos, sem comprometer o potencial regenerativo dos progenitores hematopoiéticos normais. A associação de IL-2 in vivo e in vitro após autoTPH parece facilitar o efeito anti-tumoral deste agente biológico.

Charak e cols avaliaram o efeito da IL-2 sobre a medula óssea. Verificaram, em modelo animal, que a incubação de medula óssea com IL-2 durante 24 horas induzia a produção de células citotóxicas com actividade lítica contra células tumorais. Por outro lado, o potencial hematopoiético da medula óssea mantinha-se após incubação com IL-2. Assim, estes resultados sugerem que a incubação de medula óssea com IL-2 pode ter um efeito depurador do enxerto^{xv}.

O mesmo grupo avaliou, em estudos pré-clínicos, o efeito anti-tumoral de (a) infusão de enxerto de medula óssea depois de incubada com IL-2, (b) de IL-2 in vivo após autotransplante com medula não tratada e (c) de autotransplante de medula activada com IL-2, seguida de IL-2 in vivo. Verificou-se que o efeito anti-tumoral obtido com medula tratada, bem como com IL-2 após transplante, utilizados isoladamente, foi modesto. No entanto, nos casos em que se associou medula pré-incubada com IL-2, seguida de IL-2 in vivo logo após o transplante o efeito anti-tumoral foi acentuado. Por outro lado, este efeito deixou de se observar quando a infusão de IL-2 se fez mais tardiamente (uma semana depois da infusão do enxerto activado). Estes resultados sugerem, assim, um efeito sinérgico da infusão do enxerto activado com IL-2 e a utilização de IL-2 in vivo precocemente, logo após a infusão do enxerto activado. Estes resultados indicam que a estimulação da medula óssea in vitro com IL-2 foi necessária para que este agente fosse eficaz depois da transplantação^{xvi,xvii}. Os melhores resultados observaram-se quando a infiltração medular era mínima (ou seja, ausência de doença detectável no exame morfológico).

Este mesmo grupo demonstrou que enxertos de medula óssea (autoMO) ou de progenitores hematopoiéticos periféricos (autoPBPC) congelados podem ser incubados com IL-2 durante 24 horas depois de descongelados, sem que isso afecte o potencial regenerativo dos enxertos^{xviii,xix,xx}.

Meehan e cols avaliaram a viabilidade e toxicidade da utilização de autoTPH com enxertos activados com IL-2, seguida de IL-2 in vivo, em doentes com carcinoma da mama e com hemopatias malignas.

Sessenta e uma doentes com carcinoma da mama foram submetidas a quimioterapia de alta dose, seguida de autoPBPC, utilizando IL-2 in vitro (incubação com IL-2 durante 24 horas) e in vivo (IL-2 subcutânea com início no dia de infusão do enxerto). A dose máxima tolerada de IL-2 foi de 6×10^5 IU/m²/dia, durante 4 semanas (5 dias/semana, total de 20 doses). Não se observou atraso na recuperação hematopoiética^{xxi}.

Dezasseis doentes com hemopatias malignas foram submetidos a autoTPH activado por IL-2, após tratamento citotóxico de alta dose (busulfan + ciclofosfamida ou irradiação corporal total + ciclofosfamida). Os doentes receberam IL-2 na dose de $1,8 \times 10^6$ IU/m²/dia subcut, iniciada após recuperação hematopoiética, durante 1-4 semanas. A toxicidade registada foi aceitável.^{xxii}

Klingemann e cols efectuaram autoTPH com enxertos de medula óssea incubada com IL-2 em cultura de longa duração, durante uma semana, em 10 doentes com leucemia mieloblástica aguda, seguida de administração de IL-2 a partir do dia do transplante, na dose de $2-6 \times 10^5$ IU/m²/dia, subcut, durante 7 dias. Os efeitos acessórios atribuíveis à IL-2 foram ligeiros, obrigando à suspensão do tratamento em apenas um doente^{xxiii}.

Em suma, estes estudos preliminares indicam a viabilidade de utilização clínica de IL-2 in vitro e in vivo, em neoplasias não hematológicas e em hemopatias malignas, sem comprometer a recuperação hematopoiética e sem toxicidade exagerada. Não há dados suficientes que permitam avaliar o benefício terapêutico da IL-2 in vitro e in vivo.

Com base nestes dados e no sentido de reduzir o risco de recaída após autoTPH, propomo-nos investigar em estudo de fase II o efeito da IL-2 in vitro e in vivo na reconstituição hematopoiética, a toxicidade relacionada com o tratamento e a eficácia terapêutica, comparativamente com grupo histórico, em doentes com hemopatias malignas de alto risco submetidos a autoTPH. A IL-2 será administrada em baixa dose, iniciada precocemente e mantida durante período prolongado

OBJECTIVOS DO ESTUDO

1. Avaliar a viabilidade, toxicidade e tolerância do tratamento com IL-2 in vivo após autoenxerto pré-incubado com IL-2.
2. Avaliar o efeito na recuperação hematológica e imunológica do regime adoptado.
3. Avaliar o efeito na taxa de recaída, sobrevivência livre de doença e sobrevivência global dos doentes, comparativamente com grupo histórico.

DOENTES

1. Critérios de inclusão

1.1. Idade superior a 18 anos e inferior a 60 anos

1.2. Não elegível para transplantação alogénica

1.3. Ausência de envolvimento medular detectável no exame morfológico

1.4. Diagnóstico:

- a) Leucemia aguda não linfoblástica (LANL) em 1ª remissão completa (RC) se uma ou mais das seguintes características presentes: hiperleucocitose ($\geq 50 \times 10^9/L$) na apresentação, anomalia cromosómica, excepto t(8;21), t(15;17) ou inv(16), tempo até obtenção de RC > 4 semanas, LANL secundária; 2ª RC ou seguintes.
- b) Leucemia aguda linfoblástica (LAL) em 1ª RC se uma ou mais das seguintes características: hiperleucocitose na apresentação, t(9;22); 2ª RC ou seguintes
- c) Linfoma não Hodgkin (LNH) agressivo (subtipos: grandes células B, imunoblástico, anaplástico ou de células do manto) se: falência de indução, 1ª recaída com doença resistente ou estável após terapêutica de 2ª linha, ou para além de 2ª recaída.
- d) Doença de Hodgkin (DH) se: falência de indução, doença refractária ou estável após terapêutica de 2ª linha, doença para além de 2ª recaída.
- e) Mieloma múltiplo (MM) se: não elegível para duplo autotransplante, ou doença em progressão após 1º autotransplante.

1.5. Consentimento informado escrito do doente

2. Critérios de exclusão

- 2.1. Disfunção hepática com bilirrubina > 2 vezes o limite superior do normal, ou ALT/AST > 3 vezes o limite superior do normal.

- 2.2. Disfunção renal com Depuração creatinina (EDTA) < 75 ml/min/1,73 m².
- 2.3. Disfunção cardíaca – FEV < 45 %
- 2.4. Disfunção pulmonar – FEV1 < 70%; Capacidade de difusão < 60%.
- 2.5. HIV1 ou HIV2 positivo.
- 2.6. Performance status – Índice de Karnofsky < 80%.
- 2.7. Doença médica grave não compensada

MÉTODOS

1. Avaliação pré-transplante

- Exame físico, perfil hematológico, bioquímico e de hemostase, serologia para CMV, EBV, VHB, VHC, VIH1, VIH2.
- Estudo da medula óssea por aspirado medular e biopsia, incluindo estudo morfológico, imunofenotípico e citogenético.
- Nos doentes com DH ou LNH – TAC torácica e abdominal, cintigrafia com Ga⁶⁷.
- Nos doentes com MM – doseamento de imunoglobulinas séricas e urinárias, exame radiológico do esqueleto, RMN coluna se pertinente, β2 microglobulina sérica.
- Avaliação de subpopulações linfocitárias - CD3, CD4, CD8, CD56, CD19, CD20.
-

2. Seguimento pós-transplante

- Monitorização da doença por métodos complementares ao 1º, 3º, 6º, 12º, 18º, 24º meses ou sempre que indicado clinicamente; em seguida, anualmente.
- Avaliação dermatológica periódica e documentação histológica de manifestações sugestivas de “doença enxerto contra hospedeiro autóloga”.
- Monitorização laboratorial
 - Avaliação imunológica das populações linfocitárias após recuperação de neutrófilos $> 0,5 \times 10^9/L$ e, em seguida, quinzenal até completar imunoterapia e aos 6º, 9º e 12º meses.
 - Avaliação da citotoxicidade linfocitária, mensalmente.

3. Regimes de quimioterapia de alta dose

- **Leucemias agudas** (LANL, LAL) – Busulfan 1 mg/kg po de 6/6 horas x 16 (dias -6 a -3) + Melfalan 120 mg/m² iv dose única, dia -2
- **Mieloma múltiplo** – Melfalan 200 mg/m² iv dia -1.
- **LNH e DH** – Carmustina 300 mg/m² iv 1 dia, Etoposido 200 mg/m²/dia iv 4 dias, Citarabina 200 mg/m² de 12/12 horas iv 4 dias, Melfalan 140 mg/m² iv dose única (BEAM).

4. Colheita do enxerto

Será utilizado enxerto de progenitores hematopoiéticos periféricos, mobilizados com G-CSF na dose de 10-20 µg/kg/dia. A colheita far-se-á ao 5º dia e seguintes, até à obtenção de células CD34+ $\geq 3 \times 10^6$ /kg de peso do doente.

O enxerto será criopreservado em azoto líquido.

5. Incubação do enxerto com Interleucina-2

Ao dia -1, parte do enxerto (2/3) é descongelado e incubado durante 24 horas com IL-2, segundo protocolo descrito por Verma e cols.¹⁹.

6. Imunoterapia pós-transplante

- **Interleucina-2** – 6×10^5 IU/m²/dia, subcut, 5 dias/semana, a partir do dia 0, duas horas depois da infusão do enxerto, durante 4 semanas. Após 2 semanas de repouso, a mesma dose na 1ª e 2ª semana de cada mês até total de 3 meses.

- *Modificação de dose de IL-2*

Toxicidade não hematológica de grau ≥ 3 da escala da WHO: suspensão de IL-2, retomando na semana seguinte com 50% da dose.

Manter suspensa se persistência de sinais de toxicidade mais de 72 horas.

7. Terapêutica anti-tumoral adicional

Nos doentes com DH ou LNH com massas tumorais à data do transplante, farão irradiação local após transplante.

8. Avaliação de toxicidade

Será adoptada a escala da WHO para avaliação da toxicidade induzida pelo tratamento.

REFERÊNCIAS

- ⁱ Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Blood 1990;75:555
- ⁱⁱ Passweg JR, Tiberghien P, Cahn JY, et al. Bone Marrow Transplant 1998;21:153
- ⁱⁱⁱ Van Besien KW, De Lima M, Giralt AS, et al. Bone Marrow Transplant 1997;19:977.
- ^{iv} Jones RJ, Ambinder RF, Piantadosi S, et al. Blood 1991;77:649.
- ^v Tricot, G, Vesole DH, Jaganath S, et al. Blood 1996;87:1196.
- ^{vi} Meloni G, Foa R, Vignetti M et al. Blood 1994; 84:2158.
- ^{vii} Maraninchi D, Blaise D, Viens P, et al. Blood 1991;78:2182.
- ^{viii} Gisselbrecht C, Maraninchi D, Pico JL, et al. Blood 1994;83:2081.
- ^{ix} Peest D, Leo R, Bloche S, et al. Br J Haematol 1995;89:328.
- ^x Benyunes MC, Massumoto C, York A, et al. Bone Marrow Transplant 1993;12:159.
- ^{xi} Blaise D, Attal M, Reiffers J et al. Blood 1997;90 (suppl 1):113a (abst#491)
- ^{xii} Hamon MD, Prentice HG, Gottlieb DJ, et al. Bone Marrow Transplant 1993;11:399.
- ^{xiii} Benyunes MC, Higuchi C, York A, et al. Bone Marrow Transplant 1995;16:283.

-
- ^{xiv} Bensinger WI, Rowley SD, Demirer T, et al. J Clin Oncol 1996;14:1447.
- ^{xv} Charak BS, Choudhary GD, Tefft M, Mazumder A. Bone Marrow Transplant 1992;10:103.
- ^{xvi} Agah R, Malloy B, Kerner M, et al. Cancer Res. 1989;49:5959.
- ^{xvii} Harak BS, Brynes RK, Chogyoji M, et al. Transplantation 1993;56:31.
- ^{xviii} Charak BS, Areman EM, Dickerson SA, et al. Bone Marrow Transplant 1993;11:147.
- ^{xix} Verma UN, Areman E, Dickerson PL, et al. Bone Marrow Transplant 1995;15:199.
- ^{xx} Areman EM, Rhodes PL, Mazumber A, Meehan KR. J Hematother 1999;8:39.
- ^{xxi} Meehan KR, Verma UN, Cahill R, et al. Bone Marrow Transplant 1997;20:643.
- ^{xxii} Meehan KR, Badros A, Frankel SR, et al. J Hematother 1997;6:457.
- ^{xxiii} Klingemann HG, Eaves CJ, Barnett MJ, et al. Bone Marrow Transplant 1994;14:389.