



Poster 26. RECETORES DE CITOTOXICIDADE NATURAL NAS CÉLULAS NATURAL KILLER DO SANGUE PERIFÉRICO

Marlene Santos^{1,2}, Ana Helena Santos^{1,2}, Lurdes Oliveira^{1,2}, Sónia Fonseca^{1,2}, João Rodrigues^{1,2}, Marta Gonçalves^{1,2}, Maria Luís Queirós^{1,2}, Magdalena Leander^{1,2}, Catarina Lau^{1,2}, Maria Anjos Teixeira^{1,2}, Margarida Lima^{1,2}

¹Laboratório de Citometria, Serviço Hematologia Clínica, Hospital Santo António, Centro Hospitalar do Porto.

²Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Introdução

Com base na expressão de CD56 (molécula de adesão) e de CD16 (recetor para o fragmento Fc da IgG) distinguem-se no sangue periférico (SP) duas populações de células *natural killer* (CNK) CD56+: as CNK CD56+fracoCD16+ (ou CNK CD56+) com funções predominantemente citotóxicas, e as CNK CD56+forteCD16-/+fraco (ou CNK CD56++), fundamentalmente imunomoduladoras. Os recetores de citotoxicidade natural (NCR, *natural cytotoxicity receptors*) são específicos das CNK. Pertencem a este grupo o CD335 (NCR1), o CD336 (NCR2) e o CD337 (NCR3). Têm função ativadora são importantes no reconhecimento de células tumorais (proteoglicanos heparinóides sulfatados) ou infetadas por vírus (hemaglutininas víricas). O CD335 e o CD337 são expressos de forma constitutiva nas CNK, enquanto o CD336 se expressa só nas CNK activadas. Para a transmissão do sinal, os dois primeiros exercem usam os motivos ITAM de outras moléculas enquanto o CD336 se associa à DAP12/KARAP.

Objectivos

Caraterizar, por citometria de fluxo (CF), a expressão dos NCR nas subpopulações de CNK CD56+ e CD56++ do SP de indivíduos adultos saudáveis.

Material e Métodos

Foram estudadas amostras de SP colhidas em EDTA-K3, de 30 indivíduos adultos saudáveis (dadores benévolos de sangue), 15 homens e 15 mulheres, com idade mediana de 42 anos, variando entre os 23 e 65 anos. A caraterização da expressão de NCR nas CNK foi feita por CF, através da marcação directa das células com combinações quadruplas de anticorpos monoclonais com diferentes especificidades (CD3, CD56, CD335, CD336, CD337) conjugados com fluorocromos distintos (FITC, PE, PC5, APC ou AF647), seguida de fixação dos leucócitos e lise dos eritrócitos (FACSlysing solution, Becton Dickinson, BD). As amostras (200.000 células) foram adquiridas no citómetro FACScalibur TM (BD) e analisadas com o *software* Paint a Gate (BD). Foi calculada percentagem (%) de CNK nos linfócitos, a fração de CNK CD56+ e CD56++ e, dentro de cada população, a % de CNK que expressava cada um dos NCR e a respetiva expressão, avaliada pela intensidade média de fluorescência (IMF) e pelo seu coeficiente de variação (CV). Para a análise estatística dos dados recorreu-se ao SPSS 18.

Resultados

As CNK representavam 14,3±8,7% dos linfócitos e, tal como esperado, havia um claro predomínio de CNK CD56+ (94,8±3,0%) em relação às CNK CD56++ (5,2±3,0%). A figura ilustra o perfil de expressão dos NCR (CD335, CD336 e CD337) nas CNK CD56+ (vermelho) e CD56++ (preto). Observou-se expressão de CD335 e de CD337 na maioria (69,2±18,5% e 66,2±16,0%, respetivamente) das CNK de todos os indivíduos, embora a expressão destas moléculas fosse fraca e heterogénea. Quer as CNK CD56+ quer as CD56++ expressavam CD335 e CD337, sendo a % de CNK CD335+ e CD337+ superiores, e a expressão destas moléculas mais forte e mais homogénea nas CNK CD56++ ($p < 0,001$). Pelo contrário, o CD336 expressava-se numa fracção muito pequena das CNK (0,5±0,3%).



Discussão e conclusões

Tal como esperado, observamos NCR CD335 e CD337 eram expressos na maioria das CNK do SP, enquanto o CD336 se observou numa fracção muito pequena destas células, o que pode ser explicado pela relação deste recetor com a activação celular. A intensidade fraca de expressão de CD335 e de CD337 pode ter relação com as condições experimentais (ex. anticorpos monoclonais e/ou fluorocromos), o que pode ter influenciado os resultados, pelo que a % de células positivas pode ser superior ao obtido. De facto, embora o perfil observado nos "dot plots" CD335/CD56 e CD337/CD56 sugira que estes NCR se expressam praticamente todas as CNK, as % de CNK com IMF superiores às observadas nos controlos negativos foram bastante inferiores a 100%. Este estudo foi importante para obter valores e perfis fenotípicos de referência para o estudo das CNK em doentes com diversas patologias do foro imunohematológico e oncohematológico.

Apresentador

Marlene Santos, Técnica de Diagnóstico e Terapêutica, Análises Clínicas; Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do CHP; Aluna de Mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública, ICS/UCP.

marlena@portugalmail.pt