

CURSO DE MESTRADO EM ONCOLOGIA

Efeito da mobilização com G-CSF nos linfócitos e células NK dos enxertos hematopoiéticos

Dissertação de Mestrado

da

Licenciada PATRÍCIA ALEXANDRA AZEVEDO BLANCO BENEVIDES

PORTO, 2003

Efeito da mobilização com G-CSF nos
linfócitos e células NK dos enxertos
hematopoiéticos

Patrícia Alexandra Azevedo Blanco Benevides

Orientador: Prof. Doutora Isabel Leal Barbosa

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

ÍNDICE

Índice de figuras	v
Índice de quadros	vii
Abreviaturas	ix
Agradecimentos	xi
Resumo	xiii
Summary	xv
Introdução	1
1. Utilização de células progenitoras hematopoiéticas em transplantação.....	2
2. Componentes celulares dos enxertos de células progenitoras do sangue periférico.....	4
2.1. Caracterização morfológica dos linfócitos T e das células NK.....	5
2.2. Caracterização fenotípica dos linfócitos T e das células NK.....	6
2.2.1. Receptores da super-família das imunoglobulinas.....	7
2.2.2. Moléculas de adesão, activação e receptores de citocinas.....	8
2.2.3. Receptores das células NK.....	12
2.2.3.1. Receptores de linhagem NK.....	12
2.2.3.2. Receptores pertencentes à super-família de receptor <i>killer</i> semelhantes às imunoglobulinas – KIRs.....	13
2.2.3.3. Receptores pertencentes à super-família das lectinas de tipo C - KLRs.....	14
2.3. Caracterização funcional dos linfócitos T e das células NK.....	16
2.3.1. Produção de citocinas.....	16
2.3.2. Actividade citotóxica das células NK.....	18
3. Acção do G-CSF nos linfócitos T e nas células NK.....	22

Objectivos	24
Material e Métodos	26
1. Grupos estudados.....	27
2. Amostras e colheita das CPSP.....	28
3. Imunofenotipagem.....	29
3.1. Técnica de marcação.....	29
3.2. Citometria de fluxo.....	30
3.2.1. Aquisição.....	30
3.2.2. Análise das populações leucocitárias.....	31
3.2.3. Análise fenotípica dos linfócitos.....	32
3.2.4 Análise fenotípica das células NK.....	33
4. Quantificação das células mononucleares produtoras de citocinas por ELISPOT.....	35
4.1. Preparação das células mononucleares.....	35
4.1.1 Isolamento e criopreservação.....	35
4.1.2. Descongelação.....	36
4.2. Quantificação do número de células produtoras de IFN- γ e IL-4.....	36
4.2.1. Revestimento das placas.....	36
4.2.2. Activação celular.....	37
4.2.3. Detecção de spots.....	39
4.3. Análise.....	40
5. Análise estatística.....	43
Resultados	44
1. Representatividade das populações leucocitárias do sangue periférico e da citraferese dos dadores e dos doentes.....	45

2. Caracterização fenotípica das populações linfocitárias do sangue periférico e da citaferese dos dadores e dos doentes.....	48
2.1. Expressão dos marcadores de linhagem linfocitária.....	48
2.2. Expressão das moléculas de activação, adesão e dos receptores de citocinas.....	50
2.3. Análise comparativa das populações linfocitárias no sangue periférico e na citaferese dos dadores e dos doentes.....	52
3. Caracterização fenotípica das células NK.....	55
3.1. Expressão dos NKRs nas sub-populações de células NK do sangue periférico e da citaferese dos dadores e dos doentes.....	55
3.2. Expressão das moléculas de adesão, activação e dos receptores de citocinas nas sub-populações de células NK do sangue periférico e da citaferese dos dadores e dos doentes.....	60
3.3. Análise comparativa das sub-populações de células NK do sangue periférico e da citaferese dos dadores e dos doentes.....	64
4. Quantificação das células mononucleares produtoras de IFN- γ e de IL-4.....	68
Discussão	74
1. Actualidade e importância do trabalho.....	75
2. Fenótipo das populações linfocitárias e das células NK do sangue periférico e da citaferese.....	76
3. Quantificação das células mononucleares produtoras de IFN- γ e de IL-4.....	81
Conclusões	83
1. Avaliação global do efeito do G-CSF nas populações linfocitárias e nas células NK dos dadores e dos doentes.....	84
2. Perspectivas futuras.....	90
Referências Bibliográficas	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1 - Célula NK a reconhecer e a destruir uma célula tumoral.....	4
Fig.2 - Esquema dos NKR de inibição específicos das moléculas de HLA classe I.....	15
Fig.3 - Esquema da produção de citocinas pelos linfócitos CD4+.....	17
Fig.4 - Representação esquemática do mecanismo da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC).....	19
Fig.5 - Modelo de omissão do próprio proposto para explicar o mecanismo de citotoxicidade das células NK.....	20
Fig.6 - Esquema da destruição de uma célula alvo por uma célula NK pela acção de perforinas e granzimas.....	20
Fig.7 - Exemplo da análise sequencial realizada para o estudo das populações leucocitárias.....	32
Fig.8 - Exemplo da análise sequencial realizada para o estudo do fenótipo dos linfócitos.....	33
Fig.9 - Exemplo da análise sequencial efectuada para o estudo fenotípico das células NK.....	34
Fig.10 - Detecção das células mononucleares produtoras de IFN- γ e IL-4 por ELISPOT: a) esquema de uma placa; b) técnica de detecção.....	38
Fig.11 - Diferenças fenotípicas das populações linfocitárias do sangue periférico dos dadores e dos doentes.....	53
Fig.12 - Diferenças na expressão dos (a) marcadores de linhagem linfocitária e das (b) moléculas de activação e adesão nas populações linfocitárias da citafereze dos dadores e dos doentes.....	54

Fig.13 - Diferenças nos padrões de expressão dos NKRrs entre as sub-populações (a) CD56++ e (b) CD56+ do sangue periférico e da citafereze dos dadores.....	57
Fig.14 - Diferenças nos padrões de expressão dos NKRrs entre as sub-populações (a) CD56++ e (b) CD56+ do sangue periférico e da citafereze dos doentes.....	59
Fig.15 - Diferenças nos padrões de expressão das moléculas de adesão, activação e dos receptores de citocinas na sub-população CD56+ entre o sangue periférico e a citafereze dos dadores.....	62
Fig.16 - Diferenças nos padrões de expressão das moléculas de adesão, activação e dos receptores de citocinas na sub-população CD56+ entre o sangue periférico e a citafereze dos doentes.....	64
Fig.17 - Diferenças fenotípicas entre as células (a) CD56++ e (b) CD56+ do sangue periférico dos dadores e dos doentes.....	65
Fig.18 - Diferenças fenotípicas entre as células (a) CD56++ e (b) CD56+ da citafereze dos dadores e dos doentes.....	66
Fig.19 - Produção de IFN- γ pelas células mononucleares do SP e da Cit; a) plano geral da placa; b) exemplo de um par SP/Cit com o número de <i>spots</i> /5x10 ⁵ células mononucleares.....	69
Fig.20 - Produção de IL-4 pelas células mononucleares do SP e da Cit; a) plano geral da placa; b) exemplo de um par SP/Cit com o número de <i>spots</i> /5x10 ⁵ células mononucleares.....	71
Fig.21 - Produção de IL-4 pelas células mononucleares do SP e da Cit; a) plano geral da placa; b) exemplo de um par SP/Cit com o número de <i>spots</i> /5x10 ⁵ células mononucleares.....	72
Fig.22 - Produção de IL-4 pelas células mononucleares do SP e da Cit; a) plano geral da placa; b) exemplo de um par SP/Cit com o número de <i>spots</i> /5x10 ⁵ células mononucleares.....	73

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Caracterização dos grupos estudados.....	27
Quadro 2 - Percentagens das sub-populações leucocitárias do sangue periférico e da citafereze dos dadores e dos doentes.....	45
Quadro 3 - Percentagens das sub-populações CD56+ e CD56++ do sangue periférico e da citafereze dos dadores e dos doentes.....	46
Quadro 4 - Concentrações das sub-populações leucocitárias do sangue periférico e da citafereze dos dadores e dos doentes.....	47
Quadro 5 - Expressão dos marcadores de linhagem linfocitária, do sangue periférico e da citafereze dos (a) dadores e dos (b) doentes.....	49
Quadro 6 - Expressão das moléculas de activação, adesão e receptores de citocinas nas populações linfocitárias do sangue periférico e da citafereze dos (a) dadores e dos (b) doentes.....	51
Quadro 7 - Expressão de NKRs nas sub-populações CD56+ e CD56++ do (a) sangue periférico e da (b) citafereze dos dadores.....	55
Quadro 8 - Expressão dos NKRs nas sub-populações CD56+ e CD56++ do (a) sangue periférico e da (b) citafereze dos doentes.....	58
Quadro 9 - Expressão das moléculas de adesão, activação e dos receptores de citocinas nas sub-populações CD56+ e CD56++ do (a) sangue periférico e da (b) citafereze dos dadores.....	60
Quadro 10 - Expressão das moléculas de adesão, activação e dos receptores de citocinas nas sub-populações CD56+ e CD56++ do (a) sangue periférico e da (b) citafereze dos doentes.....	63

Quadro 11 - Número de células secretoras de (a) IFN- γ e (b) IL-4 por 10^5 e 10^6 células mononucleares do sangue periférico e da citafereze dos dadores.....	68
Quadro 12 - Número de células secretoras de (a) IFN- γ e (b) IL-4 por 10^5 e 10^6 células mononucleares do sangue periférico e da citafereze dos doentes.....	70

ABREVIATURAS

ADCC- *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*.

ADCC-R- *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity Receptor*.

APC- Alofococianina.

CD- *Cluster* de diferenciação.

Cit- Citaferese.

CPH- Células progenitoras hematopoiéticas.

CR3 – Receptor do complemento 3

DH- Doença de Hodgkin.

ELISPOT- *Enzyme Linked Immunospot*

FITC- Fluoresceína.

FSC- *Forward Scatter*.

G-CS - Factor Estimulador de Colónias de Granulócitos.

GM-CSF- Factor Estimulador de Colónias de Granulócitos e Macrófagos.

HLA- *Human Leucocyte Antigen*.

ICAM- *Intracelular Adhesion Molecule*.

IFN- Interferão.

IgG- Imunoglobulina de classe G.

IL- Interleucina.

IL-2R- Receptor da Interleucina 2.

ITAM - *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*.

ITIM- *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*.

KIR- *Killer cell-Ig-like Receptor*.

KLR- Receptores da Superfamília das Lectinas de tipo C.

LFA- *Lymphocyte Function Associated Antigens.*

LGL- Linfócito Grande Granular.

LNH- Linfoma Não Hodgkin.

MGF- *Mast Cell Growth Factor.*

min.- Minuto.

ml- mililitro.

MM- Mieloma Múltiplo.

NCR - receptor de Citotoxicidade Natural.

NK - *Natural Killer.*

NKR - Receptores das NK.

ns- Não significativo.

p- Valor de significância estatística.

PC5- Ficocianina.

PE- Ficoeritrina.

PerCP- *Peridinin Chlorophyll Protein Conjugate*

r.p.m.- Rotações Por Minuto.

SCF- *Stem Cell Factor.*

SP- Sangue periférico.

SSC- Side Scatter.

TA- Temperatura Ambiente.

Tc- Tcitológicos.

Th- Tauxiliares.

TNF- Tumor Necrose Factor.

UTM- Unidade de Transplante de Medula.

AGRADECIMENTOS

Queria começar por agradecer à Exma. Sra. Prof. Doutora Isabel Leal Barbosa pela sua orientação, constante apoio e incentivo na elaboração deste trabalho.

Um sincero agradecimento à Directora do Departamento de Imuno-Hemoterapia, Exma. Sra. Dra. Alzira Carvalhais, à Directora do Serviço de Criobiologia e Terapia Celular, Exma. Sra. Dra. Susana Sousa e ao Director Clínico e Coordenador do Programa de Transplante de Medula Óssea, Exmo. Sr. Dr. Pedro Pimentel, por me facultarem todos os meios necessários para a realização deste estudo.

A todos os elementos do Departamento de Imuno-Hemoterapia, e principalmente aos colaboradores do Laboratório de Criobiologia, o meu muito obrigado pela atenção e ajuda dispensada e pelo ambiente de trabalho proporcionado. Gostaria de salientar o auxílio da Exma. Sra. Dra. Cláudia Sousa e Dra. Fernanda Gomes na análise de alguns dos casos.

Ao Director do Serviço de Transplante de Medula Óssea, Exmo. Sr. Dr. Fernando Campilho, um sincero agradecimento por toda a ajuda e atenção dispensada na análise estatística dos dados. Os meus sinceros agradecimentos ao pessoal de enfermagem do Serviço de Transplante de Medula Óssea, especialmente à Exma. Sra. Enfermeira Maria João Silva e à Exma. Sra. Enfermeira Aurora Oliveira, por todo o empenho e dedicação na recolha e envio das amostras, sem as quais este estudo nunca se teria realizado.

Ao Exmo. Sr. Prof. Doutor Guimarães dos Santos queria aqui deixar o meu apreço e admiração pela dinamização do Mestrado em Oncologia. Gostaria ainda de lembrar, o contributo de todo o corpo docente e não docente deste Mestrado e do IPO do Porto.

À Liga Portuguesa Contra o Cancro - Núcleo Regional do Norte agradeço a bolsa que me concedeu permitindo-me a realização do Mestrado.

Por último gostaria de agradecer aos dadores e aos doentes que contribuíram para que este trabalho se realizasse.

Mais uma vez a todos o meu muito obrigado.

RESUMO

No nosso trabalho pretendeu-se determinar o efeito do factor estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF) nas populações linfocitárias e nas células NK dos enxertos hematopoiéticos de vinte sete dadores e vinte seis doentes, sendo os parâmetros avaliados o fenótipo celular e a produção de citocinas.

No sangue periférico (SP), o fenótipo dos linfócitos e das células NK foram analisados, antes da mobilização com G-CSF, de modo a determinar o padrão normal de expressão dos antigénios estudados. Nos dadores e nos doentes, a percentagem das populações linfocitárias e das células NK e a relação CD4/CD8 foi normal. Das moléculas co-estimuladoras estudadas, apenas o CD28 e o CD150 foram expressas pelas populações linfocitárias. O CD62L e o CD11a foram expressos pela maioria dos linfócitos, enquanto o CD25 foi o único receptor de citocinas expresso. Das diferenças entre grupos, verificou-se que os doentes possuíam uma maior percentagem de linfócitos CD8+ e CD150+ e uma menor percentagem de linfócitos CD45RA+, comparativamente aos dadores.

Relativamente às células NK, as células CD56+ apresentaram uma maior expressão de receptores NK (NKR), nomeadamente de CD16 e de CD161, do que as células CD56++ e estas exprimiram mais CD62L, relativamente à sub-população CD56+. O CD122 foi o único receptor de citocinas expresso nas duas sub-populações de células NK. Apesar destas características comuns a dadores e doentes, as células NK do SP dos doentes apresentaram uma maior percentagem de células CD56++CD16+, CD56+HLA-DR+ e CD56+CD94+ do que os dadores.

A mobilização das células progenitoras hematopoiéticas com G-CSF provocou um aumento da concentração das sub-populações leucocitárias no SP, não tendo as percentagens destas células sofrido qualquer variação. Na citaferese (Cit) dos dois grupos,

a única alteração comum aos linfócitos e às células NK, foi a diminuição da expressão da molécula de adesão CD62L, sendo esta diminuição mais acentuada nos dadores do que nos doentes. Relativamente às outras moléculas de adesão estudadas, o CD11a e o CD11c, não se observaram diferenças tão acentuadas. Outro efeito relevante nas populações linfocitárias foi a diminuição da percentagem de linfócitos CD45RO⁺ e CD45RA⁺ nos dadores e a diminuição da percentagem de linfócitos CD45RA⁺ nos doentes.

Nas células NK dos dadores e dos doentes, além da diminuição da expressão de CD62L, o G-CSF parece ter provocado uma diminuição da expressão de CD161 nas células CD56⁺⁺ dos dadores e nas duas sub-populações de células NK dos doentes. Nos dadores, ocorreu um aumento da percentagem de células CD56⁺⁺ que exprimiram granzima B e CD16, e nas células CD56⁺ observou-se uma diminuição da expressão de CD57 e NKβ1. Nos doentes, verificou-se apenas uma diminuição da percentagem de células CD56⁺CD57⁺.

No estudo da produção de citocinas observamos em alguns dadores e doentes, um aumento da produção de IL-4 pelas células mononucleares da Cit comparativamente ao SP. Quanto ao IFN-γ, a produção desta citocina foi idêntica no SP e na Cit.

Em resumo, os nossos resultados mostram que o G-CSF provocou um aumento da concentração leucocitária na Cit. A acção principal do G-CSF, nos linfócitos e nas células NK da Cit, foi na expressão da molécula de adesão, CD62L. Nos dadores e nos doentes, a relação linfócitos naive/memória (CD45RA/CD45RO) também sofreu alterações. Nas células NK dos dois grupos, verificou-se uma diminuição da expressão de CD161. A produção de IFN-γ e IL-4 pelas células mononucleares do SP e da Cit, parece sugerir um efeito imunomodulador do G-CSF no balanço das respostas imunológicas tipo 1/tipo 2.

SUMMARY

This work is intended to determine the granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) effect, used in the mobilization of peripheral blood progenitor cells (PBPC), on the lymphocyte populations and the NK cells of the haematopoietic grafts. The parameters evaluated were the cell phenotype and the cytokine production of peripheral blood (PB) and PBPC grafts from twenty-seven donors and twenty-six patients.

In peripheral blood, before the mobilization with G-CSF, the phenotype of the lymphocytes and the NK cells were analysed to determine the normal pattern of expression of the studied antigens. In donors and patients, the percentage of the lymphocyte populations, NK cells and the relationship CD4/CD8 was normal. Of the co-stimulatory molecules studied, only CD28 and CD150 were expressed by the lymphocyte populations. CD62L and CD11a were expressed by most lymphocytes, while CD25 was the only cytokine receptor expressed. However, the patients possessed a larger percentage of lymphocytes CD8⁺ and CD150⁺ and a smaller percentage of lymphocytes CD45RA⁺ than donors.

With regards to the NK cells, the CD56⁺ cells showed a higher expression of NK cells receptors (NKR), namely CD16 and CD161, than the CD56⁺⁺ cells. In donors and patients CD56⁺⁺ cells expressed more CD62L than CD56⁺ sub-population. CD122 was the only cytokine receptor expressed in the two NK cells sub-populations. In spite of these characteristics being common to both donors and patients, the patients NK had a larger percentage of CD56⁺⁺CD16⁺, CD56⁺HLA-DR⁺ and CD56⁺CD94⁺ than donors.

The mobilization of haematopoietic progenitor cells (HPC) with G-CSF increased the concentration of the leukocyte sub-populations in PB, without variations

in the percentages of these cells. In PBPC of the two groups, the only alteration common to both the lymphocytes and to the NK cells was the decrease in the expression of the adhesion molecule CD62L, this decrease being more accentuated in donors than in patients. Relative to the other studied adhesion molecules, CD11a and CD11c, no major differences were observed. Another relevant effect in the lymphocyte populations was the decrease of the percentage of lymphocytes CD45RO⁺ and CD45RA⁺ in donors and the decrease of the percentage of lymphocytes CD45RA⁺ in patients.

As well as the expression of CD62L, G-CSF seems to decrease the expression of CD161 in donor CD56⁺⁺ cells and in patients NK cell sub-population. Furthermore in donors the percentage of CD56⁺⁺ cells that expressed granzyme B and CD16 increased whereas in the CD56⁺ cells, the expression of CD57 and NK β 1 decreased. In patients the percentage of cells CD56⁺CD57⁺ decreased.

The cytokine study showed that in some donors and patients there was an increased in the IL-4 production by mononuclear cells from PBPC graft in comparison with PB. The IFN- γ production was identical by mononuclear cells from PB and PBPC graft.

In conclusion, G-CSF increased the leukocyte concentration in PBPC from both donors and patients. The main effect of G-CSF, in the lymphocytes and in the NK cells from PBPC, was in the expression of the adhesion molecule, CD62L. In donors and patients, the relationship between naive/memory lymphocytes (CD45RA/CD45RO) also suffered alterations. In the NK cells of both groups, the expression of CD161 decreased. IFN- γ and IL-4 production by PB and PBPC graft cells may suggest an immunomodulatory role for G-CSF in the balance between immune response type 1/type 2.

INTRODUÇÃO

1. Utilização de células progenitoras hematopoiéticas em transplantação

O transplante hematopoiético constitui actualmente uma importante arma terapêutica nas doenças hematológicas e não hematológicas em que o sistema hematopoiético necessita de ser reconstituído.¹

Até ao final dos anos 80, a medula óssea foi utilizada como a principal fonte de células progenitoras hematopoiéticas (CPH) para transplante. No entanto, outras fontes, como o sangue do cordão umbilical e o sangue periférico (SP) têm sido cada vez mais utilizadas como alternativa à medula óssea.^{2,3,4} As CPH são caracterizadas pela sua capacidade de auto-renovação e diferenciação, originando as diferentes linhagens celulares: eritróide, megacariocítica, mielóide e linfóide.⁵

A existência de um número reduzido de CPH em circulação obriga à sua mobilização da medula óssea para o SP, sendo estas células designadas por células progenitoras do sangue periférico (CPSP). Esta mobilização pode ser efectuada de várias formas, como por exemplo, utilizando factores de crescimento hematopoiético, tais como; Factor Estimulador de Colónias de Granulócitos (Granulocyte Colony Stimulating Factor - G-CSF), Interleucina-3 (IL-3), Factor Estimulador de Colónias de Granulócitos e Macrófagos (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor - GM-CSF) e Factor de Células Estaminais (Stem Cell Factor - SCF).⁴ O G-CSF, usualmente definido como factor de indução da linhagem mielóide, nomeadamente de neutrófilos, possui uma acção pleiotrópica em diferentes células do sistema imune do hospedeiro, nas quais induz alterações qualitativas e quantitativas.² Os receptores para esta citocina podem ser encontrados em progenitores mielóides, granulócitos maduros, monócitos e alguns linfócitos B e T.^{3,5,6}

Na transplantação hematopoiética, a utilização de CPSP tem-se revelado vantajosa uma vez que o procedimento de recolha das células não requer anestesia e é menos invasivo para o doente ou dador do que a colheita de medula óssea. Segundo vários estudos o transplante com CPSP permite um melhor e mais rápido arranque do enxerto que se traduz numa recuperação hematológica mais rápida, numa menor frequência de infecção pós transplante e num menor tempo de internamento hospitalar.⁷

Os transplantes hematopoiéticos podem ser autólogos ou alogénicos. No caso dos transplantes autólogos, a colheita das CPSP é efectuada ao doente antes de ser submetido a quimioterapia e/ou radioterapia de alta dose, sendo posteriormente utilizadas para reconstituir o seu sistema hematopoiético. Nos transplantes alogénicos as CPSP são provenientes de um dador compatível com o receptor.

2. Componentes celulares dos enxertos de células progenitoras do sangue periférico

Nos adultos a medula óssea contém o maior *pool* de células progenitoras, as quais são caracterizadas pela expressão do antígeno de superfície CD34, que está ausente nas demais células sanguíneas.^{8,9} No sangue periférico a concentração de células CD34+ é baixa (< 0,05%), podendo este número ser aumentado através da administração de G-CSF combinado ou não com quimioterapia de alta dose.⁸ A re-infusão das CPSP, após quimioterapia ou radioterapia de alta dose acelera a recuperação hematopoiética, uma vez que o enxerto de CPSP possui um elevado número de células CD34+, linfócitos T e de células NK. Os linfócitos T e as células NK são as principais células efectoras da resposta imune anti-tumoral, visto serem capazes de reconhecer e destruir células malignas (Fig.1).^{9,10} Estas duas populações leucocitárias diferenciam-se basicamente pela sua morfologia e fenótipo.⁹

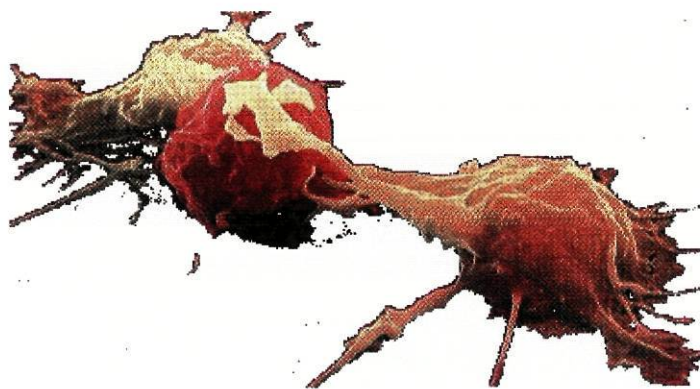


Fig.1 – Célula NK a reconhecer e a destruir uma célula tumoral. Adaptado de WWW.osms.otago.ac.nz/immunet/rescente.htm.¹⁰

2.1. Caracterização morfológica dos linfócitos T e das células NK

Os linfócitos T maduros são pequenas células, com núcleo bem definido e cromatina condensada e com citoplasma pobre em 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.¹¹ No sangue periférico observam-se dois tipos de linfócitos T, os pequenos linfócitos e os grandes linfócitos, também denominados linfócitos grande granulares.¹²

As células NK são definidas como células citotóxicas com morfologia de linfócito grande granulares, núcleo redondo, cromatina condensada e citoplasma abundante com numerosos grânulos. Estes grânulos contêm uma enorme variedade de enzimas lisossomais, proteoglicanos e proteínas importantes para a função citotóxica, tais como serina-esterases (granzimas) e proteínas formadoras de poros (perforinas).^{13,14}

A origem das células NK ainda não é totalmente conhecida, uma vez que se desconhece o local onde se diferenciam e os rearranjos genéticos envolvidos. Apesar de não serem consideradas como uma linhagem celular independente, é possível distinguir células NK maduras de outros linfócitos, reconhecer alguns dos seus progenitores e constatar o envolvimento da medula óssea e a não dependência do timo no seu desenvolvimento.¹⁴ No entanto, as células NK e os linfócitos T desempenham funções que se encontram interligadas e partilham a expressão de antígenos, sugerindo uma relação no seu desenvolvimento e existência de um precursor comum.^{13,14}

2.2. Caracterização fenotípica dos linfócitos T e das células NK

A caracterização fenotípica das células é feita pela identificação de antígenos de superfície que nos permitem distinguir as várias linhagens celulares. O CD45 possibilita a identificação de leucócitos, o CD3 dos linfócitos T, o CD3 e o CD56 das células NK (CD3-CD56+) e dos linfócitos T citotóxicos (CD3+CD56+).

Os linfócitos T maduros são identificados pela presença de CD3 à superfície associado ao complexo receptor da célula T (TCR)/CD3. A porção extra-citoplasmática das cadeias α e β do TCR é constituída por dois domínios semelhantes às imunoglobulinas (Ig). 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.¹³ O CD45 é uma glicoproteína transmembranar expressa na superfície de todas as células hematopoiéticas nucleadas. As isoformas do CD45 permitem distinguir os linfócitos T naive (CD45RA+CD45RO-) dos linfócitos T memória/activados (CD45RA-CD45RO+). Após activação dos linfócitos T *naive*, a expressão de CD45RA diminui, sendo esta diminuição acompanhada de um aumento da expressão de CD45RO.¹⁵ Portanto durante o processo de estimulação, as células *naive* (CD45RA+CD45RO-) convertem-se em células de memória (CD45RA-CD45RO+). Finda a estimulação antigénica as células de memória adquirem uma baixa expressão de CD45RA e de CD45RO, mas não revertem novamente em células *naive*.¹⁶

Fenotipicamente as células NK são caracterizadas pela presença de CD56 e pela ausência de CD3 (CD56+CD3-), além de não exprimirem receptores específicos para os antígenos tais como Ig e o complexo TCR, do qual faz parte o CD3.^{9,14,17} De acordo com a intensidade de expressão de CD56 na sua superfície, as células NK podem ser divididas em duas sub-populações. A maioria das células NK humanas (90%), apresentam uma

baixa intensidade de expressão de CD56 e são por isso denominadas de CD56^{dim} (CD56+) e exprimem elevados níveis de CD16 (CD16++). Os restantes 10% apresentam elevada intensidade de expressão do antígeno CD56 sendo por isso designadas de CD56^{bright} (CD56++) e não exprimem CD16 (CD16-) ou apresentam baixa expressão de CD16 (CD16+).^{18,19,20}

Para além destas características fenotípicas, os linfócitos T e as células NK exprimem um elevado número de antígenos de superfície, os quais podem ser usados para distinguir estes tipos de células. Estes antígenos pertencem a diferentes famílias, de acordo com a sua estrutura molecular.

2.2.1. Receptores da super-família das imunoglobulinas

As moléculas pertencentes à super-família das imunoglobulinas incluem um vasto grupo de receptores de superfície caracterizado por possuírem uma região semelhante às Ig. Os membros desta família são responsáveis por diversas funções imunes, particularmente no reconhecimento de antígenos de superfície das células. Esta super-família inclui entre outros, o CD3, CD4, CD8, CD28, CD80, CD86, CD150 e o CD152.

Todos os linfócitos T maduros exprimem na sua superfície o CD3, o qual está associado ao TCR, formando o complexo TCR/CD3. O complexo CD3 é formado por três proteínas da super-família das Ig e por um dímero de polipeptídeos. As moléculas possuem na porção intra-citoplasmática receptores ITAM (“tyrosine base activation motifs”) que são responsáveis pela transdução de sinais de activação após contacto do TCR com os antígenos.^{13,21}

As moléculas CD4 e CD8 são glicoproteínas expressas à superfície celular, sendo a porção extra-citoplasmática de ambas constituída por domínios imunoglobulínicos.^{19,20} Com base na expressão de CD4 e CD8, os linfócitos T podem ser divididos em duas subpopulações funcionalmente distintas, sendo denominados de linfócitos T auxiliares (Thelper- Th) e linfócitos T citotóxicos (Tc). Os linfócitos Th apresentam na sua membrana o antígeno CD4 (CD4+) e os linfócitos Tc apresentam na sua membrana o antígeno CD8 (CD8+).^{22,23}

O CD28 é uma potente molécula co-estimuladora na activação dos linfócitos T. No sangue periférico este antígeno é expresso em 95% dos linfócitos CD4+ e em mais de 50 % dos linfócitos CD8+.²⁴⁻²⁷ Esta molécula de activação possui dois ligandos, o CD80 e o CD86, os quais são expressos nos linfócitos T e B activados.^{28,29,30} O CD152 (CTL-4) partilha os mesmos ligandos com o CD28, mas são funcionalmente distintos. Enquanto o CD28 transmite sinais estimuladores aos linfócitos T, a ligação do CTL-4 ao CD80 e ao CD86 produz um sinal inibidor da activação dos linfócitos T. Em contraste ao CD28, o CD152 é unicamente expresso em linfócitos T activados.^{25,31} A molécula de superfície CD150 (SLAM) é expressa em linfócitos T do sangue periférico CD45RO+ CD45RA- e está envolvida na activação dos linfócitos T.³²⁻³⁷

2.2.2. Moléculas de adesão, activação e receptores de citocinas

Algumas das moléculas de adesão presentes na superfície dos linfócitos e das células NK são o CD2, o CD7, antígenos pertencentes à família das integrinas β 2 (CD11a/CD18, CD11b/CD18 e CD11c/CD18) e à família da L-selectina (CD62L).

A molécula CD2 está presente em cerca de 75% dos linfócitos do SP, sendo um ligando para a molécula de adesão o *Lymphocyte-function-associated antigens* (LFA-3), presente nas células alvo. A distribuição de CD2 divide as células NK circulantes em três sub-populações distintas: as células NK CD56⁺⁺ apresentam uma elevada intensidade de expressão de CD2, cerca de 80% das células CD56⁺ exprimem quantidades normais de CD2 e os restantes 20% não exprimem este marcador.^{38,39,40}

O antígeno CD7 é expresso nos linfócitos T e nas células NK. O ligando para esta molécula é ainda desconhecido, pensando-se que poderá estar envolvido na adesão e na activação dos linfócitos T e das células NK. Vários estudos mostraram que a ligação do CD7 induz respostas proliferativas, modula a adesão das células T, aumenta a expressão dos receptores de interleucina-2 (IL-2) e favorece a secreção de IL-2. Nas células NK, a ligação ao CD7 promove a proliferação celular e a produção de interferão gama (IFN- γ).^{41,42}

A molécula de adesão CD62L (L-selectina) é expressa na maioria dos linfócitos T, B, neutrófilos, monócitos, células NK e das células hematopoiéticas malignas.^{43,44} Das sub-populações leucocitárias, as células NK CD56⁺⁺ são as que apresentam maior intensidade de expressão de CD62L (95%), enquanto só 25% das células NK CD56⁺ são CD62L⁺.⁴⁵ A função do CD62L é mediar a migração dos linfócitos e das células NK para os nódulos linfáticos periféricos e desempenha um importante papel na migração destas células ao longo do endotélio activado.^{46,47}

Os três antígenos pertencentes à família das integrinas β 2: CD11a/CD18, CD11b/CD18 e CD11c/CD18 são compostos por duas subunidades, uma subunidade β 2 (CD18) partilhada por todas as integrinas e uma subunidade α que varia de integrina para integrina.^{48,49,50}

O antígeno CD11a, em associação com subunidade CD18, sem a qual não actua, forma a integrina $\alpha L\beta 2$, um heterodímero também designado LFA-1. A sua função é essencialmente de adesão entre leucócitos durante a resposta imune, tendo ainda um papel importante na migração leucocitária através do endotélio, por ligação às moléculas de adesão intracelular-1 (*Intracellular Adhesion Molecule- ICAM*) (CD54), ICAM-2 (CD102) e ICAM-3 (CD50).⁴⁸ O CD11b constitui a subunidade α da integrina $\alpha M\beta 2$, formando um heterodímero também designado de receptor do complemento 3 (CR3) e que está presente em maior abundância em neutrófilos e em monócitos/macrófagos. Como molécula de adesão liga-se essencialmente a proteínas solúveis como o fibrinogénio e a moléculas de adesão endotelial como ICAM-1. Tem, assim, um papel importante nos fenómenos de extravasão e quimiotaxia durante o processo inflamatório.⁴⁹ O CD11c corresponde à subunidade α da integrina $\alpha X\beta 2$, conhecida também por p150,95. Este antígeno é expresso em mais de 80% das células NK e em menos de 20% dos linfócitos T. Actua em sinergia com o CR3, pelo que se liga ao mesmo tipo de moléculas e tem funções semelhantes, tais como a de receptor fagocítico e molécula de adesão envolvida na migração de células mielóides através do endotélio.⁵⁰

Apesar dos antígenos CD28, CD80, CD86, CD150 e CD152 serem classificados como receptores da super-família das imunoglobulinas, funcionam como moléculas co-estimuladoras dos linfócitos T e das células NK. Uma das moléculas de activação estudada foi o HLA-DR que constitui o epítipo monomórfico da molécula do complexo leucocitário humano (*Human Leucocyte Antigen – HLA*) de classe II. É uma glicoproteína transmembranar constituída por duas cadeias, uma cadeia α e uma cadeia β . É expresso constitutivamente em linfócitos B, células dendríticas, células endoteliais e, após activação, em linfócitos T e em células NK.⁵¹ A expressão do HLA-DR é regulada

positivamente pela acção de citocinas e pelo contacto célula a célula. A principal citocina que conduz ao aumento da expressão de HLA-DR é o IFN- γ .⁵¹

As citocinas participam na regulação do desenvolvimento de uma resposta imune efectora, através da sua ligação a receptores específicos existentes nos vários tipos de células.⁵² Os receptores da IL-2 desempenham importantes papéis na diferenciação e activação de linfócitos T e de células NK, sendo constituído pelo menos por três subunidades: α (CD25), β (CD122) e γ (CD132).¹³ O CD25 corresponde à cadeia α do receptor de IL-2 de alta afinidade (IL-2R $\alpha\beta\gamma$), embora quando expresso isoladamente demonstra baixa afinidade para a IL-2. O IL-2R $\alpha\beta\gamma$ é apenas expresso constitutivamente em células CD56⁺⁺, que, na presença de baixas doses desta citocina demonstram capacidade proliferativa.^{18,19} Nas células do SP, o CD25 é expresso em linfócitos T em repouso, em linfócitos CD4⁺ mas não nos linfócitos CD8⁺. Quando activados, tanto os linfócitos CD4⁺ como os linfócitos CD8⁺ exprimem CD25.⁵³ O antígeno CD122 é detectado em 5-15% dos linfócitos do sangue periférico e constitui a subunidade β do receptor de IL-2 de alta afinidade assim como do receptor de IL-2 de afinidade intermédia (IL-2R $\beta\gamma$) sendo expresso em células NK, linfócitos T e B, monócitos e em precursores mielóides. Os linfócitos CD8⁺ exprimem significativamente CD122 mas têm baixa intensidade de expressão de CD25, enquanto que os linfócitos CD4⁺ apresentam baixa expressão de CD122 e nenhuma de CD25. Contudo quando as células CD4⁺ são activadas apresentam elevada expressão deste antígeno.^{54,55}

A molécula CD117 ou *c-kit* constitui o receptor para o factor de crescimento, *stem cell factor* (SCF), também chamado *mast cell growth factor* (MGF).⁵⁶ É constitutivamente expresso em células progenitoras hematopoiéticas, mastócitos, células germinais e em melanócitos, sendo essencial para o seu desenvolvimento.⁵⁷ Está também presente nas

células NK CD56++ conferindo-lhes o carácter de células com elevada capacidade proliferativa.¹⁹

2.2.3. Receptores das células NK

As células NK possuem, na sua superfície, receptores de linhagem NK, bem como um conjunto de receptores, conhecidos como receptores das células NK (*NK receptors* - NKR), que se ligam a moléculas HLA de classe I que são fundamentais para distinguir células normais de células transformadas e/ou estranhas e, deste modo, inibir ou activar a lise da célula alvo. Na sua superfície distinguem-se os receptores de inibição que impedem a destruição de células com HLA classe I e os receptores de activação que permitem a lise de células com moléculas de HLA classe I alteradas.^{9,17,58}

Os NKRs de acordo com a sua estrutura podem ser classificados em três superfamílias: a) receptores *killer* do tipo super-família das imunoglobulinas (*Killer cell-Ig-like receptor*, KIR), que reconhece primariamente HLA-A, -B e -C; b) receptores da super-família das lectinas de tipo C que reconhece HLA-E e c) receptores de citotoxicidade natural (NCRs), classe recentemente descrita e cujos ligandos são ainda desconhecidos.^{59,60}

2.2.3.1. Receptores de linhagem NK

Os receptores de linhagem NK, são receptores cujo padrão de expressão permite definir a população de células NK, sendo os mais característicos os CD56, CD16 e o CD57.

A molécula CD56, também designada por N-CAM, é uma isoforma da molécula de adesão das células neuronais, pertencente à super-família das Ig e foi primeiramente identificada no tecido neuronal. Como este antígeno está presente na superfície de todas as células NK, foi considerado o principal marcador para identificar este tipo celular.^{9,17}

O CD16 (receptor FC γ III) é uma glicoproteína transmembranar e constitui o receptor para a região Fc da IgG, estando portanto envolvido numa das vias de activação das células NK, devido à formação do complexo oligomérico do receptor das células NK que medeia a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC).^{12,60} Está presente na grande maioria das células NK do sangue periférico (90%), mas pode também ser encontrado na superfície de outras células, tais como neutrófilos, macrófagos e um pequeno grupo de linfócitos T.^{18,61}

A molécula de adesão CD57 está presente em pequenas populações de células NK e de linfócitos T. O significado funcional de expressão de CD57 na superfície de algumas células NK ainda não é conhecido.⁶²

2.2.3.2. Receptores pertencentes à super-família de receptor *killer* semelhantes às imunoglobulinas - KIRs

Os KIRs são proteínas de membrana do tipo I (terminal amino extracelular) que contêm dois ou três domínios extracelulares do tipo Ig. Incluem, entre outros, os antígenos CD158 (p58) e NK β 1 (p70) que reconhecem, respectivamente, HLA-C e HLA-B.⁶³ De acordo com o comprimento da sua cauda citoplasmática um KIR pode sinalizar a inibição (caudas longas) ou activação (caudas curtas) do processo de citotoxicidade quando uma molécula de HLA classe I é reconhecida.^{60,61} Assim, longas caudas citoplasmáticas contêm *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs* (ITIMs) que sinalizam a inibição do mecanismo de citotoxicidade quando o KIR está ligado de modo apropriado com a molécula de HLA classe I para a qual é específico.⁶⁴ Estes KIRs de inibição contêm uma ou duas sequências ITIM e quando a tirosina desses motivos é fosforilada, recrutam e activam a SHP-1 fosfatase conduzindo à inibição do sinal.⁶⁵ KIRs com caudas citoplasmáticas curtas associam-se de modo não covalente a moléculas citoplasmáticas DAP12 que sinalizam a activação quando o KIR está ligado.^{66,67} O DAP12 é um homodímero ligado por pontes dissulfureto, que contém moléculas ITAM e que funciona como unidade de transdução do sinal conduzindo à activação da citotoxicidade.^{17,65}

2.2.3.3. Receptores pertencentes à super-família das lectinas de tipo C - KLRs

Os KLRs pertencem à família das lectinas de tipo C sendo assim designados por possuírem domínios que reconhecem carboidratos dependentes de cálcio. Os receptores são glicoproteínas transmembranares de tipo II (terminal amino intracelular) podendo

existir como homodímeros (CD69) ou como heterodímeros (CD94/ NKG2A, -B, -C ou -E) ligados por pontes dissulfureto.⁵⁹ A molécula CD69 constitui um dos primeiros marcadores expresso em células NK activadas, após estimulação por agentes mitogénicos, sendo rapidamente induzida após estimulação com IL-2.⁶⁸ Está presente apenas numa pequena percentagem de células NK, linfócitos T e B do sangue periférico. A expressão deste antígeno representa um dos estadios iniciais no processo de activação de linfócitos e que precede a proliferação dos linfócitos sendo por isso considerado um marcador geral de linfócitos activados.⁶⁹ Um outro receptor de activação pertencente a esta família é o CD161.⁷⁰ É uma glicoproteína de membrana expressa nas células NK do sangue periférico mas também já foi detectada num pequeno grupo de linfócitos CD4+ ou CD8+ que exprimem o receptor TCR $\alpha\beta$. Relativamente à sua função, estudos recentes indicam que este receptor tem um papel essencial na regulação da actividade citolítica das células NK activada por outras moléculas na sua superfície, nomeadamente o CD158a.⁷⁰

A família das lectinas de tipo C inclui ainda o heterodímero CD94/NKG2 que é composto por duas glicoproteínas, a molécula CD94, marcadora de células imaturas, e uma molécula pertencente à família NKG2, ligadas por pontes dissulfureto (Fig.2).^{65,71}

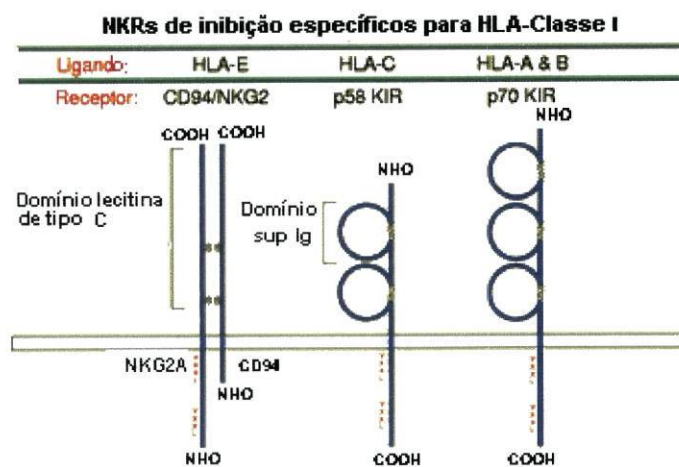


Fig.2 - Esquema dos NKRs de inibição específicos das moléculas de HLA classe I. Adaptado de Campbell KS. Signal transduction by inhibitory receptors on human Natural Killer cells. Eur. J. Immunol 1998; 28:599-609.⁶⁵

Estes receptores podem ser de inibição (NKG2A, NKG2B) ou de activação (NKG2C, NKG2E) dependendo do tamanho das suas caudas citoplasmáticas.^{71,72} Assim, os receptores de inibição (CD94/NKG2-A, -B) possuem longas caudas citoplasmáticas com duas sequências ITIM. Pela sua ligação a substratos efectores, como fosfatases de tirosina SHP-1 e SHP-2, causam a inibição da citotoxicidade das células NK e a secreção de citocinas. Em contrapartida, os receptores de activação (CD94/NKG2-C, -E) possuem caudas citoplasmáticas curtas e, para transmitirem o sinal de activação, ligam-se à molécula dimérica KARAP12/DAP12 com uma sequência ITAM.^{73,74,75}

2.3. Caracterização funcional dos linfócitos T e das células NK

2.3.1. Produção de citocinas

Os linfócitos são as células que reconhecem especificamente e respondem a qualquer tipo de antígenos.⁷⁶ Eles não só localizam como também activam muitos mecanismos efectores que são necessários para eliminar os antígenos estranhos ao organismo.^{76,77} Em resposta à estimulação antigénica, os linfócitos e as células NK segregam citocinas que promovem a proliferação e a diferenciação dos linfócitos T, bem como de outras células leucocitárias.⁷⁶

Com base no padrão de produção de citocinas os linfócitos CD4⁺ podem ser subdivididos em linfócitos Th1 e Th2. Os linfócitos Th1 segregam IL-2, factor de necrose tumoral (TNF- α) e IFN- γ , enquanto que os Th2 libertam interleucina-4 e 10 (IL-4 e IL-10).^{78,79} A população Th0 é precursora dos linfócitos Th1 e Th2, podendo ser considerada como uma terceira sub-população, a qual liberta todas as citocinas (Fig.3).^{80,81} As

citocinas produzidas pelos linfócitos Th desempenham um papel central na activação dos linfócitos T, B e de outras células que participam na resposta imune. As citocinas produzidas pelas células Th1 induzem a inflamação e activam principalmente certo tipo de linfócitos T e macrófagos, enquanto as Th2 activam principalmente os linfócitos B e as respostas imunes dependentes de anticorpos.^{82,83,84}

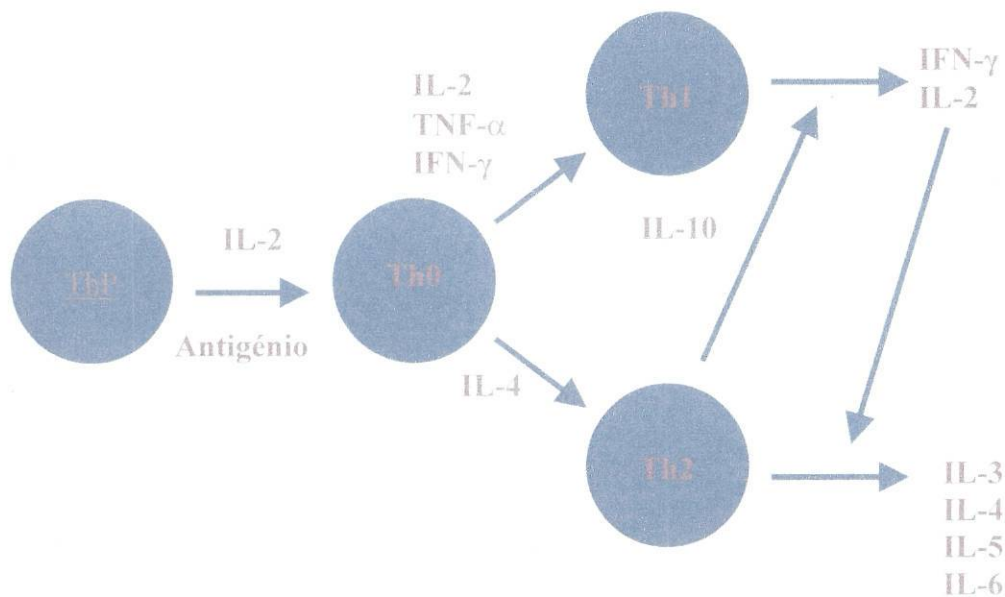


Fig.3 - Esquema da produção de citocinas pelos linfócitos CD4+. Adaptado de Alistair Noble & David M Kemeny. Do functional subsets of leukocytes arise by divergent or linear differentiation? Immunology 2002; 106:443-46.⁸¹

Os linfócitos CD8+, durante muitos anos foram considerados como uma população homogénea de células citotóxicas produtoras de um número limitado de citocinas. Recentemente, tornou-se claro que os linfócitos CD8+ têm um padrão de produção de citocinas idêntico ao dos linfócitos CD4+. Os linfócitos Tc, com base nas citocinas que produzem podem também ser divididos em dois grupos, sendo designados de células Tc1 e Tc2.⁷⁸ De igual modo, as células NK podem ser divididas em NK1 e

NK2. As células NK1 produzem IFN- γ mas não IL-4, IL-5 e IL-13, enquanto as células NK2 não produzem IFN- γ mas produzem IL-4, IL-5 e IL-13.⁸⁵ Portanto, o IFN- γ permite distinguir uma resposta celular do tipo 1 e a IL-4 uma resposta celular do tipo 2.⁷⁸

O IFN- γ é uma citocina com actividade anti-viral e anti-proliferativa, a qual se liga a receptores existentes na superfície das células de modo a activar respostas biológicas importantes.⁸⁶ Esta citocina é responsável pela activação dos macrófagos, aumentando assim a sua actividade anti-tumoral e pelo controlo da diferenciação dos linfócitos B, aumentando ou diminuindo a sua resposta imune.⁸⁷ A IL-4 é uma citocina pleiotrópica que possui um efeito antagonista ao IFN- γ . A detecção da produção da IL-4 é muito difícil devido à vasta distribuição dos seus receptores (IL-4R) pelos vários tipos de células existentes no sangue.⁸⁸ A IL-4 é produzida em baixas quantidades, contudo as quantidades produzidas são biologicamente significativas. Mesmo após estimulação a concentração de IL-4 é 100 vezes inferior à concentração de IFN- γ .^{89,90} A quantificação de células produtoras destas citocinas requer uma técnica muito sensível, como é o caso do ELISPOT (enzyme-linked immunospot) que possui uma sensibilidade 200 vezes superior à técnica convencional ELISA e não é radioactivo.⁹⁰ Com a técnica ELISPOT é possível avaliar a concentração de células produtoras de IFN- γ e IL-4, permitindo diferenciar e discriminar os Th1 dos Th2, Tc1 dos Tc2 e as NK1 das NK2. Nesta técnica as células são estimuladas com antigénios ou mitogénios e depois incubadas com anticorpos específicos para as citocinas que se pretendem avaliar. As citocinas produzidas aparecem como *spots* coloridos, que podem variar no tamanho e na cor.^{89,90}

2.3.2. Actividade citotóxica das células NK

O reconhecimento das células alvo pelas células NK pode ser realizado de dois modos distintos. As células NK têm a capacidade de reconhecer anticorpos à superfície das células alvo e de accionarem o mecanismo ADCC (Fig.4).^{17,91} A associação do CD16 com as cadeias de transdução de sinal CD3 ξ e Fc ϵ R1 γ formam o receptor ADCC (ADCC-R), o qual é responsável pela ADCC provocando a lise das células alvo.⁹² As cadeias CD3 e Fc ϵ R1 γ exprimem na sua cauda citoplasmática imuno-receptores ITAM que são responsáveis pela transdução de sinais de activação. A activação de células NK mediada pelo CD16 promove, além da actividade citolítica, a fosforilação de resíduos de tirosina de várias proteínas reguladoras, assim como a libertação de citocinas.⁹² Na ausência de anticorpos, este receptor não é utilizado para iniciar a actividade citotóxica.

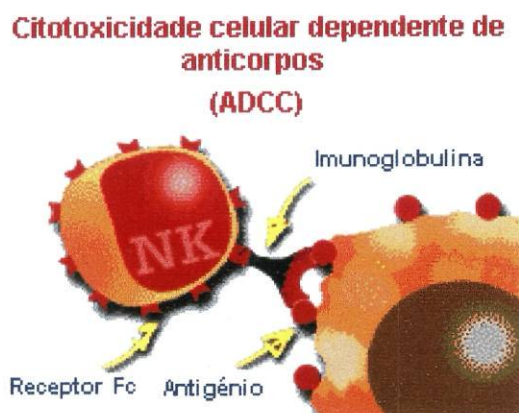


Fig.4 – Representação esquemática do mecanismo da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). Adaptado de WWW.pathoindia.com/update6.html.⁹¹

Uma segunda forma das células NK reconhecerem as células alvo é através da diferente expressão de moléculas de HLA classe I por parte das células alvo. De acordo

com o modelo inicialmente proposto por Karre e Ljunggren⁹³ da hipótese do “missing self” onde a função das células NK é reconhecer e destruir as células que não exprimem ou que tenham alterações nas moléculas HLA de classe I. O equilíbrio entre os sinais de activação e os de inibição e a sua regulação torna as células NK capazes de distinguir as células normais das células malignas. Quando a célula exprime quantidades normais de HLA de classe I liga-se aos receptores de inibição existentes nas células NK bloqueando as cascatas de sinais que levariam à lise.⁵⁸ Os receptores possuem na sua cauda citoplasmática moléculas ITIM com diferentes estruturas moleculares e especificidade para o HLA, gerando um sinal que se sobrepõe ao sinal de activação, impedindo a morte da célula.⁶¹ Quando a célula alvo é uma célula tumoral que perdeu ou possui baixos níveis de moléculas de HLA classe I que não são detectados pelos receptores de inibição, são gerados sinais de activação pela ligação aos receptores de activação tais como o CD2, CD16 ou CD28 iniciando a via de transdução de sinal de activação da citotoxicidade, que vai culminar na morte da célula alvo (Fig.5).⁵⁸

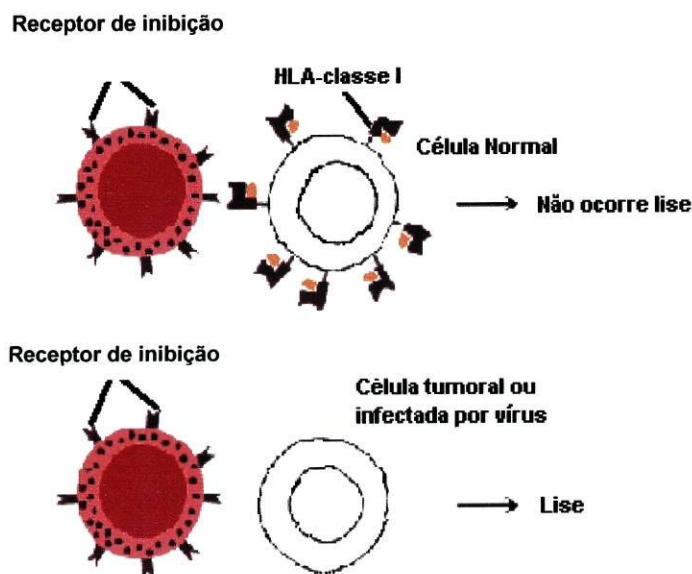


Fig.5 – Modelo de omissão do próprio proposto para explicar o mecanismo de citotoxicidade das células NK. Adaptado de www.elmo.shore.ctc.edu/biotech/immunology/notes4-4.htm.⁹⁴

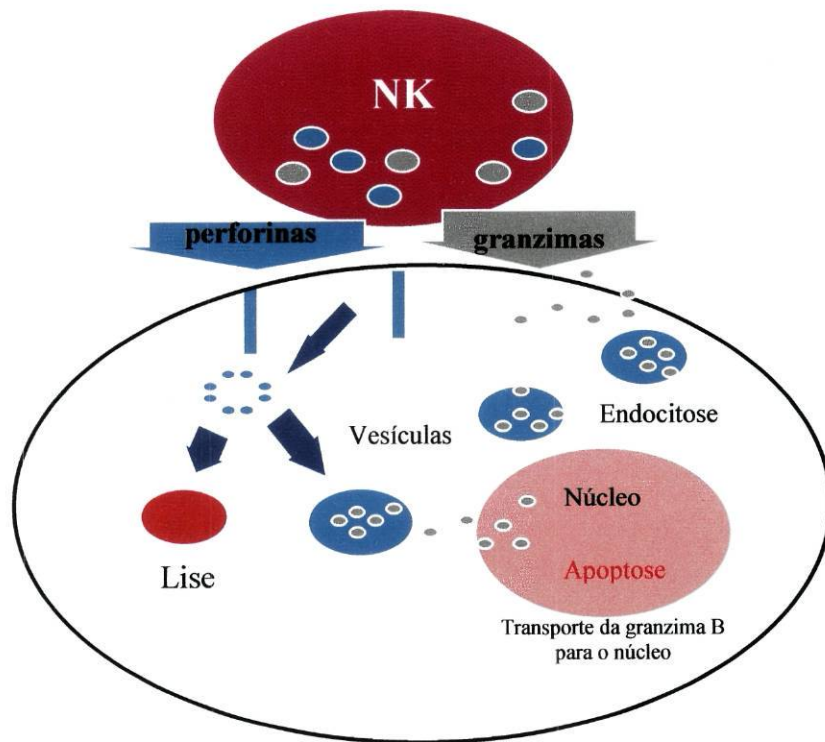


Fig.6 – Esquema da destruição de uma célula alvo por uma célula NK pela acção de perforinas e granzimas.

Adaptado de WWW.bccancer.bc.ca.⁹⁶

Após a estabilização da ligação da célula NK/célula alvo, através das moléculas de adesão, ocorre uma orientação dos grânulos para o local de contacto e a célula NK liberta o conteúdo dos grânulos.⁹⁵ A perforina libertada forma vários poros na membrana da célula alvo que vão permitir a entrada de granzimas, desencadeando-se uma série de reacções que irão culminar na morte da célula (Fig.6).^{95,96}

3. Acção do G-CSF nos linfócitos e nas células NK

O G-CSF é a citocina mais utilizada na mobilização das CPH da medula óssea para o sangue periférico em dadores e em doentes. Contudo, existem estudos que demonstram que esta citocina provoca uma supressão da função dos linfócitos e células NK.^{97,98} Algumas hipóteses foram formuladas de modo a explicar os mecanismos de indução da imunossupressão pelo G-CSF. Besinger et al⁹⁹ verificaram uma diminuição da função efectora imune das células mononucleares presentes nos enxertos, sugerindo uma imunossupressão generalizada. Joshi et al² propõem que a diminuição da função dos linfócitos e das células NK se deve à secreção de citocinas secundárias por parte de células acessórias do sistema imune. Kitabayashi et al¹⁰⁰ sugerem que o G-CSF pode regular a produção de IFN- γ por estas células. As interacções dos linfócitos e das células NK com células supressoras (granulócitos) constituem a hipótese proposta por Taga et al¹⁰¹ para explicar este fenómeno. Outros estudos indicam que alguns monócitos presentes nas CPSP mobilizadas com G-CSF podem ser responsáveis pelas imuno-disfunções verificadas.^{102,103}

Weaver et al¹⁰⁴ analisaram as sub-populações dos linfócitos T em células mobilizadas e verificaram um aumento na frequência de linfócitos CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ e CD20+ após 3 dias de mobilização, porém estes valores baixaram nos 4 e 5 dias de mobilização para valores inferiores aos obtidos antes da administração de G-CSF. Reyes et al⁹⁸ verificaram que a percentagem de células CD4+ e CD8+ não modificou durante o tratamento com esta citocina, embora tenha ocorrido uma expansão das células CD4+CD45RO+ associada a uma diminuição das células CD4+CD45RA+.

Sloand et al¹⁰⁵ sugerem que o G-CSF modula o equilíbrio entre os linfócitos Th1 e Th2 a favor dos Th2, devido à diminuição da produção de IFN- γ e ao aumento da

produção de IL-4. De acordo com vários estudos, os doentes alotransplantados com CPSP não apresentam um aumento na incidência ou severidade da doença de enxerto contra hospedeiro aguda, apesar do número de células CD3+ ter aumentado 10 vezes nas CPSP, comparativamente ao transplante de medula óssea clássico.^{105,106}

OBJECTIVOS

O principal objectivo deste estudo foi avaliar o efeito do G-CSF nas células dos enxertos hematopoiéticos, nomeadamente no fenótipo e na produção de IFN- γ e IL-4 pelos linfócitos e pelas células NK.

Inicialmente caracterizaram-se fenotipicamente as referidas células no SP dos dadores e dos doentes, de modo a definir o padrão de expressão dos antigénios de linhagem linfocitária, linhagem NK, das moléculas de adesão e de activação e dos receptores de citocinas. Comparou-se o fenótipo dos linfócitos e das células NK do SP e da Cit nos dadores e nos doentes, de modo a avaliar a possível acção do G-CSF.

Em ambos os grupos, quantificou-se as células mononucleares produtoras de IFN- γ e IL-4 do SP e da Cit.

Com este estudo dos linfócitos e das células NK dos enxertos hematopoiéticos, pretendeu-se compreender a possível função destas células quando infundidas nos doentes.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Grupos estudados

O sangue periférico (SP) e a citafereze (Cit) foram obtidos de doentes candidatos a autotransplante e de doadores de CPSP para alotransplante. O grupo “doadores” integrou vinte e sete indivíduos e o grupo “doentes” vinte e seis indivíduos com hemopatias malignas, tais como mieloma múltiplo (MM), doença de Hodgkin (DH) e linfoma não Hodgkin (LNH) (Quadro 1).

Quadro 1 – Caracterização dos grupos estudados

	Dadores	Doentes
Idade (Mediana)	35	53
Sexo		
Masculino	12	13
Feminino	15	13
Diagnóstico	---	11 MM 8 LNH 7 DH

2. Amostras e colheita de CPSP

As CPH foram mobilizadas para o SP com G-CSF. Aos doadores foi administrada uma dose de G-CSF de 12 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ e aos doentes uma dose de 10-16 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ (dependendo do diagnóstico), por via subcutânea durante 5 dias consecutivos. Os SP foram colhidos antes da mobilização com G-CSF e as CPSP ao quinto dia de mobilização por citafereze.

3. Imunofenotipagem

Na imunofenotipagem utilizaram-se anticorpos monoclonais conjugados com fluoresceína (FITC) / ficoeritrina (PE) / "peridinin chlorophyll protein conjugate" (PerCP) ou PerCP Cy5.5 / alofocianina (APC).

No estudo dos linfócitos usou-se o anticorpo anti-CD3 na quarta fluorescência, excepto numa combinação em que se utilizou o CD152. Nas restantes fluorescências os marcadores utilizados foram os seguintes: CD3 (PerCP), CD4 (PE, FITC ou PerCP), CD8 (PerCP), CD14 (PE), CD19 (PerCP), CD25 (PE), CD28 (PE), CD45 (FITC), CD45RO (FITC), CD45RA (PE), CD62L (FITC), CD80 (FITC), CD86 (PE), CD95 (FITC), CD122 (FITC) e CD150 (PE).

As células NK foram marcadas com os anticorpos monoclonais anti-CD56 (PC5-ficocianina) e anti-CD3 (APC) na terceira e na quarta fluorescência respectivamente, tendo-se usado os seguintes anticorpos monoclonais para as restantes fluorescências: CD2 (PE), CD7 (FITC), CD11a (FITC), CD11b (PE), CD11c (PE), CD16 (FITC), CD25 (PE), CD57 (FITC), CD62L (FITC), CD94 (FITC), CD69 (PE), CD117 (FITC), CD122 (FITC), CD158a (FITC), CD161 (PE), CDHLA-DR (PE), CDNK β 1 (PE) e Granzima B (PE).

3.1. Técnica de Marcação

Os volumes de anticorpo monoclonal utilizados na marcação de células (5 a 10×10^5 cel/100 μ l) foram os aconselhados pelos fabricantes. Após a adição dos anticorpos monoclonais, as amostras incubaram à temperatura ambiente e no escuro

durante 15 minutos. Posteriormente foram sujeitas a lise eritrocitária com 2 ml de FACS™ *Lysing Solution* (BD- ENZifarma) durante 10 minutos nas mesmas condições de temperatura e obscuridade. Decorrido este tempo, as células foram centrifugadas a 1500 r.p.m. durante 5 minutos e os sobrenadantes rejeitados. Finalmente fixaram-se as células com 300 µl de CELLFix™ (BD- ENZifarma).

Para a granzima B utilizou-se um protocolo de permeabilização da membrana uma vez que esta é um marcador intracitoplasmático. Após a incubação com os anticorpos monoclonais (anti-CD94, anti-CD56 e anti-CD3) e a lavagem das células, rejeitou-se o sobrenadante. As células foram fixadas com 100 µL de meio de fixação (solução A; Caltag Laboratories) durante 15 minutos, no escuro e a temperatura ambiente. Procedeu-se depois à lavagem das células e à rejeição do sobrenadante. As células foram então, suspensas em 100 µl de meio de permeabilização (solução B; Caltag Laboratories) e incubadas com o anticorpo granzima B durante 15 minutos nas mesmas condições de temperatura e obscuridade. No fim deste tempo executou-se nova lavagem das células e sua fixação.

3.2. Citometria de fluxo

3.2.1. Aquisição

A aquisição das amostras foi realizada por citometria de fluxo, utilizando-se um FACSCalibur (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). No estudo dos

linfócitos adquiriram-se 60.000 eventos e para as células NK 90.000, garantindo-se assim a representatividade de cada uma das populações estudadas.

3.2.2. Análise das populações leucocitárias

A análise dos eventos adquiridos foi efectuada com o programa BD CellQuest Pro (ENZifarma). As diferentes populações estudadas foram seleccionadas pela sua granularidade, tamanho e intensidade de expressão dos antígenos. No “dot plot” “Forward Scatter/Side Scatter” (FSC/SSC) fez-se um gate na região dos linfócitos de modo a obter uma percentagem de células CD45+ maior que 95% e de CD14+ (monócitos) menor que 5% (Fig.7a,b). Posteriormente nesta região avaliou-se a expressão de CD3 de modo a determinar a percentagem de linfócitos T (CD3+) (Fig.7c) e no “dot plot” CD3/CD56 determinou-se a percentagem de células NK (CD3-CD56+) e linfócitos Tc (CD3+CD56+) (Fig.7d). Os resultados foram expressos em percentagens de células positivas para cada marcador.

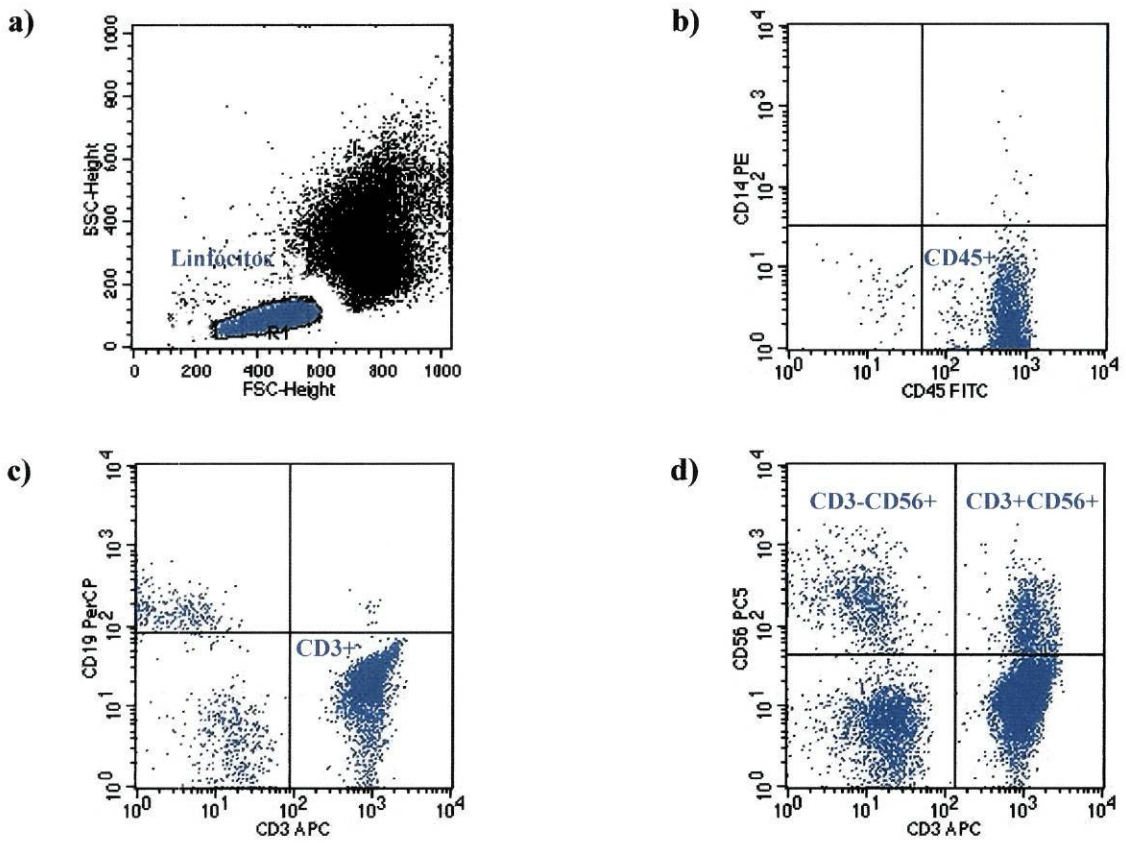


Fig.7 – Exemplo da análise sequencial realizada para o estudo das populações leucocitárias. a) Região dos linfócitos b) “dot plot” CD45/CD14 c) “dot plot” CD3/CD19 d) “dot plot” CD3/CD56.

3.2.3. Análise fenotípica dos linfócitos

A região dos linfócitos foi definida no “dot plot” FSC/SS, a partir da qual se avaliou a expressão dos marcadores de superfície estudados (Fig.8).

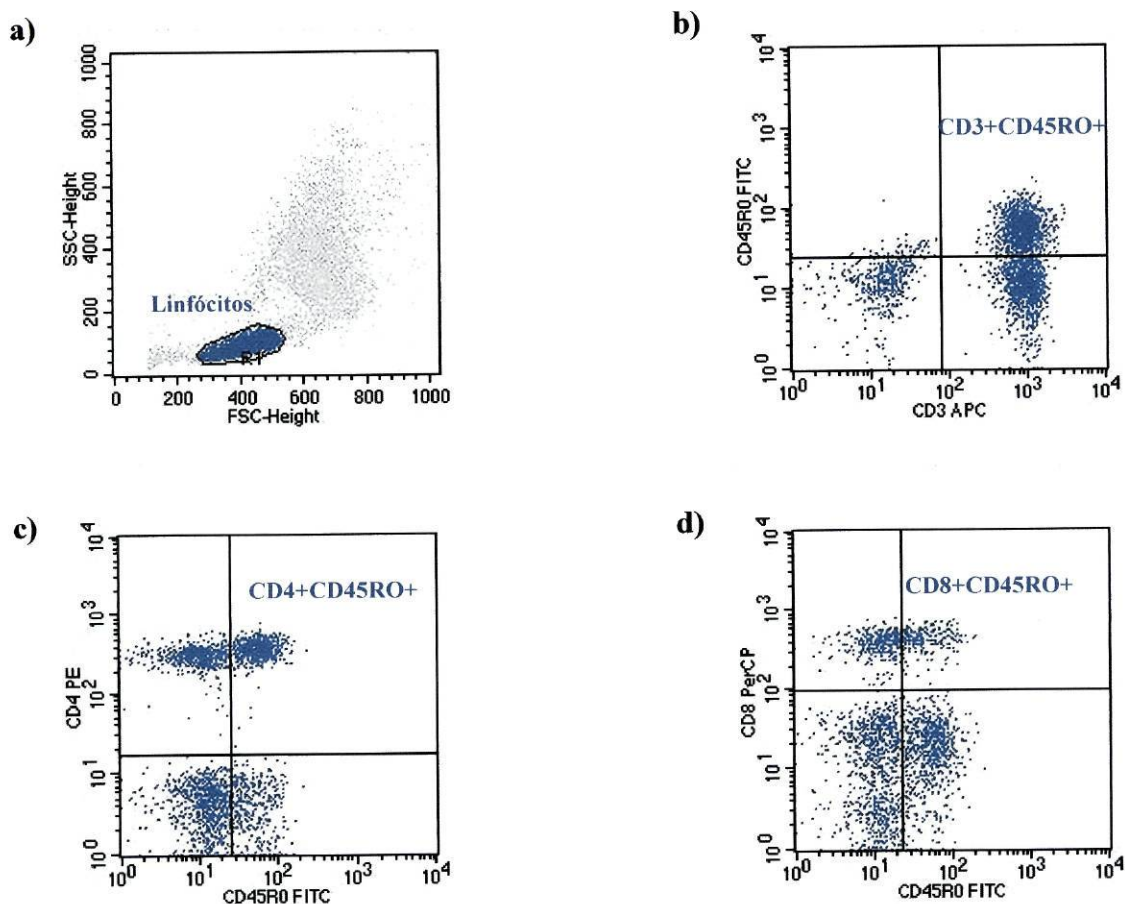


Fig.8 – Exemplo da análise sequencial realizada para o estudo do fenótipo dos linfócitos. O exemplo aqui demonstrado refere-se à expressão do CD45RO, tendo-se procedido de igual modo para a análise dos outros marcadores. **a)** Região dos linfócitos. **b)** “dot plot” CD3/CD45RO. **c)** “dot plot” CD45RO/CD4. **d)** “dot plot” CD45RO/CD8.

3.2.4. Análise fenotípica das células NK

No “dot plot” FSC/SSC definiu-se a região dos linfócitos (Fig.9a). Como as células NK são caracterizadas fenotipicamente como CD3-CD56+ foi construído um “dot plot” CD3/SSC onde se seleccionaram as células CD3- (Fig.9b). A partir desta população fez-se um “dot plot” CD3/CD56 no qual se seleccionaram as células CD56 positivas. De acordo com a intensidade de expressão de CD56 definiram-se duas

regiões, uma para as células CD56++ e outra para as células CD56+ (Fig.9c). Nestas duas sub-populações de células NK foi estudada a expressão dos restantes marcadores (Fig.9d,e).

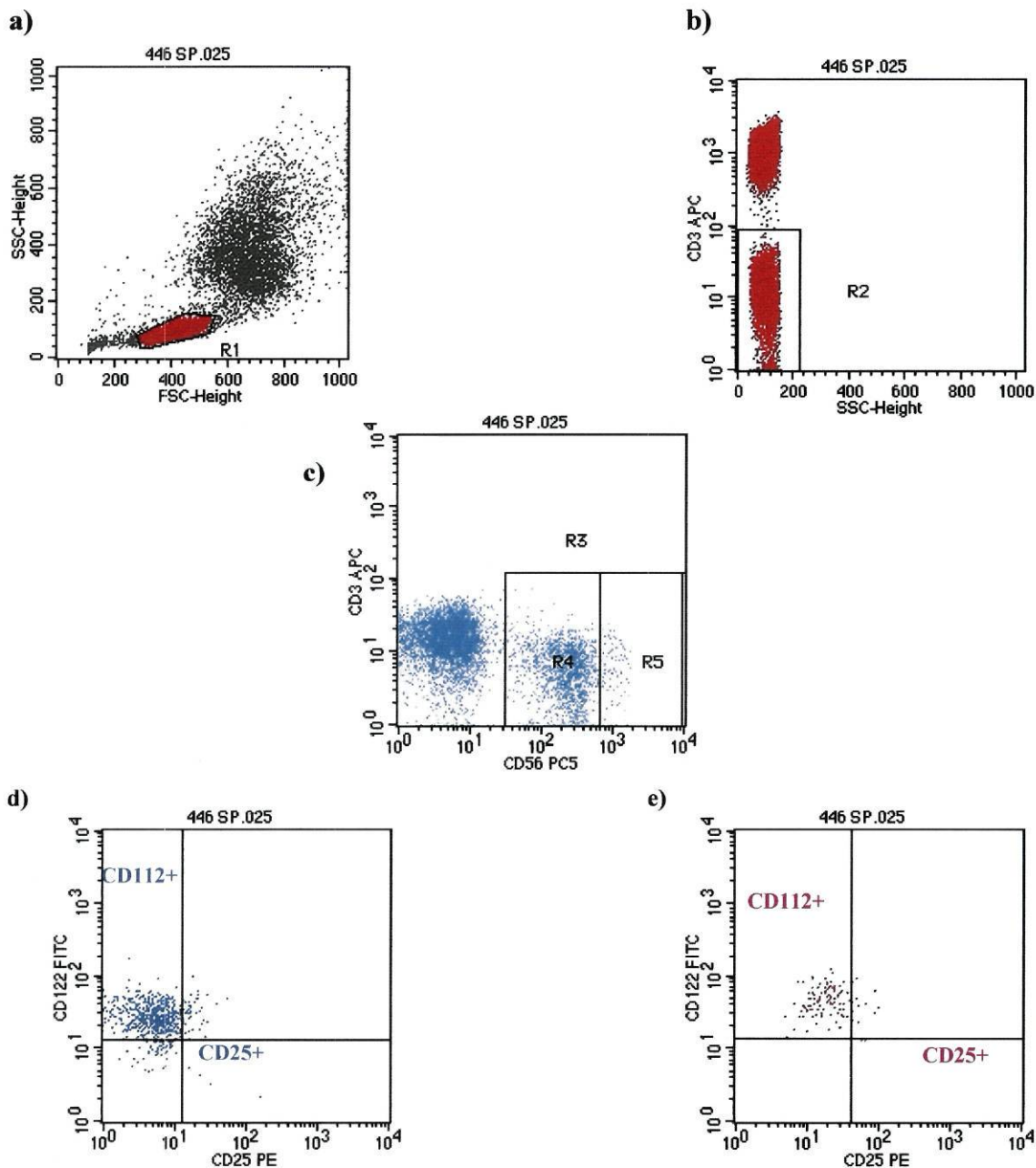


Fig.9 – Exemplo da análise sequencial efectuada para o estudo fenotípico das células NK. **a)** Região dos linfócitos. **b)** Região dos eventos CD3-. **c)** Seleção das células CD56+ e CD56++. **d)** Exemplo da expressão de dois marcadores nas células CD56+. **e)** Exemplo da expressão de dois marcadores nas células CD56++. **R1** – Região dos linfócitos. **R2** – Região dos eventos CD3-. **R3** – Região das células NK. **R4** – Região das células CD56+. **R5** – Região das células CD56++.

4. Quantificação de células mononucleares produtoras de citocinas por ELISPOT

A técnica de ELISPOT foi montada de acordo com os protocolos estabelecidos por vários autores.^{90,107-110}

4.1. Preparação das células mononucleares

Os ensaios para a quantificação de células mononucleares produtoras de citocinas foram realizados num grupo de cinco dadores e seis doentes (4 MM e 2 LNH).

4.1.1. Isolamento e criopreservação

Imediatamente após a colheita, o SP e a Cit foram diluídos 1:2 em RPMI 1640 com 5% de L-glutamina e posteriormente isoladas em gradiente de Ficoll/Hypaque (10ml de amostra em 5ml de Ficoll) por centrifugação a 1600 r.p.m. durante 20 minutos. A interface foi transferida para 1 tubo e as células foram suspensas em RPMI 1640 e centrifugadas a 1100 r.p.m. durante 10 minutos. O sobrenadante foi rejeitado e o pellet novamente suspenso.

As células mononucleares, cuja concentração foi ajustada de modo a obter-se 20×10^6 células/ml, foram criopreservadas em azoto líquido a -190°C , até ao dia da sua utilização. O meio de congelação consistiu numa solução de 80% albumina humana (Albumina Humana 5%, Octapharma) e 20% DMSO (B BRAUN). À suspensão celular

a congelar foi adicionado igual volume da solução de congelação sendo a concentração final de DMSO de 10% (v/v).

4.1.2. Descongelação

As amostras foram retiradas do tanque de azoto e colocadas em água a 37°C até descongelar. De seguida transferiu-se as amostras para tubos contendo RPMI 1640, centrifugou-se a 1100 r.p.m. durante 10 minutos e o sobrenadante foi rejeitado.

A viabilidade das amostras foi determinada por citometria de fluxo através da marcação com 7 AAD, tendo-se obtido uma viabilidade superior a 80%.

4.2. Quantificação do número de células produtoras de IFN- γ e IL-4

Um conjunto de placas foi preparado para a quantificação do IFN- γ e outro para a IL-4, sendo os protocolos utilizados semelhantes.

4.2.1. Revestimento das placas

Os anticorpos de captura (IL-4 e INF- γ) foram diluídos na solução tampão de revestimento*. Posteriormente as placas foram revestidas com 100 μ l/poço de anticorpo e incubaram durante a noite a 4°C. Após a incubação, o tampão de revestimento foi

* Soluções descritas em anexo.

rejeitado e lavou-se os poços uma vez com 200µl/poço com a solução de bloqueamento*. De seguida os poços foram bloqueados com 200µl de solução de bloqueamento e as placas foram incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente. Findo este tempo, rejeitou-se a solução de bloqueamento.

4.2.2. Activação celular

As células mononucleares foram diluídas de modo a obter-se as seguintes concentrações: 5×10^6 , 5×10^5 e 5×10^4 células/ml, ajustando a concentração à viabilidade. Após a diluição do mitogénio (PHA) e do antigénio (PPD) em RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de L-Glutamina (Gibco-BRL), foi colocado um volume de 100 µl/poço de PHA e PPD (Fig.10a). Posteriormente, colocou-se 100 µl/poço de células de acordo com a Fig.10a. As placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ e 99% de humidade durante 48h para o caso do IFN-γ e 24h para a IL-4 (Fig.10b – etapas 1 e 2).

* Soluções descritas em anexo.

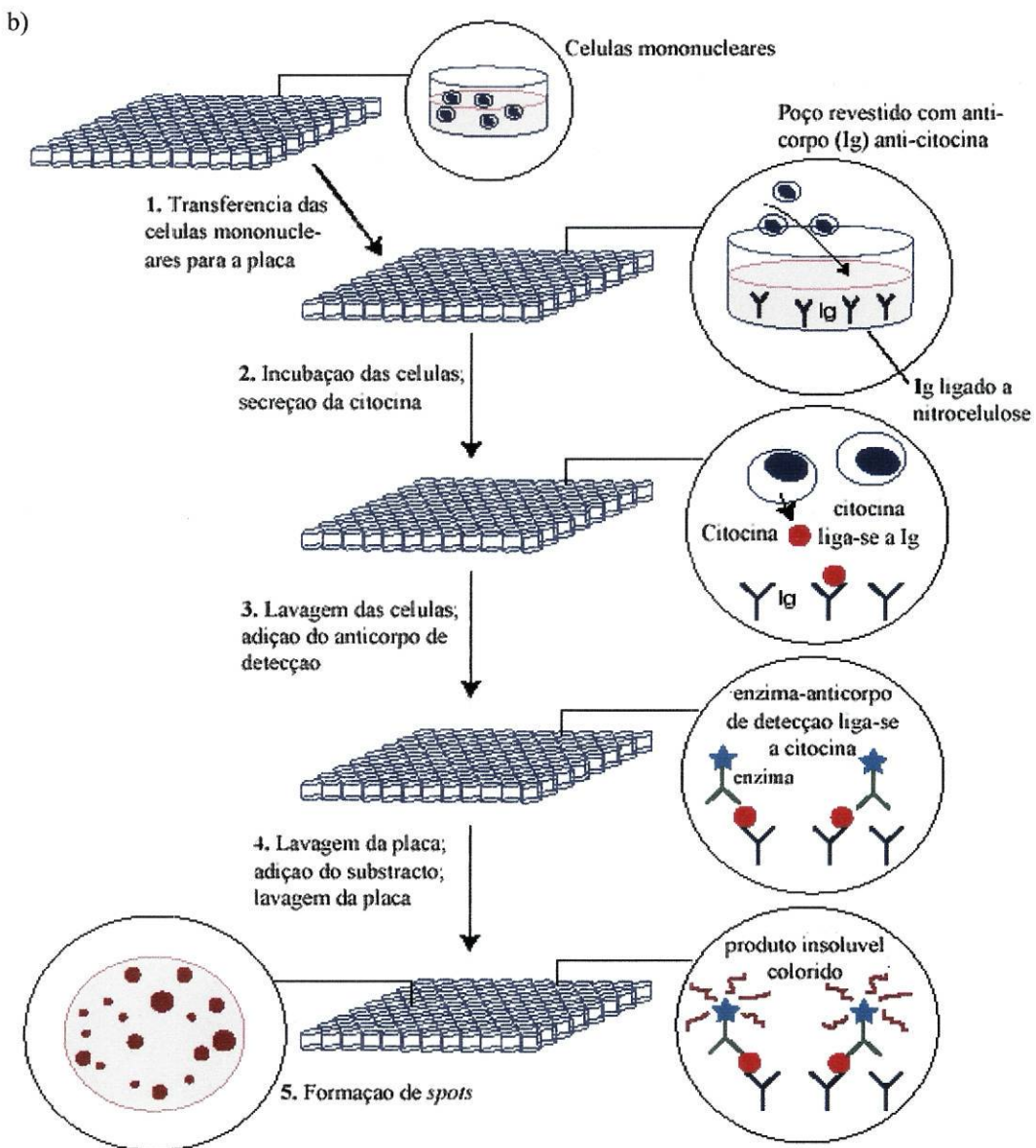
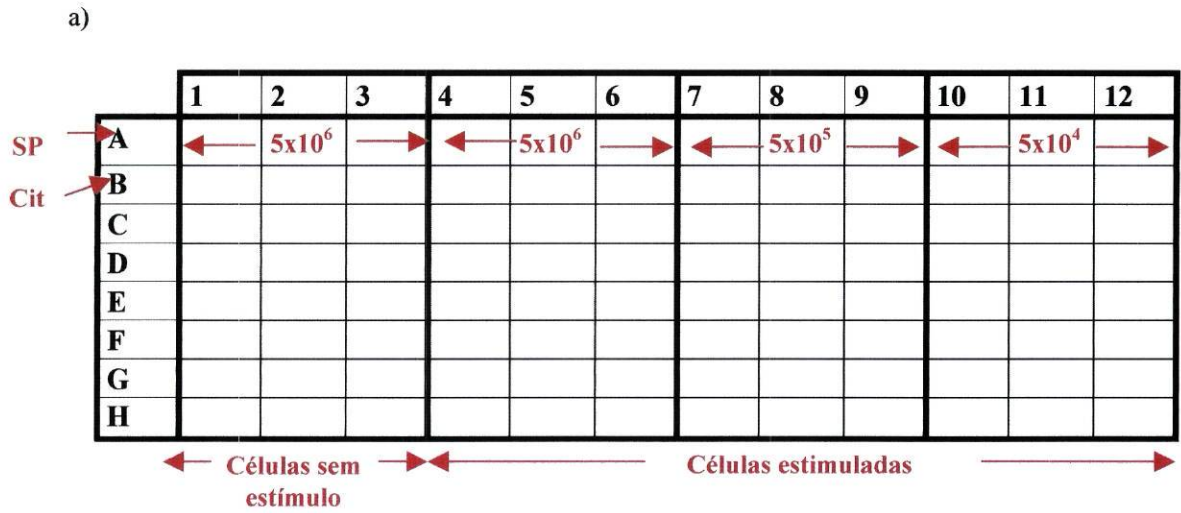


Fig.10 – Detecção das células mononucleares produtoras de IFN- γ e IL-4 por ELISPOT: a) esquema de uma placa; b) técnica de detecção. Adaptado de www.ermm.cbcu.cam.ac.uk.¹¹¹

4.2.3. Detecção de *spots*

Anticorpo de detecção

No final da activação celular, as células em suspensão foram aspiradas e as placas foram lavadas duas vezes com água desionizada e três vezes com 200 µl/poço de solução tampão de lavagem I*, deixando as placas repousar durante 5 minutos entre cada lavagem. De seguida adicionou-se 100µl/poço de anticorpo de detecção biotilado diluído em solução tampão de diluição* e as placas incubaram à temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente lavou-se mais três vezes as placas com 200 µl/poço de solução tampão de lavagem I* (Fig.10b – etapa 3).

Enzima

Adicionou-se 100 µl/poço de Avidina-HRP diluída em solução de diluição* e as placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 1 hora. As placas foram novamente lavadas quatro vezes com 200 µl/poço de solução de lavagem I* e duas vezes com 200 µl/poço de solução tampão de lavagem II* (Fig10b – etapa 4).

Substrato

Colocou-se 100 µl/poço de solução final de substrato* e deixou-se desenvolver os spots (30 a 60min) (Fig.10b – etapa 5). Para parar a formação dos spots lavaram-se

* Soluções descritas em anexo.

os poços com água desionizada e deixou-se as placas a secar ao ar durante 2 horas à temperatura ambiente e na obscuridade. As placas foram mantidas na obscuridade até posterior análise no Elispot reader.

4.3. Análise

As placas de ELISPOT foram lidas pelo Analyzer ImmunoSpot™ Series I na empresa CTL Europe LLC (Alemanha). O sistema fornece uma leitura automatizada das placas, permitindo deste modo uma análise detalhada. Os dados podem ser reanalisados através do programa ImmunoSpot™ Series I Satellite.

Soluções para o ELISPOT

1. Solução tampão de revestimento (1x Phosphate Buffered Saline [PBS]): PBS pH7,2.
2. Anticorpos de captura (IL-4 e IFN- γ): diluir 1:200 em PBS estéril
3. Solução de bloqueamento: RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de L-Glutamina (Gibco-BRL).
4. Solução tampão de lavagem I: 1xPBS com 0,05% Tween-20 (0,5ml Tween-20 por 1L de PBS).
5. Solução tampão de diluição: 1xPBS com 10% de FBS.
6. Anticorpo de detecção biotilado (IL-4 e IFN- γ): diluir 1:250 em solução tampão de diluição.
7. Avidina-HPR (BD): diluir 1:100 em solução tampão de diluição.
8. Solução tampão de lavagem II: 1xPBS
9. Solução substracto:

- a) Preparação da solução stock de 3-amino-9-etil-carbazol (AEC): adicionar 100mg de AEC (Sigma) a 100ml de N,N-dimetilformamida (DMF - Sigma).
- b) Preparação da solução acetato 0,1M: adicionar 148ml de ácido acético 0,2M a 352ml de acetato de sódio 0,2M. Adiciona-se água até perfazer um volume de 1L de seguida ajusta-se o pH a 5,0.
- c) Preparação da solução substrato final: adicionar 333,3 μ l da solução stock de AEC a 10ml da solução acetato 0,1M. Filtrar através de um filtro de 0,45 μ m. Adicionar 5 μ l de H₂O₂ (30%) e usar imediatamente.

5- Análise estatística

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

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. A expressão dos antigénios foi considerada positiva, somente quando expressos em mais de 10% das células.

RESULTADOS

1. Representatividade das populações leucocitárias do sangue periférico e da citafereze dos dadores e dos doentes

Nos grupos estudados, comparou-se as percentagens das diferentes populações leucocitárias do SP e da Cit. Para tal foram quantificadas as percentagens dos linfócitos T (CD3+), linfócitos T citotóxicos (CD3+CD56+), linfócitos B (CD19+), células NK (CD3-CD56+) e das sub-populações de células NK: CD56++ e CD56+ (Quadro 2 e 3).

Quadro 2 – Percentagens das sub-populações leucocitárias do sangue periférico e da citafereze dos dadores e dos doentes.

	Dadores		Doentes	
	SP	Cit	SP	Cit
Linf. T	72 (66-83)	72 (58-84)	82 (61-96)	79 (61-90)
Linf. Tc	4 (1-18)	4 (0-12)	6 (2-22)	6 (2-28)
Linf. B	11 (8-29)	16 (9-24)	3 (1-21)	4 (0-23)
Céls. NK	6 (1-18)	5 (0-12)	6 (2-22)	6 (2-12)

No SP dos dadores, os linfócitos T foram a população linfocitária predominante (72%), seguindo-se os linfócitos B com 11%, as células NK com 6% e os linfócitos Tc com 4%. Na Cit, os linfócitos T constituíram 72% do total de linfócitos, os linfócitos B foram a segunda população mais representada com 16%, seguida pelas células NK com 5% e pelos linfócitos Tc com 4% (Quadro 2).

Nos doentes, os linfócitos T representaram 82% dos linfócitos do SP e 79% dos linfócitos da Cit. Os linfócitos B corresponderam apenas 3% das células do SP e 4% das

células da Cit, enquanto os linfócitos Tc e as células NK estiveram presentes em 6% das células do SP e da Cit. Assim, quando comparados os grupos, dadores e doentes, apenas se verificaram diferenças estatisticamente significativas na percentagem de linfócitos B ($p < 0,05$), a qual foi maior nos dadores do que nos doentes (Quadro 2).

No SP dos dadores, a sub-população de células NK que esteve presente em maior percentagem foi a CD56+ com 95%, enquanto a CD56++ constituiu 5% da população total. Na Cit, as sub-populações CD56+ e CD56++ não sofreram alterações, relativamente ao SP, mantendo-se constante a proporção entre ambas (Quadro 3).

Quadro 3 – Percentagens das sub-populações CD56+ e CD56++ do sangue periférico e da citafereze dos dadores e dos doentes.

Grupo	SP		CIT	
	CD56+	CD56++	CD56+	CD56++
Dadores	95 (82-99)	5 (1-18)	94 (87-98)	6 (2-14)
Doentes	90 (79-98)	10 (2-22)	87 (72-97)	13 (4-28)

No SP dos doentes, a percentagem de células CD56+ e CD56++ foi de 90% e 10%, respectivamente. Na Cit, 87% das células NK demonstraram ser CD56+ e 13% CD56++. Dos resultados obtidos, pode-se concluir que os dadores, comparativamente aos doentes, possuíam uma maior percentagem de células CD56+ ($p=0,007$), quer no SP quer na Cit, observando-se o oposto para a sub-população CD56++ ($p=0,007$) (Quadro 3).

No SP e na Cit, uma vez que se conhecia a concentração de leucócitos, foi possível determinar o número absoluto das sub-populações leucocitárias (Quadro 4).

Quadro 4 – Concentrações das sub-populações leucocitárias do sangue periférico e da citafereze dos dadores e dos doentes.

	Dadores		Doentes	
	SP	Cit	SP	Cit
Leucócitos*10⁶/ml	6,0 (4,1-8,8)	588,0 (208-920)	5,8 (2,9-12,4)	451,0 (270-764)
Linf. T*10⁶/ml	1,4 (0,3-2)	122,8 (77,7-239,8)	0,9 (0-3,3)	95,6 (52,9-231,3)
Linf. Tc*10⁶/ml	0,09 (0-0,3)	7,2 (0,7-22,1)	0,06 (0-0,3)	7,3 (1,3-22,7)
Linf. B*10⁶/ml	0,3 (0,1 – 1,4)	31,0 (4,8 – 174,0)	0,1 (0 – 0,3)	13,2 (0,2 – 109,9)
Céls. NK*10⁶/ml	0,2 (0,03-0,34)	10,8 (1,6-30,1)	0,1 (0,03-0,4)	10,3 (2,7-31,4)

A comparação das concentrações celulares do SP e da Cit revelou que todas as sub-populações leucocitárias foram significativamente maiores na Cit do que no SP. Este aumento deveu-se ao facto da mobilização com G-CSF provocar um aumento da concentração de leucócitos, linfócitos e de células NK e da colheita das CPSP ter sido efectuada por citafereze, na qual se verificou um enriquecimento de células mononucleares. Nos dadores, a mobilização com G-CSF, provocou um aumento de 98 vezes nos leucócitos, 88 vezes nos linfócitos T, 103 vezes nos linfócitos B, 80 vezes nos linfócitos Tc e de 54 vezes nas células NK. Este aumento nos doentes foi de 98 vezes nos linfócitos, 106 vezes nos linfócitos T, 132 vezes nos linfócitos B, 122 vezes nos linfócitos Tc e de 103 vezes nas células NK.

Tanto no SP como na Cit, a concentração dos linfócitos T e B foi maior nos dadores do que nos doentes. Os linfócitos Tc do SP apresentaram uma concentração superior nos dadores ($0,09 \times 10^6/\text{ml}$) do que nos doentes ($0,06 \times 10^6/\text{ml}$), já na Cit as concentrações foram idênticas nos dois grupos ($7,2$; $7,3 \times 10^6/\text{ml}$, respectivamente). Quanto às células NK a concentração foi semelhante nos dadores e nos doentes (Quadro 4).

2. Caracterização fenotípica das populações linfocitárias do sangue periférico e da citafereze dos dadores e dos doentes

2.1. Expressão dos marcadores de linhagem linfocitária

Nos dadores e nos doentes, foram avaliadas as duas principais sub-populações de linfócitos T, linfócitos CD4+ e linfócitos CD8+. Nos dadores, os linfócitos CD4+ representaram 45% dos linfócitos do SP e 44 % dos linfócitos da Cit, enquanto os linfócitos CD8+ constituíram 27 e 26% dos linfócitos do SP e da Cit, respectivamente (Quadro 5a).

No SP dos dadores, o CD45RO foi expresso em 38% dos linfócitos, 35% dos linfócitos T, 26% dos linfócitos CD4+ e os linfócitos CD8+, não exprimiram este antigénio (8%) (Quadro 5a). Nos linfócitos da Cit, o CD45RO passou a ser expresso em 29% dos linfócitos, 27% dos linfócitos T, 21% dos linfócitos CD4+ e os linfócitos CD8+ continuaram a não exprimir CD45RO (6%). Quanto ao CD45RA, foi expresso em 53% dos linfócitos, 31% dos linfócitos T, 13% dos linfócitos CD4+ e em 17% dos linfócitos CD8+. As populações linfocitárias da Cit exprimiram menos CD45RA do que as do SP, passando este antigénio a ser expresso em 44% dos linfócitos, 21% dos linfócitos T e em 13% dos linfócitos CD8+ (Quadro 5a). Dos resultados obtidos verificou-se que as populações linfocitárias da Cit exprimiram menos CD45RO e CD45RA do que as populações linfocitárias do SP.

Quadro 5 – Expressão dos marcadores de linhagem linfocitária, do sangue periférico e da citafereze dos

(a) dadores e dos (b) doentes.

	SP	Cit	p		SP	Cit	p
CD4+	45 (32-52)	44 (37-54)	ns		40 (15-62)	40 (13-78)	ns
CD8+	27 (13-40)	26 (13-33)	ns		34 (20-60)	34 (20-53)	ns
CD45RO	38 (17-52)	29 (11-42)	0,001		38 (29-54)	38 (16-46)	ns
CD3+CD45RO	35 (16-49)	27 (11-41)	0,000		33 (22-53)	37 (15-44)	ns
CD4+CD45RO	26 (13-36)	21 (6-28)	0,000		25 (13-34)	24 (9-30)	ns
CD8+CD45RO	8 (2-22)	6 (2-10)	0,000		11 (2-37)	10 (2-25)	ns
CD45RA	53 (38-73)	44 (31-69)	0,002		39 (24-55)	38 (22-49)	0,026
CD3+CD45RA	31 (18-44)	21 (9-45)	0,000		25 (11-39)	16 (9-39)	0,006
CD4+CD45RA	13 (7-21)	9 (4-29)	0,002		8 (2-24)	4 (1-19)	0,002
CD8+CD45RA	17 (11-30)	13 (5-23)	0,001		18 (10-29)	12 (5-26)	0,004

Legenda: (■) – marcadores de linhagem linfocitária; p- valor de p obtido para a comparação entre SP e Cit; ns- não significativo.

No SP dos doentes, 40% dos linfócitos foram CD4+ e 34% foram CD8+. Na Cit, a percentagem de linfócitos CD4+ e de linfócitos CD8+ não sofreu qualquer variação, relativamente ao SP (Quadro 5b). O CD45RO foi expresso em 38% dos linfócitos do SP e da Cit, enquanto os linfócitos T exprimiram este antígeno em 33% das células do SP e em 37% das células da Cit. A percentagem de linfócitos CD4+ e CD8+ que exprimiram CD45RO foi aproximadamente igual no SP e na Cit. No SP, o CD45RA foi expresso em 39% dos linfócitos, em 25% dos linfócitos T e em 18% dos linfócitos CD8+. Enquanto na Cit, este antígeno foi expresso em 38% dos linfócitos, 16% dos linfócitos T e em 12% dos linfócitos CD8+ (Quadro 5b). Assim, comparando as

populações linfocitárias do SP com as da Cit, verificou-se uma diminuição da expressão de CD45RA.

2.2. Expressão das moléculas de activação, adesão e dos receptores de citocinas

As populações linfocitárias dos dadores e dos doentes não exprimiram CD80, CD86, CD122 e CD152, estando estes antigénios presentes em percentagens inferiores a 3% (dados não apresentados).

No SP dos dadores, a maioria dos linfócitos e linfócitos T exprimiram CD28 (62%), enquanto nos linfócitos CD4+ e CD8+ a expressão deste antigénio foi de 43% e de 16%, respectivamente. As populações linfocitárias na Cit exprimiram mais este antigénio do que as mesmas populações no SP (Quadro 6a). O CD150 foi expresso em 18% dos linfócitos e em 17% dos linfócitos T, enquanto nos linfócitos e linfócitos T da Cit, a expressão deste antigénio diminuiu para 11% e 10%, respectivamente. O CD62L foi expresso em 60% dos linfócitos, 46% dos linfócitos T, 32% dos linfócitos CD4+ e em 14% dos linfócitos CD8+ (Quadro 6a). Na Cit, ocorreu uma diminuição significativa da expressão de CD62L, passando as populações linfocitárias a não exprimirem este antigénio. No SP, 98% dos linfócitos e 72% dos linfócitos T exprimiram CD11a, tendo-se obtido os mesmos valores para estas células da Cit (Quadro 6a). O CD25 foi expresso em 26% dos linfócitos e em 21% dos linfócitos T, enquanto nos linfócitos da Cit a expressão deste antigénio não sofreu qualquer alteração (Quadro 6a).

Quadro 6 - Expressão das moléculas de activação, adesão e receptores de citocinas nas populações linfocitárias do sangue periférico e da citiferese dos (a) dadores e dos (b) doentes.

a)

	SP	Cit	p
CD28	62 (47-72)	64 (53-79)	0,011
CD3+CD28+	62 (45-72)	64 (53-79)	0,007
CD4+CD28+	43 (30-52)	43 (31-51)	ns
CD8+CD28+	16 (8-28)	18 (9-32)	0,000
CD150	18 (6-34)	11 (1-30)	0,031
CD3+CD150+	17 (4-31)	10 (1-29)	ns
CD62L	60 (28-80)	6 (2-26)	0,000
CD3+CD62L+	46 (20-60)	4 (0-21)	0,000
CD4+CD62L+	32 (12-43)	2 (0-16)	0,000
CD8+CD62L+	14 (6-21)	2 (0-10)	0,000
CD11a	99 (97-99)	99 (97-99)	ns
CD3+CD11a+	72 (55-84)	73 (57-87)	ns
CD25	26 (14-45)	29 (1-17)	ns
CD3+CD25+	21 (1-34)	20 (12-42)	ns

b)

	SP	Cit	p
	62 (27-81)	67 (28-80)	ns
	62 (27-81)	66 (27-80)	ns
	40 (0-58)	34 (0-57)	ns
	18 (11-36)	19 (7-37)	ns
	28 (2-64)	28 (5-56)	ns
	26 (2-64)	26 (5-54)	ns
	55 (34-70)	18 (1-57)	0,000
	43 (18-66)	13 (0-53)	0,000
	27 (8-46)	8 (0-30)	0,000
	14 (8-24)	4 (0-22)	0,000
	99 (97-99)	99 (98-99)	ns
	77 (62-90)	78 (61-91)	ns
	24 (3-53)	18 (3-53)	ns
	20 (1-50)	16 (3-49)	ns

Legenda: (■) - moléculas de activação e de adesão; (■) – receptores de citocinas; p- valor de p obtido para a comparação entre SP e a Cit; ns- não significativo.

No SP dos doentes, 62% dos linfócitos e linfócitos T foram CD28+, enquanto que 40% dos linfócitos CD4+ e 18% dos linfócitos CD8+ exprimiram este antigénio. Nas populações linfocitárias da Cit, não se observou nenhuma variação estatisticamente significativa na expressão deste antigénio. O CD150, tanto no SP como na Cit, foi expresso em 28% dos linfócitos e em 26% dos linfócitos T (Quadro 6b). O CD62L foi

expresso em 55% dos linfócitos, em 43% dos linfócitos T, em 27% dos linfócitos CD4+ e em 14% dos linfócitos CD8+. Na Cit, a expressão do CD62L diminuiu significativamente, passando a ser expresso unicamente pelos linfócitos e linfócitos T (18 e 13%, respectivamente). No SP, o CD11a foi expresso em 99% dos linfócitos e em 77% dos linfócitos T, enquanto na Cit, 99% dos linfócitos e 78% dos linfócitos T, exprimiram este antígeno (Quadro 6b). Quanto ao CD25 foi expresso em 24% dos linfócitos e em 20% dos linfócitos T, nos linfócitos da Cit não ocorreu qualquer variação na expressão deste antígeno (Quadro 6b).

2.3. Análise comparativa das populações linfocitárias no sangue periférico e na citafereze dos dadores e dos doentes

No SP, os dadores apresentaram uma maior percentagem de linfócitos CD45RA+ e de linfócitos CD4+CD45RA+ do que os doentes, tendo-se verificado o oposto para a percentagem de linfócitos CD8+ e CD150+ (Fig.11).

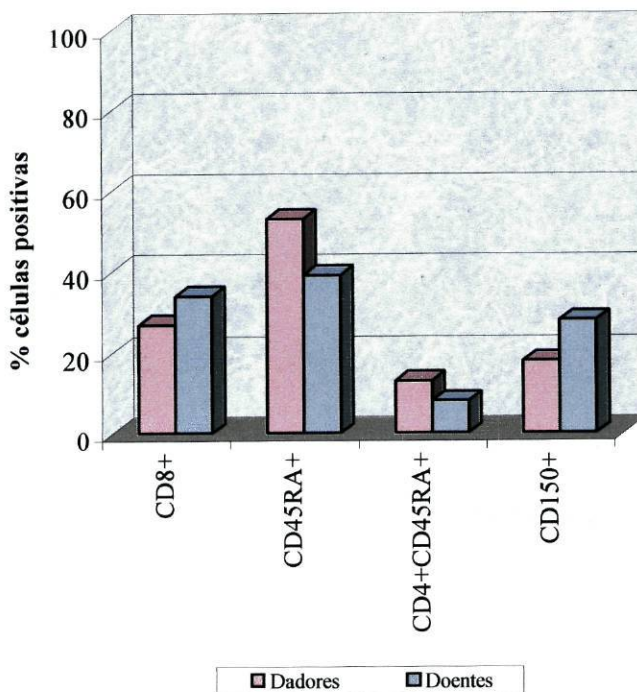


Fig.11 – Diferenças fenotípicas das populações linfocitárias do sangue periférico dos dadores e dos doentes.

Nas populações linfocitárias da Cit, ocorreram diferenças significativas na expressão de CD8, CD45RA, CD45RO, CD28, CD150 e CD62L. Os doentes, possuíam um maior número de linfócitos CD8+, de linfócitos e de linfócitos T CD150+, do que os dadores (Fig.12a e Fig.12b). Nos dadores, os linfócitos do SP exprimiram mais CD45RO do que os linfócitos da Cit, não se tendo verificado esta diminuição nos doentes. Quanto ao CD45RA, os dadores apresentaram uma maior percentagem de linfócitos CD45RA+ do que os doentes, contudo nos linfócitos da Cit, de ambos os grupos, verificou-se uma diminuição da expressão de CD45RA (Fig.12a).

A percentagem de linfócitos CD4+ que exprimiram CD28 foi mais elevada nos dadores do que nos doentes (Fig.12b). Nos dois grupos estudados, a percentagem de

linfócitos CD62L+ e CD3+CD62L+ na Cit diminuiu relativamente ao SP, contudo esta diminuição foi, mais acentuada nos dadores do que nos doentes (Fig.12b).

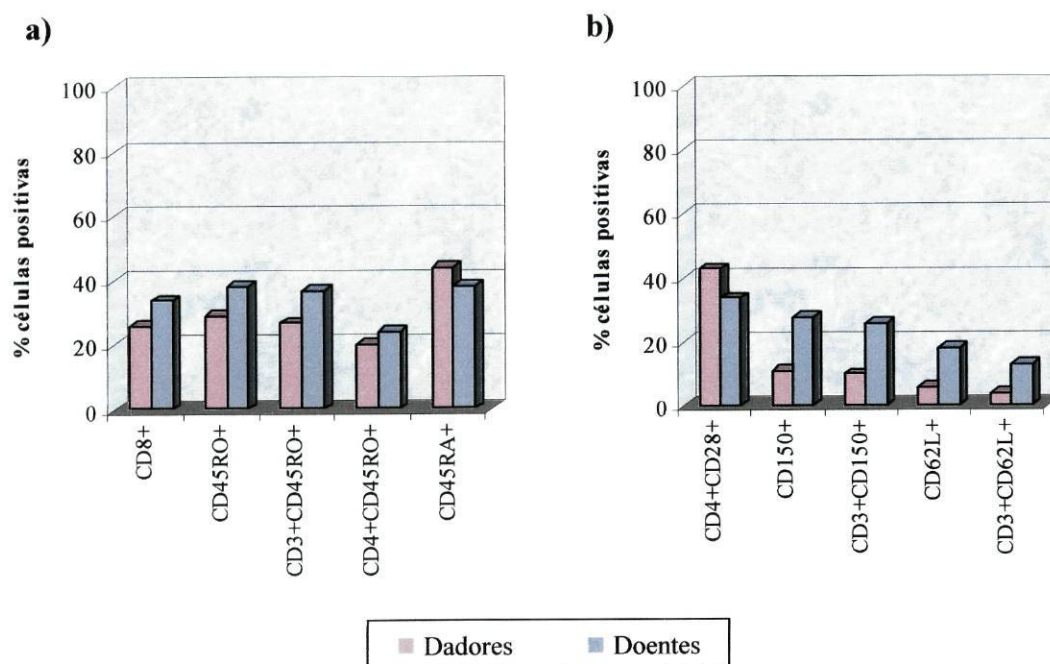


Fig.12 – Diferenças na expressão dos (a) marcadores de linhagem linfocitária e das (b) moléculas de activação e adesão nas populações linfocitárias da citofereza dos dadores e dos doentes.

3. Caracterização fenotípica das células NK

3.1. Expressão dos NKRrs nas sub-populações de células NK do sangue periférico e da citafereze dos dadores e dos doentes

No SP dos dadores, o CD16 e o CD57 estiveram presentes respectivamente em 94 e 45% das células CD56+ e em 13 e 5% das células CD56++. Somente 18% das células CD56+ exprimiram o antígeno CD158a na sua superfície e 14% exprimiram NK β 1, enquanto nas células CD56++ não houve expressão destes dois antígenos. A granzima B foi expressa pela maioria das células CD56+ (95%) e em 17% das células CD56++ (Quadro7a).

Quadro 7 – Expressão de NKRrs nas sub-populações CD56+ e CD56++ do (a) sangue periférico e da (b) citafereze dos dadores.

a)

	CD16	CD57	CD158a	NKB1	GranzB	CD69	CD94	CD161
CD56+	94 (82-98)	45 (20-76)	18 (12-20)	14 (6-28)	95 (80-99)	4 (1-7)	52 (32-81)	92 (82-98)
CD56++	13 (7-21)	5 (1-13)	6 (1-13)	3 (0-6)	17 (8-21)	2 (1-8)	96 (79-100)	58 (24-77)
p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	ns	0,000	0,000

b)

CD56+	95 (89-99)	33 (13-73)	16 (6-37)	12 (0-10)	99 (83-100)	4 (2-10)	56 (13-77)	93 (71-98)
CD56++	28 (12-54)	4 (1-13)	4 (1-9)	5 (2-9)	23 (12-32)	3 (1-7)	95 (83-100)	30 (10-68)
p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	ns	0,000	0,000

Legenda: (■) - antígenos de linhagem NK; (○) – KIRs; (■) - GranzB; (○) – KLRs; p - valor de p obtido para a comparação entre as células CD56+ e CD56++; ns - não significativo.

No SP dos dadores, nenhuma das sub-populações de células NK exprimiu CD69 (menos de 10%). O CD94 foi mais expresso nas células CD56++ (96%) do que nas células CD56+ (52%), tendo-se verificado o oposto para o CD161. Na sub-população CD56++, 58% das células demonstraram ser CD161+, enquanto que na sub-população CD56+ mais de 90% das células foram CD161+. Assim, observou-se que, com excepção do CD94, todos os NKRs foram expressos numa maior percentagem de células CD56+ do que de células CD56++ (Quadro 7a).

Na Cit dos dadores, as moléculas de linhagem NK continuaram a ser mais expressas nas células CD56+ verificando-se, no entanto, um aumento de expressão do CD16 nas células CD56++ (28%). O CD57 continuou a não ser expresso nas células CD56++, estando presente em 33% de células CD56+. Relativamente aos KIRs, o CD158a e o NK β 1, foram expressos, respectivamente em 16% e 12% das células CD56+, enquanto as células CD56++ não exprimiram nenhum destes antígenos. A granzima B foi expressa na maioria das células CD56+ (99%) e em 23% das células CD56++ (Quadro 7b). Quanto aos KLRs, nenhuma das sub-populações dos dadores exprimiu CD69, enquanto o CD94 foi expresso em metade das células CD56+ (56%) e quase na totalidade das células CD56++ (95%). O CD161 encontrou-se presente numa maior percentagem de células CD56+ (93%) do que de células CD56++ (29%). Na Cit, tal como no SP, todos os antígenos foram mais expressos nas células CD56+ do que nas CD56++, com a excepção do CD94, que foi mais expresso nas células CD56++ (Quadro 7b).

A Fig.13 ilustra as diferenças significativas encontradas na expressão destes antígenos nas células CD56++ e nas células CD56+ do SP e da Cit.

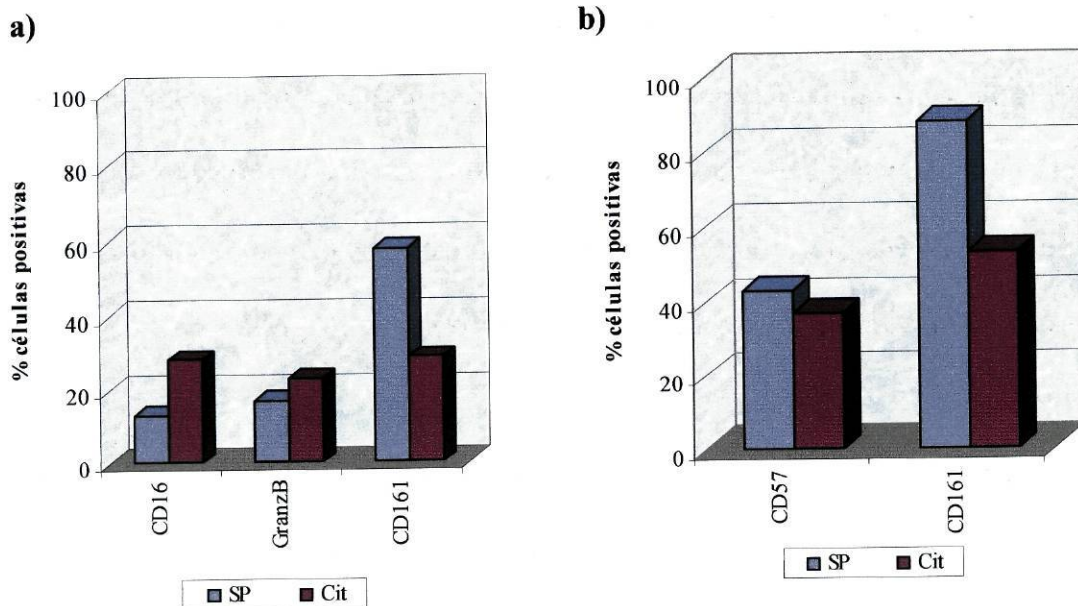


Fig.13 – Diferenças nos padrões de expressão dos NKRs entre as sub-populações (a) CD56++ e (b) CD56+ do sangue periférico e da citafereze dos dadores.

Assim, comparando o padrão de expressão antigénica da sub-população CD56++ verificou-se, na Cit, um aumento significativo da expressão do CD16 e da granzima B, comparativamente ao SP. Os KIRs e os KLRs das células CD56++, não sofreram alterações, apenas o CD161 foi expresso em menor percentagem de células da Cit do que do SP. Nas células CD56+, observaram-se diferenças na expressão dos antígenos CD57 e NK β 1, cujas expressões foram menores na Cit do que no SP. O padrão de expressão dos restantes antígenos não sofreu alterações após a administração do G-CSF.

No SP dos doentes, o CD16 foi expresso em 94% das células CD56+ e em 46% das células CD56++ (Quadro 8a). De salientar a expressão de CD16 nas células CD56++ (46%) a qual diferiu das percentagens observadas no SP dos dadores (13%) (Quadro 7a). Na sub-população CD56+, 43% das células demonstraram ser CD57+, enquanto que na sub-população CD56++ não houve expressão de CD57. Dos KIRs estudados, o CD158a foi expresso em 20% das células CD56+ e em 10% das células CD56++ e o NK β 1 foi expresso em 12% das células CD56+ (Quadro 8a). A granzima B esteve presente em 96% das células CD56+ e em 17% das células CD56++. Dos KLRs, o CD69 não foi expresso nas sub-populações de células NK, o CD94 foi mais expresso nas células CD56++ (99%) do que nas CD56+ (70%) e o CD161 foi expresso em 88% das células CD56+ e em 14% das células CD56++ (Quadro 8a).

Quadro 8 - Expressão dos NKRs nas sub-populações CD56+ e CD56++ do (a) sangue periférico e da (b) citafereze dos doentes.

a)

	CD16	CD57	CD158a	NKB1	GranzB	CD69	CD94	CD161
CD56+	94 (77-99)	43 (22-69)	20 (3-56)	12 (1-33)	96 (78-99)	6 (1-17)	70 (32-94)	88 (32-91)
CD56++	46 (7-88)	2 (0-7)	10 (1-16)	5 (3-11)	17 (7-51)	4 (0-10)	99 (70-100)	14 (3-42)
p	0,000	0,000	0,001	0,003	0,000	0,019	0,000	0,000

b)

CD56+	95 (87-99)	37 (16-61)	13 (5-23)	12 (0-33)	93 (74-99)	7 (1-19)	66 (32-84)	53 (7-91)
CD56++	38 (21-67)	1 (0-4)	6 (1-19)	5 (1-10)	18 (4-49)	2 (0-6)	97 (81-100)	7 (2-14)
p	0,000	0,000	0,004	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000

Legenda: (■) - antígenos de linhagem NK; (●) – KIRs; (■) - Granzima B; (■) – KLRs; p - valor de p obtido para a comparação entre as células CD56+ e CD56++.

Na Cit dos doentes, 95% das células CD56+ e 38% das células CD56++ foram CD16+ (Quadro 8b). De referir, a diminuição da percentagem de células CD16+ na população CD56++ relativamente à mesma sub-população de células NK no SP (46%). O CD57 e os KIRs, só foram expressos nas células CD56+ (Quadro 8b). A granzima B foi expressa em 93% das células CD56+ e em 18% de células CD56++. Relativamente aos KLRs, nenhuma das sub-populações de células NK exprimiu CD69, enquanto o CD94 esteve presente num maior número de células CD56++ (97%) do que de células CD56+ (66%), tendo-se verificado o oposto para o CD161 (Quadro 8b).

A única diferença significativa que ocorreu nas células CD56++ foi na percentagem de células CD56++CD161+, a qual foi menor na Cit do que no SP, passando este antigénio a não ser expresso (Fig.14a). As células CD56+ da Cit exprimiram menos CD57 e CD161 do que as mesmas células do SP (Fig.14b).

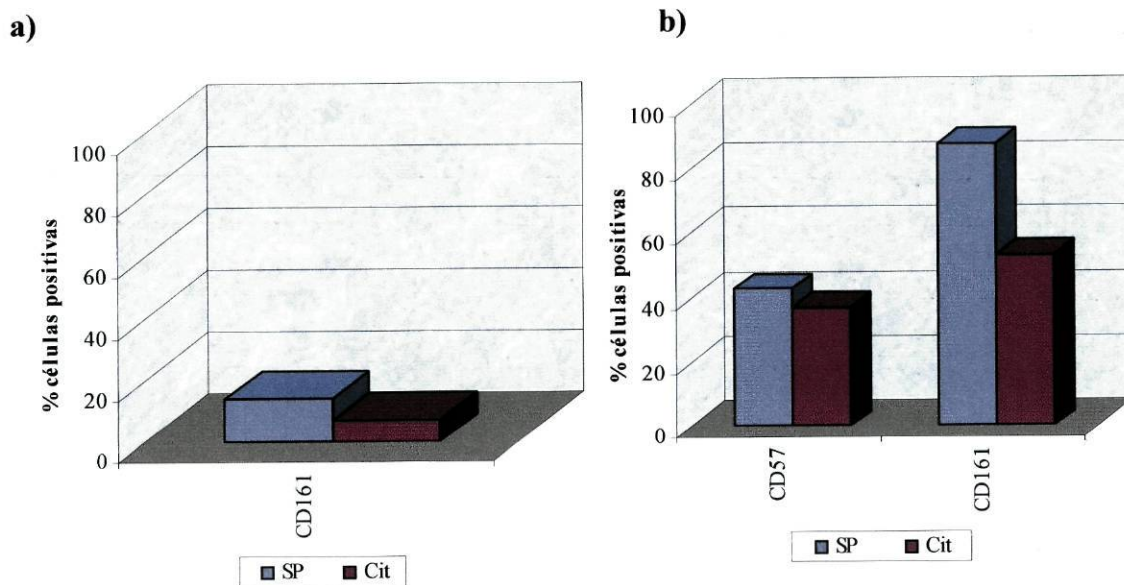


Fig.14 – Diferenças nos padrões de expressão dos NKRs entre as sub-populações (a) CD56++ e (b) CD56+ do sangue periférico e da citaferese dos doentes.

3.2. Expressão das moléculas de adesão, activação e dos receptores de citocinas nas subpopulações de células NK do sangue periférico e da citafereze dos dadores e doentes

No SP dos dadores, o CD2, CD7, CD11a e o CD11c foram expressos pela maioria das células CD56+ e CD56++ (Quadro 9a). O CD2 foi expresso em 80% das células CD56+ e em 93% das células CD56++. O CD7 e o CD11a foram expressos, respectivamente, em 98 e 99% das células CD56+, enquanto nas células CD56++ o CD7 foi expresso em 93% e o CD11a na totalidade das células. O CD11c foi expresso em 69% das células CD56+ e em 92% das células CD56++ (Quadro 9a).

Quadro 9 - Expressão das moléculas de adesão, activação e dos receptores de citocinas nas subpopulações CD56+ e CD56++ do (a) sangue periférico e da (b) citafereze dos dadores.

a)

	CD2	CD7	CD11a	CD11c	CD62L	HLA-DR	CD117	CD25	CD122
CD56+	80 (52-95)	98 (79-100)	99 (91-100)	69 (46-99)	23 (17-40)	10 (0-37)	2 (0-6)	2 (1-6)	96 (91-99)
CD56++	93 (77-96)	93 (77-98)	100 (92-100)	92 (78-99)	86 (71-100)	31 (0-63)	4 (1-8)	6 (3-8)	98 (90-100)
p	0,000	0,002	ns	0,000	0,005	0,001	0,000	0,000	ns

b)

CD56+	77 (54-93)	98 (91-100)	95 (66-100)	73 (53-89)	13 (0-27)	21 (5-42)	2 (0-5)	3 (1-8)	96 (82-98)
CD56++	93 (86-97)	93 (87-98)	100 (94-100)	94 (78-100)	90 (85-96)	30 (12-59)	5 (1-10)	5 (1-14)	97 (91-100)
p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	ns	0,000	0,014	ns

Legenda: (■) - moléculas de adesão e de activação; (■) – receptores de citocinas; p - valor de p obtido para a comparação entre as células CD56+ e CD56++; ns - não significativo.

Uma maior percentagem de células CD56⁺⁺ (86%) do que de células CD56⁺ (23%), exprimiram CD62L. O HLA-DR foi expresso num maior número de células CD56⁺⁺ (31%) do que de células CD56⁺ (10%). Quanto aos receptores de citocinas, o CD122 foi expresso em mais de 96% das células CD56⁺ e CD56⁺⁺, o CD25 e o CD117 não foram expressos nas sub-populações das células NK (Quadro 9a).

Na Cit dos dadores, as duas sub-populações de células NK também exprimiram todas as moléculas de adesão e de activação. Assim, as moléculas CD2, CD7, CD11a e CD11c foram expressas em mais de 73% de células CD56⁺ e em mais de 90% de células CD56⁺⁺ (Quadro 9b). Quanto ao CD62L, foi mais expresso nas células CD56⁺⁺ do que nas CD56⁺, sendo 90% das células CD56⁺⁺CD62L⁺ e 13% das CD56⁺CD62L⁺. O HLA-DR foi expresso em 21% de células CD56⁺ e em 30% de células CD56⁺⁺. Dos receptores de citocinas estudados apenas o CD122 foi expresso na Cit e com uma distribuição semelhante nas duas sub-populações de células NK (Quadro 9b).

Comparando a sub-população CD56⁺⁺ do SP com a da Cit, não se verificou diferenças significativas no padrão de expressão das moléculas de adesão, activação e dos receptores de citocinas. Quanto à sub-população CD56⁺, ocorreram diferenças na expressão das moléculas CD11a, CD62L e HLA-DR. O CD62L foi expresso numa menor percentagem de células CD56⁺ da Cit do que de células CD56⁺ do SP, tendo-se verificado o oposto para o HLA-DR (Fig.15). Apesar da percentagem de células CD56⁺CD11a⁺ ter sido significativamente menor na Cit do que no SP, este antigénio continuou a ser expresso em 95% das células (Fig.15).

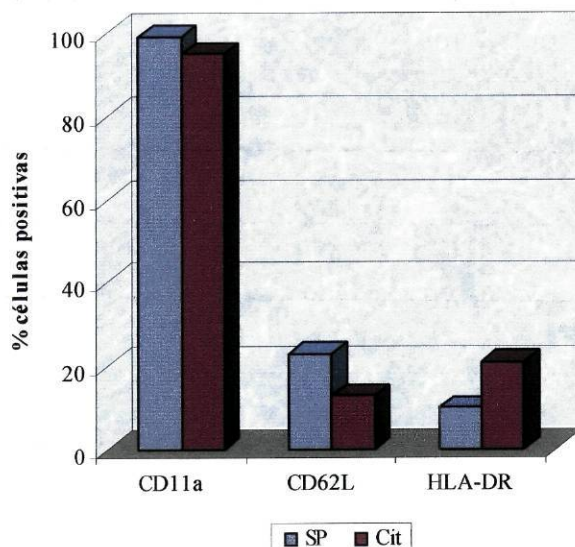


Fig.15 – Diferenças nos padrões de expressão das moléculas de adesão, activação e dos receptores de citocinas na sub-população CD56+ entre o sangue periférico e a cultura dos doadores.

No SP dos doentes, O CD7 foi expresso em 99% das células CD56+ e em 98% das células CD56++, enquanto o CD11a foi expresso na totalidade das células NK. Quanto às moléculas CD2, CD62L, CD11c e HLA-DR, estiveram presentes numa maior percentagem de células CD56++ do que de células CD56+ (Quadro 10a). O CD2 foi expresso em 75% das células CD56+ e em 93% das células CD56++, enquanto o CD62L foi expresso em 18% das células CD56+ e em 93% das células CD56++. A percentagem de expressão do CD11c e do HLA-DR foi, respectivamente, de 77% e 19% nas células CD56+ e de 87% e 36% nas células CD56++. Relativamente aos receptores de citocinas, o CD117 e o CD25 não foram expressos em nenhuma das sub-populações das células NK, enquanto o CD122 foi expresso em 98% das células CD56+ e em 100% das células CD56++ (Quadro 10a).

Quadro 10 – Expressão das moléculas de adesão, activação e dos receptores de citocinas nas sub-populações CD56+ e CD56++ do (a) sangue periférico e da (b) citiferese dos doentes.

a)

	CD2	CD7	CD11a	CD11c	CD62L	HLA-DR	CD117	CD25	CD122
CD56+	75 (52-92)	99 (92-100)	100 (98-100)	77 (53-97)	18 (9-38)	19 (4-39)	2 (1-6)	3 (0-12)	98 (94-100)
CD56++	93 (85-99)	98 (87-100)	100 (93-100)	87 (77-99)	93 (73-99)	36 (13-59)	4 (0-10)	6 (1-29)	100 (95-100)
p	0,001	ns	ns	0,002	0,001	0,004	0,016	0,020	0,015

b)

CD56+	75 (51-91)	99 (95-100)	99 (93-100)	68 (48-79)	14 (0-30)	17 (1-48)	1 (0-7)	3 (1-5)	97 (95-99)
CD56++	93 (84-98)	98 (92-100)	100 (99-100)	90 (32-100)	95 (86-99)	23 (3-70)	3 (1-9)	4 (1-12)	99 (97-100)
p	0,001	ns	0,001	0,004	0,001	ns	ns	0,003	0,001

Legenda: (■) - moléculas de adesão e de activação; (■) – receptores de citocinas; p - valor de p obtido para a comparação entre as células CD56+ e CD56++; ns - não significativo.

Na Cit dos doentes, o CD2 foi expresso em 75% das células CD56+ e em 93% das células CD56++, enquanto o CD7 e o CD11a foram expressos na totalidade das células de ambas as sub-populações NK (Quadro 10b). O CD11c foi expresso em 68% das células CD56+ e em 90% das células CD56++, enquanto o CD62L foi expresso em 14% das células CD56+ e em 95% das células CD56++ (Quadro 10b). Somente 17% das células CD56+ e 23% das células CD56+ exprimiram HLA-DR. Quanto aos receptores de citocinas, o CD117 e o CD25 não foram expressos pelas sub-populações de células NK, embora o CD122 tenha sido expresso na totalidade das células CD56++ e CD56+ (Quadro 10b).

Nos doentes, comparando o fenótipo das duas sub-populações de células NK do SP com o da Cit, as células CD56+ foram a única sub-população que sofreu variações significativas. A percentagem de células CD56+CD62L+ foi menor na Cit do que no SP. Quanto ao CD11a e ao CD11c, a expressão destas duas integrinas foi menor na Cit do que no SP, contudo continuaram a ser expressas pela maioria das células (Fig.16).

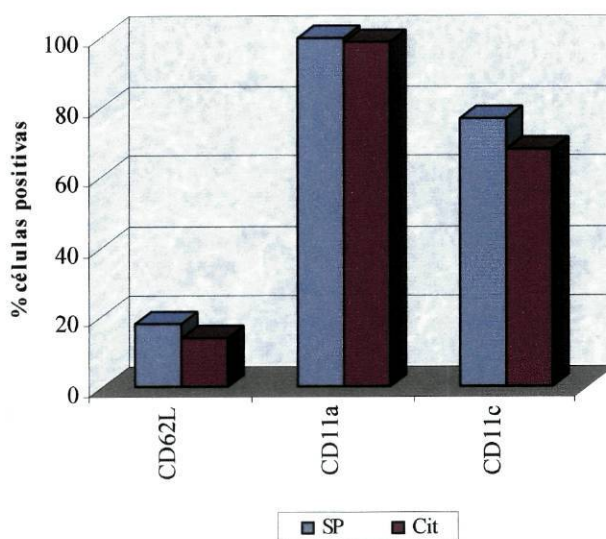


Fig.16 – Diferenças nos padrões de expressão das moléculas de adesão, activação e dos receptores de citocinas na sub-população CD56+ entre o sangue periférico e a citofereze dos doentes.

3.3. Análise comparativa das sub-populações de células NK do sangue periférico e da citofereze dos dadores e dos doentes

Quando comparada a expressão antigénica das células CD56++ do SP dos dadores com a dos doentes, verificaram-se diferenças significativas na expressão do CD16, CD161 e do CD7. O CD16 foi expresso em 46% das células CD56++ dos doentes e em 13% das células CD56++ dos dadores. O CD161 foi expresso em 58% de

58% de células CD56++ dos dadores, enquanto nos doentes esteve presente em apenas 14% das células CD56++. Os doentes apresentaram uma maior percentagem de células CD56++CD7+ relativamente aos dadores, contudo o CD7 foi expresso em mais de 90% das células CD56++ de ambos os grupos (Fig. 17a).

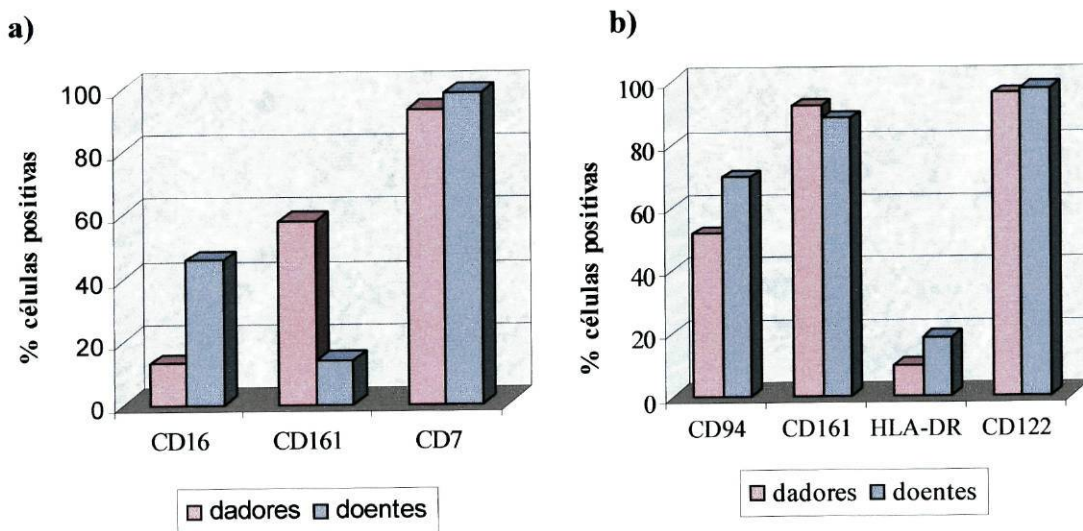


Fig.17 – Diferenças fenotípicas entre as células (a) CD56++ e (b) CD56+ do sangue periférico dos dadores e dos doentes.

Relativamente à sub-população CD56+ do SP, as principais diferenças significativas observadas foram na expressão do CD94, CD161, HLA-DR e do CD122 (Fig.17b). Os doentes, possuíam um maior número de células CD56+ a exprimirem CD94 (70%), do que os dadores (52%). A percentagem de células CD56+CD161+ foi maior nos dadores do que nos doentes, tendo-se verificado o oposto para o CD122, contudo em ambos os grupos este antigénio foi expresso em mais de 90% das células NK CD56+. Quanto ao HLA-DR, foi apenas expresso em 10% das células CD56+ dos dadores e em 19% das células CD56+ dos doentes (Fig. 17b).

Na sub-população CD56++ da Cit, verificaram-se diferenças com significado estatístico na expressão do CD16, CD161, CD7, CD62L e do CD122 (Fig.18a). Enquanto nos doadores, 28% das células CD56++ exprimiram CD16, nos doentes a expressão deste antígeno foi superior (38%). Nos doadores, 29% das células CD56++ exprimiram CD161, enquanto as células CD56++ dos doentes não exprimiram este antígeno. As células CD56++, dos doadores exprimiram menos CD7 e menos CD62L do que as células CD56++ dos doentes. Na Cit dos doentes, observou-se uma maior percentagem de células CD56++CD122+ comparativamente aos doadores (Fig.18a). Apesar das diferenças observadas na expressão de CD7, CD62L e de CD122, entre doadores e doentes, todos estes antígenos foram expressos em mais de 90% das células CD56++.

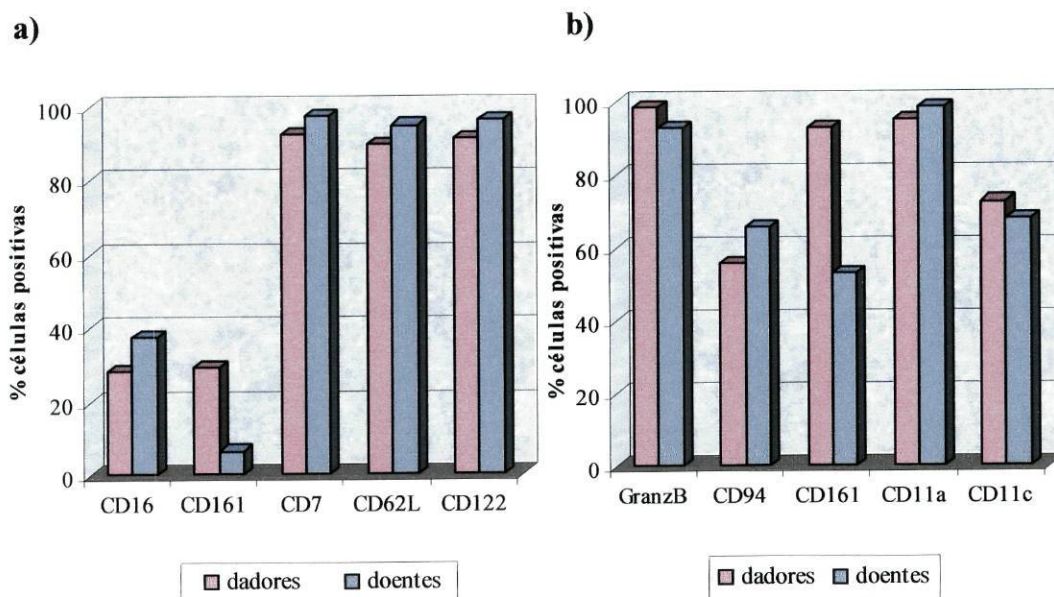


Fig.18 - Diferenças fenóticas entre as células (a) CD56++ e (b) CD56+ da citofereze dos doadores e dos doentes.

Na Cit, ocorreram diferenças significativas na expressão do CD94, sendo este antígeno mais expresso nas células CD56+ dos doentes, do que nas células CD56+ dos dadores. Assim, nos dadores, 56% das células CD56+ foram CD94+, enquanto nos doentes 66% das células CD56+ foram CD94+ (Fig.18b). Também ocorreram diferenças estatisticamente significativas na expressão de CD161, os doentes apresentaram uma menor percentagem de células CD56+CD161+, do que os dadores. Quanto à granzima B e ao CD11c, as células CD56+ dos dadores exprimiram mais estes antígenos do que as células CD56+ dos doentes, tendo-se verificado o oposto para o CD11a (Fig.18b). Apesar das diferenças de expressão da granzima B, CD11c e do CD11a, entre dadores e doentes, terem dado significativas, estes antígenos foram expressos em mais de 90% das células CD56+.

4. Quantificação das células mononucleares produtoras de IFN- γ e IL-4

Em todos os ensaios utilizaram-se três concentrações (5×10^5 , 5×10^4 e 5×10^3 /poço) de células mononucleares estimuladas e células não estimuladas que serviram de controlo. Os resultados apresentados correspondem à média dos triplicados efectuados para cada concentração e foram expressos em número de células secretoras de citocinas por 1×10^6 e 1×10^5 células mononucleares. Na maioria dos dadores e em três doentes, não foi possível testar a concentração máxima de células mononucleares (1×10^6), dado o número de células da amostra ter sido insuficiente.

Nos dadores e nos doentes, o número de células produtoras de IFN- γ do SP e da Cit foi idêntico (Quadro 11a e Quadro 12a). No dador D e no doente I, verificou-se que as células sem estímulo produziram uma maior quantidade de IFN- γ do que as células estimuladas (Quadro 11a e Quadro 12a). A Fig.19 ilustra o plano geral de produção de IFN- γ pelas células mononucleares do SP e da Cit, não se tendo verificado grandes alterações no número de células produtoras desta citocina.

Quadro 11 – Número de células secretoras de (a) IFN- γ e (b) IL-4 por 10^5 e 10^6 células mononucleares do sangue periférico e da citiferese dos dadores.

a)

Dadores		Sem Estímulo	1×10^6	1×10^5
A	SP	8	---	3
	Cit	4	---	2
B	SP	4	---	5
	Cit	4	---	3
C	SP	4	---	2
	Cit	4	4	4
D	SP	2	2	2
	Cit	166	126	2
E	SP	6	---	2
	Cit	6	4	6

b)

Sem Estímulo	1×10^6	1×10^5
4	---	2
6	---	5
2	---	3
2	---	1
2	2	4
2	250	8
2	---	3
4	4	4
2	---	3
4	8	2

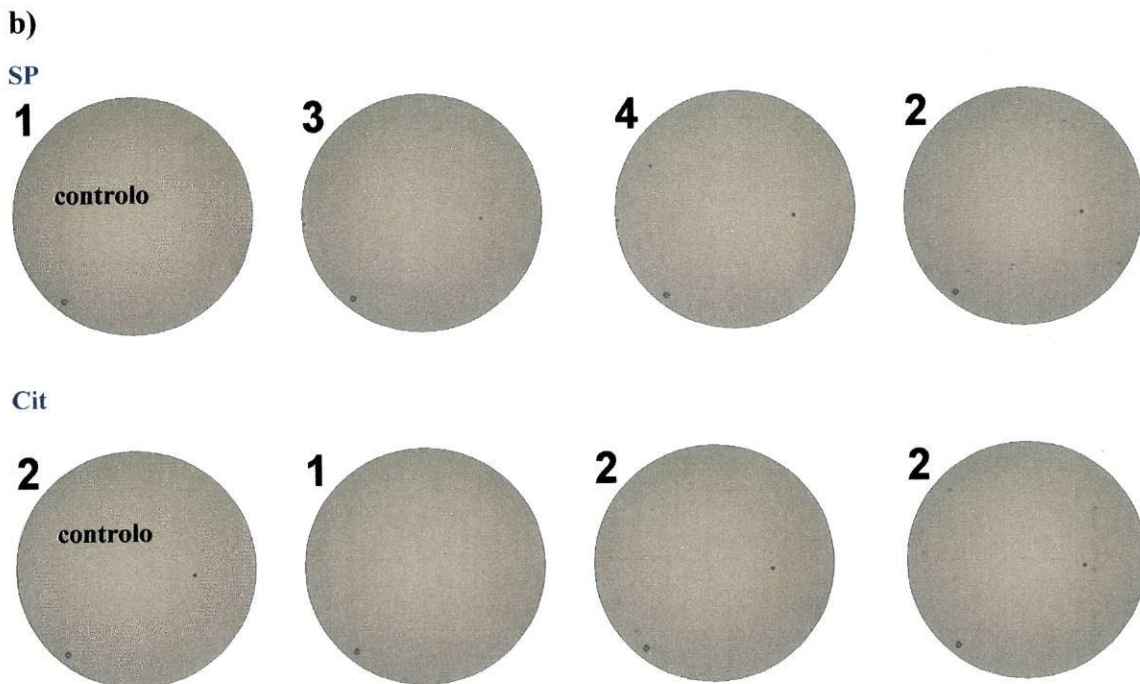
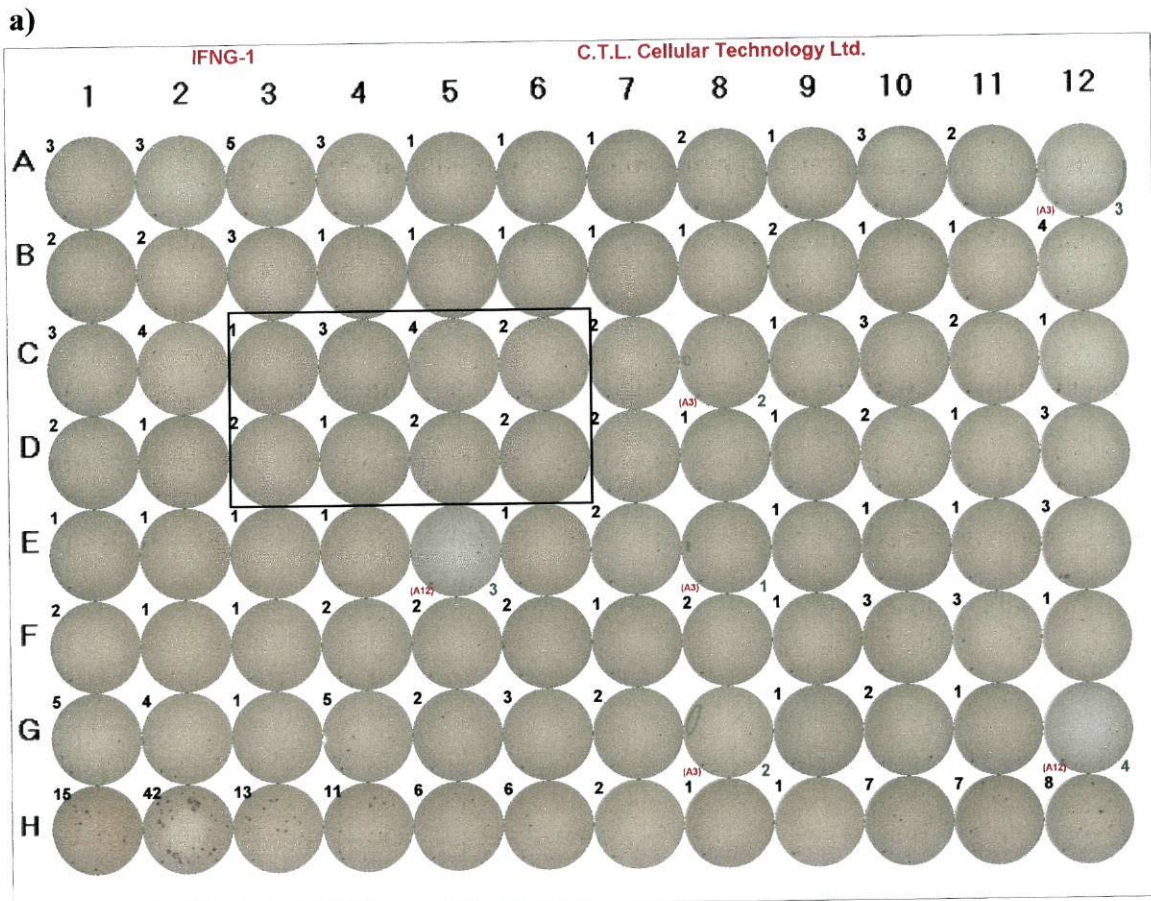


Fig.19 – Produção de IFN- γ pelas células mononucleares do SP e da Cit; a) plano geral da placa; b) exemplo de um par SP/Cit com o número de *spots*/ 5×10^5 células mononucleares.

Em todos os dadores, excepto o B, o número de células produtoras de IL-4 foi superior na Cit, do que no SP (Quadro 11b). O dador C foi o que apresentou uma maior produção de IL-4 pelas células mononucleares da Cit do que as do SP, tendo aumentado de 2 no SP para 250/10⁶ células mononucleares na Cit (Quadro 11b e Fig.20).

Nos doentes F, I e K observou-se um aumento da produção de IL-4 pelas células mononucleares da Cit, relativamente ao SP, embora nos doentes I e K, não tenha sido possível testar as células mononucleares do SP à mesma concentração das células mononucleares da Cit (Quadro 11b, Fig.21 e Fig.22).

Quadro 12 – Número de células secretoras de (a) IFN- γ e (b) IL-4 por 10⁵ e 10⁶ células mononucleares do sangue periférico e da citafereze dos doentes.

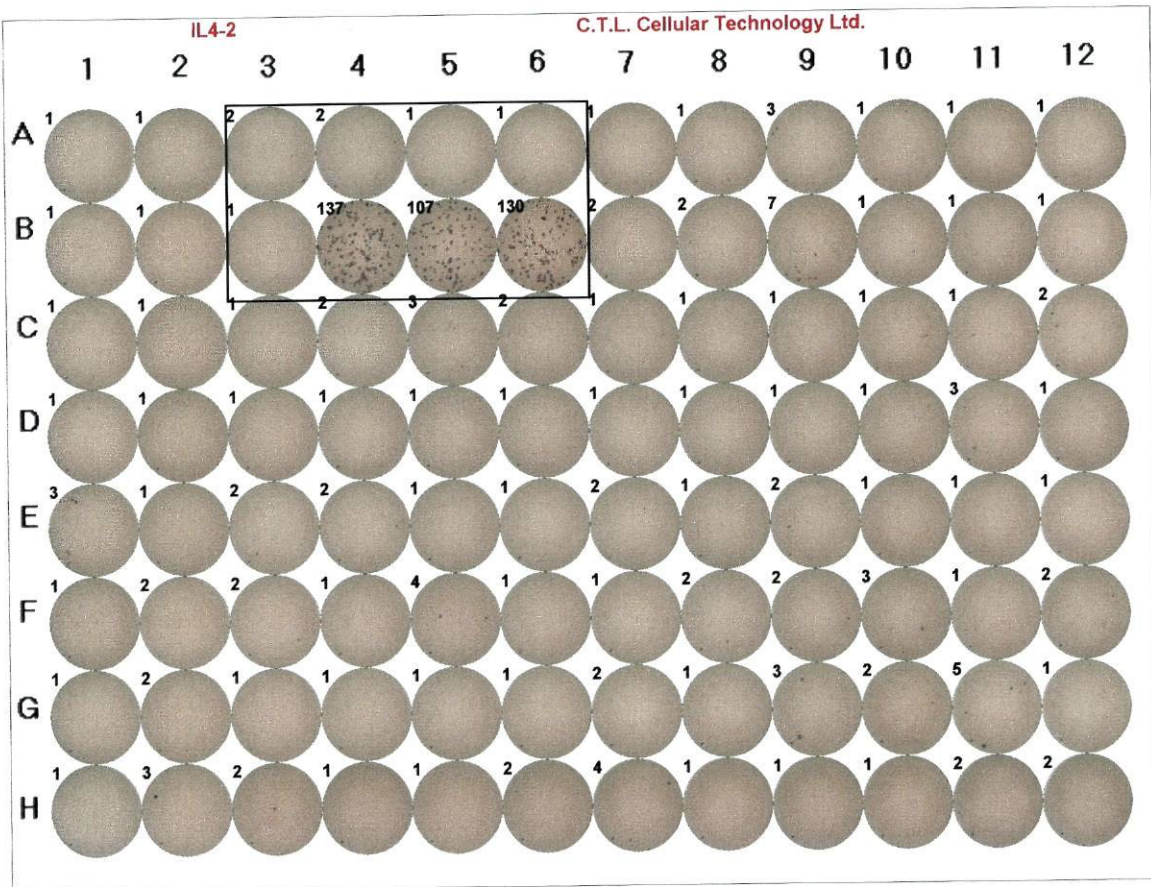
a)

Doentes		Sem Estímulo	1x10 ⁶	1x10 ⁵
F	SP	2	2	2
	Cit	4	4	4
G	SP	4	2	2
	Cit	2	2	2
H	SP	2	2	2
	Cit	2	2	2
I	SP	6	---	5
	Cit	46	16	2
J	SP	6	---	2
	Cit	4	4	4
K	SP	4	---	3
	Cit	16	16	4

b)

Sem Estímulo	1x10 ⁶	1x10 ⁵
2	2	2
2	22	2
2	6	2
2	2	2
2	2	2
4	4	4
4	---	1
4	80	2
2	---	3
6	6	2
2	---	5
2	108	2

a)



b)

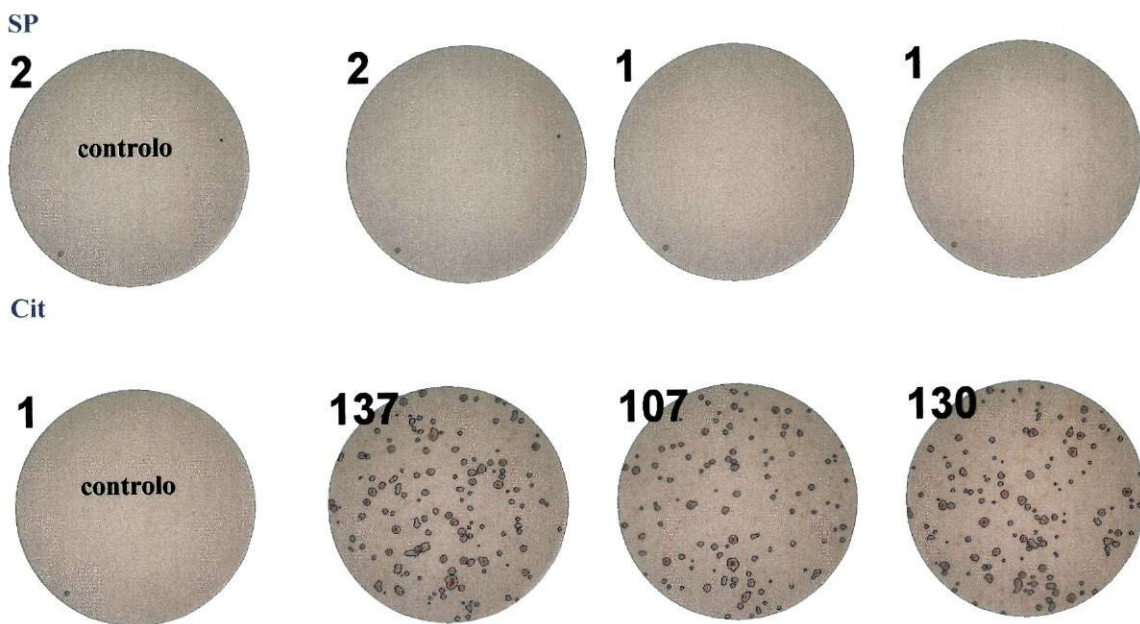
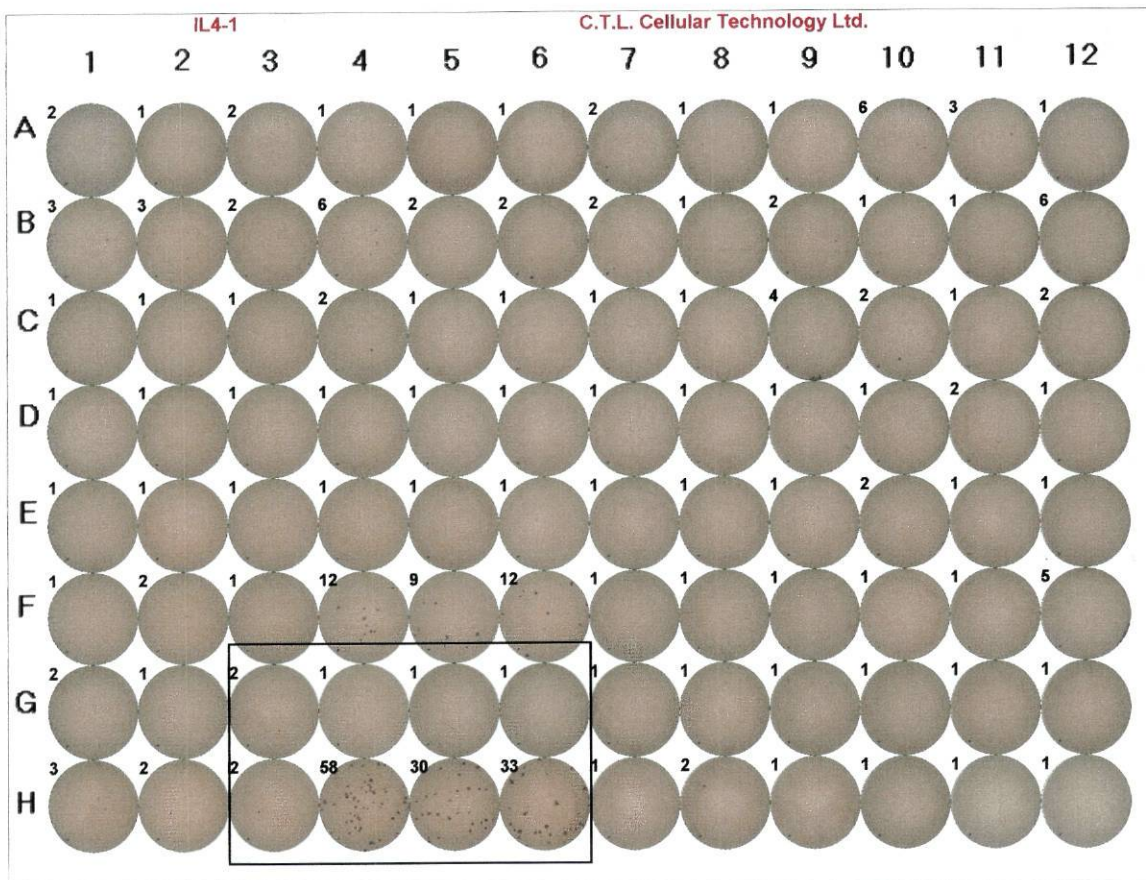


Fig.20 - Produção de IL-4 pelas células mononucleares do SP e da Cit; a) plano geral da placa; b) exemplo de um par SP/Cit com o número de spots/ 5×10^5 células mononucleares.

a)



b)

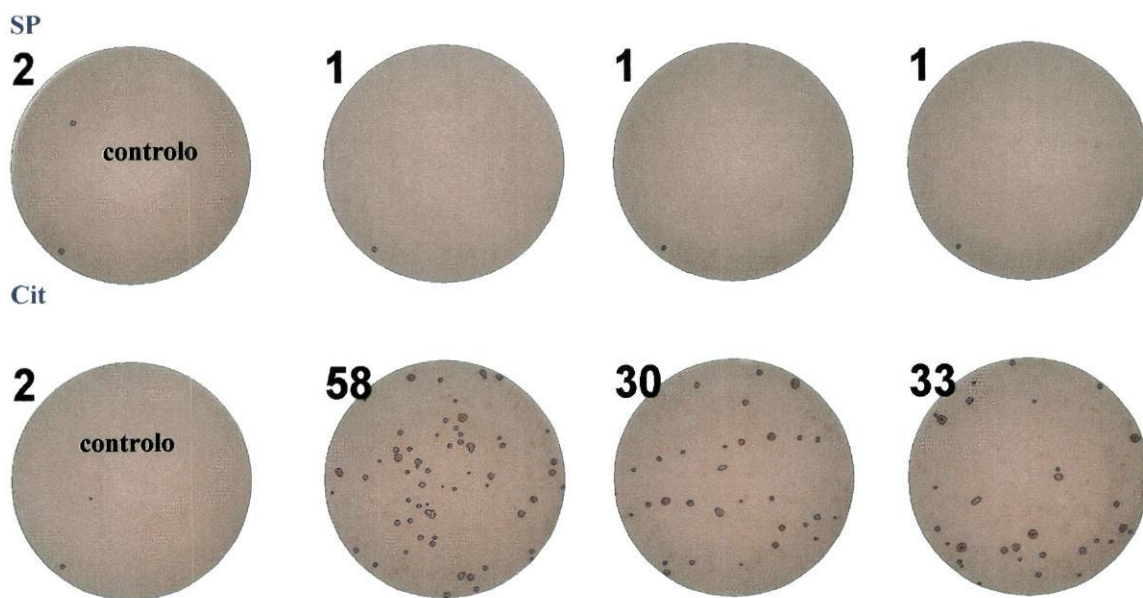


Fig.21 - Produção de IL-4 pelas células mononucleares do SP e da Cit; a) plano geral da placa; b) exemplo de um par SP/Cit com o número de *spots*/ 5×10^5 células mononucleares.

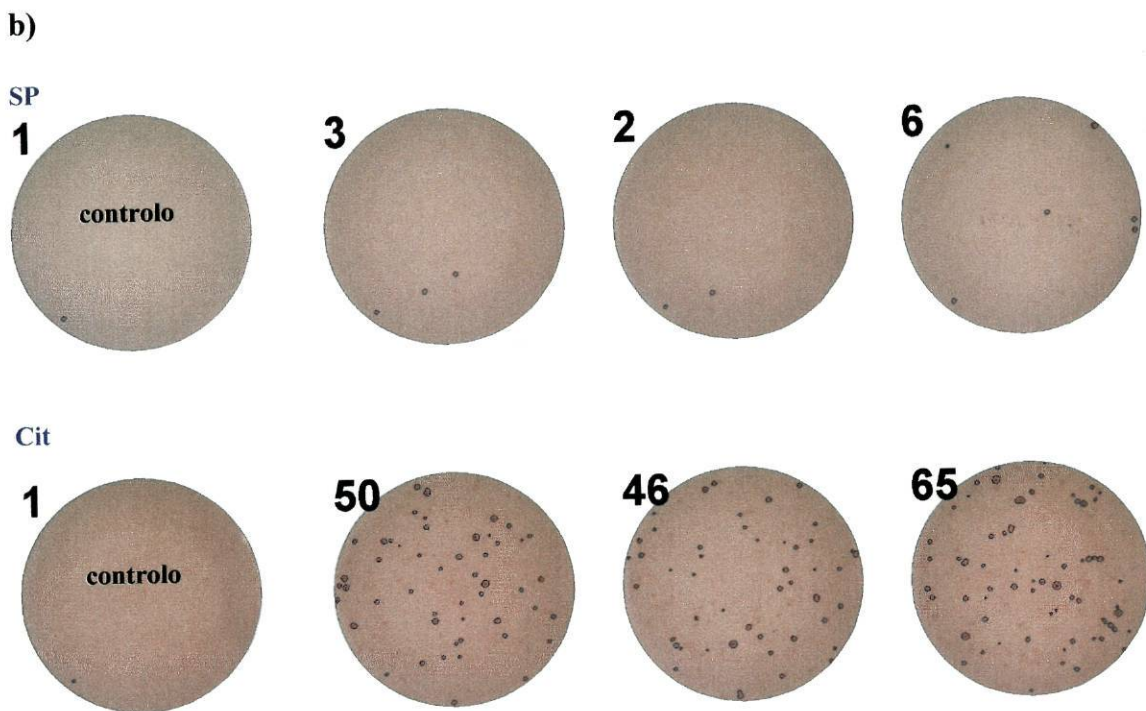
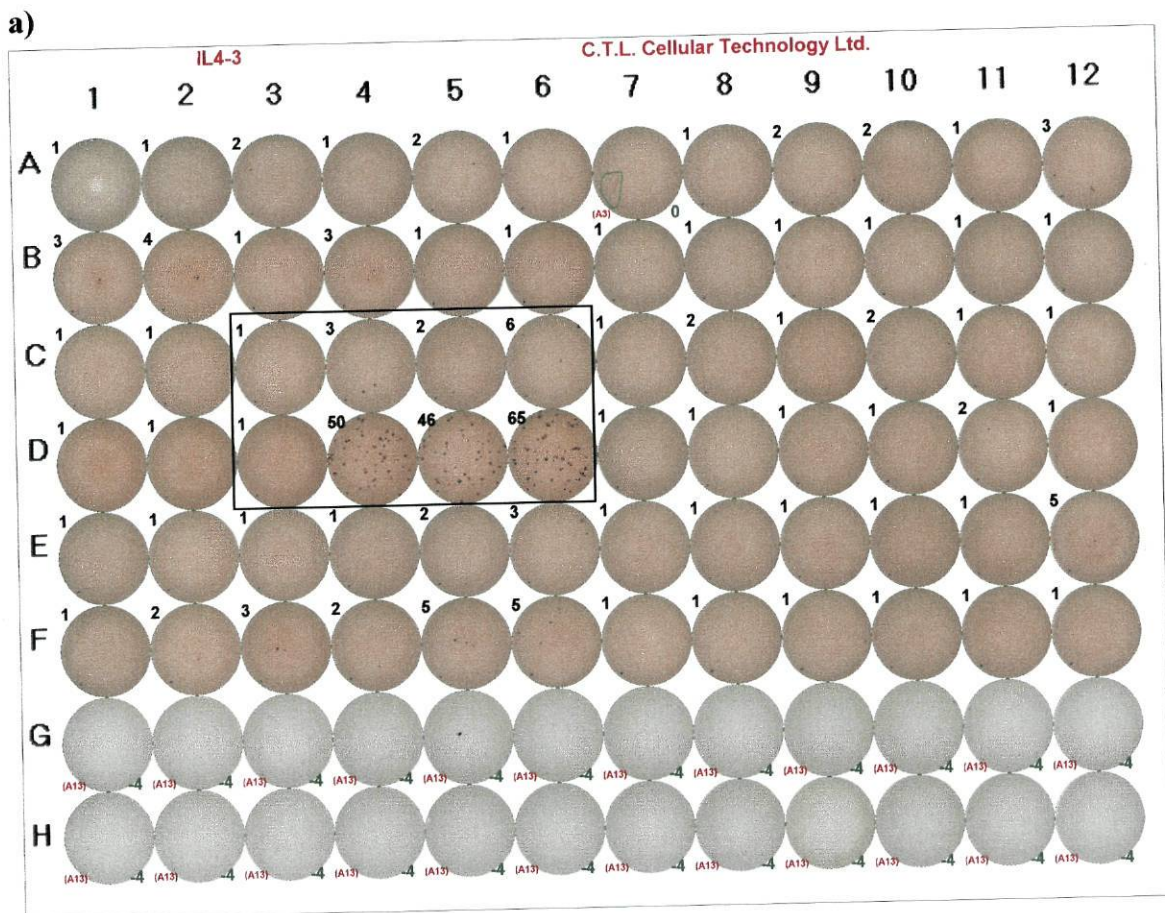


Fig.22 - Produção de IL-4 pelas células mononucleares do SP e da Cit; a) plano geral da placa; b) exemplo de um par SP/Cit com o número de *spots*/5x10⁵ células mononucleares.

DISCUSSÃO

1. Actualidade e importância do trabalho

Nos últimos anos, vários estudos demonstraram que as CPSP diferem qualitativamente das CPH da medula óssea, uma vez que possuem um ciclo celular diferente, bem como alterações no padrão de expressão antigénica, tais como a diminuição da expressão de moléculas de adesão.¹¹² Parte destas alterações são induzidas pelo G-CSF, citocina utilizada na mobilização das CPH da medula óssea para o SP.¹¹² A avaliação do efeito desta citocina nos outros componentes celulares do enxerto, nomeadamente nos linfócitos e nas células NK é de extrema importância. Vários estudos realizados sobre o efeito do G-CSF nos linfócitos e nas células NK documentam a supressão da actividade destas células após a mobilização.⁹⁸⁻¹⁰¹

Neste trabalho, procedeu-se à avaliação do efeito do G-CSF no fenótipo dos linfócitos e das células NK, bem como nas células mononucleares produtoras de IFN- γ e IL-4 presentes nos enxertos de CPSP.

2. Fenótipo das populações linfocitárias e das células NK do sangue periférico e da citafereze

Inicialmente avaliamos as populações linfocitárias do sangue periférico dos dadores e dos doentes e procedemos à sua comparação. Pudemos constatar que os dois grupos apresentaram percentagens semelhantes das populações linfocitárias, linfócitos T e células NK e respectivas sub-populações, e que essas percentagens são semelhantes às descritas na literatura.¹¹³ Contudo, verificou-se uma diferença na percentagem de linfócitos CD8+, a qual foi significativamente maior nos doentes do que nos dadores. No SP a razão CD4/CD8 obtida nos dadores foi aproximadamente 2, enquanto nos doentes foi inferior, tendo-se obtido um valor de 1,2. Os nossos resultados são idênticos aos descritos por vários autores.^{1,80,84}

Nos dadores, a percentagem de linfócitos CD45RO+, CD45RA+ e de CD62L+ do SP, obtidas no nosso trabalho estão de acordo com os descritos na literatura. Tayebi H et al¹⁰³ verificou que 40% dos linfócitos T exprimiram CD45RO e 54% exprimiram CD45RA. No nosso estudo, 33% e 25% dos linfócitos T do SP dos doentes, exprimiram CD45RO e CD45RA, estes valores diferiram dos resultados do Mills KC et al¹¹⁴, o qual constatou que 25% dos linfócitos T eram CD45RO+ e 35% dos linfócitos T eram CD45RA+. A expressão de CD62L, em ambos os grupos estudados, foi semelhante à descrita por Sugimori et al, o qual obteve 68% de linfócitos CD62L+.¹¹⁵ No SP dos dadores e dos doentes, as populações linfocitárias não exprimiram CD80, CD86, CD152 e CD122, estando os nossos resultados de acordo com os descritos por Rondelli et al³, os quais também não observaram a expressão destes antigénios.

Nos linfócitos do SP, observaram-se diferenças, entre os dadores e os doentes, na expressão de CD45RA e de CD150. Os dadores possuíam uma maior percentagem

de linfócitos CD45RA⁺ e de CD4⁺CD45RA⁺ do que os doentes. No caso do CD150 verificou-se que os doentes possuíam uma maior percentagem de linfócitos CD150⁺ do que os dadores. Na expressão dos restantes antigénios estudados, não se verificou nenhuma diferença significativa.

As células NK são usualmente divididas em duas sub-populações caracterizadas pela distinta intensidade de expressão do antigénio CD56. Assim, no SP dos dadores, 95% das células NK demonstraram ser CD56⁺, enquanto 5% foram definidas como CD56⁺⁺, sendo estes valores semelhantes aos descritos na literatura.^{5,18} Nos doentes, as sub-populações CD56⁺ e CD56⁺⁺ constituíram, respectivamente, 90% e 10% das células NK. Da comparação dos dois grupos verificou-se que os dadores possuem uma maior percentagem de células CD56⁺ do que os doentes, enquanto a percentagem de células CD56⁺⁺ foi maior nos doentes do que nos dadores.

Tal como descrito por Cooper *et al*²⁰ e Lima *et al*¹¹⁶ e observado no nosso estudo, as duas sub-populações de células NK são fenotipicamente distintas, tendo apresentado diferentes padrões de expressão antigénica. Assim, observou-se que todos os NKRs, com excepção do CD94 foram expressos numa percentagem muito maior de células CD56⁺ do que de células CD56⁺⁺. As células CD56⁺ exprimiram mais CD16 do que as células CD56⁺⁺, este antigénio pela sua ligação à IgG, tem um papel importante na activação da ADCC.^{17,18,117} Nas células CD56⁺, a elevada expressão de CD16 pode estar associada a uma maior actividade citotóxica, comparativamente às células CD56⁺⁺. O facto do CD57, um oligossacárido possivelmente envolvido na adesão celular, ser expresso apenas nas células CD56⁺ não tem ainda uma explicação clara na literatura.⁶² De um modo geral, a maior expressão de KIRs e KLRs nas células CD56⁺ relativamente às células CD56⁺⁺ confirma a maior capacidade citotóxica

natural da sub-população CD56+. A elevada percentagem de células CD56++CD94+ sugere a existência de capacidade citotóxica nestas células, mas com padrões de actividade diferentes, nomeadamente com uma maior especificidade para se ligar a HLA-E expresso nas células alvo.^{9,15,100} Além disso trata-se de um marcador típico de células imaturas o que pode ser indicativo da natureza das células CD56+.^{9,17} Os KIRs e os KLRs são marcadores importantes na medida em que o balanço entre os sinais de activação e de inibição fornecidos pelos seus ligandos medeiam os fenómenos de citotoxicidade.^{9,17,65} A granzima B foi expressa na quase totalidade das células CD56+ e em 17% das células CD56++. Este facto vem reforçar a ideia de que as células CD56+ são mais citotóxicas do que as células CD56++, já que se trata de uma enzima existente dentro dos grânulos das células NK e que são libertados quando estas exercem a sua acção efectora sobre as células alvo.¹¹⁸

A maioria das sub-populações de células NK exprimiu CD2, CD7 e as integrinas β 2, CD11a e CD11c. No caso do CD7 e do CD11c, observamos, tal como Lima et al¹¹⁶, 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+, sendo estas diferenças estatisticamente significativas no nosso grupo de doadores. Tendo em conta a acção citotóxica das células NK contra células tumorais, estas moléculas parecem ajudar nessa função, tendo um papel importante na adesão das células NK às células alvo.^{9,17} As células NK dos dois grupos, exprimiram CD62L, contudo este antigénio foi mais expresso nas células CD56++ do que nas células CD56+. Estes resultados são idênticos aos descritos por Frey M et al⁴⁵, que obtiveram 95% das células CD56++CD62L+ e 24% das células CD56+CD62L+.

Relativamente aos receptores de citocinas verificou-se que todas as células CD56+ e CD56++ exprimem o receptor de IL-2 de afinidade intermédia (CD122).

Nenhuma sub-população de células NK exprimiu CD25, contradizendo o que está descrito na bibliografia que indica que as células CD56⁺⁺ são as únicas células que exprimem constitutivamente este receptor.¹⁹ Segundo estes autores, a presença deste receptor nas células CD56⁺⁺ induz uma elevada resposta proliferativa a baixas doses de IL-2, representando células NK pouco diferenciadas. Segundo Carson WE et al¹⁹ as células CD56⁺⁺ exprimem constitutivamente o receptor *c-kit* (CD117), que potencia o sinal proliferativo resultante da ligação de IL-2 ao IL-2R de elevada afinidade. Contudo no nosso estudo este receptor não foi expresso nas células CD56⁺⁺ dos grupos estudados.

No nosso trabalho, os doentes apresentaram uma maior percentagem de células CD56⁺⁺CD16⁺ e uma menor percentagem de células CD56⁺⁺CD161⁺, relativamente aos dadores. Dado que a expressão de CD16 está relacionada com a maturação das células NK, este marcador de linhagem NK é normalmente pouco expresso nas células CD56⁺⁺. Este aumento pode então indicar que, nos doentes, as células CD56⁺⁺ se encontram numa fase de maior diferenciação relativamente aos dadores. A baixa percentagem de células CD56⁺⁺CD161⁺ pode estar associada com a reduzida actividade citotóxica desta sub-população de células NK.¹¹⁹

Na sub-população CD56⁺ do SP, as diferenças que ocorreram entre dadores e doentes, foram uma maior expressão de CD94 e HLA-DR nas células CD56⁺ dos doentes.

Na Cit, verificamos algumas diferenças, quando comparamos a expressão antigénica dos linfócitos dos dadores com a dos doentes. Os doentes, tal como no SP, possuem uma maior percentagem de linfócitos CD8⁺ do que os dadores. A expressão de CD45RO diminuiu nos dadores, não se tendo verificado qualquer alteração na expressão deste antígeno nos doentes. A expressão da molécula de adesão, CD62L, nos

linfócitos diminuiu em ambos os grupos, contudo esta diminuição foi mais acentuada nos dadores do que nos doentes. A percentagem de linfócitos CD150+ e de CD3+CD150+ foi maior nos doentes do que nos dadores.

Da comparação da sub-população NK CD56++ das CPSP dos dadores e dos doentes, verificou-se que haviam diferenças significativas entre os dois grupos. Tanto as células CD56++ como as células CD56+ dos dadores exprimiram mais CD161 do que as células CD56++ e CD56+ dos doentes. Para além desta diferença, verificou-se que as células CD56++ dos doentes exprimiram mais CD16 do que as células CD56++ dos dadores. Mais de 90% das células CD56++ dos dadores e dos doentes exprimiram CD7, CD62L e CD122, embora se tenha observado diferenças significativas. A mesma comparação nas células CD56+ revelou que os doentes exprimiram mais CD94 e CD11a e menos granzima B e CD11c, relativamente à mesma sub-população nos dadores. As alterações que ocorreram na expressão de granzima B, CD11a e CD122, apesar de significativas, foram pouco relevantes uma vez que estes antigénios continuaram a ser expressos em mais de 90% das células CD56+.

3. Quantificação das células mononucleares produtoras de IFN- γ e IL-4

Nos dois grupos estudados, as células mononucleares do SP produziram pouco IFN- γ , não se tendo observado qualquer variação na produção desta citocina pelas células mononucleares após a administração do G-CSF. Quanto à IL-4, as células mononucleares da Cit produziram mais IL-4 do que as do SP. Este aumento foi superior nos quatro doentes com MM, aos quais foi administrada uma dose de 16 μ g/Kg/dia de G-CSF, pelo facto dos doentes com este diagnóstico serem considerados maus mobilizadores. Os nossos resultados estão de acordo com os de vários autores, os quais não observaram qualquer variação na produção de IFN- γ e verificaram um aumento da produção de IL-4. Reyes et al⁹⁸, não observou diferenças na produção de IFN- γ pelas células mononucleares estimuladas, antes e após a administração de G-CSF. Verificou ainda uma diminuição da resposta das células mononucleares do SP a mitogénios após a primeira injeção de G-CSF, continuando a diminuir até ao quarto dia de mobilização, tendo revertido no fim do tratamento.⁹⁸ No entanto, Sloand et al¹⁰⁵ e mais recentemente Franzke et al¹²⁰, observaram uma diminuição da produção de IFN- γ e um aumento da produção de IL-4 pelas células mononucleares estimuladas com PHA, resultando numa diminuição da razão TH1/TH2. De acordo com o modelo de Ferrara, o G-CSF reduz a aloreactividade através do aumento da produção de IL-4 e da inibição da secreção de IFN- γ , tendo proposto que a diminuição da produção de IFN- γ se deve ao aumento do número de células não produtoras desta citocina.¹⁰³

As células mediadoras da resposta do tipo 1 (produtoras de IFN- γ) parecem modular a doença de enxerto contra hospedeiro aguda, visto o IFN- γ ser a citocina marcadora destas células e responsável pela demorada recuperação hematopoiética. Em contraste, as células mediadoras da resposta do tipo 2 parecem ser favoráveis à doença

de enxerto contra hospedeiro aguda, visto estas células segregarem IL-4, citocina responsável pela inibição da produção de outras citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ) e pela tolerância imunológica.¹⁰³

CONCLUSÕES

1. Avaliação global do efeito do G-CSF nas populações linfocitárias e nas células NK dos dadores e dos doentes

O estudo comparativo do fenótipo dos linfócitos e das células NK do SP e da Cit permitiu-nos avaliar o possível efeito do G-CSF utilizado na mobilização das CPH da medula óssea para o SP.

Na Cit, a percentagem das populações linfocitárias dos dois grupos estudados, foi idêntica à do SP, sendo os linfócitos T a população predominante. O nosso estudo está de acordo com Joshi et al² que demonstrou que o G-CSF não provocava variações significativas nas percentagens de linfócitos T e de células NK. Nos grupos estudados, não se verificaram alterações na percentagem das sub-populações linfocitárias (CD4+ e CD8+) e das células NK (CD56++ e CD56+), após mobilização com G-CSF. Weaver et al¹⁰⁴ e de Reyes et al⁹⁸, observaram que o G-CSF não induz variações significativas na percentagem de linfócitos CD4+ e de linfócitos CD8+ quer nos dadores quer nos doentes, o que está de acordo com os nossos resultados. Dos resultados obtidos, pode-se concluir que a mobilização com G-CSF não alterou a percentagem das sub-populações leucocitárias. Contudo, toda as concentrações das sub-populações leucocitárias da Cit aumentaram significativamente em relação ao SP, chegando a haver aumentos superiores a 100 vezes. O G-CSF contribuiu para a mobilização deste elevado número de leucócitos para a periferia. Os nossos resultados estão de acordo com outros estudos, que sugerem que o G-CSF induz aumento do número de leucócitos^{104,106} e de linfócitos.⁹⁸ Porém este aumento foi mais acentuado do que o obtido noutros estudos.^{103,104}

Nos linfócitos e nas células CD56+ dos dois grupos estudados, a mobilização com G-CSF provocou uma diminuição da expressão de CD62L, tendo sido esta

diminuição mais acentuada nos dadores do que nos doentes (resultados a apresentar no American Society Haematology Meeting em Dezembro de 2003 – Anexo I).¹²¹ As alterações na expressão do CD62L poderão estar associada com uma maior ou menor mobilização das células da medula óssea para o SP. Os doentes maus mobilizadores, possuíam uma menor percentagem de células CD62L- relativamente ao bons mobilizadores. No SP dos dadores, 60% dos linfócitos foram CD62L+ tendo diminuído para 6% ao quinto dia de mobilização, enquanto nos doentes 55% dos linfócitos foram CD62L+, tendo diminuído para 18% após a mobilização. Tanto nos dadores como nos doentes, o efeito do G-CSF não se fez sentir na outra molécula de adesão, o CD11a, sendo este antigénio expresso na totalidade dos linfócitos. Sugimori et al¹¹⁵, também observaram que no SP, 68% dos linfócitos são CD62L+ diminuindo significativamente para 17% ao quarto dia de mobilização com G-CSF.¹¹⁵ A diminuição da percentagem de linfócitos CD62L+, verificada no nosso estudo foi mais acentuada, passando este antigénio a não ser expresso nas populações linfocitárias da Cit. Esta diferença pode estar associada ao facto de Sugimori et al¹¹⁵ ter colhido as CPSP ao quarto dia de mobilização e no nosso trabalho termos colhido ao quinto dia. Segundo Sugimori et al a diminuição do número de células CD62L+ não se deve provavelmente à supressão da expressão do gene do CD62L, já que os linfócitos T CD62L- após mobilização recuperaram o elevado nível de expressão de L-selectina na superfície celular.¹¹⁵ A diminuição do CD62L deve ser causada pela modulação deste antigénio durante o tratamento com G-CSF. Esta citocina, como já foi previamente demonstrado, também induz a modulação de L-selectina nos neutrófilos e monócitos.^{47,115}

Como já foi referido anteriormente, em ambos os grupos, o G-CSF provocou uma diminuição na percentagem de células NK CD56+CD62L+. A percentagem de células CD56++CD62L+, não sofreu qualquer alteração significativa com a

mobilização. Nas células CD56⁺⁺, o CD62L parece não ser regulado ou apresentar um diferente tempo de resposta ao G-CSF, comparativamente às células CD56⁺.^{118,122} Dos resultados obtidos pode-se concluir que a L-selectina é modulada e que, independentemente da expressão de CD62L, ambas as sub-populações de células NK migram para o SP em resposta ao G-CSF. Nos dadores e nos doentes, as células CD56⁺ da Cit exprimiram menos CD11a e CD11c do que estas células do SP. Apesar destas diminuições serem significativas, estes antígenos foram expressos na maioria das células (>90%).

Nas populações linfocitárias, o outro efeito relevante do G-CSF foi no padrão de expressão do CD45RO e do CD45RA. Nos dadores, o G-CSF provocou uma diminuição da expressão de CD45RO e CD45RA em todas as populações linfocitárias, enquanto nos doentes apenas observamos uma diminuição na expressão de CD45RA nos linfócitos. Os nossos resultados estão de acordo com os do Rutella et al⁸⁰, os quais observaram uma diminuição da expressão de CD45RO e de CD45RA nos linfócitos dos dadores. No entanto, Tayebi et al¹⁰³ verificou que a administração de G-CSF aumentou a percentagem de linfócitos CD45RA⁺ e que a percentagem de linfócitos CD45RO⁺ diminuiu, embora não significativamente. Este autor sugere que o G-CSF tende a reduzir a activação dos linfócitos das CPSP.¹⁰³ Reyes et al⁹⁸ constatou que 24 horas após a quarta dose de G-CSF houve uma redução significativa na percentagem de linfócitos T naive CD4⁺CD45RA⁺ associada com o concomitante aumento dos linfócitos T de memória CD4⁺CD45RO⁺ quando comparado com os valores do pré-tratamento.⁹⁸ Esta variação na expressão das isoformas CD45RA/RO pelos linfócitos CD4⁺ reverteu catorze dias após a quinta dose de G-CSF, o que levou a concluir que o G-CSF provoca uma diminuição reversível na activação dos linfócitos T.⁹⁸ Tal como já foi referido anteriormente, nos nossos resultados observou-se, em todas as sub-

populações linfocitárias, uma diminuição da percentagem de linfócitos CD45RA+ nos dadores e doentes, e uma diminuição da percentagem de linfócitos CD45RO+ apenas nos dadores. Este resultado pode estar relacionado com a diminuição da activação dos linfócitos T induzida pelo G-CSF. Uma vez que o CD45RO é expresso pelos linfócitos T de memória e activados, é natural que se observe uma diminuição da percentagem de linfócitos CD45RO+, embora esta redução deva estar associada ao aumento da percentagem de linfócitos CD45RA+, o que não ocorreu neste estudo.

Nos dadores, a expressão de CD28 nos linfócitos, linfócitos T e linfócitos CD8+, aumentou após a administração do G-CSF, sendo expresso em mais de metade dos linfócitos. Os nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Rondelli et al³, que obtiveram 61% dos linfócitos a exprimirem CD28. Nos doentes, não se verificou nenhuma alteração na expressão deste antigénio após a mobilização com o G-CSF. O CD28 é uma molécula co-estimuladora e que está envolvida na expansão clonal dos linfócitos T, bem como na produção de IL-2. Este papel do CD28 sugere que a modulação dos níveis da expressão deste antigénio pode alterar a função dos linfócitos T. Nos dadores, a percentagem de linfócitos CD150+ da Cit, diminuiu relativamente ao SP. As populações linfocitárias dos dadores e dos doentes, não exprimiram CD80, CD86 e CD152, o que está de acordo com os resultados obtidos por Rondelli et al.³

Nos linfócitos dos dois grupos, a expressão de CD25 e de CD122 não sofreu qualquer alteração significativa após a administração do G-CSF. Os nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Sugimori et al¹¹⁵ e por Reyes et al⁹³, os quais verificaram que a expressão de CD25 e de CD122 nos linfócitos não sofreu modificação após mobilização com G-CSF. Contudo, estes resultados foram diferentes dos obtidos por Rondelli et al, que verificou que nos dadores após a mobilização com G-CSF havia uma diminuição da expressão de CD25 e de CD122 nos linfócitos.³

Além do efeito provocado na expressão do CD62L, verificou-se nas células NK CD56⁺⁺, uma alteração comum aos dadores e doentes na expressão do CD161. Nos dadores, a percentagem de células CD56⁺⁺CD161⁺ diminuiu após a administração de G-CSF. Relativamente às células CD56⁺, não se observou qualquer efeito do G-CSF na expressão do CD161. Nos doentes, nas duas sub-populações de células NK, ocorreu uma diminuição da percentagem de células NK CD161⁺. Azzoni L et al¹¹⁹ demonstrou que o CD161 estava relacionado com a actividade citotóxica das células NK. Os nossos resultados poderão sugerir que o G-CSF provoca uma diminuição da capacidade citotóxica das células NK.

Nos dadores, para além da alteração do CD161, observaram-se ainda variações no padrão de expressão de CD16 nas células CD56⁺⁺, e de CD57 e HLA-DR nas células CD56⁺. Na Cit, as células CD56⁺⁺ exprimiram mais CD16 relativamente à mesma sub-população no SP. Estas alterações poderão estar relacionadas com a maturação das células CD56⁺⁺. O aumento da expressão do CD16 nas células CD56⁺⁺ pode sugerir que estas células se encontram num estado de maior maturação relativamente à mesma sub-população no SP, possivelmente devido ao efeito do G-CSF. Nas células CD56⁺ não ocorreu nenhuma alteração significativa na expressão destes antigénios. A elevada percentagem de células CD56⁺CD16⁺ e a baixa percentagem de células CD56⁺⁺CD16⁺, indica que as células CD56⁺ possivelmente apresentam uma maior actividade citotóxica do que as células CD56⁺⁺.

Apenas as células CD56⁺ dos dadores exprimiram CD57, tendo ocorrido uma diminuição da percentagem de células CD56⁺CD57⁺ após mobilização com G-CSF. Quanto ao HLA-DR, a percentagem de células CD56⁺ que exprimiram este antigénio foi maior na Cit do que no SP, não se tendo observado qualquer alteração na sub-

população CD56⁺⁺. Na Cit, tal como no SP, a expressão de HLA-DR foi maior nas células CD56⁺⁺ do que nas células CD56⁺.

Nos doentes, a mobilização com G-CSF provocou algumas alterações fenotípicas nas células CD56⁺⁺ e CD56⁺. A única diferença observada nas células CD56⁺⁺ foi a diminuição da percentagem de células CD56⁺⁺CD161⁺, referida anteriormente. Na subpopulação de células NK CD56⁺, em simultâneo com a diminuição da percentagem de células CD56⁺CD62L⁺, observaram-se variações na expressão do CD11a e CD11c. Apesar da diminuição da expressão de CD11a ser significativa, a percentagem de células CD56⁺CD11a⁺ manteve-se superior a 99%. Nos doentes, tal como nos dadores, verificou-se que as células CD56⁺ exprimiram mais NKR^s do que as células CD56⁺⁺, com a excepção do CD94.

Em resumo, o principal efeito do G-CSF, nos linfócitos e nas células NK dos enxertos, foi a diminuição da expressão da molécula de adesão CD62L. As outras moléculas de adesão estudadas, nomeadamente o CD11a e CD11c não sofreram alterações tão acentuadas, como as que ocorreram no caso do CD62L. Nos linfócitos dos dadores e dos doentes, a administração de G-CSF alterou a relação CD45RO/CD45RA nos linfócitos. Nas células NK de ambos os grupos, observou-se uma diminuição da expressão de CD161. Os restantes KLRs e KIRs e receptores de citocinas estudados, não sofreram qualquer alteração significativa, com a mobilização.

No pequeno grupo de dadores e doentes testado, verificou-se que as células mononucleares da Cit produziram mais IL-4 do que as do SP. Não se observaram alterações na secreção do IFN- γ . Os nossos resultados sugerem que o G-CSF pode exercer um efeito imunomodulador nos linfócitos e nas células NK e que poderão ser terapêuticamente explorados em condições associadas com o balanço TH1/TH2, tais como na falência do enxerto e da doença de enxerto contra hospedeiro aguda.

2. Perspectivas futuras

A continuação deste estudo permitirá a avaliação de um maior número de doentes e analisar os dados de acordo com o diagnóstico. Possibilitará ainda determinar se existe correlação entre as alterações no fenótipo e na produção de citocinas que ocorrem nos linfócitos e nas células NK e a dose de G-CSF administrada na mobilização. A continuidade deste trabalho permitirá analisar a modulação do CD62L nos linfócitos e nas células NK e o seu papel na mobilização celular para a periferia.

A realização de ensaios de quantificação de citocinas por ELISPOT, usando populações celulares isoladas permitirá distinguir uma resposta celular do tipo 1 de uma resposta celular do tipo 2, através da produção de IL-4 e de IFN- γ . O estudo da actividade citotóxica das células NK através da quantificação da granzima B por técnica de ELISPOT, será um importante parâmetro de avaliação funcional destas células.

Estes estudos permitirão avaliar o efeito selectivo do G-CSF nas várias populações celulares dos enxertos hematopoiéticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Cell-mediated effector responses. In: Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, editors. *Kuby Immunology*. Fourth Edition. New York: W. H. Freeman and Company; 2000.p. 351-368.

- 2 - Joshi SS, Lynch JC, Pavletic SZ, Tarantolo SR, Pirruccello SJ, Kessinger A, et al. Decreased immune functions of blood cells following mobilization with granulocyte colony-stimulating factor: association with donor characteristics. *Blood* 2001;98:1963-1970

- 3 - Rondelli D, Raspadori D, Anasetti C, Bandini G, Arpini M, Stanzani M, et al. Alloantigen presenting capacity, T cell alloreactivity and NK function of G-CSF-mobilized peripheral blood cells. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:631-637.

- 4 - Miller JS, Prosper F, McCullar V. Natural killer (NK) cells are functionally abnormal and NK progenitors are diminished in granulocyte colony-stimulating factor – mobilized peripheral blood progenitor cell collections. *Blood* 1997;90:3098-3105.

- 5 - Gyger M, Stuart RK, Perreault C. Immunobiology of allogeneic peripheral blood mononuclear cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:1-16.

- 6 - Talmadge JE, Reed EC, Kessinger A, Kuszynski CA, Perry GA, Gordy CL, et al. Immunologic attributes of cytokine mobilized peripheral blood stem cells and recovery following transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1996;17:101-109.

- 7 - Verbik DJ, Jackson JD, Pirruccello SJ, Patil KD, Kessinger A, Joshi SS. Functional and phenotypic characterization of human peripheral blood stem cell harvests: a comparative analysis of cells from consecutive collections. *Blood* 1995;85:1964-1970.
- 8 - Tjonnfjord GE, Steen R, Evensen SA, Thorsby E, Egeland T. Characterization of CD34⁺ peripheral blood cells from healthy adults mobilized by recombinant human Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Blood* 1994;84:2795-2801.
- 9 - Miller JS. The biology of Natural Killer cells in cancer and infection. *Cancer Invest* 2002;20:1-14.
- 10 - WWW.osms.otago.ac.nz/immunet/rescente.htm.
- 11 - 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.
- 12 - Kay NE, Douglas SD. Lymphocytes and plasma cells. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, editors. *Williams hematology*. 5th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1995. p. 907-915.
- 13 - 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.

- 14 - Trinchieri G, Lanier LL. 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. 956-959.
- 15 - Sewell WA, Cooley MA, Hegen M. CD45 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, Goyert S, Von dem Borne AEGKr, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamara K, Zola H. Leucocyte Typing VI- White cell differentiation antigen. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 499-502.
- 16 - 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;28:1073-1082
- 17 - Miller JS. The biology of natural killer cells in cancer, infection, and pregnancy. Exp Hematol 2001;29:1157-1168.
- 18 - Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. TRENDS Immunol 2001;22:633-640.
- 19 - 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;27:354-360.

20 - Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chem KS, Ghaheeri BA, Ghayr T. Human Natural Killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset. *Blood* 2001;97:3146-3151.

21 - Saito T, Yamazaki T. CD3 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, Goyert S, Von dem Borne AEGKr, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamara K, Zola H.. *Leucocyte Typing VI- White cell differentiation antigen*. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 44-48.

22 - Piatier-Tonneau D. CD4 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, Goyert S, Von dem Borne AEGKr, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamara K, Zola H. *Leucocyte Typing VI- White cell differentiation antigen*. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 49-54.

23 - Nakauchi H. CD8 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, Goyert S, Von dem Borne AEGKr, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamara K, Zola H. *Leucocyte Typing VI- White cell differentiation antigen*. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 65-67.

24 - Azuma M, Oki S. CD28 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, Goyert S, Von dem Borne AEGKr, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamara K, Zola H. *Leucocyte Typing VI- White cell differentiation antigen*. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 71-73.

- 25 - Cocks BG, Chang CJ, Carballido JM, Yssel H, Vries JE, Aversa G. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 1995;376:260-263.
- 26 - Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamaly. *Nature* 2002;2:116-126.
- 27 - Wild MK, Cambiaggi A, Brown MH, Davies EA, Ohno H, Saito T, et al. Dependence of T cell antigen recognition on the dimensions of an accessory receptor-ligand complex. *J Exp Med* 1999;5:31-41.
- 28 - Fleisher J, Soeth E, Reiling N, Grage-Griebenow E, Flad H-D, Ernst M. Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on human peripheral blood monocytes. *Immunology* 1996;89:592-598.
- 29 - Jones M, Mason DY. CD80 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, Goyert S, Von dem Borne AEGKr, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamara K, Zola H. *Leucocyte Typing VI- White cell differentiation antigen*. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 186-187.
- 30 - Hardie DL, Casamayor M, Johnson GD, Hill D, Van Schijndel G, Van Lier R, Khan M, MacLennan ICM. CD86 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, Goyert S, Von dem Borne AEGKr, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamara K, Zola H. *Leucocyte Typing VI- White cell differentiation antigen*. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 201-204.

31 - Linsley PS, Greene JL. CD152 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, Goyert S, Von dem Borne AEGKr, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamara K, Zola H. Leucocyte Typing VI- White cell differentiation antigen. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 95-98.

32 - Sidorenko SP. CD150 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, Goyert S, Von dem Borne AEGKr, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamara K, Zola H. Leucocyte Typing VI- White cell differentiation antigen. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 582-584.

33 - Howie D, Simarro M, Sayos J, Guirado M, Jaime Sancho J, Cox Terhorst C. Molecular dissection of the signalling and costimulatory functions of CD150 (SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation. *Blood* 2002;99:957-965.

34 - Hironobu Tatsuo, Yusuke Yanagi. The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiol Immunol* 2002;46:135-142.

35 - Hashimoto K, Ono N, Tatsuo H, Minagawa H, Takeda M, Takeuchi K, et al. SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J Virol* 2002;76:6743-6749.

36 - Andres O, Obojes K, Kim KS, Meulen V, Schneider-Schaulies J. CD46- and CD150- independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses. *J Gen Virol* 2003;84:1189-1197.

37 - Erlenhorf C, Duprex WP, Rima BK, Meulen V, Scheinder-Schaulies J. Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J Gen Virol* 2002;83:1413-1436.

38 - 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. 100-114.

39 - 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.

40 - Kato K. CD2 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al, editors. *Leucocyte typing VI – White cell differentiation antigens*. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p.39-43.

41 - 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. 64-65.

42 - 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. 62-63.

43 - Goda K, Tanaka T, Takeuchi E, Miyasaka M. CD62L workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, Goyert S, Von dem Borne AEGKr, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamara K, Zola H. Leucocyte Typing VI- White cell differentiation antigen. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 420-422.

44 - Mackay IR, Rosen FS. T-cell function and migration. *N Engl J Med* 2000;5:1020-1034.

45 - Frey M, Packianathan NB, Fehniger TA, Ross MA, 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;161:400-408.

46 - Tu L, Poe JC, Kadono T, Venturi GM, Bullard DC, Tedder TF, et al. A functional role for circulating mouse L-selectin in regulating leukocyte/endothelial cell interactions in vivo. *J Immunol* 2002;169:2034-2043.

47 - Ding Z, Issekutz TB, Downey GP, Waddell TK. L-selectin stimulation enhances functional expression of surface CXCR4 in lymphocytes: implications for cellular during adhesion and migration. *Blood* 2003;101:4245-4252.

48 - Hogg N. CD11a workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al, editors. Leucocyte typing VI – White cell differentiation antigens. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p.343-345.

49 - Hogg N. CD11b workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al, editors. Leucocyte typing VI – White cell differentiation antigens. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p.346-347.

50 - Hogg N. CD11c workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al, editors. Leucocyte typing VI – White cell differentiation antigens. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p.347-348.

51 - 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. 2220-2241.

52 - 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.

53 - Sasaki Y, Sugamura K. CD25 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, Goyert S, Von dem Borne AEGKr, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamara K, Zola H. Leucocyte Typing VI- White cell differentiation antigen. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 802-804.

54 - Oda K, Sugamura K. CD122 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, Goyert S, Von dem Borne AEGKr, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamara K, Zola H. Leucocyte Typing VI- White cell differentiation antigen. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 830-832.

55 - Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;16:359-393.

56 - Ashman LK, Cambareri AC, Nguyen L et al. CD117 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al, editors. Leucocyte typing VI – White cell differentiation antigens. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 816-818.

57 - 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;178:1079-1084.

58 - Natarajan K, Dimasi N, Wang J, Mariuzza RA, Margulies DH. Structure and function of Natural Killer Cell Receptor: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination. *Annu Rev Immunol* 2002;20:853-885.

59 - Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta A. Human NK-cell receptors. *Immunol Today* 2000;21:420-422.

60 - Djeu JY, Kun J, Sheng W. A view to a kill: signals triggering cytotoxicity. *Clin. Cancer Res* 2002;8:636-640.

61 - Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural Killer cell receptors : new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002;100:1935-1947.

62 - Azuma M, Oki S. CD57 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al, editors. *Leucocyte typing VI – White cell differentiation antigens*. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p.74-75.

63 - Carretero M, Melero I, Pérez-Villar JJ, Navarro F, López-Botet M. CD158a and b workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al, editors. *Leucocyte typing VI – White cell differentiation antigens*. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p. 294-295.

64 - Borrego F, Kabat J, Kim DK, Lieto L, Maasho K, Pena J, et al. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol* 2001;38:637-660.

65 - Campbell KS, Hil G. Signal transduction by inhibitory receptors on human Natural Killer cells. *Eur J Immunol* 1998;28:599-609.

66 - Soloski J Mark. Recognition of tumor cells by the innate system. *Curr Opin Immunol* 2001;13:154-162.

67 - Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1999;94:333-339.

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

69 - Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Pena J, Solana R. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology* 1999; 159-165.

70 - Poggi A, Revello V, Nanni L, Costa P et al. CD161 (human NKR-P1A) workshop panel report. 277-279. In: Kishimoto T, Kikutani H, von der Borne AEGKr, Goyert SN, Mason DY, Miyasaka M, et al, editors. *Leucocyte typing VI – White cell differentiation antigens*. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p.307-312.

71 - 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. *Leucocyte typing VI – White cell differentiation antigens*. New York: Garland Publishing, Inc; 1998. p.279-282.

72 - Pascal V, Brunet C, Pradel V, Thirion X, Andre P, Faucher C, et al. Analysis of donor NK and T cells infused in patients undergoing MHC-matched allogeneic hematopoietic transplantation. *Leukemia* 2002;16:2259-2266.

73 - Voss SD, Daley J, Ritz J, Robertson MJ. Participation of CD94 receptor complex in costimulation of human Natural Killer cells. *J Immunol* 1998;160:1618-1626.

74 - Raziuddin A, Longo DL, Bennett M, Pickett-Winkler R, Ortaldo JR, Murphy WJ. Increased bone marrow allograft rejection by depletion of NK cells expressing inhibitory Ly49 NK receptors for donor class I antigens. *Blood* 2002;100:3026-3033.

75 - Boyington JC, Riaz AN, Patamawenu A, Coligan JE, Brooks AG, Sun DP. Structure of CD94 reveals a novel C-type lectin fold: implications for the NK cell-associated CD94/NKG2 receptors. *Immunity* 1999;10:75-82.

76 - Male D. Introduction to the immune System. In: Roitt M, Brostoff J, Male D, editors. *Immunology*. 6th ed. International: Mosby; 2001.p.1-13.

77 - Kipps TJ. Functions of T lymphocytes: T-cell receptor for antigen. In: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ, editors. *Williams haematology*. 5th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1995. p. 949-957.

78 - Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, Noble A, Kemeny DM. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* 2000, 95:231-240.

79 - Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* 2000, 95:2484-2490.

80 - Rutella S, Pierelli L, Bonanno G, Sica S, Ameglio F, Capoluongo E, et al. Role for granulocyte colony-stimulating factor in the generation of human T regulatory type 1 cells. *Blood* 2002;100:2562-2571.

81 - Noble A, Kemeny DM. Do functional subsets of leukocytes arise by divergent or linear differentiation? *Immunology* 2002; 106:443-446.

82 - Bacchetta R, Sartirana C, Levings MK, Bordignon C, Narula S, Rancarolo GM. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur J Immunol* 2002;32:2237-2245.

83 - Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787-793.

84 - Sivakumaran M. Modulation of Th1/Th2 subsets by granulocyte-colony stimulating factor. *Blood* 2001;97:333.

85 - Deniz G, Akdis M, Aktas E, Blaser K, Akdis CA. Human NK1 and NK2 subsets determined by purification of IFN- γ – secreting and IFN- γ – nonsecreting NK cells. *Eur J Immunol* 2002;32:879-884.

86 - Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8⁺ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* 2003;101:4260-4266.

87 - Rentenaar RJ, Vosters JLG, Van Diepen FNJ, Remmerswaal EBM, Van Lier RAW, Ten Berge IJM. Differentiation of human alloreactive CD8⁺ T cells in vitro. *Immunol* 2002;105:278-285.

88 - Kusnierz-Glaz CR, Still BJ, Amano M, Zukor JD, Negrin RS, Blume KG, et al. Granulocyte colony stimulating factor induced comobilization of CD4-CD8- T cells and hematopoietic progenitor cells (CD34⁺) in the blood of normal donors. *Blood* 1997;89:2586-2595.

89 - Lalvani A, Brooks R, Hambleton S, Britton WJ, Hill AVS, McMichael AJ. Rapid effector function in CD8⁺ memory T cells. *J Exp Med* 1997;186:859-865.

90 - Ekerfelt C, Ernerudh J, Jenmalm CM. Detection of spontaneous and antigen-induced human interleukin-4 responses in vitro: comparison of ELISPOT, a novel ELISA and real-time RT-PCR. *J Immunol Methods* 2002;260:55-67.

91 - WWW.pathoindia.com/update6.html.

92 - Male D. Cell-mediated cytotoxicity. In: Roitt M, Brostoff J, Male D, editors. *Immunology*. 6th ed. Edinburgh: Mosby; 2001. p. 163-172.

93 - Karre K, Ljunggren HG, Piontek G. Selective rejection of H-2- deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986;319: 675.

94 - WWW.elmo.shore.ctc.edu/biotech/immunology/notes4-4.htm.

95 - 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>.

96 - WWW.bccancer.bc.ca

97 - Rowley SD. Practical aspects of stem cell collection. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P, editors. *Hematology, basic principles and practice*. 3th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 1642-1644.

98 - Reyes E, Garcia-Castro I, Esquivel F, Hornedo J, Cortes-Funes H, Solovera J, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) transiently suppresses mitogen-stimulated T-cell proliferative response. *Br J Cancer* 1999;80:229-235.

99 - Besinger WI, Clift RA, Anasetti C, Appelbaum FA, Demirer T, Rowley S, et al. Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Stem Cells* 1996;14:90-105.

100 - Kitabayashi A, Hirokawa M, Hatano Y, Ohta S. Granulocyte colony-stimulating factor downregulates allogenic immune responses by posttranscriptional inhibition of tumor necrosis factor- α production. *Blood* 1995;86:2220-2227.

101 - Taga T, Kairya Y, Shimida M, Mori A. Suppression of natural Killer cell activity by granulocytes in patients with aplastic anemia: role of granulocyte colony-stimulating factor. *Immunol Lett* 1993;39:65-70.

102 - Durek C, Schäfer I, Braasch H, Ulmer AJ, Flad HD, Jocham D, et al. Effects of colony-stimulating factors on cellular cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 1997;44:35-40.

103 - Tayebi H, Kuttler F, Saas P, Lienard A, Petracca B, Lapierre V, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor mobilization on phenotypical and functional properties of immune cells. *Exp Hematol* 2001;29:458-470.

104 - Weaver CH, Longin K, Buckner CD, Bensinger W. Lymphocyte content in peripheral blood mononuclear cells collected after the administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Bone Marrow Transplant* 1994, 13: 411-415.

105 - Sloand EM, Kim S, Maciejewski JP, Van Rhee F, Chaudhuri A, Barret J, et al. Pharmacologic doses of granulocyte colony-stimulating factor affect cytokine production by lymphocytes in vitro and in vivo. *Blood* 2000, 95: 2269-2274.

106 - Gazitt Y. Immunologic profiles of effector cells and peripheral blood stem cells mobilized with different hematopoietic growth factors. *Stem Cells* 2000;18:390-398.

107 - Bailey T, Stark S, Grant A, Hartnett C, Tsang M, Kalyuzhny A. A multidonor ELISPOT study of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-13, IFN- γ and TNF- α release by cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods* 2002;270:171-182.

108 - Helms T, Boehm OB, Asaad JR, Trezza PR, Lehmann VP, Tary- Lehmann M. Direct visualization of cytokine-producing recall antigen-specific CD4 memory T cells in healthy individuals and HIV patients. *J Immunol* 2000;164:3723-3732.

109 - Whiteside LT, Zhao Y, Tsukishiro T, Elder ME, Gooding W, Baar J. Enzyme-linked immunospot, cytokine flow cytometry, and tetramers in detection of T-cell responses to a dendritic cell-based multi-peptide vaccine in patients with melanoma. *Clin. Cancer Res* 2003;9:641-649.

110 - Lampa J, Klareskog L, Ronnelid J. Effects of gold on cytokine production *in vitro*; increased of monocyte dependent interleukin 10 production and decreased of interferon- γ levels. *J Rheumatol* 2002;29:21-28.

111 - www.ermm.cbcu.cam.ac.uk.

112 - Abkowitz JL, Robinson AE, Kale S, Long MW, Chen J. Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood* 2003;102:1249-1253.

113 - Candeias J, Ramos J, Barbosa IL. Sub-populações linfocitárias do sangue periférico, valores de referência por citometria de fluxo. *Arq Medicina* 1993;7:7-14.

114 - Milles KC, Gross TG, Varney ML, Heimann DG, Reed EC, Kessinger A, et al. Immunologic phenotype and function in human bone marrow, blood stem cells and umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 1996;18:53-61.

115 - Sugimori N, Nakao S, Yachie A, Niki T, Takami A, Yamazaki H, et al. Administration of G-CSF to normal individuals diminishes L-selectin⁺ T cells in the peripheral blood that respond better to alloantigen stimulation than L-selectin⁻ T cells. *Bone Marrow Transplant* 1999, 23: 119-124.

116 - 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 Mol Dis* 2001;27:731-743.

117 - Campbell JJ, Qin S, Unamatz 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;166:6477-6482.

118 - Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G, et al. CD56^{bright} cells differ in their KIR repertoire and Cytotoxic features from CD56^{dim} NK cells. *Eur J Immunol* 2001;31:3121-3126.

119 - Azzoni L, Zatsepina O, Abebe B, Bennett MI, Kanakaraj P, Perussia B. Differential transcriptional regulation of CD161 and a novel gene, 197/15a, by IL-2, IL-15, and IL-12 in NK and T cells. *J Immunol* 1998;161:3493-3500.

120 - Franzke A, Piao W, Lauber J, Gatzlaff P, Konecke C, Hansen W, et al. G-CSF as immune regulator in T cells expressing the G-CSF receptor: implications for transplantation and autoimmune diseases. *Blood* 2003;102:734-739.

121 - Barbosa IL, Benevides PA, Gomes FI, Sousa CC, Campilho F, Sousa S et al. Selective effect of Granulocyte-Colony stimulating factor on CD62L expression on leucocytes present on PBPC grafts. (*Blood in press*)

122 - Vuckovic S, Kim M, Khailil D, Turtle JC, Crosbie VG, Williams N, et al. Granulocyte-colony stimulating factor increase CD123^{hi} blood dendritic cells with altered CD62L and CCR7 expression. *Blood* 2003;101:2314-2317.

ANEXO I

Selective effect of granulocyte-colony stimulating factor on CD62L expression on leucocytes present on PBPC grafts

Isabel L Barbosa, PhD ¹, Patricia A Benevides, BSc ¹, Fernanda I Gomes, BSc ¹, Cláudia C Sousa, BSc ¹, Fernando Campilho, MD ², Susana R Sousa, MD ¹, Pedro Pimentel MD ² and AlziraCarvalhais MD ¹.

¹ Imuno-Hemoterapia, Instituto Português de Oncologia Porto SA, Porto, Portugal, and ² Serviço de Transplante de Medula Óssea, Instituto Português de Oncologia Porto SA, Porto, Portugal.

Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) is currently used to mobilize peripheral blood progenitor cells (PBPC) to be used in haematopoietic transplantation. It has been shown that adhesion molecules play an important role in the migration of leukocytes from BM to the periphery. In this study we compared the expression of CD11a/CD18 and CD62L on lymphocytes and NK cells of non-mobilization peripheral blood (PB) and PBPC grafts collected on the 5th day of G-CSF mobilization from healthy donors (n=22) and patients candidates to autologous transplantation (n=19). Figure 1 summarizes the expression of CD62L and CD11a on PB cells and PBPC grafts. PB lymphocytes from donors and patients expressed CD62L (60% and 55% respectively) and this expression was mainly on T lymphocytes. Following G-CSF mobilization there was a significant decrease in the percentage of lymphocytes and T cells CD62L+. The expression of CD11a on PB and PBPC lymphocytes from the study groups did not change and was similar (median value 99%). As previously reported by others we observed a differential expression of CD62L on NK cell subpopulations CD56++ (immature NK cells) and CD56+ (mature NK cells). Both for donors and patients the majority of CD56++ cells from PB and PBPC grafts express CD62L. Only a small number of PB CD56+ from donors (25%) and patients (18%) express CD62L. In the PBPC grafts there was a significant decrease in the percentage of CD56+CD62L+ for both groups (12 and 14% for donors and patients respectively), in comparison with the same cells previously to mobilization. As for lymphocytes, CD11a was expressed on the majority of all NK cell populations of PB and PBPC from the two study groups. Thus, G-CSF induced a selective shedding of CD62L from lymphocytes and NK CD56+ cells present on PBPC grafts. These results suggest that integrins and selectins expressed on lymphocytes and NK cells may have a different roles on G-CSF mobilization of leucocytes from BM to the periphery.

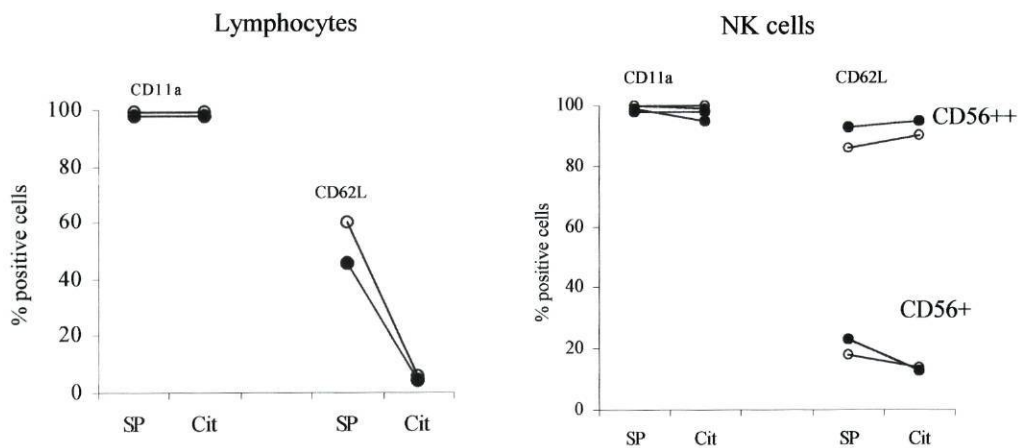


Figure 1. Expression of CD11a and CD62L on lymphocytes and NK cells sub-populations.

○ Donors ● Patients