

**U. PORTO**



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO



Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Medicina

**CÉLULAS *NATURAL KILLER***  
**DIFERENCIAÇÃO TERMINAL DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER***

Aluna

**Maria Margarida Gonçalves Arêde Calejo**

Mestrado Integrado em Medicina (MIM)  
do ICBAS/UP e HSA/CHP

Orientadora: Prof. Doutora Margarida Lima

Disciplina de Iniciação a Investigação Clínica (DIIC)  
Responsável: Prof. Doutora Margarida Lima, HSA/CHP e ICBAS/UP

Ano letivo 2011/2012

Este trabalho, apresentado para fins de obtenção do grau de Mestre em Medicina, integra uma proposta de projeto de investigação e o respetivo relatório de execução, desenvolvidos no âmbito da Disciplina de Iniciação à Investigação Científica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS/UP) e do Centro Hospitalar do Porto (CHP), durante os anos letivos 2010/2011 (conceção e redação da proposta) e 2011/2012 (execução do projeto, análise e interpretação dos resultados e elaboração do relatório).

O projeto foi executado no CHP (Laboratório de Citometria do Serviços de Hematologia Clínica) sob a orientação da Prof. Doutora Margarida Lima (CHP).

## ***Agradecimentos***

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Doutora Margarida Lima, por toda a inspiração, orientação e apoio incansável, sem os quais não teria sido possível realizar este projeto e também pelo grande exemplo de profissionalismo e dedicação à investigação científica.

À Doutora Magdalena Leander, Bolseira de Investigação, e à Dra. Marlene Santos, Técnica de Diagnóstico e Terapêutica, pela ajuda imprescindível na realização do trabalho laboratorial, e a todos os profissionais do Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do CHP.

# Índice

<b>Resumo .....</b>	<b>i</b>
<b>A. PROPOSTA DE PROJETO DE INVESTIGAÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>Intervenientes no Projeto.....</b>	<b>2</b>
Instituições, Departamentos e Serviços .....	2
Equipa de Investigação .....	2
Constituição .....	2
Funções e responsabilidades .....	2
Tempo dedicado ao projeto .....	3
<b>Plano científico.....</b>	<b>4</b>
Introdução .....	4
Enquadramento e justificação .....	8
Problemas .....	8
Questões .....	9
Hipóteses de trabalho.....	9
Objetivos.....	9
Desenho .....	9
Tipo de estudo .....	9
Fases do estudo .....	9
Universo, população e amostra.....	10
Seleção dos participantes e critérios de elegibilidade .....	10
Plano de trabalho .....	10
Tarefas associadas ao projeto .....	10
Material e métodos .....	13
Equipamento, material e reagentes .....	13
Reagentes e material consumível.....	14
Procedimentos técnicos .....	15
Calendarização.....	16
Duração.....	16
Datas de início e conclusão.....	16
Cronograma de execução .....	16
Indicadores de produção .....	17
Comunicações orais e posters .....	17
Trabalhos escritos.....	17
Referências bibliográficas .....	18
<b>Plano Financeiro .....</b>	<b>20</b>
Orçamento .....	20
Financiamento .....	20
<b>Glossário .....</b>	<b>21</b>
Abreviaturas e acrónimos.....	21
Termos técnicos.....	22

<b>Anexos  Proposta de Projeto.....</b>	<b>25</b>
Termo de consentimento informado .....	26
Folheto informativo para os participantes .....	27
Folha de rosto .....	28
Pedidos de autorização institucional .....	30
Termos de autorização local.....	32
Termos de responsabilidade .....	33
<b>B. RELATÓRIO DE EXECUÇÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>35</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>36</b>
Colheita de sangue periférico e preparação das células .....	36
Estudo fenotípico das células NK do sangue .....	36
Cultura de células mononucleares na presença de interleucinas .....	37
Estudo fenotípico das células NK cultivadas.....	37
Análise estatística .....	37
<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>38</b>
Perfil fenotípico das células NK do sangue periférico .....	38
Evolução do perfil fenotípico das células NK de sangue periférico cultivadas na presença de interleucinas .....	39
<b>Conclusões .....</b>	<b>49</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>51</b>
<b>Anexos  Relatório de Execução .....</b>	<b>52</b>

## Resumo

As células *natural killer* (CNK) representam uma população importante de células efetoras da imunidade inata, pelo seu papel na lise de células tumorais e/ou víricas e na secreção de citocinas moduladoras das respostas imunes inata e adaptativa.

Distinguem-se duas subpopulações de CNK através da expressão diferencial dos antígenos CD56 e CD16 na superfície celular: uma com baixa densidade de expressão de CD56 e elevada de CD16 (CD56<sup>+fraco</sup>/CD16<sup>+</sup>) e outra com elevada densidade de expressão de CD56 e expressão baixa/ausente de CD16 (CD56<sup>+forte</sup>/CD16<sup>-/+fraco</sup>). As CNK CD56<sup>+fraco</sup> predominam no sangue periférico, onde representam 90% das CNK, enquanto as CNK CD56<sup>+forte</sup> constituem importantes populações noutros compartimentos do organismo, nomeadamente nos órgãos linfóides secundários (gânglios linfáticos, baço e amígdalas palatinas) e no endométrio. Estas duas subpopulações de CNK diferem também na expressão de moléculas envolvidas na adesão, migração (receptores de quimiocinas), ativação e actividade citotóxica (receptores *killer*). Distinguem-se também pela sua função, uma vez que as CNK CD56<sup>+fraco</sup> são essencialmente citotóxicas e as CD56<sup>+forte</sup> produzem grandes quantidades de citocinas e têm funções imunomoduladoras.

Existem vários aspetos da diferenciação terminal das CNK que ainda não estão claramente compreendidos, nomeadamente a relação entre os dois tipos de CNK presentes no SP: as CNK CD56<sup>+fraco</sup>/CD16<sup>+</sup> e CD56<sup>+forte</sup>/CD16<sup>-/+fraco</sup>. Teoricamente, propõe-se que estas células possam representar dois estadios consecutivos ou dois estadios terminais distintos da maturação das CNK. Estudos anteriores demonstram a possibilidade da conversão das CNK CD56<sup>+forte</sup>/CD16<sup>-/+fraco</sup> em CD56<sup>+fraco</sup>/CD16<sup>+</sup>, após estimulação com citocinas, o que, juntamente com o facto de que as CD56<sup>+fraco</sup> possuem telómeros mais curtos, indicia que as CD56<sup>+forte</sup> serão precursoras das anteriores. No entanto, ainda não foi suficientemente explorada a hipótese da conversão oposta.

Com este trabalho, pretendemos mostrar que a conversão entre estes dois subtipos de CNK pode ocorrer de forma bidirecional, pela estimulação com citocinas com ação já conhecida na diferenciação, ativação e sobrevivência das CNK e com o aparecimento de células com fenótipo intermédio entre as duas populações iniciais.

Na execução deste projeto, começou-se por estudar, por citometria de fluxo, o perfil fenotípico das CNK do sangue periférico de indivíduos normais, usando para o efeito anticorpos monoclonais específicos para oito moléculas: CD3, CD45 (molécula panleucocitária), CD56 (molécula de adesão), CD16 (receptor de para o fragmento Fc da IgG), CD94 (receptor *killer* da família das letinas), CD62L (seletina leucocitária), CD181 (receptor de quimiocinas CXCR1) e CD197 (receptor de quimiocinas CCR7). Posteriormente, procedeu-se à cultura *in vitro* de células mononucleadas do sangue periférico estimuladas com quatro interleucinas (IL) envolvidas na estimulação e diferenciação terminal das CNK: IL-2, IL-12, IL-15 e IL-21, avaliando-se o perfil fenotípico das CNK nos dias 0, 2, 4/5, 7 e 9 de cultura.

Nas CNK do sangue periférico foi possível distinguir as duas populações descritas: a população CD56<sup>+fraco</sup>/CD16<sup>+</sup>, com expressão do receptor de quimiocinas CXCR1 (CD181), com expressão fraca de CD94 e de CD62L e com ausência de expressão de CCR7 (CD197); e a população CD56<sup>+forte</sup>/CD16<sup>-/+fraco</sup>, com expressão forte de CD94 e de CD62L e com expressão de CCR7 (CD197).

Após cultura com as IL mencionadas acima, nas CNK verificou-se um aumento da expressão de CD56, de CD94 e dos recetores de quimiocinas CCR7 e CXCR1, bem como um aumento do tamanho e complexidade celulares, comparativamente aos níveis no início da cultura. Contrariamente, a expressão de CD16 parece diminuir ligeiramente ao longo do tempo de cultura, mas mantendo-se o perfil CD16<sup>+</sup>. A expressão de CD62L também sofreu uma redução ao longo do tempo de cultura.

O fenótipo das CNK no final do tempo de cultura com IL não corresponde exatamente ao perfil das CNK CD56<sup>+forte</sup> encontradas no SP, mas tem algumas características semelhantes, como uma expressão aumentada de CD56, CD94 e CCR7, e uma expressão diminuída de CD16, que apontam para a possibilidade da conversão de CD56<sup>+fraco</sup> em CD56<sup>+forte</sup>. O aumento da expressão de CXCR1 e a diminuição da expressão de CD62L poderão, por sua vez, ser atribuídos à ativação celular decorrente da estimulação com IL.

Deste modo, torna-se importante a continuação deste estudo, nomeadamente prosseguindo com a estimulação das culturas *in vitro* com as IL em separado e em diferentes combinações e também com a estimulação das populações de CNK purificadas, como previsto na proposta de projeto inicial. Futuramente, irá realizar-se a separação e purificação das duas subpopulações de CNK (CD56<sup>+fraco</sup> e CD56<sup>+forte</sup>) por separação magnética ou por citometria de fluxo. As populações purificadas serão depois cultivadas *in vitro*, na presença de diferentes tipos de IL. Através do estudo fenotípico será avaliada a possibilidade de conversão das CNK CD56<sup>+forte</sup> em CNK CD56<sup>+fraco</sup> e vice-versa, e confirmada a existência de fenótipos intermédios.

## **A. Proposta de Projeto de Investigação**

### **DIFERENCIAÇÃO TERMINAL DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER***

Área de Investigação: Hematologia – Células do Sistema Imune

**Aluna:** Margarida Calejo

**Orientadora:** Prof. Doutora Margarida Lima

Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do ICBAS/UP e HSA/CHP

Disciplina de Iniciação a Investigação Clínica (DIIC)

Ano letivo 2010/2011

---



## Intervenientes no Projeto

### *Instituições, Departamentos e Serviços*

- Centro Hospitalar do Porto (CHP)
  - Hospital de Santo António (HSA)
    - Departamento de Medicina (DM)
      - Serviço de Hematologia Clínica (SHC)
        - Laboratório de Citometria (LC)

### *Equipa de Investigação*

#### **Constituição**

##### **Aluno**

- Margarida Calejo: Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC) do Curso de Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) da Universidade do Porto (UP) (ICBAS/UP).

##### **Orientadores**

- Prof. Doutora Margarida Lima: Médica, Imunohemoterapeuta, Assistente Hospitalar Graduada do SHC do HSA/CHP; Responsável pelo LC do SHC do HSA/CHP. (Orientadora)

##### **Supervisores**

- Prof. Doutora Margarida Lima: Professora Auxiliar Convidada do ICBAS/UP; Regente da DIIC.

##### **Consultores**

- Prof. Doutora Julia Almeida: Médica, Hematologista, Investigadora e Professora Universitária, CIC e USAL.
- Prof. Doutor Alberto Orfão: Médico, Hematologista, Investigador e Professor Universitário, Centro de Investigación del Câncer (CIC), Hospital Universitario de Salamanca (USAL).

##### **Outros investigadores**

- Téc. Marlene Santos, Técnica de Diagnóstico e Terapêutica (TDT) do LC, SHC, HSA/CHP;
- Doutora Magdalena Leander, Bolseira de Investigação do LC, SHC, HSA/CHP.

##### **Funções e responsabilidades**

- A concepção e elaboração da proposta e a execução do projeto são da responsabilidade da Aluna;

- Os Orientadores acompanharão a aluna na elaboração de proposta, na execução do projeto e na análise e interpretação dos resultados;
- A Regente da DIIC supervisionará todas as fases do projeto, desde a sua concepção até à apresentação dos resultados, passando pela sua execução e análise/interpretação dos dados.
- Os restantes investigadores colaborarão em aspectos específicos do projeto, conforme especificado.

#### **Tempo dedicado ao projeto**

- Total: 5,7 pessoas\*mês
- Aluno: 10% durante 22 meses ( $1 \times 0,10 \times 22 = 2,2$  pessoas\*mês)
- Orientador: 2.5% durante 22 meses ( $1 \times 0,025 \times 22 = 0,55$  pessoas\*mês)
- Supervisor: 2.5% durante 22 meses ( $1 \times 0,025 \times 22 = 0,55$  pessoas\*mês)
- Outros investigadores (3): 15% durante 4 meses ( $3 \times 0,15 \times 4 = 2,4$  pessoas\*mês)

## Plano científico

### *Introdução*

As células *natural killer* (CNK) são uma população importante de linfócitos, envolvida na resposta imunitária inata e com um papel de modulação e complementaridade na resposta imunitária adaptativa. São definidas, tradicionalmente, através do fenótipo da superfície celular, pela expressão do antígeno CD56 e ausência do antígeno CD3 (2). Actuam como células efectoras, destruindo por citólise células neoplásicas ou infetadas por vírus, e como células imunoreguladoras, através da produção de várias citocinas. Em indivíduos normais, representam cerca de 10-15% dos linfócitos circulantes (1). No entanto, as CNK também constituem importantes populações noutros compartimentos do organismo, nomeadamente nos órgãos linfóides secundários (gânglios linfáticos, baço e amígdalas palatinas) e no endométrio (3).

#### Populações de células NK

No sangue periférico (SP), é possível distinguir duas subpopulações de CNK através da expressão diferencial dos antígenos CD56 e CD16 na superfície celular: uma com baixa densidade de expressão de CD56 e elevada de CD16 (CD56<sup>+fraco</sup>/CD16<sup>+</sup>) e outra com elevada densidade de expressão de CD56 e expressão baixa ou ausente de CD16 (CD56<sup>+forte</sup>/CD16<sup>-/+fraco</sup>) (4). O CD56 ou NCAM (*Neuronal Cell Adhesion Molecule*) é uma molécula de adesão expressa nas células neuronais e em algumas células hematológicas, em particular nas CNK e nos linfócitos T (LT) citotóxicos; o CD16 ou FcγRIIIA é o receptor de baixa afinidade para o fragmento Fc da IgG e intervém na função de citotoxicidade mediada por anticorpos (ADCC, *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*) (2). Para além de diferirem na expressão de CD56 e de CD16, estas duas subpopulações diferem também na expressão de moléculas envolvidas na adesão, migração, ativação e função citotóxica das CNK, entre as quais os recetores de quimiocinas e os recetores *killer* tipo imunoglobulina (KIR, *Killer cell Immunoglobulin like Receptors*), os recetores *killer* tipo lectina (KLR, *Killer cell Lectin type Receptors*) e os recetores de citotoxicidade natural (NCR, *Natural Cytotoxicity Receptors*)(5).

As CNK CD56<sup>+fraco</sup> são predominantes no SP, onde representam cerca de 90% das CNK, enquanto as restantes 10% são CNK CD56<sup>+forte</sup>. Nos gânglios linfáticos e amígdalas, a subpopulação mais numerosa tem fenótipo CD56<sup>+forte</sup> (3). Nos gânglios linfáticos, as CNK CD56<sup>+forte</sup> concentram-se na zona parafolicular, rica em LT. Considerando que 40% de todos os linfócitos se encontram nos gânglios e apenas 2% no SP, o subtipo de CNK CD56<sup>+forte</sup> é o mais numeroso no organismo (6).

### Função das células NK

Em termos funcionais, também existem diferenças marcadas entre os dois subtipos de CNK. As CNK CD56<sup>+fraco</sup> são essencialmente citotóxicas e têm a capacidade de lisar células alvo espontaneamente e sem necessidade de sensibilização, possuindo mais perforinas, granzimas e grânulos citolíticos que as CNK CD56<sup>+fraco</sup> (7). Para além disso, o facto de estas células expressarem níveis elevados de CD16 ou FcγRIIIA, confere-lhes a capacidade de desencadear ADCC, contrariamente ao que acontece com a população de CNK CD56<sup>+forte</sup>, em que a quantidade de expressão de CD16 é bastante menor e a capacidade de ADCC é mínima.

A população de CNK CD56<sup>+forte</sup> demonstra citotoxicidade muito reduzida mas apresenta capacidade de produção abundante de variadas citocinas imunorreguladoras, que incluem interferão gama (IFN-γ), factor de necrose tumoral beta (TNF-β, *Tumor Necrosis Factor beta*) factor estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, *Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor*), interleucinas (IL) - 10 e -13 em resposta à estimulação por monoquinas (como IL-12, IL-1, IL-2, IL-15 ou IL-18) (8) ou por ligação de recetores activadores como o CD16 ou o NKG2D (9). Esta capacidade não é observável em níveis comparáveis na população CD56<sup>+fraco</sup>, mesmo após estimulação destas com citocinas. (8) O IFN-γ é a principal citocina secretada pelas CNK e tem uma função importante na ativação e modulação da resposta imune Th1, na estimulação da ação dos macrófagos contra patogéneos intracelulares e no aumento da expressão de moléculas da classe I do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) pelas células apresentadoras de antigénios, para além do seu papel antiproliferativo em células tumorais ou infectadas por vírus (2).

Por outro lado, as CNK CD56<sup>+forte</sup> expressam o recetor de elevada afinidade para a IL-2 (IL-2R) pelo que respondem e proliferam rapidamente a concentrações picomolares desta citocina (4). Estas células estão presentes em grande quantidade nas zonas T parafoliculares dos gânglios linfáticos, onde a produção local de IL-2 pelos LT pode induzir rapidamente a produção de citocinas pelas CNK que, por sua vez, intervêm e modulam a imunidade inata, evidenciando o papel destas células na interface entre a imunidade inata e adaptativa (10).

No entanto, as funções de cada população parecem poder ser influenciadas pela estimulação com citocinas. Por exemplo, o tratamento com IL-2 *in vivo* e *in vitro* parece induzir citotoxicidade nas CNK CD56<sup>+forte</sup> em níveis comparáveis aos das CNK CD56<sup>+fraco</sup> (1). Por sua vez, as CNK CD56<sup>+fraco</sup> também produzem citocinas após estimulação, embora em menor quantidade do que as CNK CD56<sup>+forte</sup> (8).

### Fenótipo das células NK

A actividade das CNK é regulada por um conjunto de recetores (*recetores killer*) inibidores ou activadores que reconhecem diferentes moléculas, principalmente moléculas do MHC da classe I. A ativação das CNK depende do balanço da estimulação dos recetores activadores e inibidores, quer para a

lise de células alvo quer para a libertação de citocinas. Estão identificadas várias famílias de recetores *killer* sendo as 3 principais: a superfamília dos KIR que reconhecem principalmente moléculas de HLA-A, -B e -C; a família das lectinas tipo-C que incluem os recetores CD94/NKG2 e reconhecem moléculas de MHC-I não clássico (HLA-E) e moléculas *MHC-I-like*, e a família dos NCR, que inclui os recetores activadores NKp30, NKp44 e NKp46, cujos ligandos não são ainda completamente conhecidos.

As duas subpopulações de CNK também diferem quanto à expressão de recetores de ativação e inibição. As CNK CD56<sup>+fraco</sup> expressam níveis elevados de KIR e níveis intermédios de CD94/NKG2A e pelo contrário, nas CNK CD56<sup>+forte</sup>, os KIR têm pouca a nenhuma expressão e o CD94/NKG2A é expresso em níveis elevados (4). O recetor CD94/NKG2A é inibitório e devido à propriedade de reconhecimento do HLA-E, permite às CNK reconhecer a expressão geral de moléculas do MHC-I das células alvo, e se esta for elevada, inibir a lise mediada pelas CNK. Por outro lado, os recetores activadores NCR NKp30 e NKp46 parecem ter igual expressão nos dois subtipos de CNK (1).

Também se verificam diferenças significativas na expressão de moléculas de adesão celular e recetores de quimiocinas entre os dois subtipos de CNK, que traduzem afinidades para diferentes locais no organismo e podem também indicar funções diferentes. As CNK CD56<sup>+forte</sup> exibem níveis elevados da molécula de adesão L-selectina (CD62L) e do recetor de quimiocinas CCR7, contrariamente às CNK CD56<sup>+fraco</sup> (11), sendo estas moléculas de *homing* para os órgãos linfóides secundários onde se concentra a maior parte das CNK CD56<sup>+forte</sup> (12). Em relação a outros recetores de quimiocinas, os estudos realizados são discrepantes em relação à distribuição pelos dois subtipos. Segundo Campbell *e col.* (11) o subtipo NK CD56<sup>+forte</sup> expressa níveis elevados de determinados recetores, como CCR5, CXCR3 e CXCR4, e níveis baixos ou ausência de expressão de outros, como o CXCR1, o CXCR3 e o CCR1-4, CCR6 e CCR9). Por sua vez, as CNK CD56<sup>+fraco</sup> expressam níveis elevados de CXCR1, CXCR3 e CXCR4 e níveis intermédios de CXCR2 e CXCR3, não expressando CCR1-7, CCR9 e CXCR5. Noutro estudo, os autores encontraram expressão de CCR1, CCR4, CCR5, CCR6, CCR9, CXCR5 e CXCR6 em CNK isoladas do SP (13). Todos estes recetores, excepto o CCR4, se expressavam em maior quantidade nas CNK CD56<sup>+forte</sup>, sendo os recetores com expressão mais significativa CCR7, CCR5 e CXCR6. Assim, a expressão de CXCR1, CXCR2 e CXCR3 parece ser mais característica das CNK CD56<sup>+fraco</sup>, enquanto as CNK CD56<sup>+forte</sup> expressam CCR7, CCR5 e CXCR3, com expressão de CXCR4 semelhante em ambas as populações. Como consequência do repertório diferente de recetores de quimiocinas, os dois subtipos têm propriedades migratórias distintas. Ambos migram para locais com inflamação, mas, por exemplo, o CCR5 promove a migração das CNK CD56<sup>+forte</sup> para fluidos sinoviais inflamados (nomeadamente na artrite reumatóide) e a expressão do CXCR1 pelas CNK CD56<sup>+fraco</sup> permite a sua migração e acumulação no fígado de doentes com cirrose biliar primária (14).

### Diferenciação das células NK

Os estádios do desenvolvimento e diferenciação das CNK não estão tão bem definidos como os de outras linhagens de células do sistema imune. Os dados disponíveis indicam que as CNK têm origem em células precursoras hematopoiéticas CD34+CD45RA- na medula óssea que posteriormente migram através da corrente sanguínea para os gânglios linfáticos, concentrando-se nas regiões parafoliculares ricas em LT (15). Nos gânglios linfáticos, pelo estímulo de vários fatores, incluindo IL-2 produzida por LT ativadas e/ou IL-15 produzida por células apresentadoras de antígeno (APC, *Antigen Presenting Cells*) (1), originam CNK com o fenótipo CD56<sup>+forte</sup> CD16<sup>-</sup> KIR<sup>-</sup> e CD94/NKGA2<sup>+</sup> (15,16).

A diferenciação terminal das CNK, nomeadamente a origem e relação das duas subpopulações encontradas no SP, também ainda não está totalmente esclarecida. Foram consideradas inicialmente duas hipóteses: (a) as CNK CD56<sup>+fraco</sup> e CD56<sup>+forte</sup> surgirem como produto de duas linhagens hematopoiéticas distintas ou (b) um dos subtipos ser precursor do outro. Em relação à primeira hipótese, não existem muitas evidências que a suportem, enquanto vários trabalhos apoiam a segunda, especificamente, a hipótese de as CNK CD56<sup>+forte</sup> serem precursoras das CNK CD56<sup>+fraco</sup>.

Por um lado, as CNK CD56<sup>+fraco</sup> têm telómeros mais curtos que as CNK CD56<sup>+forte</sup> do SP e dos gânglios linfáticos, sugerindo que as CNK CD56<sup>+fraco</sup> são mais maduras/diferenciadas (17). Para além disso, a estimulação de CNK CD56<sup>+forte</sup> CD16<sup>-/+fraco</sup> com IL-2 e IL-15 induz a expressão de CD16, KIR e granzimas e reduz a expressão de CCR7, CXCR3, CD117 e CD62L, na superfície celular, levando a que as CNK CD56<sup>+forte</sup> adquiram um fenótipo semelhante às CNK CD56<sup>+fraco</sup> (17).

Adicionalmente, a ligação da molécula CD56 com o recetor do fator de crescimento dos fibroblastos, parece também induzir a conversão de CNK CD56<sup>+forte</sup> em CNK com fenótipo e funcionalidade semelhante CD56<sup>+fraco</sup> (18).

Béziat *et al* (19) apresentam resultados que apoiam a hipótese de uma diferenciação no sentido das CNK CD56<sup>+forte</sup> para as CNK CD56<sup>+fraco</sup>, em que se verifica a gradual perda de expressão de NKG2A e aquisição de KIR e de funções citolíticas. Neste modelo, o estadio final de diferenciação seria CD56<sup>+fraco</sup> NKG2A<sup>-</sup>KIR<sup>+</sup>, havendo estádios intermédios com fenótipo CD56<sup>+fraco</sup>NKG2A<sup>+</sup>KIR<sup>-/+</sup> e expressão intermédia de outros recetores e marcadores com expressão diferencial entre os subtipos CD56<sup>+forte</sup> e CD56<sup>+fraco</sup>. No entanto, o mesmo estudo sugere que o fenótipo CD56<sup>+fraco</sup>NKG2A<sup>-</sup> não é um estado irreversível das CNK, mostrando que estas últimas, após estimulação com IL-12 e IL18, reexpressam NKG2A e readquirem capacidade de produção de IFN $\gamma$  (19). Esta plasticidade aparente das CNK maduras também é evidenciada por outros resultados, que indicam que as CNK CD56<sup>+fraco</sup> também podem adquirir características das CNK CD56<sup>+forte</sup>. A ativação das CNK CD56<sup>+fraco</sup> com citocinas leva a um aumento da densidade de expressão do CD56 (17). A exposição TGF $\beta$  é capaz de induzir a conversão de CNK CD56<sup>+fraco</sup> CD16<sup>+</sup> em CNK CD56<sup>+forte</sup> CD16<sup>-</sup>, mas que possuem um fenótipo que se assemelha mais às CNK CD56<sup>+forte</sup> decíduais do que às CNK do

SP (20). Para além disso, a estimulação com IL-12 induz uma redução da expressão de CD16 e um aumento da expressão CD62L nas CNK CD56<sup>+fraco</sup> (17,21).

Por fim, o facto de ser possível a conversão de CNK CD56<sup>+forte</sup> em CNK CD56<sup>+fraco</sup>, por si só, pode não significar que as primeiras sejam menos maduras ou simples precursoras das NK CD56<sup>+fraco</sup>, especialmente considerando que as CNK CD56<sup>+forte</sup> são mais numerosas e exercem funções imunorreguladoras de produção de citocinas importantes, quer periféricamente quer nos gânglios linfáticos. Deste modo, torna-se importante continuar o estudo da diferenciação terminal das CNK, nomeadamente observando a relação e a possibilidade de interconversão entre os subtipos de CNK CD56<sup>+forte</sup> e CD56<sup>+fraco</sup>.

### ***Enquadramento e justificação***

Este trabalho surge enquadrado nas actividades dos LC do SHC do HSA/CHP e do CIC/USAL.

O LC do SHC do HSA/CHP, chefiado pela Prof. Doutora Margarida Lima, é um laboratório vocacionado para o estudo de doenças hematológicas, competindo-lhe a caracterização fenotípica das células, por citometria de fluxo. Nos últimos anos, diferenciou a sua actividade no estudo dos LT e das CNK, sendo actualmente considerado um laboratório de referência nesta área.

O LC do CIC /USAL, chefiado pelo Prof. Doutor Alberto Orfão, é um laboratório de referência a nível mundial, com experiência inigualável em numerosas aplicações da citometria em diversas áreas, incluindo a Imunologia e a Hematologia.

Nos últimos anos, estes dois LC têm colaborado em numerosos estudos no âmbito da caracterização das doenças linfoproliferativas de LT e de CNK.

No LC do SHC do HSA/CHP, foi efectuada a caracterização fenotípica das CNK em diversas situações normais (CNK CD56<sup>+fraco</sup> e CD56<sup>+forte</sup> do SP) (4) e patológicas – CNK activadas em resposta a infeções agudas, infeções crónicas e tumores (22,23) e CNK neoplásicas (24). Durante o trabalho experimental, foi observado que no SP de indivíduos normais se encontrava, por vezes, uma população de CNK com características fenotípicas intermédias entre as CNK CD56<sup>+fraco</sup> e as CNK CD56<sup>+forte</sup>, estando esta população aumentada em alguns doentes com linfocitose de CNK (resultados não publicados). Assim, na tentativa de melhor compreender estes fenómenos, postulou-se que, na presença de determinados estímulos, as CNK CD56<sup>+fraco</sup> podiam dar origem às CNK CD56<sup>+forte</sup> e/ou vice-versa, sendo esta a hipótese que se pretende testar com este trabalho.

### ***Problemas***

A diferenciação terminal das CNK está pouco esclarecida, sendo ainda controversa a relação entre as duas populações maioritárias de CNK identificadas no SP: CD56<sup>+fraco</sup> e CD56<sup>+forte</sup>.

## Questões

São várias as questões a investigar:

- É possível a interconversão entre os subtipos de CNK  $CD56^{+fraco}$  e  $CD56^{+forte}$  presentes no SP?
- Essa interconversão é unidireccional ( $CD56^{+fraco} \rightarrow CD56^{+forte}$ ;  $CD56^{+forte} \rightarrow CD56^{+fraco}$ ) ou bidireccional ( $CD56^{+fraco} \leftrightarrow CD56^{+forte}$ )?
- Essa interconversão é mediada por factores solúveis, nomeadamente citocinas?
- Que citocinas desempenham um papel importante nesse processo?

## Hipóteses de trabalho

A interconversão entre os subtipos de CNK  $CD56^{+forte}$  e  $CD56^{+fraco}$  do SP: é possível; é bidireccional; pode ser demonstrada *in vitro*, através da estimulação das CNK com diferentes tipos de citocinas; pode ser avaliada através do estudo imunofenotípico das CNK, sendo possível obter populações de CNK com características fenotípicas intermédias entre os dois subtipos de CNK acima referidos.

## Objetivos

Neste trabalho pretendemos estudar a diferenciação terminal das CNK, nomeadamente verificar a hipótese de conversão recíproca entre as CNK  $CD56^{+fraco}$  e  $CD56^{+forte}$  do SP, após estimulação *in vitro* com citocinas envolvidas na ativação, maturação e diferenciação terminal das CNK.

Os objectivos principais são os seguintes: aprofundar conhecimentos sobre a diferenciação terminal das CNK; avaliar a possibilidade de interconversão entre as CNK  $CD56^{+fraco}$  e  $CD56^{+forte}$ ; determinar quais as citocinas envolvidas neste processo.

## Desenho

### Tipo de estudo

Estudo nacional e institucional, de carácter analítico, observacional e transversal, de natureza laboratorial.

### Fases do estudo

O estudo será desenvolvido em duas fases, que visam dar resposta aos objectivos propostos:

- Na 1ª fase será avaliada a ação de diferentes citocinas nas características fenotípicas das CNK totais presentes no SP.
- Na 2ª fase será feito o *sorting* (por separação magnética ou por citometria de fluxo) das duas populações de CNK  $CD56^{+fraco}$  e  $CD56^{+forte}$ , e será estudada a ação das mesmas citocinas em cada uma das populações de CNK.



### **Universo, população e amostra**

Universo: Indivíduos adultos normais.

População: Dadores benévolos de sangue do SHC do HSA/CHP.

Amostra: 1ª fase do estudo: 6 indivíduos; 2ª fase do estudo: 6 indivíduos.

### **Seleção dos participantes e critérios de elegibilidade**

A seleção será não probabilística, de conveniência.

Critérios de inclusão: Ser dador de sangue do SHC do HSA/CHP; Concordar em participar no estudo, assinando termo de consentimento informado.

Critérios de exclusão: Ser a primeira dádiva de sangue.

### ***Plano de trabalho***

Apresentam-se, de seguida as principais tarefas associadas ao projeto e o material e métodos:

#### **Tarefas associadas ao projeto**

Durante a execução do projeto estão previstas as seguintes tarefas:

TAREFA 1 – Consentimento informado e colheita de amostras de SP.

TAREFA 2 – Culturas de células mononucleadas de SP.

TAREFA 3 – Culturas de CNK CD56<sup>+fraco</sup> e CD56<sup>+forte</sup> de SP.

#### **TAREFA 1 – Consentimento informado e colheita de amostras de SP**

- Duração: 8 meses.
- Datas previstas para o início e conclusão: 01-08-2011 a 31-11-2011 e 01-01-2012 a 31-04-2012.
- Instituições, Departamentos e Serviços: HSA/CHP – DM – SHC, Dadores de Sangue.
- Investigadores: Marlene Santos; Margarida Calejo; Margarida Lima.
- Colaboradores: Enfermeiras dos Dadores de Sangue.
- Objetivos:
  - Informar os dadores de sangue e solicitar a participação no estudo;
  - Assinar o termo de consentimento informado;
  - Fazer a colheita das amostras de sangue.
- Descrição:
  - Os dadores de sangue serão informados sobre o estudo e será solicitada a sua participação;
  - Será dado o folheto informativo sobre o estudo;
  - Será assinado o termo de consentimento informado;
  - Serão colhidas as amostras de SP.

- Distribuição de tarefas, funções e responsabilidades:

Investigador	Tarefas/Funções/Responsabilidades
Marlene Santos Magdalena Leander	Informação do médico de serviço nos Dadores de Sangue Solicitação de colheita das amostras de sangue às enfermeiras dos dadores de Sangue
Enfermeiras de serviço nos Dadores de Sangue	Colheita das amostras de sangue
Investigador responsável ou Médico de serviço nos Dadores de Sangue	Informação dos dadores de sangue, distribuição do folheto informativo e assinatura do termo de consentimento informado
Margarida Lima	Supervisão
Margarida Calejo	Colaboração nas tarefas acima descritas

Nota: Este procedimento aplica-se às colheitas de amostras de sangue aos dadores de sangue do HSA/CHP.

### **TAREFA 2 – Culturas de células mononucleadas de sangue periférico**

- Duração: 4 meses.

- Datas previstas para o início e conclusão: 01-08-2011 a 31-11-2011.

- Instituições, Departamentos e Serviços: HSA/CHP – DM – SHC – LC.

- Investigadores: Marlene Santos; Magdalena Leander; Margarida Calejo; Margarida Lima.

- Objectivos:

Avaliar a diferenciação terminal das CNK na presença de citocinas e a possibilidade de interconversão entre as CNK CD56<sup>+fraco</sup> e CD56<sup>forte</sup>;

Optimizar as condições experimentais e identificar as citocinas mais relevantes neste processo.

- Descrição:

A partir das amostras de SP, serão separadas as células mononucleadas (linfócitos e monócitos);

As células mononucleadas do SP serão cultivadas *in vitro*, na presença de diferentes citocinas, em diferentes combinações;

Em diferentes tempos de cultura, será estudado o perfil fenotípico das CNK, por citometria de fluxo.

Os procedimentos laboratoriais são descritos com mais detalhe na secção “Material e Métodos”.

- Distribuição de tarefas, funções e responsabilidades:

Investigador	Tarefas/Funções/Responsabilidades
Marlene Santos Magdalena Leander	Separação das células mononucleadas Cultura das células mononucleadas Imunofenotipagem das CNK Análise dos resultados
Margarida Lima	Supervisão do estudo Análise e interpretação dos resultados
Margarida Calejo	Colaboração nas tarefas acima descritas

### **TAREFA 3 – Culturas de CNK CD56<sup>+fraco</sup> e CD56<sup>+forte</sup> de sangue periférico**

- Duração prevista: 4 meses.

- Datas previstas para o início e conclusão: 01-01-2012 a 31-04-2012.

- Instituições, Departamentos e Serviços: HSA/CHP – DM – SHC – LC ou CIC/USAL – LC.

- Investigadores: Margarida Calejo; Margarida Lima; Maria Jara; Julia Almeida; Alberto Orfão.

- Objectivos:

Induzir a diferenciação terminal das CNK e a interconversão entre as CNK CD56<sup>+fraco</sup> e CD56<sup>+forte</sup>, usando CNK purificadas.

- Descrição:

Proceder-se-á à separação das CNK CD56<sup>+</sup> em duas populações purificadas (CD56<sup>+fraco</sup> e CD56<sup>+forte</sup>) por separação magnética ou por citometria fluxo;

As duas populações de CNK purificadas – CD56<sup>+fraco</sup> e CD56<sup>+forte</sup> – serão separadamente cultivadas *in vitro*, na presença de diferentes tipos / combinações de citocinas;

Em tempos diferentes de cultura, será estudado o perfil fenotípico das CNK, por citometria de fluxo.

Os procedimentos laboratoriais são descritos com mais detalhe na secção “Material e Métodos”.

- Distribuição de tarefas, funções e responsabilidades:

Investigador	Tarefas/Funções/Responsabilidades
Maria Jara	<i>Sorting</i> das CNK
Margarida Lima Julia Almeida	Cultura das CNK Imunofenotipagem das CNK Análise e interpretação dos resultados
Margarida Calejo	Participação nas tarefas acima descritas
Todos	Análise e interpretação dos resultados

## ***Material e métodos***

### **Equipamento, material e reagentes**

#### **Equipamento**

Será usado o equipamento disponível nos LC das duas instituições envolvidas no estudo e mencionados na Tabela 1.

**Tabela 1: Equipamento**

<b>Grande equipamento</b>	Estufa CO <sub>2</sub> 37°C
Arca congeladora -80°C	Frigoríficos
Câmara estéril	Separador magnético de células
Centrífugas refrigeradas	<b>Pequeno equipamento</b>
Citómetros de fluxo (analisador e <i>sorter</i> )	Câmara de Newbauer
Contador hematológico automático	Micropipetas automáticas

**Reagentes e material consumível**

Serão usados os reagentes e materiais consumíveis mencionados na Tabela 2.

**Tabela 2: Reagentes e material consumível**

<b>Finalidade</b>	<b>Descrição</b>	<b>Fabricante</b>
Colheita de sangue	Tubo de vidro CPT, heparina, 8 ml	Becton Dickinson
Lavagem e suspensão células	Tampão fosfato-salino (PBS)	Sigma
Lise e fixação células	FACSlising	Becton Dickinson
Separação magnética das CNK	CD56 Microbeads	Miltenyi Biotec
Culturas celulares	Meio de cultura RPMI160	Sigma
	Soro bovino fetal	Sigma
	L-Glutamina	Sigma
	Penicilina / estreptomicina	Sigma
	Fitohemaglutinina	Sigma
	IL-2	Miltenyi Biotec
	IL-12	Miltenyi Biotec
	IL-15	Miltenyi Biotec
	IL18	R&D Systems
	IL-21	Miltenyi Biotec
Imunofenotipagem das CNK (AcMo)	anti-CD16 (PB)	Coulter / Immunotech
	anti-CD45 (PO)	Caltag
	anti-CD62L (FITC)	Coulter / Immunotech
	anti-CD181 (PE)	Antibodies on-line
	anti-CD197 (PERCP-Cy5.5)	Antibodies on-line
	anti-CD56 (PE-Cy7)	Coulter / Immunotech
	anti-CD94 (APC)	Becton Dickinson / Pharmingen
	anti-CD3 (APC-H7)	Becton Dickinson / Pharmingen
Material consumível	Placas de cultura	Não aplicável
	Tubos de 5 e de 15 ml	Não aplicável
	Pipetas Pasteur estéreis	Não aplicável
	Pontas para pipetas estéreis	Não aplicável

## **Procedimentos técnicos**

### **Colheita de sangue e isolamento de células mononucleadas:**

O SP será colhido em tubo de vidro com vácuo tipo "CPT" que já contém anticoagulante (heparina sódica) e gradiente de densidade de 1.077 (tipo Ficoll-Hypaque), separados por uma barreira de gel de poliéster, que permite simultaneamente a colheita de sangue e a separação das células mononucleadas por centrifugação. Alternativamente, o procedimento será efectuado a dois tempos: colheita de sangue em tubo de vidro com vácuo, contendo apenas anticoagulante (heparina sódica), seguida de separação das células mononucleadas, por centrifugação, em tubo com gradiente com densidade de 1.077 (Lymphoprep™).

### **Culturas celulares**

As células (células mononucleadas ou CNK purificadas) serão cultivadas, com concentração de 1,0 a 2,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, por 5 dias, em culturas incubadas a 37°C com uma tensão de 5% de CO<sub>2</sub>.

O meio de cultura será o RPMI 1640 completo, suplementado com 15% de soro bovino fetal, 1% de solução de antibióticos (penicilina/ estreptomicina), 2mM de L-glutamina.

Para estímulo da proliferação/diferenciação terminal das CNK, serão usadas diferentes citocinas, isoladamente e/ou em combinação: IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21.

Em tempos diferentes de cultura (dias 0, 1, 3 e 5), as células serão retiradas, lavadas em tampão salino/fosfato (PBS, *phosphate buffered saline*) por centrifugação a 1.500 rpm, 10 min, a 4°C, e suspendidas em PBS. De seguida, as células serão contadas em câmara de Neubauer, a sua concentração celular será ajustada e proceder-se-á à imunofenotipagem.

### **Imunofenotipagem**

A imunofenotipagem das CNK será efectuada por técnica de imunomarcção directa, usando combinações de anticorpos monoclonais (AcMo) com diferentes especificidades (anti-CD3, anti-CD16, anti-CD45, anti-CD56, anti-CD62L, anti-CD94, anti-CD181, anti-CD197) conjugados com diferentes fluorocromos (PB, *Pacific Blue*; PO, *Pacific Orange*; FITC, *Fluorescein isothiocyanate*; PE, *Phycoerythrin*; PercP-Cy5.5, *Peridin chlorophyll protein-Cyanine 5.5*; PE-Cy7, *Phycoerythrin-Cyanine 7*; APC, *Allophycocyanin*; APC-H7, *Allophycocyanin-Cyanin-7*). Para a lise dos eritrócitos e fixação dos leucócitos será usado o reagente *FACSlising*® (Becton Dickinson, BD), de acordo com as instruções do fornecedor.

As amostras serão lidas no citómetro de fluxo *FACScanto System II* (BD), com 3 lasers: um laser azul (488 nm), um laser vermelho (633 nm) e um laser violeta (405 nm).

Para a análise dos resultados será usada a aplicação informática *Infinicyt* (Cytognos).

**Tabela 3. Combinações de anticorpos monoclonais para caracterização fenotípica das CNK**

Fluorocromo	PB	PO	FITC	PE	PercP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Especificidade	CD16	CD45	CD62L	CD181	CD197	CD56	CD94	CD3

## **Calendarização**

### **Duração**

Global: 22 meses

Execução: 8 meses

### **Datas de início e conclusão**

Global: Outubro de 2010 a Julho de 2012

Execução: Agosto de 2011 a Abril de 2012

### **Cronograma de execução**

ANO	2010			2011												2012							
	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	
Mês																							
Escolha do tema e do assunto	x																						
Identificação dos problemas/questões		x	x																				
Revisão bibliográfica/concepção do estudo	x	x	x	x																			
Elaboração do proposta de projeto			x	x	x	x	x																
Submissão à aprovação								x	x														
Apresentação da proposta									x	x													
Execução do projeto											x	x	x	x		x	x	x	x				
Análise e interpretação dos resultados														x	x				x	x			
Apresentação dos resultados																						x	x
Provas de dissertação do MIM																							x

## ***Indicadores de produção***

### **Comunicações orais e posters**

- Apresentação oral da proposta em reunião do SHC do HSA/CHP (Maio / Junho de 2011)
- Apresentação oral da proposta nas 3ª JIIC (1 de Julho de 2011)
- Apresentação oral dos resultados nas 4ª JIIC (Junho / Julho 2012)
- Apresentação dos resultados na forma de poster, em congressos (ex. reuniões da Sociedade Portuguesa de Imunologia e/ou Hematologia (2012)

### **Trabalhos escritos**

- Proposta de projeto de investigação (2011)
- Dissertação de MIM (2012)



## **Referências bibliográficas**

1. Farag SS, Caligiuri MA, Human natural killer cell development and biology. *Blood* 2006; 20, 123-137
2. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008; 112: 461-469
3. Ferlazzo G, Münz C. NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *J Immunol*. 2004; 172: 1333-1339.
4. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*. 2001;22:633–640.
5. Lima M, Teixeira MA, Queirós ML, Leite M, Santos AH, Justiça B, Orfao A. 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; 27:731-43.
6. Poli A, Michel T, Theresine M, Andres E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 2009; 126:458–465.
7. Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G, Sykora KW, Schmidt RE. CD56bright NK cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol*. 2001; 31:3121–6.
8. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Turner SC, Chen KS, Ghaehri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset. *Blood* 2001; 97:3146–51.
9. Bruceton YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Activation, coactivation and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev*. 2006; 214:73-81
10. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003; 101: 3052–7.
11. Campbell JJ, Qin S, Unutmaz D, Soler D, Murphy KE, Hodge MR, Wu L, and Butcher EC. Unique subpopulations of CD56<sup>+</sup> NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J. Immunol*. 2001; 166: 6477–6482.
12. Ferlazzo G, D. Thomas, S.-L. Lin, K. Goodman, B. Morandi, W. A. Muller, A. Moretta, and C. Münz. 2003. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J. Immunol*. 2004; 172:1455.
13. Berahovich RD, Lai NL, Wei Z, Lanier LL, Schall TJ: Evidence for NK-cell subsets based on chemokine receptor expression. *J Immunol*. 2006; 177: 7833-7840.
14. Maghazachi AA. The role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010; 341:37-58.
15. Freud AG, Becknell B, Roychowdhury S, Mao HC, Ferketich AK, Nuovo GJ, Hughes TL, Marburger TB, Sung J, Baiocchi RA, Guimond M, Caligiuri MA. A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity* 2005; 22: 295-304.
16. Freud AG, Yokohama A, Becknell B, Lee MT, Mao HC, Ferketich AK e Caligiuri MA. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J. Exp. Med*. 2006; 203: 1033-1043.
17. Romagnani C, Juelke K, Falco M et al. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol* 2008; 178:4947-55.

18. Chan A, Hong DL, Atzberger A, Kollnberger S, Filter AD, Buckley CD, McMichael A, Enver T and Bowness P, CD56<sup>high</sup> human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblast. *J Immunol* 2007; 179:89-94.
19. Béziat , Descours B, Parizot C, Debré P, Vieillard V. NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS One*. 2010; 5(8):e11966
20. Keskin DB, Allan DS, Rybalov B, Andzelm MM, Stern JN, Kopcow HD, Koopman LA, Strominger JL. TGFb promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16) NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2007; 104:3378–83.
21. Loza MJ, Perussia B. The IL-12 signature: NK cell terminal CD56+high stage and effector functions. *J Immunol* 2004; 172:88–96.
22. Lima M, Almeida J, dos Anjos Teixeira M, Queirós ML, Justiça B, Orfão A. The "ex vivo" patterns of CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO, and CD11a/HLA-DR expression identify acute/early and chronic/late NK-cell activation states. *Blood Cells Mol Dis*. 2002; 28:181-90.
23. Lima M, Almeida J, Teixeira MA, Santos AH, Queirós ML, Fonseca S, Moura J, Gonçalves M, Orfão A, Pinto Ribeiro AC. Reactive phenotypes after acute and chronic NK-cell activation. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2004;18:331-4.
24. Lima M, Almeida J, Montero AG, Teixeira Mdos A, Queirós ML, Santos AH, Balanzategui A, Estevinho A, Algueró Mdel C, Barcena P, Fonseca S, Amorim ML, Cabeda JM, Pinho L, Gonzalez M, San Miguel J, Justiça B, Orfão A. Clinicobiological, immunophenotypic, and molecular characteristics of monoclonal CD56-/+dim chronic natural killer cell large granular lymphocytosis. *Am J Pathol*. 2004; 165:1117-27.
25. Yu J, Mao HC, Wei M, Hughes T, Zhang J, Park IK, Liu S, McClory S, Marcucci G, Trotta R, Caligiuri MA: CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets. *Blood*. 2010, 115:274-281.
26. Zwirner N, Domaica C. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors*. 2010: 274-88.
27. Becknell B, Caligiuri M. Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv. Immunol*. 86, 209-239.
28. Chaix J, Tessmer MS, Hoebe K, Fuséri N, Ryffel B, Dalod M, Alexopoulou L, Beutler B, Brossay L, Vivier E, Walzer T. Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18. *J Immunol*. 2008. 181:1627-31.
29. Wendt K, Wilk E, Buyny S, Schmidt RE and Jacobs R. Interleukin-21 differentially affects human natural killer cell. *Immunology*. 2007. 122: 486-495.
30. Sivori S, Cantoni C, Parolini S, Marcenaro E, Conte R, Moretta L and Moretta A. IL-21 induces both rapid maturation of human CD34<sup>+</sup> cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors. *Eur. J. Immunol*. 2003. 33: 3439-3447

## Plano Financeiro

### *Orçamento*

Não serão efectuadas consultas, internamentos ou exames no CHP, pelo que não haverá despesas para esta instituição.

Todos os procedimentos laboratoriais efectuados no LC do SHC do HSA/CHP são de investigação (não codificados pela tabela do SNS), pelo serão efectuados com reagentes comprados especificamente para o estudo de investigação.

	Custo estimado (€)
Reagentes e material consumível de laboratório	6.700,00
Impressão de poster para apresentação de resultados	50,00
Inscrição aluno em congresso médico	200,00
Organização das Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica	50,00
<b>TOTAL</b>	<b>7.000,00</b>

### *Financiamento*

O estudo terá duas fontes de financiamento:

- a) Bolsa atribuída pelo ICBAS/UP à DIIC – 3.500,00 euros.
- a) Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB) – 3.500,00 euros.

## Glossário

### ***Abreviaturas e acrónimos***

ADCC, *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*, Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos

APC, *Allophycocyanin*, Alofococianina

APC, *Antigen Presenting Cell*, Célula Apresentadora de Antígenos

APC-H7, *Allophycocyanin-Cyanin-7*, Alofococianina-Cianina 7

CHP, Centro Hospitalar do Porto

CIC, Centro de Investigación del Cancer

CNK, Células *natural killer*

DIIC, Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica

DM, Departamento de Medicina do HSA/CHP

FITC, *Fluorescein isothiocyanate*, Isotiocinato de fluoresceína

GM-CSF, *Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor*, Factor Estimulador de Colónias de Granulócitos e Monócitos

HUS, Hospital Universitário de Salamanca

HLA, *Human Leukocyte Antigens*

HSA, Hospital de Santo António

ICBAS, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

IFN- $\gamma$ , Interferão gama

IL, Interleucinas, o mesmo que citocinas

JIIC, Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica

KIR, *Killer cell Immunoglobulin like Receptors*, Recetores Killer semelhantes às Imunoglobulinas

KLR, *Killer cell Lectin type Receptors*, Recetores Killer do tipo das Lectinas

LB, Linfócitos B

LC, Laboratório de Citometria

LT, Linfócitos T

MHC, *Major Histocompatibility Complex*, Complexo Maior de Histocompatibilidade

MIM, Mestrado Integrado em Medicina

NCAM, *Neuronal Cell Adhesion Molecule*, Molécula de Adesão das Células Neuronais

NCR, *Natural Cytotoxicity Receptors*, Recetores de Citotóxicidade Natural

NK, *Natural Killer*, “Assassinas naturais”

PB, *Pacific Blue*, Azul pacífico

PBS, *Phosphate Buffered Saline*, Tampão Fosfato Salino

PE, *Phycoerythrin*, Ficoeritrina

PE-Cy7, *Phycoerythrin-Cyanine 7*, Ficoeritrina-Cianina 7

PercP-Cy5.5, *Peridin chlorophyll protein-Cyanine 5.5*, Proteína peridina clorofila -Cianina 5.5

PO, *Pacific Orange*, Laranja pacífico

SHC, Serviço de Hematologia Clínica do HSA/CHP

SP, Sangue periférico

TNF- $\beta$ , *Tumor Necrosis Factor beta*, Factor de necrose tumoral beta

UP, Universidade do Porto

USAL, Universidade de Salamanca

## **Termos técnicos**

### **Recetores celulares**

Descrevem-se as principais características das moléculas que vão ser avaliadas neste estudo para identificar as CNK e diferenciar as populações de CNK CD56<sup>+fraco</sup> e CD56<sup>+forte</sup>.

- **CD45 (Antigénio panleucocitário)** – Proteína transmembranar expressa em todas as células hematopoiéticas excepto eritrócitos, plaquetas e plasmócitos, servindo para identificar células hematopoiéticas nas amostras analisadas.
- **CD3** – Complexo de proteínas transmembranares que funciona como corecetor transdutor de sinal do recetor do LT (TCR, *T-Cell Recetor*). É expresso nos LT e não tem expressão nas CNK.
- **CD56 (NCAM, Neural Cell Adhesion Molecule)** – Molécula de adesão expressa nas células neuronais e em algumas células hematológicas, em particular nas CNK e nos LT citotóxicos. Nas CNK, pode ter uma densidade de expressão variável, que permite distinguir duas subpopulações de CNK: CD56<sup>+fraco</sup> e CD56<sup>+forte</sup>.
- **CD16 (Fc $\gamma$  RIII, Fc gamma Receptor type III)** – Recetor de baixa afinidade para o fragmento Fc da IgG. Intervém na função de citotoxicidade mediada por anticorpos. É expresso por CNK, macrófagos e neutrófilos. Nas CNK, é expresso predominantemente pelas CNK CD56<sup>+fraco</sup>.
- **CD62L (Selectina L)** – Molécula de adesão celular expressa por LB, LT, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e CNK. Actua como um recetor de *homing* dos leucócitos para os órgãos e tecidos linfóides secundários. Nas CNK, é expressa predominantemente pelas CNK CD56<sup>+forte</sup> que se encontram no SP, enquanto se verifica expressão fraca nas CD56<sup>+fraco</sup> (6).
- **CD94 (KLRD1, Killer cell Lectin-like Receptor subfamily D, member 1)** – Proteína membranar relacionada com a superfamília das lectinas tipo C e que se associa covalentemente com 5 recetores diferentes da família NKG2: NKG2A, B, C, E e H, formando heterodímeros

CD94/NKG2. O ligando natural destes heterodímeros é a molécula HLA-E (MHC classe I, não clássico) e a sua ação pode ser inibitória ou ativadora, dependendo da molécula de NKG2 presente. O CD94 é expresso em alguns LT CD8+ e nas CNK, sendo expresso por quase todas as CNK CD56<sup>+forte</sup> e por uma fração das CNK CD56<sup>+fraco</sup> (25).

- **CD181 (CXCR1, C-X-C Chemokine Receptor type 1, ou IL8RA, Interleukin-8 Receptor A** – Recetor para quimiocinas da família CXC, cujo principal ligando é a IL-8, conferindo propriedades de migração para zonas de inflamação aguda. É expresso maioritariamente pelos neutrófilos e, nas CNK, é expresso quase exclusivamente pelas células CD56<sup>+fraco</sup>/CD16<sup>+</sup>.
- **CD197 (CCR7, C-C Chemokine Receptor type 7)** – Recetor para quimiocinas da família das CC, tem como principal ligando o ELC (*EBI-1-Ligand Chemokine*) e promove a migração para os órgãos e tecidos linfóides secundários. É expresso em LT, células dendríticas e CNK. Nestas últimas, expressa-se exclusivamente nas CNK CD56<sup>+forte</sup>, estando ausente nas CNK CD56<sup>+fraco</sup>.

## Citocinas

Descrevem-se as principais funções das citocinas que vão ser usadas neste estudo para induzir a diferenciação terminal das CNK.

- **IL-2 (Interleucina-2)** – É um potente factor de crescimento linfóide, produzido pelos LT ativados, especialmente pelos LT CD4+ e por células dendríticas activadas. Promove a proliferação e diferenciação de LT, CNK e LB e está envolvida na eliminação de LT auto-reactivos. Actua através de um recetor, o IL-2R, que nas CNK CD56<sup>+forte</sup> é um recetor de alta afinidade (IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ ) e nas CNK CD56<sup>+fraco</sup> é um recetor de afinidade intermédia (IL-2R $\beta\gamma_c$ ). A IL-2 actua sobre as CNK induzindo a sua expansão e estimulando a sua função citolítica (26).
- **IL-12 (Interleucina-12)** – É uma citocina pró-inflamatória e moduladora da imunidade celular, produzida por macrófagos e LB e LT periféricos activados por patogéneos. Tem ação principal sobre as CNK e os LT, estimulando a produção de citocinas como IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$ , induzindo a citotoxicidade e estimulando a proliferação. Nas CNK, principalmente nas CD56<sup>+forte</sup>, a IL-12 é um dos dois estímulos essenciais para a produção de IFN- $\gamma$ , sendo o outro, uma outra citocina (IL-1, IL-2, IL-15 ou IL-18) ou a ligação de um recetor activador (2).
- **IL-15 (Interleucina-15)** – É um potente fator de crescimento linfóide, sendo produzido por células dendríticas activadas e macrófagos. Muitos dos seus efeitos são semelhantes aos da IL-2, uma vez que os seus recetores têm estruturas semelhantes. Nas CNK, a IL-15 é crucial para diferenciação completa na medula óssea e a apresentação de IL-15 pelas células do estroma da promove a sobrevivência das CNK e induz a expressão de recetores importantes no

desenvolvimento destas (26). Para além disso, promove a proliferação das CNK à custa do subtipo CD56<sup>+forte</sup> e citotoxicidade principalmente do subtipo CD56<sup>+fraco</sup> (27).

- **IL-18 (Interleucina-18)** – É uma citocina pró-inflamatória e nas CNK está envolvida na estimulação da migração, contribuindo para o contacto com as células dendríticas. Para além disso, tem um papel no *priming* das CNK, nomeadamente facilitando a produção de IFN- $\gamma$  após co-estimulação com IL-12 (28).
- **IL-21 (Interleucina-21)** – É uma citocina com efeitos pleiotrópicos em vários tipos celulares. É produzida por células dendríticas e LT Th17 e que actua sobre os LB, LT, células dendríticas e CNK, sendo que nestas últimas, o recetor da IL-21 tem igual distribuição nas CD56<sup>+fraco</sup> e CD56<sup>+forte</sup>. A IL-21 aumenta a citotoxicidade e sobrevivência das CNK, bem como a produção de IFN- $\gamma$ , na presença de IL-15 e IL-18 (26). Parece afetar de forma diferente as duas subpopulações de CNK, promovendo mais a proliferação nas CD56<sup>+forte</sup> e a citotoxicidade nas CD56<sup>+fraco</sup> (29). Para além disso, durante a diferenciação a partir *stem cells* hematopoiéticas CD34<sup>+</sup>, a cultura com IL-21 (e outros mediadores) parece favorecer a formação de células CD56<sup>+fraco</sup>, enquanto a ausência de IL-21 ocorre preferencialmente a formação de células CD56<sup>+forte</sup> (30).

# ANEXOS | Proposta de Projeto

- Termo de consentimento informado (Dadores de sangue)
- Folheto informativo (Dadores de sangue)
  
- Folha de rosto
- Pedidos de autorização local
- Termos de autorização local
- Termos de responsabilidade



## ***Termo de consentimento informado***

### **DIFERENCIAÇÃO TERMINAL DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER***

Eu, abaixo-assinado \_\_\_\_\_  
(NOME COMPLETO DO INDIVÍDUO PARTICIPANTE DO ESTUDO)

Fui informado de que o Estudo de Investigação acima mencionado se destina a aprofundar os conhecimentos sobre a diferenciação terminal das células *natural killer*.

Sei que neste estudo está prevista a realização de uma colheita de duas amostras de sangue num total de 10mL, integrada no processo de colheita para doação de sangue, tendo-me sido explicado em que consistem e quais os seus possíveis efeitos.

Sei que essas amostras de sangue vão ser utilizadas para fazer as análises que fazem parte deste estudo.

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos Participantes neste estudo são confidenciais e que será mantido o anonimato.

Sei que posso recusar-me a participar ou interromper a qualquer momento a participação no estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado.

Concordo que sejam efetuadas colheitas das amostras de sangue para realizar as análises que fazem parte deste estudo.

Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do Participante no estudo:

\_\_\_\_\_, dador de sangue nº \_\_\_\_\_

Data

\_\_/\_\_/\_\_

Assinatura

\_\_\_\_\_

Nome do Médico Responsável ou Nome do Investigador Responsável

\_\_\_\_\_

Data

\_\_/\_\_/\_\_

Assinatura

\_\_\_\_\_

## ***Folheto informativo para os participantes***

Caro dador de sangue,

O meu nome é Margarida Calejo e sou aluna do 5º ano de Mestrado Integrado em Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar / Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António.

Com a supervisão da Dra. Margarida Lima do Serviço de Hematologia Clínica deste Hospital, estou a realizar o presente estudo, intitulado DIFERENCIAÇÃO TERMINAL DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER*, no âmbito da minha dissertação final de Mestrado Integrado em Medicina.

Este trabalho de investigação, para o qual solicitamos a sua participação, tem como objectivo aprofundar conhecimentos sobre a maturação de um tipo de células sanguíneas, as células *natural killer*, que têm um papel importante na defesa do organismo, por exemplo, contra as infecções víricas e contra os tumores.

Para realizar as análises que fazem parte deste estudo (que não incluem estudos genéticos), temos necessidade de amostras de sangue de indivíduos saudáveis e, por isso, pedimos-lhe que autorize a colheita de duas amostras do seu sangue.

A participação neste estudo tem benefícios e também não acarreta riscos para si. Indirectamente, poderá estar a contribuir para aprofundarmos o conhecimento dos mecanismos que permitem defender-nos das infecções e dos tumores.

Se tiver qualquer questão ou dúvida em relação ao estudo, não hesite em me contactar.

Agradeço mais uma vez a sua participação!

Cumprimentos

Margarida Calejo

**Folha de rosto****TÍTULO**

DIFERENCIAÇÃO TERMINAL DAS CÉLULAS NATURAL KILLER

**CLASSIFICAÇÃO**

Trabalho Académico de Investigação ■ Conferidor de grau ■ (Mestrado ■)

**VERSÃO**

Novo ■

**CALENDARIZAÇÃO**Data início: Outubro / 2010 Data conclusão: Julho / 2012 PRAZO A CUMPRIR: Julho de 2011  
(Execução: Outubro / 2011 Data conclusão: Dezembro / 2011)**ALUNOS E ORIENTADORES****Aluno**

MARGARIDA CALEJO

Estudante, aluna do 5º Ano do Mestrado Integrado em Medicina, Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto; (+351) 96 383 3391; mg\_calejo@hotmail.com / mgcalejo@gmail.com.

**Orientadores****ORIENTADORA:**

MARGARIDA LIMA

Médica, Imunohemoterapeuta, Laboratório de Citometria, Serviço de Hematologia Clínica, Departamento de Medicina; (+351) 966 327 115; [mmc.lima@clix.pt](mailto:mmc.lima@clix.pt)**Consultores**

ALBERTO ORFÃO

Médico, Hematologista, Investigador, Laboratório de Citometria, Centro de Investigacion del Cancer; Professora Universitária, Universidade de Salamanca; Salamanca, Espanha.

JÚLIA ALMEIDA

Médica, Hematologista, Investigadora, Laboratório de Citometria, Centro de Investigacion del Cancer; Professora Universitária, Universidade de Salamanca; Salamanca, Espanha.

**Supervisor**

MARGARIDA LIMA

Médica, Professora Auxiliar Convidada, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar / Universidade do Porto; Responsável pela Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica, Directora do Departamento de Ensino e Investigação do Centro Hospitalar do Porto. [director.defi@hgsa.min-saude.pt](mailto:director.defi@hgsa.min-saude.pt)**PROMOTOR** O próprio ■**INSTITUIÇÕES E SERVIÇOS****Unidades, Departamentos e Serviço do CHP**

Laboratório de Citometria, Serviço de Hematologia Clínica, Departamento de Medicina.

**Outras Instituições intervenientes**

Laboratório de Citometria, Centro de Investigacion del Cancer, Universidad de Salamanca, Salamanca, Espanha.

**CARACTERÍSTICAS do estudo****Alvo do estudo:**Humanos **Países / Instituições envolvidos:**Nacional Institucional **Natureza do estudo :**Laboratorial **Características do estudo (desenho)**Analítico Observacional Transversal **Participantes:**Existência grupo controlo: Não Seleção dos Participantes: Não aleatória **Estudos observacionais:**Tipo: Outro **Estudos experimentais:**Não se aplica **Outros aspectos relevantes para a apreciação do estudo:**

Participação de grupos vulneráveis Não

Convocação de doentes / participantes Não

Consentimento informado Sim

Realização de inquéritos / questionários Não  (Contacto Investigadores / Participantes: Sim )

Realização de entrevistas Sim

Colheita de produtos biológicos Sim  (CHP ) (sangue)

Armazenamento de produtos biológicos Não

Criação de bancos de produtos biológicos Não

Realização de exames / análises Sim  (CHP ) (análises)

Realização de estudos genéticos Não

Recolha de dados Não

Criação de bases de dados Não

Saída para outras instituições Não

**ORÇAMENTO E FINANCIAMENTO**Orçamento total: 7.000,00 Euros Contrato financeiro em anexo: Não  Sim 

Financiamento: Interno (CHP) 0,00 Euros Externo (Outros) 7.000,00 Euros

Entidade financiadora: ICBAS/UP (Bolsa atribuída à DIIC) e UMIB/ICBAS/UP

**INDICADORES**

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina

Data: \_\_\_\_\_ Assinatura do proponente (Investigador Responsável / Aluno): \_\_\_\_\_

/ / \_\_\_\_\_

***Pedidos de autorização institucional***

Trabalho Académico de Investigação: **DIFERENCIAÇÃO TERMINAL DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER***

**Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Administração do CHP, Dr. Pedro Esteves**

MARGARIDA CALEJO, na qualidade de aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/UP, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no CHP o estudo de investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data                      Assinatura  
/   /                      \_\_\_\_\_

**Exma. Senhora Presidente da Comissão de Ética do CHP, Dr.ª Luísa Bernardo**

MARGARIDA CALEJO, na qualidade de aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/UP, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no CHP o estudo de investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data                      Assinatura  
/   /                      \_\_\_\_\_

**Exma. Senhora Directora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP,**  
Prof. Doutora Margarida Lima

MARGARIDA CALEJO, na qualidade de aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/UP, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. a autorização para realizar no CHP o estudo de investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data                      Assinatura  
/   /                      \_\_\_\_\_

Trabalho Académico de Investigação: **DIFERENCIAÇÃO TERMINAL DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER***

**Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Directivo do ICBAS/UP, Prof. Doutor António Sousa Pereira**

MARGARIDA CALEJO, na qualidade de aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/UP, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. a atribuição de 3.500,00€ (três mil e quinhentos euros) da Bolsa de Iniciação à Investigação Clínica ICBAS/UP, para financiar o estudo de investigação acima mencionado, de acordo com o orçamento apresentado.

Data

/ /

Assinatura

\_\_\_\_\_

**Termos de autorização local**Trabalho Académico de Investigação: **DIFERENCIAÇÃO TERMINAL DAS CÉLULAS NATURAL KILLER****Departamentos**

Na qualidade de Director de Departamento, declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Departamento	Nome do Director	Data	Assinatura
Medicina	Dr. José Lopes Gomes	/ /	_____

**Serviços e Unidades**

Na qualidade de Director de Serviço, declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Serviço	Nome do Director	Data	Assinatura
Hematologia Clínica	Dr. Jorge Coutinho	/ /	_____

**Termos de responsabilidade**

Trabalho Académico de Investigação: **DIFERENCIAÇÃO TERMINAL DAS CÉLULAS NATURAL KILLER**

**Aluno**

Eu, abaixo-assinado, MARGARIDA CALEJO, na qualidade de aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/UP, declaro que durante a realização do estudo de investigação acima mencionado, respeitarei as normas éticas e deontológicas, que a identificação dos doentes não será revelada e que os dados necessários para a realização do trabalho serão mantidos anónimos e não serão utilizados para outro fim.

Data                      Assinatura  
/   /                      \_\_\_\_\_

**Orientador**

Eu, abaixo-assinado, MARGARIDA LIMA, médico especialista em Imunohemoterapia do Serviço de Hematologia Clínica do HSA/CHP, na qualidade de Investigador Responsável no HSA/CHP e de Orientador de MARGARIDA CALEJO, aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/UP, declaro assumir a liderança científica do estudo de investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados e com as normas internas da Instituição. Declaro ainda que me comprometo a acompanhar o aluno nas diferentes fases da sua realização do estudo, responsabilizando-me por orientar a execução do trabalho, bem como por zelar pelo respeito dos princípios éticos e deontológicos e pelo cumprimento das normas internas da instituição.

Data                      Assinatura  
/   /                      \_\_\_\_\_

**Supervisora/Regente da Disciplina**

Eu, abaixo-assinado, MARGARIDA LIMA, na qualidade de professora responsável pela Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/UP, declaro que me comprometo a acompanhar o aluno MARGARIDA CALEJO, nas fases de realização do estudo de investigação acima mencionado, responsabilizando-me por supervisionar a execução do trabalho no âmbito da referida disciplina, bem como por zelar pelo respeito dos princípios éticos e deontológicos e pelo cumprimento das normas internas da instituição.

Data                      Assinatura  
/   /                      \_\_\_\_\_



## **B. Relatório de Execução**

### **DIFERENCIAÇÃO TERMINAL DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER***

Área de Investigação: Hematologia – Células do Sistema Imune

**Aluna:** Margarida Calejo

**Orientadora:** Prof. Doutora Margarida Lima

Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do ICBAS/UP e HSA/CHP

Disciplina de Iniciação a Investigação Clínica (DIIC)

Ano letivo 2011/2012

## Introdução

Este projeto teve como principal objetivo esclarecer melhor a diferenciação terminal das células *natural killer* (CNK) no organismo humano, especialmente, a relação existente entre os dois subtipos reconhecidos no sangue periférico (SP): as CNK CD56<sup>+fraco</sup>/CD16<sup>+</sup> e as CNK CD56<sup>+forte</sup>/CD16<sup>-/+fraco</sup>.

Concretamente, propusemo-nos testar a hipótese da interconversão destes dois subtipos, em especial, a possibilidade de conversão das CNK CD56<sup>+fraco</sup>/CD16<sup>+</sup> em CNK CD56<sup>+forte</sup>/CD16<sup>-/+fraco</sup>, dado que a hipótese inversa já tem sido explorada em outros estudos (1,2) e devido a trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar do Porto apontarem para essa possibilidade.

Assim, foi selecionado um conjunto de 8 marcadores celulares já descritos nas CNK, que seriam estudados por citometria de fluxo e que permitiriam caraterizar o perfil imunofenotípico de cada subpopulação de CNK. A partir desse perfil, seria possível observar alterações fenotípicas das CNK ao longo do tempo, em resposta à estimulação com diversas interleucinas (IL) e detetar, por exemplo, o aparecimento de populações intermédias entre os dois subtipos principais.

Devido ao facto de esta combinação de 8 marcadores ser inédita, não tendo, até agora, sido utilizada em outros trabalhos, optou-se por realizar previamente o estudo imunofenotípico das CNK no SP, sem estimulação, definindo-se um perfil base destes marcadores nas CNK dos indivíduos adultos normais.

Seguidamente, procedeu-se à cultura de células mononucleadas do SP desses indivíduos, na presença de IL que se sabe estarem envolvidas na estimulação e diferenciação das CNK: IL-2, IL-12, IL-15 e IL-21. Começou-se por testar o efeito da combinação das quatro IL, de modo a ser possível observar o efeito geral das mesmas sobre as CNK.

## Material e Métodos

### Colheita de sangue periférico e preparação das células

Após obtenção de consentimento informado, fez-se a colheita de amostras de SP de 6 indivíduos saudáveis (doadores de sangue), todos do sexo feminino com idades compreendidas entre os 22 e 51 anos.

As amostras de sangue para caracterização do perfil fenotípico das CNK foram colhidas em tubos com EDTA-K3; as amostras para culturas celulares foram colhidas em tubos com heparina sódica. Neste último caso, foram separadas as células mononucleadas por centrifugação do SP em gradiente de densidade 1.077 (*Lymphoprep*™, Axis-Shield).

### Estudo fenotípico das células NK do sangue

Após realização dos hemogramas, procedeu-se à imunofenotipagem das CNK, usando a combinação de 8 anticorpos monoclonais conjugados com diferentes fluorocromos indicada na Tabela 1.

**Tabela 1. Anticorpos monoclonais usados no presente estudo**

Especificidade	Fluorocromo	Fabricante	Clone	Isotipo
anti-CD16	PB	BC / IOT	3G8	IgG1 Ratinho anti-humano
anti-CD45	PO	Invitrogen	HI30	IgG1 Ratinho anti-humano
anti-CD62L	FITC	BC / IOT	DREG56	IgG1 Ratinho anti-humano
anti-CD181	PE	BD / Ph	5A12	IgG2b κ Ratinho anti-humano
anti-CD197	PERCP-Cy5.5	Antibodies on-line	150503	IgG2a Ratinho anti-humano
anti-CD56	PE-Cy7	BC / IOT	N901 (NKH-1)	IgG1 Ratinho anti-humano
anti-CD94	APC	BD / Ph	HP-3D9	IgG1 Ratinho anti-humano
anti-CD3	APC-H7	BD / Ph	SK7	IgG1 Ratinho anti-humano

PO, *Pacific Orange*; PB, *Pacific Blue*; FITC, *Fluorescein Isothiocyanate*; PE, *Phycoerythrin*; PercP-Cy5.5, *Peridin chlorophyll protein-Cyanine 5.5*; PE-Cy7, *Phycoerythrin-Cyanine 7*; APC, *Allophycocyanin*; APC-H7, *Allophycocyanin-Cyanine 7*

BD, *Becton Dickinson*; BC, *Beckman Coulter*; IOT, *Immunotech*; Ph, *Pharmingen*;

De seguida, procedeu-se à lise dos eritrócitos e fixação dos leucócitos usando o reagente *FACSlising*® (Becton Dickinson, BD).

A leitura das amostras foi realizada no citómetro de fluxo *FACScanto System II* (BD), com três lasers: um laser azul (488 nm), um laser vermelho (633 nm) e um laser violeta (405 nm).

Os resultados foram analisados recorrendo à aplicação informática *Infinicyt (Cytognos®)*. A expressão antigénica foi avaliada pela intensidade média de fluorescência (IMF).

### **Cultura de células mononucleares na presença de interleucinas**

As células mononucleadas numa concentração de 1,0 a 2,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, foram cultivadas em meio RPMI 1640 completo com 15% de soro bovino fetal (FBS, *fetal bovine serum*), antibióticos (penicilina e estreptomicina a 1%) e 2mM de L-glutamina, durante um máximo de 9 dias.

Numa primeira fase, foram acrescentadas no início das culturas e em conjunto as seguintes interleucinas: IL-2, IL-12, IL-15 e IL-21 (Miltenyi Biotec®), todas numa concentração de 50 ng/ml. De dois em dois dias, foi adicionado novo meio de cultura com a mesma concentração de IL. Como controlo, também se procedeu à cultura de células mononucleadas nas mesmas condições, mas sem estimulação com IL.

### **Estudo fenotípico das células NK cultivadas**

Em diferentes tempos de cultura (dias 0, 2, 4, 7 e 9, com e sem IL) as células foram retiradas, lavadas em tampão salino/fosfato (PBS, *Phosphate Buffered Saline*, pH7.2), por centrifugação a 1.500 rpm, 10 min, a 4°C, e suspendidas em PBS.

Após determinação da concentração celular, procedeu-se à imunofenotipagem com o painel de anticorpos acima referido.

### **Análise estatística**

Em *software Excel®*, foram determinados a média, desvio padrão, mediana e máximos e mínimos dos resultados obtidos. Em *software SPSS®*, versão 20.0, foram realizados testes não paramétricos para tratamento estatístico de parte dos dados.

## Resultados e Discussão

### Perfil fenotípico das células NK do sangue periférico

Após seleção das CNK (CD3<sup>-</sup> e CD56<sup>+</sup>), foi possível individualizar duas subpopulações: CNK CD56<sup>+fraco</sup> CD16<sup>+</sup>, numa frequência relativa média de 85,1% (± 6,7%) e CNK CD56<sup>+forte</sup>/CD16<sup>-/+fraco</sup>, numa frequência relativa média de 14,9% (± 6,7%).

Os resultados obtidos no estudo do perfil imunofenotípico das CNK do SP de 6 indivíduos adultos saudáveis estão expressos na Tabela 2. Os resultados estão discriminados para cada subtipo de CNK (CD56<sup>+fraco</sup> e CD56<sup>+forte</sup>), através das medianas da IMF de cada marcador, seguidas dos valores mínimos e máximos obtidos nas 6 amostras.

**Tabela 2. Perfil imunofenotípico das células NK do sangue periférico normal**

	CNK CD56 <sup>+fraco</sup>				CNK CD56 <sup>+forte</sup>				CD56 <sup>+fraco</sup> vs. CD56 <sup>+forte</sup>
	IMF				IMF				
	Mediana	Mínimo	-	Máximo	Mediana	Mínimo	-	Máximo	Valor de P*
<b>CD45</b>	4297	1267	-	5181	3772	780	-	4250	0,065
<b>CD56</b>	3827	3433	-	6881	23013	20787	-	40752	<b>0,002</b>
<b>CD16</b>	1051	136	-	5241	242	46	-	655	0,065
<b>CD62L</b>	721	502	-	2566	3531	2843	-	4162	<b>0,002</b>
<b>CD94</b>	4194	1735	-	4853	11385	9549	-	14096	<b>0,002</b>
<b>CD181</b>	409	315	-	492	18	-7	-	980	0,065
<b>CD197</b>	85	56	-	152	269	219	-	368	<b>0,002</b>

CNK, Células NK; IMF, Intensidade média de fluorescência

\* Teste *Mann-Witney U*, nível de significância:  $p < 0,05$ .

A população CD56<sup>+fraco</sup> CD16<sup>+</sup> é caracterizada pela coexpressão de CD56 e de CD16, enquanto as CNK CD56<sup>+forte</sup> CD16<sup>-/+fraco</sup> apresentam uma maior intensidade de expressão de CD56 e expressão variável e fraca de CD16, sendo este o perfil esperado para estas duas subpopulações de CNK no SP.

O facto de, estatisticamente, não haver confirmação da diferença de expressão do CD16 entre as duas populações pode dever-se ao facto de se ter encontrado valores de IMF de CD16 bastante variáveis entre as amostras, apesar de, em cada amostra, se manter a diferença entre as duas subpopulações. De acordo com a experiência prévia do Laboratório de Citometria, esta variação na expressão de CD16 nas CNK dos indivíduos normais não é habitual (3), podendo dever-se ao anticorpo monoclonal anti-CD16 usado neste estudo e/ou ao respetivo fluorocromo.

A expressão de CD94 e CD62L encontrada também corresponde ao tradicionalmente descrito para as CNK: uma maior intensidade de expressão destas moléculas nas CNK CD56<sup>+forte</sup>CD16<sup>-/+fraco</sup>, comparativamente às CNK CD56<sup>+fraco</sup>CD16<sup>+</sup> (3).

Quanto aos recetores de quimiocinas, a expressão de CD197 (CCR7) só foi observada nas CNK CD56<sup>+forte</sup> e a expressão de CD181 (CXCR1) foi maioritariamente observada nas CNK CD56<sup>+fraco</sup>. Este perfil de expressão corresponde ao descrito na maior parte dos estudos (4,5): as CNK CD56<sup>+forte</sup> expressam CD197 (CCR7), um recetor essencial para a entrada de linfócitos nos órgãos linfóides secundários, enquanto as CNK CD56<sup>+fraco</sup> expressam maioritariamente CD181 (CXCR1), o recetor para a IL8, envolvido na migração para os tecidos inflamados. No entanto, numa das amostras foi encontrada uma expressão significativamente mais elevada de CXCR1 na população CNK CD56<sup>+forte</sup> em relação à população CNK CD56<sup>+fraco</sup>, o que pode representar uma variação individual.

Em relação ao CD45, a sua expressão era sobreponível nos dois subtipos de CNK, tal como esperado.

No geral, os resultados obtidos na caracterização do perfil fenotípico das CNK do SP de indivíduos normais, com esta combinação de anticorpos monoclonais, correspondem ao esperado, embora não tenha sido obtida significância estatística para a diferença de expressão de algumas moléculas (CD16 e CD181) entre as CNK CD56<sup>+fraco</sup> e as CNK CD56<sup>+forte</sup>. Tal facto pode dever-se à variação individual e ao tamanho reduzido da amostra (n=6).

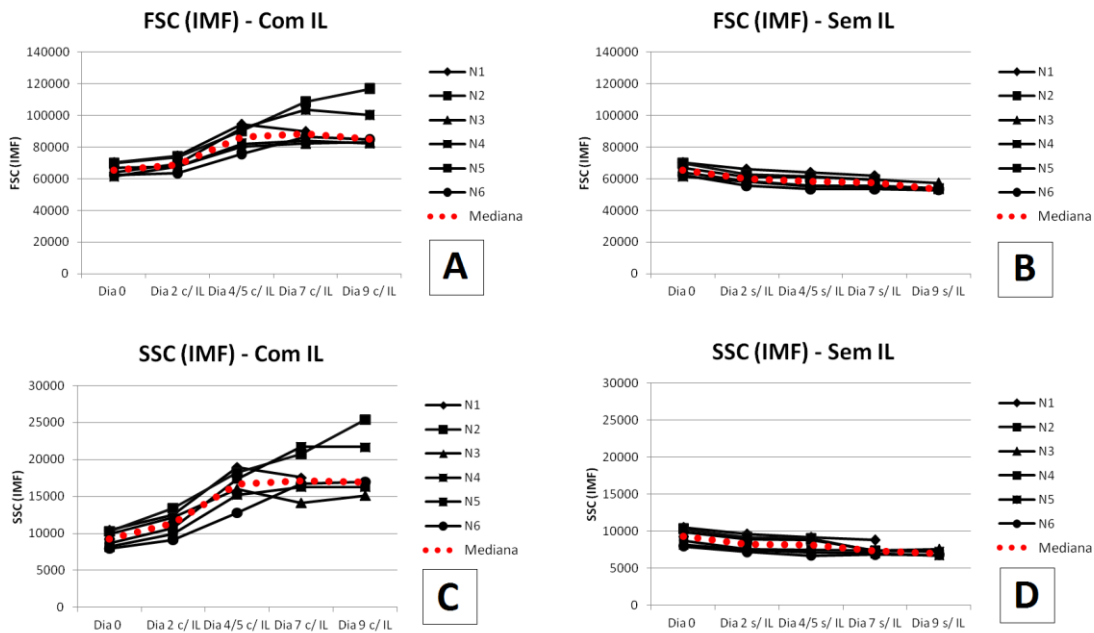
### **Evolução do perfil fenotípico das células NK de sangue periférico cultivadas na presença de interleucinas**

Para a análise das CNK, seleccionaram-se as células linfóides com base no SSC e na expressão de CD45 e, dentro destas últimas, as células CD3<sup>-</sup> e CD56<sup>+</sup>.

De seguida, caracterizou-se a evolução do perfil fenotípico das CNK, avaliando a expressão de cada marcador nas CNK totais (CD56<sup>+fraco</sup> e CD56<sup>+forte</sup>), através da respetiva IMF, no dia 0 de cultura, antes da adição de IL, e nos dias 2, 5 (dia 4 numa das amostras), dia 7 e dia 9, comparando-a com a obtida nas culturas de controlo (sem IL). A variação da IMF de cada marcador nas CNK ao longo do tempo, com e sem estimulação com IL, para cada amostra (N1-6) está representada nos gráficos das Figuras 1, 3, 4, 6, 7, 9, 11 e 13. Também se apresentam imagens do perfil fenotípico das CNK (Figuras 2, 5, 8, 10, 12 e 14), obtidas por citometria de fluxo, de uma amostra representativa, ilustrativas das variações de cada marcador, ao longo dos tempos de cultura considerados mais relevantes. Os valores de IMF obtidos estão discriminados com mais pormenor nas Tabelas I-IX apresentadas em anexo.

Na análise dos resultados obtidos, realça-se que o fenótipo encontrado ao dia 0 na população global de CNK traduz fundamentalmente as características das CNK CD56<sup>+fraco</sup>, uma vez que estas representam a população mais numerosa no SP.

As características morfológicas das CNK, traduzidas pela dispersão da luz, evoluíram ao longo do tempo de cultura com IL, verificando-se um aumento do tamanho (*forward scatter channel*, FSC) e da complexidade (*side scatter channel*, SSC) das células (Figura 1, Gráficos A e C, e Tabelas I e II dos anexos), ao contrário do que foi observado nas culturas de controlo (Figura 1, Gráficos B e D, e Tabelas I e II dos anexos). As medianas do FSC e do SSC das CNK atingiram o máximo ao dia +4/5 de cultura, altura em que eram 1,3x e 1,8x superiores ao valor basal (dia 0), respetivamente.



**Figura 1 – Evolução do FSC (tamanho celular) e do SSC (complexidade celular), do dia 0 ao dia 9 de cultura, nas culturas estimuladas com IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21) (Gráficos A e C) e nas culturas controlo (sem IL) (Gráficos B e D) – resultados de cada amostra e mediana dos valores obtidos.**

O aumento do tamanho e da complexidade das CNK, ilustrado na Figura 2, traduz a ativação celular, provavelmente associada também a proliferação, especialmente considerando a ação conhecida das IL utilizadas (IL-2, IL-12, IL-15).

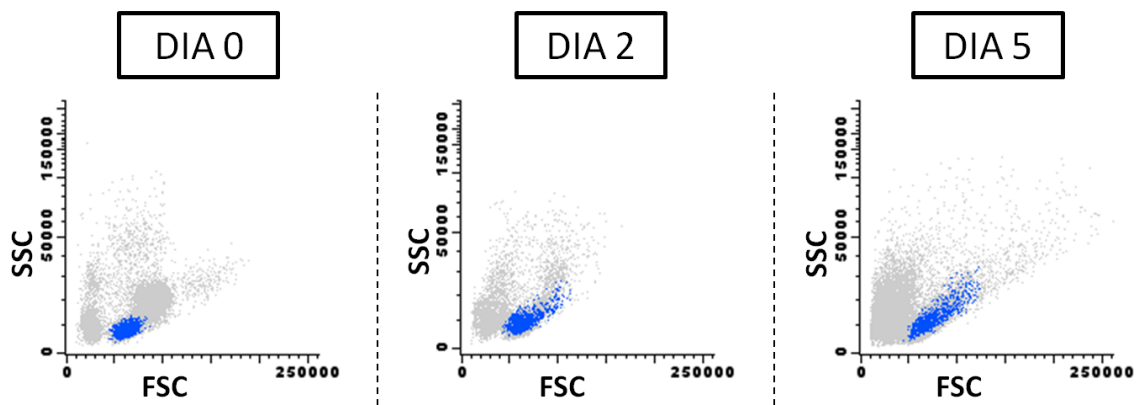


Figura 2 – Gráficos representativos da evolução do tamanho (FSC) e da complexidade (SSC) das CNK (a azul) ao longo do tempo de cultura com estimulação por IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21).

Relativamente ao marcador pan-leucocitário CD45, nas culturas estimuladas com IL, verificou-se um aumento gradual da expressão entre o dia 0 e o dia 4/5, seguido de uma redução ligeira aos dias 7 e 9 (Figura 3A e Tabela III dos anexos). A mediana da IMF de expressão do CD45 nas CNK atingiu o máximo ao dia +4/5 de cultura, altura em que era 2,1x superior ao valor basal. Por outro lado, nas culturas controlo, a expressão manteve-se constante ao longo do tempo (Figura 3B e Tabela III dos anexos).

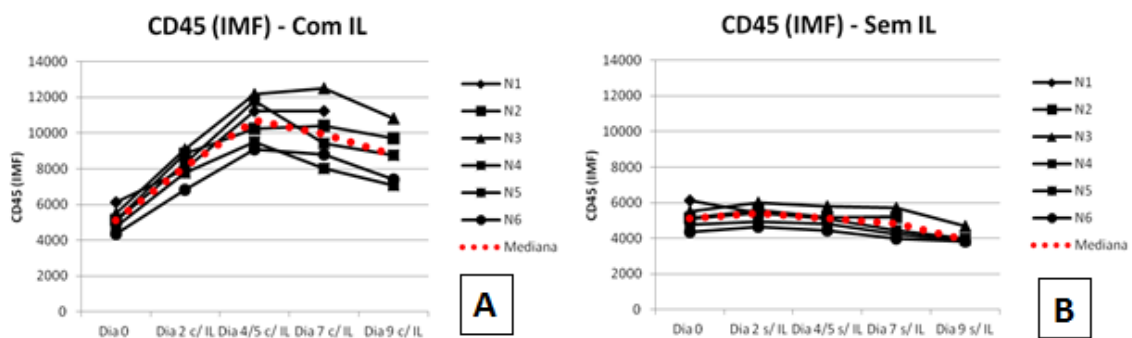
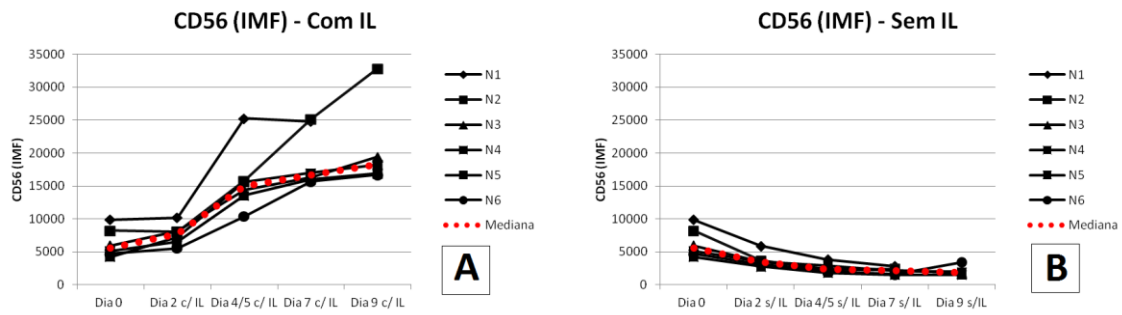


Figura 3 – Evolução da expressão de CD45 do dia 0 ao dia 9 de cultura, nas culturas estimuladas com IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21) (Gráfico A) e nas culturas controlo (sem IL) (Gráfico B) – resultados de cada amostra e mediana dos valores obtidos.

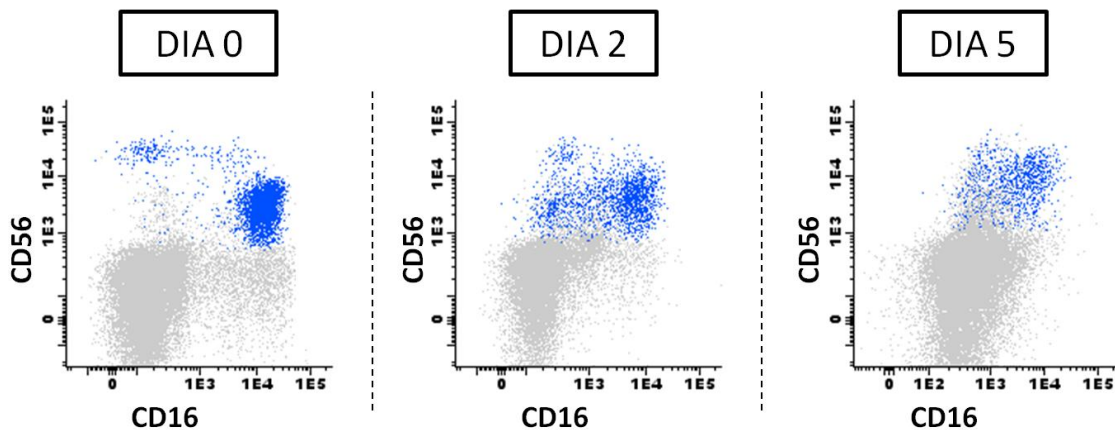
Em relação ao marcador CD56, nas culturas estimuladas observou-se um aumento significativo da sua expressão nas CNK, para valores de IMF que podem ser comparados aos encontrados na população CD56<sup>+forte</sup>CD16<sup>-/+fraco</sup> do SP normal (Figura 4A e Tabela IV dos anexos). A mediana da IMF de expressão do CD56 nas CNK aumentou progressivamente até ao dia +9, altura em que era 3,3x superior ao valor basal. Nas amostras de controlo, por outro lado, a expressão de CD56 diminuiu progressivamente ao longo do tempo de cultura (Figura 4B e Tabela IV dos anexos).





**Figura 4 - Evolução da expressão de CD56 do dia 0 ao dia 9 de cultura, nas culturas estimuladas com IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21) (Gráfico A) e nas culturas controlo (sem IL) (Gráfico B) – resultados de cada amostra e mediana dos valores obtidos.**

Tal como se pode observar na Figura 5, o aumento da IMF do CD56 nas CNK totais resultou fundamentalmente de um aumento de expressão desta molécula nas CNK CD56<sup>+fraco</sup>, de tal forma que ao longo do tempo de cultura se tornou progressivamente cada vez mais difícil separar estas células das CNK CD56<sup>+forte</sup>, exclusivamente com base na intensidade de expressão de CD56.

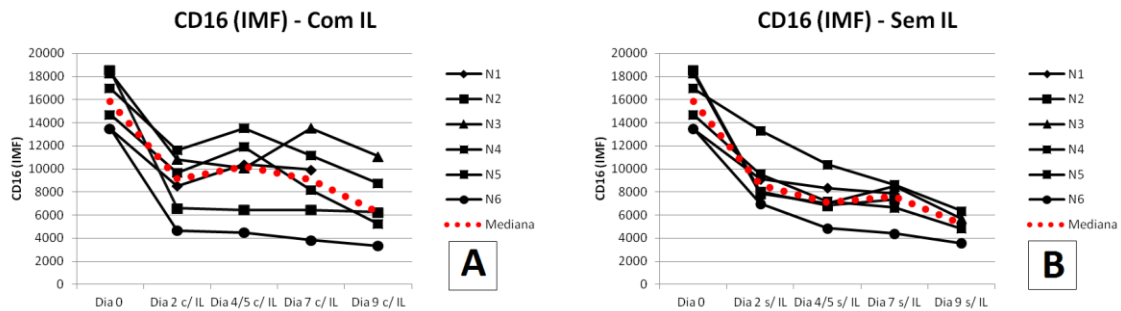


**Figura 5 – Gráficos representativos da evolução da expressão de CD56 e de CD16 nas CNK (a azul) ao longo do tempo de cultura com estimulação por IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21).**

Este resultado vem reforçar a hipótese de uma conversão das CNK CD56<sup>+fraco</sup> em CD56<sup>+forte</sup>. No entanto, encontra-se descrito um aumento da expressão de CD56 nas CNK consequente da ativação celular mediada, por exemplo, por IL, que também pode explicar este fenómeno.

Relativamente ao CD16, no dia 0 observou-se uma expressão mais forte do que é habitual nas CNK do SP, o que pode dever-se ao processamento das amostras para cultura, nomeadamente à de separação células mononucleadas em gradiente de densidade. Ao longo da cultura com IL, a expressão de CD16 diminuiu entre o dia 0 e o dia 2, mantendo-se depois relativamente constante até dia 7, com uma pequena redução a dia 9 (Figura 6A e Tabela V dos anexos). A mediana da IMF de expressão do CD16 nas CNK atingiu

o mínimo ao dia +9 de cultura (0,4x o valor basal). Porém, nas culturas de controlo, observou-se uma evolução semelhante (Figura 6B e Tabela V dos anexos).

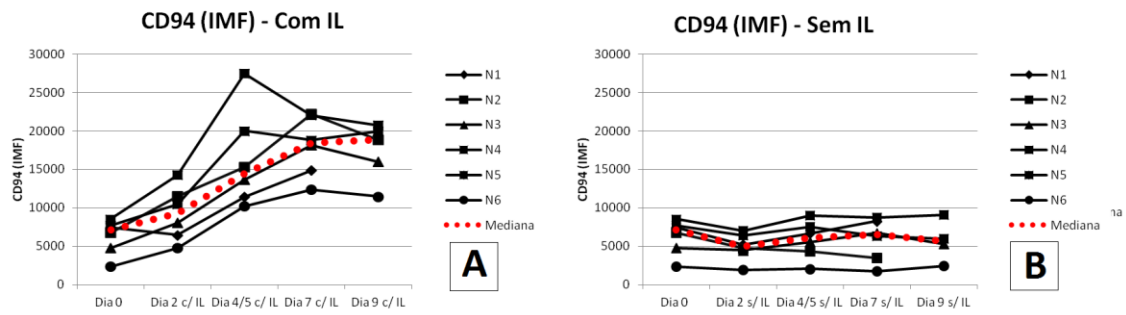


**Figura 6 – Evolução da expressão de CD16 do dia 0 ao dia 9 de cultura, nas culturas estimuladas com IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21) (Gráfico A) e nas culturas controlo (sem IL) (Gráfico B) – resultados de cada amostra e mediana dos valores obtidos.**

Nas culturas estimuladas, a diminuição de expressão de CD16 nas CNK CD56<sup>+fraco</sup> acompanhou o aumento da expressão de CD56 nestas células, contribuindo para a dificuldade em separar estas duas populações celulares a partir do dia +4/5 de cultura (Figura 5). No entanto, apesar da diminuição da expressão de CD16 ao longo do tempo de cultura, as CNK CD56<sup>+fraco</sup> mantiveram o fenótipo CD16<sup>+</sup>.

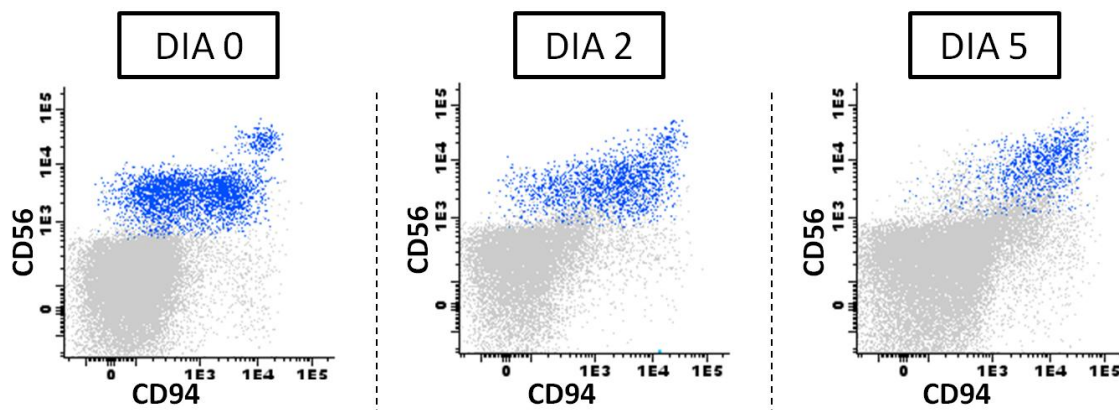
Em estudos anteriores, as evidências são pouco claras em relação à influência da estimulação com IL na expressão de CD16 nas CNK: Loza e Perussia (6) apontam para a redução da expressão de CD16 nas CNK do SP na cultura com IL-12 e IL-15, enquanto Takahashi *et al* (7) mostraram a formação de CNK CD56<sup>+fraco</sup>CD16<sup>+</sup> a partir de CNK CD56<sup>+fraco</sup>CD16<sup>-</sup> e CD56<sup>+forte</sup>CD16<sup>-</sup> em culturas com IL-2, IL-12 e IL-15. O uso conjunto de IL com efeitos opostos na expressão de CD16 poderá explicar a dificuldade em interpretar as variações observadas.

Relativamente à expressão do CD94, um recetor *killer* da família das lectinas, verificou-se um aumento gradual e significativo ao longo do tempo de cultura, de tal modo que a mediana da intensidade de expressão final (dia 9) era 2,7x superior à inicial (dia 0) (Figura 7A e Tabela VI dos anexos). Pelo contrário, nas culturas de controlo, a expressão de CD94 manteve-se relativamente constante ao longo do tempo de cultura (Figura 7B e Tabela VI dos anexos).



**Figura 7 - Evolução da expressão de CD94 do dia 0 ao dia 9 de cultura, nas culturas estimuladas com IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21) controlo (Gráfico A) e nas culturas controlo controlo (sem IL) (Gráfico B) – resultados de cada amostra e mediana dos valores obtidos.**

Conforme ilustrado na Figura 8, nas culturas estimuladas com IL observou-se que ao longo dos dias, ocorreu um aumento da expressão de CD94 nas CNK CD56<sup>+fraco</sup>, o que, juntamente com o aumento da intensidade de expressão de CD56, fez com que aos dias 4/5 já não fosse possível distinguir as estas duas populações de CNK com base na expressão destes marcadores. Desta forma, as CNK CD56<sup>+fraco</sup> estimuladas adquiriram o fenótipo CD94<sup>+</sup> característico das CNK CD56<sup>+forte</sup>.

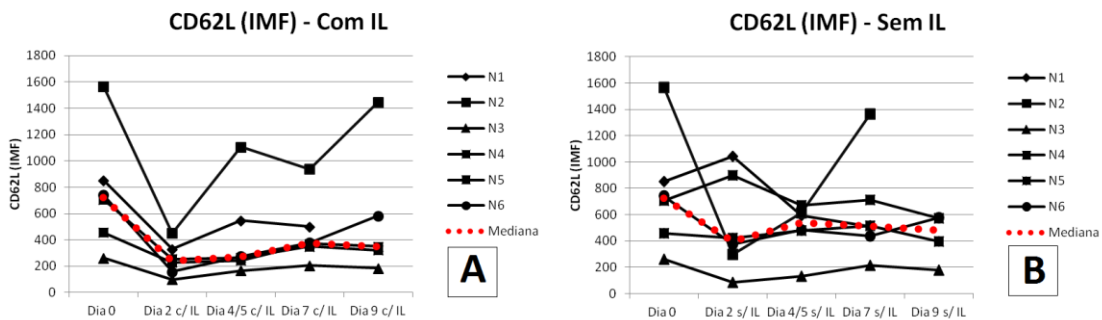


**Figura 8 – Gráficos representativos da evolução da expressão de CD94 nas CNK (a azul) ao longo do tempo de cultura com estimulação por IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21).**

O CD94 é uma proteína integral da membrana que se liga covalentemente a 5 recetores da família NKG2 (-A, -B, -C, -E e -H, mas não -D). Nas CNK, está frequentemente associado ao NKG2A, formando um recetor inibitório, cuja expressão é consistentemente mais elevada nas CD56<sup>+forte</sup>. Encontra-se já descrito que IL-12 aumenta a expressão de NKG2A nas CNK (8), incluindo na população CD56<sup>+fraco</sup>, o que se correlaciona com um aumento da capacidade de produção de IFN- $\gamma$  (9). Para além disso, o recetor CD94/NKG2A tem sido apontado como uma das moléculas envolvidas na maturação das CNK, mais propriamente, tem sido proposto que a variação da sua expressão marca a transição entre as CNK CD56<sup>+forte</sup> e as CNK CD56<sup>+fraco</sup> (9,10). Apesar de estes trabalhos proporem uma maturação de sentido CD56<sup>+forte</sup> para

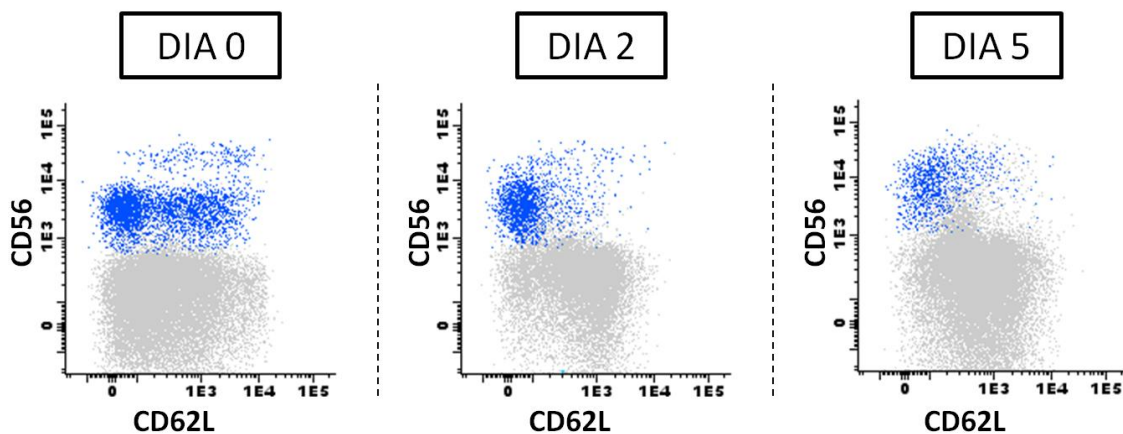
CD56<sup>+fraco</sup>, com perda de expressão de CD94/NKG2A, os resultados obtidos neste trabalho reforçam a possibilidade da transição inversa.

A expressão de Selectina L (CD62L) nas CNK diminui logo ao dia 2 nas culturas estimuladas com IL, mantendo-se depois diminuída, embora com algumas flutuações, exceto no caso de uma amostra em que se observou um aumento posterior de expressão desta molécula (Figura 9A e Tabela VII dos anexos). Nas culturas de controlo, a expressão de CD62L seguiu a mesma tendência, mas com maior variabilidade (Figura 9B e Tabela VII dos anexos). Comparando a expressão nas culturas com IL com as culturas controlo e com a expressão no SP, verificou-se uma regulação negativa da sua expressão durante a estimulação com IL.



**Figura 9 – Evolução da expressão de CD62L de dia 0 a dia 9 de cultura nas culturas estimuladas com IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21) (Gráfico A) e nas culturas controlo (sem IL) (Gráfico B) – resultados de cada amostra e mediana dos valores obtidos.**

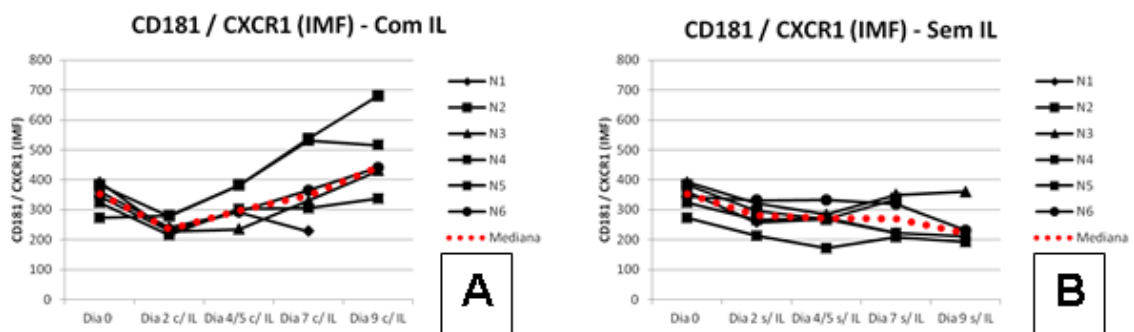
Esta diminuição de expressão de CD62L não é explicável à luz de uma possível conversão das CNK CD56<sup>+fraco</sup> (que tipicamente apresentam uma expressão variável e fraca de CD62L) em CNK CD56<sup>+forte</sup> (que são caracteristicamente CD62L<sup>+</sup>).



**Figura 10 – Gráficos representativos da evolução da expressão de CD62L nas CNK (a azul) ao longo do tempo de cultura com estimulação por IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21).**

De facto, tal como se pode observar na figura 10, nas culturas estimuladas com IL ocorre uma diminuição da expressão desta molécula quer nas CNK CD56<sup>+fraco</sup> quer nas CNK CD56<sup>+forte</sup>, até ao dia +4/5 de cultura. Esta observação pode traduzir exclusivamente o estado de ativação das CNK e está de acordo com estudos anteriores, em que foi documentada uma diminuição da expressão de CD62L nas CNK estimuladas com IL-2 (11).

Em relação ao CD181 (CXCR1), o recetor da IL8 que se expressa caracteristicamente nas CNK CD56<sup>+fraco</sup>/CD16<sup>+</sup>, nas culturas com IL, verificou-se uma pequena diminuição inicial da sua expressão nas CNK, entre dia 0 e dia 2, seguida de um aumento gradual da expressão até dia 9 (Figura 11A e Tabela VIII dos anexos). Globalmente, entre dia 2 e dia 9, pode-se observar um pequeno aumento da expressão de CD181 (CXCR1). A mediana da IMF de expressão do CD181 nas CNK atingiu o máximo ao dia +9 de cultura, altura em que era 1,3x superior ao valor basal. Nas culturas de controlo, contrariamente, observou-se que a expressão de CD181 se mantinha relativamente constante ao longo do tempo de cultura (Figura 11B e Tabela VIII dos anexos)



**Figura 11 – Evolução da expressão de CD181 (CXCR1) do dia 0 ao dia 9 de cultura, nas culturas estimuladas com IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21) (Gráfico A) e nas culturas controlo (sem IL) (Gráfico B) – resultados de cada amostra e mediana dos valores obtidos.**

Tal como atrás referido para o CD62L, o aumento da expressão de CXCR1 ao longo do tempo de cultura com IL não é explicável no contexto de uma evolução no sentido CNK CD56<sup>+fraco</sup> -> CNK CD56<sup>+forte</sup>. Como se pode observar na figura 12, esse aumento parece ocorrer sobretudo e de forma mais evidente na população de CNK CD56<sup>+forte</sup>.

Uma hipótese a considerar para explicar o aumento da expressão de CXCR1, é que, tal como referido para o CD62L, este fenómeno se deva à ativação celular. De facto, este fenómeno foi previamente descrito nas CNK (12) e nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> estimulados *in vitro* com IL-2 (13); neste último caso, o aumento de expressão de IL-2 foi atribuído à libertação dos depósitos intracelulares deste recetor, com subsequente expressão na membrana celular.

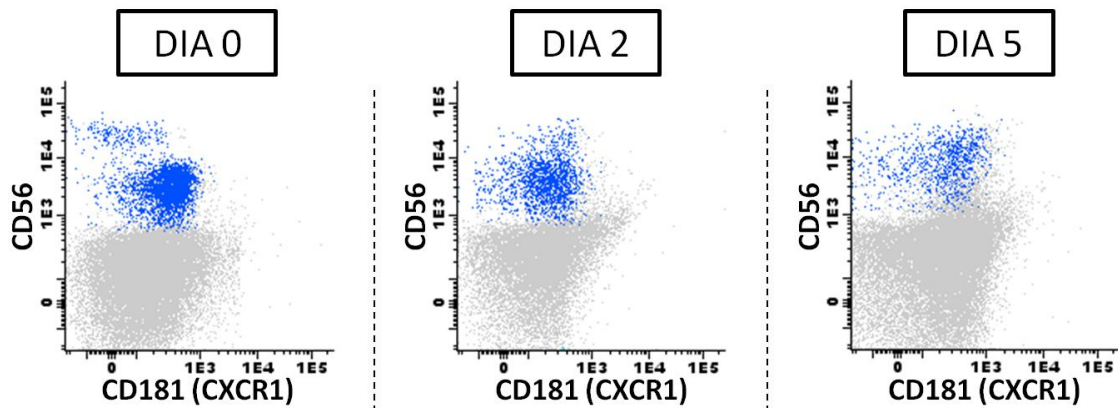


Figura 12 – Gráficos representativos da evolução da expressão de CD181 (CXCR1) nas CNK (a azul) ao longo do tempo de cultura com estimulação por IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21).

Em relação ao CD197 (CCR7), expresso exclusivamente nas CNK CD56<sup>+forte</sup>/CD16<sup>+fraco</sup> do SP, também se verifica um aumento da sua expressão nas CNK das culturas estimuladas com IL. Este aumento foi gradual do dia 0 ao dia 9, podendo-se considerar que se evolui de uma população negativa/com baixa expressão para uma população com expressão fraca de CCR7 (Figura 13A e Tabela IX dos anexos), verificando-se um aumento de 2,6x da IMF ao dia 9 em relação ao dia 0. Contrariamente, nas culturas de controlo, a IMF de CD197 (CCR7) manteve-se constante e com valores baixos, traduzindo a sua ausência de expressão nas CNK ao longo de todo o tempo de cultura (Figura 13B e Tabela IX dos anexos).

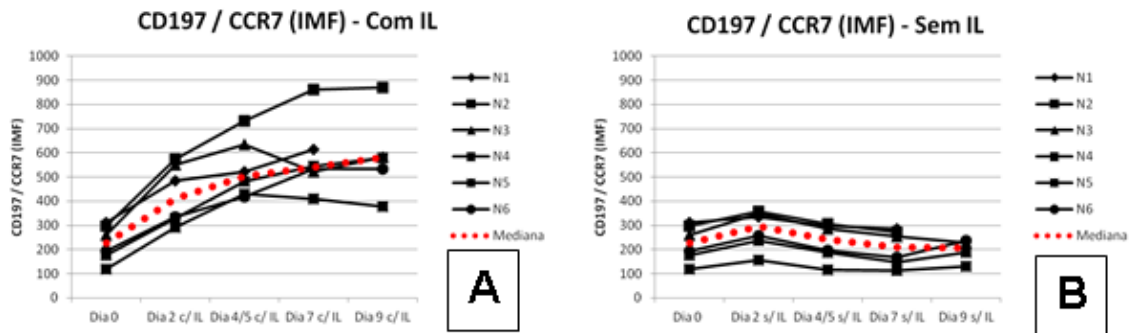
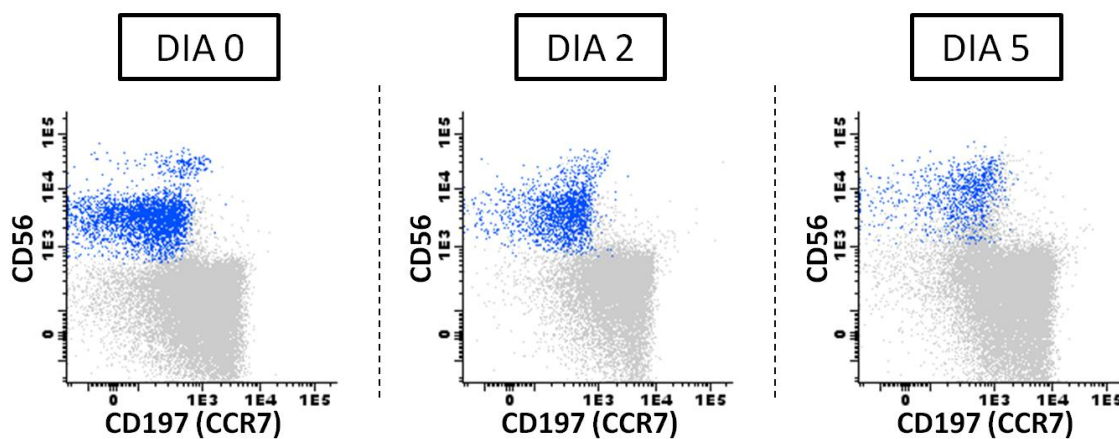


Figura 13 – Evolução da expressão de CD197 (CCR7) do dia 0 ao dia 9 de cultura, nas culturas estimuladas com IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21) (Gráfico A) e nas culturas controlo (sem IL) (Gráfico B) – resultados de cada amostra e mediana dos valores obtidos.

Na figura 14, pode-se observar, igualmente, o aumento gradual de expressão de CCR7 nas CNK ao longo do tempo, nas culturas estimuladas com IL. Deste modo, a cultura com IL parece conduzir à expressão de CCR7 nas CNK CD56<sup>+fraco</sup>.



**Figura 14 – Gráficos representativos da evolução da expressão de CD197 (CCR7) nas CNK (a azul) ao longo do tempo de cultura com estimulação por IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21).**

O aumento de expressão de CCR7 já tinha sido observado nas CNK (incluindo nas  $CD56^{+fraco}$ ) após estimulação com IL-18, mas não para o conjunto de IL utilizadas neste estudo (14). Poderá traduzir uma evolução da população das CNK de fenótipo  $CD56^{+fraco}$  para  $CD56^{+forte}$  e indicar a aquisição de novas propriedades de migração geralmente associadas ao fenótipo  $CD56^{+forte}$ , uma vez que este recetor está envolvido na migração para gânglios e órgãos linfoides secundários.

## Conclusões

Este projeto tinha como objetivo testar a hipótese de que as CNK CD56<sup>+fraco</sup> podem, sob a ação de estímulos adequados, diferenciar em CNK CD56<sup>+forte</sup>. Para isso, procedeu-se à cultura de células mononucleadas do SP com IL envolvidas na diferenciação terminal das CNK e estudou-se, por citometria de fluxo, a evolução do seu perfil fenotípico, procurando alterações na expressão de moléculas que pudessem traduzir esta evolução,

A partir dos resultados obtidos, pôde-se concluir que a cultura de células mononucleadas do sangue periférico com IL-2, IL-12, IL-15 e IL-21, durante 9 dias, levou a alterações no perfil fenotípico das CNK.

Verificou-se um aumento do tamanho e complexidade destas células, assim como um aumento da expressão de algumas moléculas envolvidas na transmissão do sinal (CD45, recetor panleucocitário), moléculas de adesão (CD56), recetores *killer* da família das lectinas (CD94) e recetores de quimiocinas (CCR7 / CD197 e CXCR1 / CD181), comparativamente aos níveis no início da cultura. Algumas destas alterações, como o aumento da expressão de CD56 e de CD197, parecem ser dependentes da ação das IL uma vez que não são observadas nas culturas não estimuladas e vão ao encontro da hipótese de trabalho (conversão das CNK CD56<sup>+fraco</sup> em CNK CD56<sup>+forte</sup>). Outras alterações, como o aumento da expressão de CD45 e de CD181 e a diminuição de expressão de CD62L, não podem ser atribuídas a este fenómeno, podendo resultar exclusivamente da ativação celular.

A expressão de CD16, o recetor de baixa afinidade para o fragmento Fc da IgG (FcγRIII) que está envolvido na citotoxicidade mediada por anticorpos e que caracteriza as CNK CD56<sup>+fraco</sup>, parece diminuir ao longo do tempo de cultura, embora as CNK mantenham um fenótipo CD16<sup>+</sup>. O significado desta diminuição e a sua relação com as IL permanece por esclarecer, uma vez que este fenómeno também foi observado nas CNK de culturas não estimuladas.

O fenótipo das CNK no final do tempo de cultura com IL não corresponde exatamente ao perfil das CNK CD56<sup>+forte</sup> encontradas no SP, mas tem algumas características semelhantes, como uma expressão aumentada de CD56, CD94 e CCR7, e uma expressão diminuída de CD16, que apontam para a possibilidade da conversão CD56<sup>+fraco</sup> -> CD56<sup>+forte</sup> em estudo. Em alternativa, este fenótipo pode também corresponder apenas a um estado de ativação das CNK CD56<sup>+fraco</sup> com aquisição de características fenotípicas que diferem significativamente das observadas nas CNK CD56<sup>+fraco</sup> encontradas no SP normal.

A co-estimulação com várias IL, possivelmente com efeitos antagónicos, permitiu ter uma visão global da sua ação conjunta, mas pode não ter deixado revelar determinadas mudanças importantes de fenótipo. Por outro lado, é importante ter em conta que existem outras células na cultura (linfócitos T e B, monócitos) que, estimuladas pelas mesmas IL, podem, elas próprias, produzir mediadores celulares (incluindo outras IL) capazes de atuar sobre as CNK. A este respeito, é de referir que algumas das IL adicionadas ao meio de cultura são estímulos potentes para a produção de IFN-γ, entre outras substâncias



biologicamente ativas. Estes mediadores também podem ter influenciado as alterações observadas no fenótipo das CNK.

O trabalho até agora efetuado e aqui relatado, corresponde apenas à primeira fase do projeto inicial em proposta. Este trabalho permitiu ter uma perspetiva geral da ação das IL sobre as CNK, importante para delinear estratégias futuras de investigação. Para além disso, foi essencial para o desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de cultura e análise das CNK que irão constituir a base das próximas fases do projeto. No seguimento destes dados, pretende-se continuar a explorar a evolução do perfil fenotípico das CNK após estimulação com IL, nomeadamente, testar a ação das IL em separado e/ou em diferentes combinações. Na continuidade deste projeto está também previsto testar a ação destas IL, isoladamente e em combinação, sobre populações de CNK purificadas através de *sorting*, por campo magnético ou por citometria de fluxo.

## Referências Bibliográficas

1. Chan A, Hong DL, Atzberger A, Kollnberger S, Filter AD, Buckley CD, McMichael A, Enver T and Bowness P, CD56high human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblast. *J Immunol* 2007; **179**:89-94.
2. Romagnani C, Juelke K, Falco M et al. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol*. 2008; **178**: 4947-55.
3. Lima M, Teixeira MA, Queirós ML, Leite M, Santos AH, Justiça B, Orfao A. 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**:731-43.
4. Berahovich RD, Lai NL, Wei Z, Lanier LL, Schall TJ: Evidence for NK-cell subsets based on chemokine receptor expression. *J Immunol*. 2006; **177**: 7833-7840.
5. Campbell JJ, Qin S, Unutmaz D, Soler D, Murphy KE, Hodge MR, Wu L, and Butcher EC. Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol*. 2001; **166**: 6477–6482.
6. Loza MJ, Perussia B. The IL-12 signature: NK cell terminal CD56+high stage and effector functions. *J Immunol* 2004; **172**:88–96.
7. Takahashi E, Kuranaga N, Satoh K, Habu Y, Shinomiya N, Asano T, Seki S, Hayakawa M. Induction of CD16+ CD56bright NK cells with antitumour cytotoxicity not only from CD16- CD56bright NK Cells but also from CD16- CD56dim NK cells. *Scand J Immunol*. 2007; **65**(2):126-38.
8. Sáez-Borderías A, Romo N, Magri G, Gumá M, Angulo A, López-Botet M. IL-12-dependent inducible expression of the CD94/NKG2A inhibitory receptor regulates CD94/NKG2C+ NK cell function. *J Immunol*. 2009; **182**(2):829-36.
9. Béziat V, Descours B, Parizot C, Debré P, Vieillard V. NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS One*. 2010; **5**(8): e11966
10. Yu J, Mao HC, Wei M, Hughes T, Zhang J, Park IK, Liu S, McClory S, Marcucci G, Trotta R, Caligiuri MA: CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets. *Blood*. 2010; **115**:274-281.
11. Huenecke S, Zimmermann SY, Kloess S, Esser R, Brinkmann A, Tramsen L, Koenig M, Erben S, Seidl C, Tonn T, Eggert A, Schramm A, Bader P, Klingebiel T, Lehrnbecher T, Passweg JR, Soerensen J, Schwabe D, Koehl U. IL-2-driven regulation of NK cell receptors with regard to the distribution of CD16+ and CD16- subpopulations and in vivo influence after haploidentical NK cell infusion. *J Immunother*. 2010; **33**(2):200-10.
12. Inngjerdingen M, Damaj B, Maghazachi AA. Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood*. 2001; **97**(2):367-75.
13. Gasser O, Missiou A, Eken C, Hess C. *Blood*. Human CD8+ T cells store CXCR1 in a distinct intracellular compartment and up-regulate it rapidly to the cell surface upon activation. 2005; **106**(12):3718-24.
14. Mailliard R, Alber S, Shen H, Watkins S, Kirkwood J, Herberman R, Kalinski P. IL18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells. *J. Exp. Med*. 2005; **202**: 941–953.

# ANEXOS | Relatório de Execução

- **Tabelas I-IX** – Valores FSC, SSC e de IMF dos marcadores celulares (CD45, CD56, CD16, CD94, CD62L, CD181 e CD197) ao longo dos tempos de cultura com e sem IL

Tabela I: *Forward Scatter* (FSC) nas células NK (CNK) a diferentes dias de cultura na ausência e na presença de IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21)

Dia de cultura	FSC das CNK													
	Sem IL							Com IL						
	Média	±	DP	Mediana	Mínimo	-	Máximo	Média	±	DP	Mediana	Mínimo	-	Máximo
D0	65858	±	3789	65360	61343	-	70327	65718	±	3789	65360	61343	-	70327
D2	60414	±	3707	59855	55676	-	66114	69406	±	4045	68651	63538	-	74242
D4/5	58495	±	4247	58399	53601	-	64031	85640	±	7443	86091	65718	-	94227
D7	57288	±	3253	57333	53343	-	61709	92495	±	10937	88248	69406	-	108675
D9	54307	±	2050	53517	52861	-	57335	93406	±	14903	84876	82382	-	116682

FSC, *Forward Scatter Channel*; IL, Interleucinas

Tabela II: *Side Scatter* (SSC) das células NK (CNK) a diferentes dias de cultura na ausência e na presença de IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21)

Dia de cultura	SSC nas CNK													
	Sem IL							Com IL						
	Média	±	DP	Mediana	Mínimo	-	Máximo	Média	±	DP	Mediana	Mínimo	-	Máximo
D0	9548	±	1106	9274	7952	-	10488	9238	±	1106	9274	7952	-	10488
D2	8320	±	1022	8253	7193	-	9580	11305	±	1643	11433	9137	-	13391
D4/5	8022	±	1068	8130	6696	-	9132	16431	±	2240	16680	9238	-	18935
D7	7435	±	703	7301	6817	-	8802	17855	±	2875	17128	11305	-	21726
D9	7043	±	391	6970	6694	-	7540	19077	±	4332	16964	16249	-	25395

SSC, *Side Scatter Channel*; IL, Interleucinas

Tabela III: Intensidade de expressão de CD45 nas células NK (CNK) a diferentes dias de cultura na ausência e na presença de IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21)

Dia de cultura	Intensidade de expressão de CD45 nas CNK													
	Sem IL							Com IL						
	Média	±	DP	Mediana	Mínimo	-	Máximo	Média	±	DP	Mediana	Mínimo	-	Máximo
D0	5567	±	609	5109	4353	-	6120	5160	±	609	5109	4353	-	6120
D2	5337	±	473	5408	4661	-	5994	8124	±	816	8138	6807	-	9073
D4/5	5086	±	443	5135	4443	-	5782	10673	±	1257	10730	5160	-	12165
D7	4798	±	672	4812	3987	-	5715	10062	±	1651	9920	8027	-	12508
D9	4104	±	405	3942	3830	-	4703	8753	±	1573	8772	7082	-	10838

IMF, Intensidade Média de Fluorescência; IL, Interleucinas

Tabela IV: Intensidade de expressão de CD56 nas células NK (CNK) a diferentes dias de cultura na ausência e na presença de IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21)

Dia de cultura	Intensidade de expressão de CD56 nas CNK													
	Sem IL							Com IL						
	Média	±	DP	Mediana	Mínimo	-	Máximo	Média	±	DP	Mediana	Mínimo	-	Máximo
D0	6369	±	2222	5560	4276	-	9902	6369	±	2222	5560	4276	-	9902
D2	3754	±	1101	3509	2782	-	5897	7617	±	1586	7678	5551	-	10174
D4/5	2569	±	723	2328	1849	-	3862	15828	±	5017	15000	6369	-	25257
D7	2113	±	510	2156	1508	-	2832	19153	±	4521	16668	7617	-	25133
D9	2186	±	853	1885	1538	-	3436	20811	±	6796	18272	15828	-	32807

IMF, Intensidade Média de Fluorescência; IL, Interleucinas

Tabela V: Intensidade de expressão de CD16 nas células NK (CNK) a diferentes dias de cultura na ausência e na presença de IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21)

Dia de cultura	Intensidade de expressão de CD16 nas CNK													
	Sem IL							Com IL						
	Média	±	DP	Mediana	Mínimo	-	Máximo	Média	±	DP	Mediana	Mínimo	-	Máximo
D0	15037	±	2334	15836	13464	-	18543	15922	±	2334	15836	13464	-	18543
D2	9146	±	2241	8574	7001	-	13319	8653	±	2634	9102	4676	-	11622
D4/5	7446	±	1836	7105	4874	-	10406	9480	±	3395	10235	4504	-	13533
D7	7241	±	1560	7615	4424	-	8641	8851	±	3462	9051	3831	-	13536
D9	5120	±	1210	5265	3574	-	6376	6937	±	3041	6238	3332	-	11099

IMF, Intensidade Média de Fluorescência; IL, Interleucinas

Tabela VI: Intensidade de expressão de CD94 nas células NK (CNK) a diferentes dias de cultura na ausência e na presença de IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21)

Dia de cultura	Intensidade de expressão de CD94 nas CNK													
	Sem IL							Com IL						
	Média	±	DP	Mediana	Mínimo	-	Máximo	Média	±	DP	Mediana	Mínimo	-	Máximo
D0	6392	±	2302	7105	2338	-	8520	6255	±	2302	7105	2338	-	8520
D2	4961	±	1778	4967	1935	-	6996	9243	±	3495	9251	4740	-	14239
D4/5	5852	±	2460	6120	2049	-	8972	16339	±	6455	14468	6255	-	27492
D7	5875	±	2751	6521	1717	-	8740	18071	±	3911	18456	9243	-	22229
D9	5703	±	2716	5632	2465	-	9080	17407	±	3784	18846	11460	-	20766

IMF, Intensidade Média de Fluorescência; IL, Interleucinas

Tabela VII: Intensidade de expressão de CD62L nas células NK (CNK) a diferentes dias de cultura na ausência e na presença de IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21)

Dia de cultura	Intensidade de expressão de CD62L nas CNK													
	Sem IL							Com IL						
	Média	±	DP	Mediana	Mínimo	-	Máximo	Média	±	DP	Mediana	Mínimo	-	Máximo
D0	695	±	448	724	262	-	1567	764	±	448	724	262	-	1567
D2	521	±	371	398	87	-	1045	254	±	125	241	159	-	451
D4/5	495	±	192	537	134	-	669	434	±	355	270	244	-	1108
D7	625	±	396	513	216	-	1365	457	±	253	375	254	-	937
D9	431	±	189	484	177	-	579	578	±	507	351	322	-	1449

IMF, Intensidade Média de Fluorescência; IL, Interleucinas

Tabela VIII: Intensidade de expressão de CD181 nas células NK (CNK) a diferentes dias de cultura na ausência e na presença de IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21)

Dia de cultura	Intensidade de expressão de CD181 nas CNK													
	Sem IL							Com IL						
	Média	±	DP	Mediana	Mínimo	-	Máximo	Média	±	DP	Mediana	Mínimo	-	Máximo
D0	356	±	44	353	273	-	393	346	±	44	353	273	-	393
D2	281	±	44	281	213	-	331	245	±	27	234	216	-	279
D4/5	267	±	52	272	172	-	332	314	±	57	298	292	-	383
D7	276	±	65	271	209	-	350	383	±	126	347	228	-	538
D9	249	±	76	222	192	-	361	481	±	128	441	314	-	680

IMF, Intensidade Média de Fluorescência; IL, Interleucinas

Tabela IX: Intensidade de expressão de CD197 nas células NK a diferentes dias de cultura na ausência e na presença de IL (IL-2 + IL-12 + IL-15 + IL-21)

Dia de cultura	Intensidade de expressão de CD197 nas CNK													
	Sem IL							Com IL						
	Média	±	DP	Mediana	Mínimo	-	Máximo	Média	±	DP	Mediana	Mínimo	-	Máximo
D0	267	±	76	227	118	-	312	226	±	76	227	118	-	312
D2	282	±	79	296	157	-	359	428	±	124	410	293	-	575
D4/5	231	±	76	240	117	-	305	537	±	123	502	226	-	732
D7	206	±	73	210	112	-	285	581	±	152	540	409	-	861
D9	196	±	49	208	130	-	238	589	±	177	581	379	-	870

IMF, Intensidade Média de Fluorescência; IL, Interleucinas