

OFERTA

MARIA DA GRAÇA FERREIRA SIMÕES DE CARVALHO



UNIVERSIDADE DE AVEIRO
SERVIÇOS DE BIBLIOTECARIA

SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS HUMANOS

ALTERAÇÕES CAUSADAS POR AGENTES IMUNODEPRESSORES EM DOENTES RECEPTORES DE ENXERTO CARDÍACO

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para obtenção do grau de Doutor em Biologia



113307

Aveiro, Setembro 1985

SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS HUMANOS

ERRATA

pag.	linha	onde se lê	leia-se
27	Fig. 14	Receptores EAC	Rosetas EAC
28	22	1979).	1979a).
38	1	passada quer pela	passada pela
38	3	anti-Ig, quer utili-	anti-Ig, e utili-
44	Fig.1.6.	linfócito livre	linfócito livre (x500).
45	22	4-Calculações	4-Cálculos
51	8	na RRM.	na RRM (x500).
60	24	Behringwewere	Behringwerek
64	17	passiva e reversiva	passiva e inversa
69	10	7 dias após o que	7 dias em estufa húmida, a 37°C e com a pressão de CO ₂ a 5%, após o que
72	18-19	As placas recobertas de antígeno foram então incubadas	O antígeno fixado às placas foi então incubado
73	22	passiva e reversiva	passiva e inversa
76	7	Fiöland	Fröland
78	10-11	significativamente diferentes (P>>0.05)	significativas (P>>0.05)
113	3	Nesta sacção	Nesta secção
116	13 e 14	$(x-x)^2$	$(x-\bar{x})^2$
117	20	$110^{\pm 30} \times 10^4$	$110^{\pm 10} \times 10^4$
120	leg. Fig. linha 5	(P0,05) mas são-no as médias (P0,05).	(P>0,05) mas são-no as médias (P<0,05).
142	15	imunodepressor alte-	imunodepressor na alte-
142	24	precedentes),	precedentes,
150 verso	8	HLA-A7,26	HLA-A1,26
155	leg. Fig. 3.25	por vírus (),	por vírus (∴),
	2	herpesvírus ().	herpesvírus (∴).
	3		
168	5	(ii) da porção Fc da	(ii) da porção Fc de
178	22	lulas RFc _Y ⁺ ;	lulas RFc _Y ⁺);
180	Fig. 4.1	Subpopulação duplamente	Subpopulação quadrupla-mente
186	6	1971,	1971),
194	16	Contrariamente aos	Contrariamente ao
196	8	estudos	estados
204	19	antígenoq	antigênios
205	2	específico: (i) antígeno T ₄	específico; (ii) antígeno T ₈
205	4	antígeno T ₈	antígeno T ₄
206	7	às alterações	as alterações

Í N D I C E

PREFÁCIO

I. INTRODUÇÃO	14
A. APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA	15
B. GENERALIDADES SOBRE POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS	16
1. Ontogenia dos linfócitos B e T	16
2. Função <i>in vitro</i> dos linfócitos humanos	19
a. Testes funcionais para linfócitos B	20
b. Testes funcionais para linfócitos T	21
3. Receptores e antigénios de membrana dos linfócitos humanos	22
a. Receptores linfocitários	22
1) Receptores E	22
2) Receptores Fc	26
3) Receptores de complemento	28
b. Antigénios linfocitários	29
1) Citotoxicidade mediada por complemento	30
2) Imunofluorescência	32
3) Reacção de roseta antiglobulina directa (RRAD) ...	33
C. A CONTROVÉRSIA NA DEMARCAÇÃO DE POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS DO SANGUE HUMANO; OBJECTIVOS DO PRESENTE ESTUDO	34
D. ESCOLHA E DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA A APLICAR NO PRESENTE ESTUDO	37
1. A escolha da RRAD para identificação de linfócitos B ...	37
2. Anticorpos monoclonais (AcMc)	40
3. Adaptação da RRAD ao uso de AcMc no teste RRAdD	42
4. Desenvolvimento de técnicas para determinação de populações linfocitárias duplamente marcadas	44
a. Técnica de destituição celular	45
b. Reacção de roseta mista (RRM)	48

II. MATERIAL E MÉTODOS	53
A. MATERIAL DE ESTUDO	54
1. Dadores voluntários de sangue	54
2. Pacientes receptores de enxerto cardíaco	54
a. Doentes de sobrevida longa, imunodeprimidos por prednisolona e azatioprina	54
b. Doentes imunodeprimidos por ciclosporina A e prednisolona	55
c. Doentes imunodeprimidos por globulina anti-timócito (GAT), ciclosporina A e prednisolona	55
B. MÉTODOS	56
1. Preparação de suspensões linfocitárias	56
2. Preparação da fracção de IgG a partir de soros normais, de anti-soros e de líquido ascítico	58
a. Preparação da IgG a partir de soros normais e de anti-soros	58
b. Preparação da IgG de anticorpos monoclonais (AcMc) a partir de líquido ascítico de Rato	59
3. Preparação de eritrócitos para reacções de roseta	60
a. Tratamento de eritrócitos de Carneiro com neuraminidase, para a reacção de roseta E	60
b. Sensibilização de eritrócitos de Boi com IgG, para a reacção de roseta EA	61
c. Conjugação de IgG a eritrócitos de Boi para as reacções RRAD e RRAdD	61
1) Tratamento de eritrócitos de Boi com papaína	61
2) Conjugação de IgG a eritrócitos de Boi, pela acção do CrCl_3	62
3) Provas da eficiência da conjugação	63
d. Conjugação de fluorocromo a eritrócitos de Boi, para a reacção de roseta mista (RRM)	65
4. Reacções de roseta	65
a. Reacção de roseta E	65
b. Reacção de roseta antiglobulina (ou antideterminante) directa, RRAD (ou RRAdD)	66
c. Reacção de roseta mista (RRM)	66
d. Reacção de roseta EA	67

5. Destituição de populações linfocitárias formadoras de rosetas	68
6. Culturas celulares	68
a. Estimulação mitogênica (PHA)	68
b. Estimulação mitogênica (GAT)	69
c. Estimulação alo-antigênica	69
d. Estimulação por células autólogas transformadas por vírus Epstein-Barr	70
e. Determinação da timidina- ³ [H] incorporadas nas células em cultura	71
7. Ensaio imunológico	71
a. "ELISA" para determinação de anticorpos contra citomegalovírus	71
b. Ensaio de antiglobulina relacionada com infecção ..	72
c. Determinação da IgM total	73
8. Metodologia estatística utilizada no tratamento dos resultados	74
III. RESULTADOS	75
A. ESTUDO DA INTERRELAÇÃO DE POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS	76
1. Marcação da população T	76
2. Marcação de diversas populações linfocitárias	79
3. Determinação da interpenetração de pares de populações	80
a. Correlação entre as populações B e Ck ⁺	82
b. Correlação entre as populações B e T	86
c. Correlação entre as populações T e Ck ⁺	89
d. Correlação entre as populações B e Ia ⁺	90
e. Correlação entre as populações T e Ia ⁺	96
f. Correlação entre as populações B e RFc _γ ⁺	97
g. Correlação entre as populações T e RFc _γ ⁺	101
h. Correlação entre as populações Ia ⁺ e RFc _γ ⁺	103
4. Heterogeneidade das populações linfocitárias	105
a. População B	105
b. População T	107
c. População Ia ⁺	108
d. População RFc _γ ⁺	111

B. ESTUDO DAS POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS DE DOENTES IMUNODEPRIMIDOS APÓS TRANSPLANTAÇÃO CARDÍACA	113
1. Estudo das populações linfocitárias de doentes de sobrevida longa, imunodeprimidos por prednisona e azatioprina	114
a. Alteração das proporções das populações linfocitárias	114
b. Alteração da quantidade de linfócitos que constituem as diversas populações linfocitárias	117
2. Estudo das alterações das populações linfocitárias ao longo dos primeiros 30 dias pós-operatórios	121
a. Alteração da concentração de linfócitos sanguíneos	121
b. Alteração das populações linfocitárias	123
1. População T	123
2. População B	126
3. População Ia ⁺	128
4. População RFc _γ ⁺	130
c. Alteração de subpopulações de linfócitos T	132
1. Subpopulação TIa ⁺	133
2. Subpopulação TFc _γ ⁺	135
d. Alteração das diversas populações e subpopulações observadas no Doente D-44	135
e. A globulina anti-timócito (GAT) ligada aos linfócitos causará interferência nas reacções de roseta?.....	138
1. Efeito da adição de GAT na análise fenotípica dos linfócitos sanguíneos	139
2. Efeito da adição de GAT na análise fenotípica das células da medula óssea	141
3. Cultura de linfócitos humanos na presença de GAT	142
3. Detecção de respostas imunológicas (celulares e humorais) contra infecções por herpesvírus em doentes imunodeprimidos)	149

a.	Células transformadas por VEB causam activação de linfócitos autólogos, <i>in vitro</i>	149
b.	Relacionamento de elevados níveis de linfócitos T _{Ia} ⁺ com infecções por herpesvírus	152
c.	Estudo da relação de níveis elevados de linfócitos T _{Ia} ⁺ e infecções virais, em casos individuais	156
IV.	DISCUSSÃO	167
A.	POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM DADORES SAUDÁVEIS	169
1.	A população B	169
2.	A população T	173
3.	Interrelação das populações B e T	174
4.	A população I _a ⁺	176
5.	A população R _{Fc_γ} ⁺	178
6.	Um modelo para a interpenetração das diversas populações linfocitárias	180
B.	POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM DOENTES RECEPTORES DE ENXERTO CARDÍACO	182
1.	Terapia por corticosteróides e azatioprina	183
a.	Efeito dos corticosteróides e da azatioprina nas funções dos linfócitos	184
b.	Efeito dos corticosteróides e da azatioprina na redistribuição das subpopulações linfocitárias	185
2.	Terapia por globulina anti-timócito (GAT)	188
a.	Efeito da GAT na quantidade de linfócitos constituintes das subpopulações linfocitárias	190
b.	Efeito da GAT na proporção das subpopulações de linfócitos circulantes	191
c.	Efeito da GAT na análise fenotípica das células linfóides	192
d.	Estimulação de linfócitos com GAT <i>in vitro</i>	194
3.	Terapia por ciclosporina A (Cs-A)	195
a.	Efeito da Cs-A e prednisolona na redistribuição das subpopulações linfocitárias	197

b. Activação dos linfócitos durante infecção por herpesvírus	198
C. NOTAS FINAIS	202
1. Alterações fenotípicas dos linfócitos	202
2. Marcadores de membrana e função dos linfócitos	204
3. Diagnóstico de infecções virais pelo aumento da subpopulação T1a ⁺	205
RESUMO	207
SUMMARY	211
BIBLIOGRAFIA	214

P R E F Á C I O

Ao apresentarmos esta dissertação à Universidade de Aveiro pretendemos não só satisfazer as disposições legais impostas àqueles que aspiram pela Carreira Universitária como também proporcionar que especialistas de Imunologia Celular possam debater connosco o trabalho que ora apresentamos e que representa o culminar de alguns anos de investigação científica. Contudo, entendemos que o título de Doutor não deve constituir mais do que um marco num caminho que sentimos ser longo e difícil, mas apaixonante. Tanto mais longo e difícil quanto mais nele avançamos; e tanto mais apaixonante quanto mais nele nos envolvemos.

Foi ainda durante a frequência do Bacharelato de Biologia da Universidade de Coimbra (1973-1976) que despertou em nós o gosto pela Fisiologia Celular. Foi por essa razão que orientámos o Currículo da Licenciatura, Ramo Científico (1976-1978), pela área da Biologia Funcional. Nestes cinco semestres de iniciação ao trabalho científico focalizámos o nosso estudo em duas linhas de investigação: Ultraestrutura Celular e Biologia Funcional. Ao Senhor Professor JOSÉ FIRMINO MESQUITA e ao Dr. DIAS, ambos do Instituto Botânico de Coimbra (Centro de Microscopia Electrónica) ficámos a dever a nossa aprendizagem de técnicas em Microscopia Electrónica de Transmissão.

E, no entanto, ao Senhor Professor Doutor ARSÉLIO PATO DE CARVALHO que mais imensamente reconhecidas ficamos por nos ter lançado na fascinante área da Biologia Celular. Cabe aqui referir um facto que ocorreu logo no início do nosso estudo em Imunologia Celular na Magna Instituição que é Universidade de Cambridge (Inglaterra). O nosso orientador de então, Prof. R.R.A. COOMBS, ao fim de algumas semanas de

aprendizagem e aplicação de novas técnicas, dirigiu-nos altos elogios à invulgar facilidade e destreza com que manuseávamos e dirigíamos o trabalho laboratorial. Evidentemente que de imediato endossámos (e agora dedicamos) este louvor ao dinâmico e hábil Investigador e sábio Professor, o Doutor PATO DE CARVALHO.

Terminada a licenciatura em Biologia ingressámos na Carreira Académica na jovem Universidade de Aveiro (1978) que por estar ainda em "fase de Instalação", o Departamento de Biologia encontrava-se em instalações provisórias, sendo o seu equipamento altamente deficiente, confinado a pouco mais do que material de vidro. Por esta razão, durante os dois anos de docência em Aveiro (1978-1980), continuámos a desenvolver trabalho científico em Coimbra. Mais uma vez queremos deixar expresso o nosso agradecimento ao Senhor Doutor ARSÉLIO PATO DE CARVALHO por nos ter mantido as portas abertas do seu Departamento de Zoologia onde trabalhámos sob orientação do Senhor Professor Doutor EUCLIDES PIRES e em colaboração com a Dra. MARIA MANUELA MARCELINO. Durante estes dois anos de Investigação em Coimbra e de Docência em Aveiro, o gosto pela Biologia Celular foi-se orientando no sentido da Imunologia Celular pois que quanto mais líamos sobre populações linfocitárias e seus mecanismos de cooperação, mais se nos foi tornando claro que seria na área da Imunologia que deveríamos prosseguir os nossos estudos de Biologia Celular. Neste período de tempo entrámos em contacto por carta com diversas Universidades da Grã-Bretanha onde sabíamos haver projectos sobre Mecanismos de Cooperação Celular. Optámos finalmente por Cambridge, Universidade de alto prestígio onde provavelmente teríamos grandes hipóteses de entrar no Mundo Científico de vanguarda.

Concedida uma bolsa de estudo da Universidade de Aveiro por um período de três anos, integrámo-nos imediatamente (Outubro de 1980) na

equipa dirigida pelo distinto Professor Doutor R.R.A. COOMBS, investigador de mÉRito internacionalmente reconhecido, que nÃO sO nos facultou a utilizaçãO de todo o equipamento do seu Departamento de Imunologia como tambEm nos concedeu todas as facilidades ligadas à vida UniversitÁria de Cambridge. Assim, para alEm de material de estudo extraordinariamente rico e de equipamento altamente sofisticado, dispunhamos dos ensinamentos de Imunologistas eminentes.

Estando em Cambridge com o objectivo de adquirir conhecimentos e aprender tÉcnicas que fossem aplicÁveis em futuros estudos mas em condiçÕes deveras inferiores como sÃo as do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, decidimos enveredar o nosso estudo por tÉcnicas eficientes mas que nÃo requeressem elevada tecnologia. Foi dentro deste espÍrito que o Senhor Professor Doutor COOMBS orientou a nos sa tese de "Master of Science" (M.Sc.degree) pelo que lhe ficamos muito gratas. Devo tambEm à Senhora Doutora ANNE WILSON o protocolo experimental que serviu de base ao desenvolvimento de novas tÉcnicas que apresentÁmos e discutimos na tese de M.Sc.

Foi, no entanto, a vinda da Senhora Doutora CAROL O'TOOLE em 1981 para o laboratÓrio de Imunologia que alterou e fez progredir a nÍvel teÓrico e experimental o nosso trabalho em Cambridge. Estando integrada num projecto da "British Heart Foundation" a Doutora CAROL O'TOOLE apareceu com um revitalizante entusiasmo apOs um ano em que dispenderamos quase todo o tempo no melhoramento de tÉcnicas. Quis pois o destino juntar duas pessoas no mais oportuno momento: uma (Doutora CAROL) repleta de conhecimentos teÓricos e com o excepcional dinamismo para o estudo experimental, e a outra (a autora) um tanto saturada do desenvolvimento de tÉcnicas e com a Ânssia de as aplicar num projecto vÁlido. Desta agradÁvel simbiose resultou o trabalho que cons

titui matéria da presente tese de Doutoramento submetida à apreciação da Universidade de Aveiro.

À orientadora desta tese, Senhora Doutora CAROL O'TOOLE é-nos extremamente difícil traduzir em palavras tudo quanto lhe devemos em formação científica. Reconhecemos e admiramos a sua formação humana e a amizade que nos tem dedicado nas situações mais difíceis da nossa carreira e que calaram bem fundo em nós. O nosso mais vivo muito obrigado!

Ao concluirmos cinco anos de estudo em Imunologia Celular, temos a sensação de ter ficado aquém das finalidades por nós inicialmente previstas, mas satisfaz-nos a certeza de sabermos ter realizado um trabalho honesto, que na modéstia das suas limitações representa o fruto de um esforço pessoal, e de termos contribuído de algum modo para um melhor conhecimento das subpopulações linfocitárias do Homem. Este nosso trabalho resume as canseiras, hesitações, entusiasmos e desalentos sofridos em solidão que, certamente todos aqueles que um dia deixaram o País, a Família e os Amigos e levaram a cabo a dissertação de uma tese de Doutoramento bem conhecem.

Terminado o trabalho em Cambridge, houve que recorrer à estatística, como meio de análise biométrica dos dados experimentais. O método estatístico, feito para provar uma determinada hipótese explicitamente formulada no início, impõe-se de sobremaneira em Biologia como condição necessária à análise dos problemas em que a variabilidade dos dados é importante como no caso das Ciências da Vida, onde o ser vivo aparece cada vez mais acompanhado de um cortejo de números cuja análise e interpretação põem por vezes difíceis problemas. Muito temos de agradecer à Senhora Professora Doutora MARIA HELENA

MOREIRA, dinâmica professora de Ecologia que, como responsável pelo computador instalado no nosso Departamento de Biologia (obtido graças aos meios financeiros do INIC) e pelos programas estatísticos cuidadosamente elaborados, nos proporcionou o acesso ao computador. Deste modo, o que poderia ter sido um tratamento matemático difícil e fastidioso tornou-se um trabalho mais leve e agradável e que até secundariamente nos levou a despertar para o fascinante mundo da informática.

Temos ainda uma palavra de reconhecimento pela prontidão com que a ilustre Senhora Professora Doutora MARIA DE SOUSA nos recebeu no Porto e pela forma entusiasmante com que nos encorajou a prosseguir com a apresentação desta tese no mais curto espaço de tempo, atitudes estas que reflectem o seu dinamismo e vontade científica. Foi ainda a Senhora Professora Doutora MARIA DE SOUSA que nos pôs em contacto com o Senhor Professor Doutor CASTRO E MELO, que em espírito de verdadeira colaboração e após horas perdidas de fastidiosa leitura do manuscrito da dissertação nos dirigiu sugestões, fez comentários e críticas que muito sinceramente agradecemos.

Aos elementos da Comissão Coordenadora do Conselho Científico da Universidade de Aveiro, Senhora Professora Doutora MARIA ANA SANTOS e Senhor Professor Doutor JORGE RINO, queremos deixar uma palavra de agradecimento pela consideração com que sempre nos distinguiram e a pronta e incondicional ajuda nos momentos que dela mais necessitamos.

A todos os colegas e pessoal auxiliar do Departamento de Biologia, que das mais diversas formas nos acompanharam e apoiaram, expressamos o nosso mais vivo apreço. Foi por nós especialmente apreciada a invulgar perfeição e prontidão com que a Senhora D. CELESTE SARABANDO

dactilografou o presente texto.

A meus Pais e Amigos apraz-nos afirmar que a realização deste trabalho sō foi possível graças ao seu incitamento e apoio os quais se manifestaram de forma constante e intensa.

Finalmente desejamos agradecer à Universidade de Aveiro, nas pessoas do Senhor Professor Doutor GUSTAVO CALDEIRA (Presidente do Conselho Directivo do Departamento de Biologia) e Senhor Professor Doutor MESQUITA RODRIGUES (Reitor da Universidade de Aveiro), a concessão da bolsa de estudo que nos permitiu realizar o trabalho de investigação pelo período de três anos, em Cambridge. Foi também o Instituto Nacional de Investigação Científica que participou financeiramente na nossa última deslocação a Cambridge (Fevereiro de 1985) permitindo-nos discutir com a Orientadora assuntos relacionados com a tese bem como fazer uma actualização da bibliografia assegurando assim a apresentação de uma tese devidamente actualizada. Ambas as instituições nos merecem palavras de reconhecimento por todo o apoio material com que já nos distinguiram, na esperança de que futuramente não negarão, as nossas solicitações no sentido de continuarmos, agora no nosso País, um trabalho que nos esforçaremos por ser válido, sem o que ficaríamos despidos de sentido os gastos físicos, morais e materiais que dispendemos até à data.

C A P Í T U L O I

- INTRODUÇÃO -

I. INTRODUÇÃO

A. APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA

Os linfócitos do sangue periférico humano têm sido divididos em várias subpopulações. Na verdade, as diversas capacidades funcionais dos linfócitos bem como a presença de determinadas estruturas moleculares na superfície externa da membrana dos linfócitos têm servido de base à distinção de subpopulações linfocitárias.

No presente estudo pretendemos mostrar que populações linfocitárias perfeitamente distintas, fixas e imutáveis não existem no Homem. Demonstraremos pois que a membrana dos linfócitos sanguíneos apresenta diversas combinações de receptores e antigénios; deste modo, as populações linfocitárias não devem ser consideradas como compartimentos celulares estanques, mas antes e pelo contrário como populações interpenetradas. O aumento ou redução da expressão de receptores e/ou antigénios na superfície externa dos linfócitos, como resultado da resposta imunológica dos linfócitos, evidenciará a natureza dinâmica e mutável das populações linfocitárias.

Estudaremos também o efeito de drogas imunodepressoras não só na demarcação de subpopulações linfocitárias mas também na capacidade de resposta imunológica dos doentes transplantados cardíacos. Embora a concentração de linfócitos circulantes no sangue seja reduzida, demonstraremos que estes doentes imunodeprimidos são capazes de desenvolver respostas imunológicas detectáveis não só através da produção de anticorpos, mas também pela expressão extraordinariamente elevada de determinados antigénios de membrana. Tendo em atenção estas reacções imunológicas desenvolvidas por doentes sob tratamen-

to prolongado de agentes "imunossupressores" e considerando a precisão de linguagem não como um "preciosismo" mas antes como a tradução correcta de um fenómeno natural, propomos que o termo comumente utilizado como *imunossupressão* seja posto em causa para ser substituído por *imunodepressão* uma vez que o primeiro indica uma ausência total de reacção imune enquanto que o segundo se refere à diminuição das capacidades imunológicas.

B. GENERALIDADES SOBRE POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS

1. Ontogenia dos linfócitos B e T

Está já definitivamente estabelecido que os linfócitos B e T apresentam diferentes vias de desenvolvimento. Nos mamíferos, a diferenciação das células precursoras em linfócitos B e T foi localizada no fígado fetal durante a embriogénese e na medula óssea durante a vida adulta (Owen e col., 1974).

Na medula óssea do Homem adulto têm sido descritos três estados de desenvolvimento de linfócitos B (McConnell e col., 1981): a) as células pré-B do tipo I constituem a população menos desenvolvida, formada de células de tamanho heterogêneo, em rápida divisão e capazes de sintetizar Ig M que não é contudo expressa na superfície celular; b) as células pré-B do tipo II apresentam tamanho homogêneo e exibem exclusão alélica (isto é, produção de uma só forma alélica, de entre as duas possivelmente existentes no genoma) para os vários alotipos

de IgM; c) as células B imaturas (ou primárias) expressam IgM de sua superfície e diferem das células B maduras por: i) não re-expressarem Ig depois do fenômeno artificial de "capping" (isto é, deslocamento para um polo celular de toda a Ig de superfície como resultado da reação com anti-Ig), ii) baixas concentrações de anti-IgM são suficientes para inibir proliferação mitogênica e, iii) são facilmente tornadas tolerantes perante exposição a fracas doses de antígeno (Nossal e Pike, 1975; Metcalf e Klinman, 1976).

Os linfócitos B maduros podem expressar à superfície externa da membrana celular apenas IgM, ou IgM em conjunção com outras classes de Ig; associa-se depois a IgD que coexiste com as outras classes de Ig mas que após estimulação antigênica desaparece e o linfócito diferencia-se em célula da memória ou, alternativamente, em plasmócito secretando apenas uma das classes de Ig (Abney e col., 1977). (Fig.1.1).

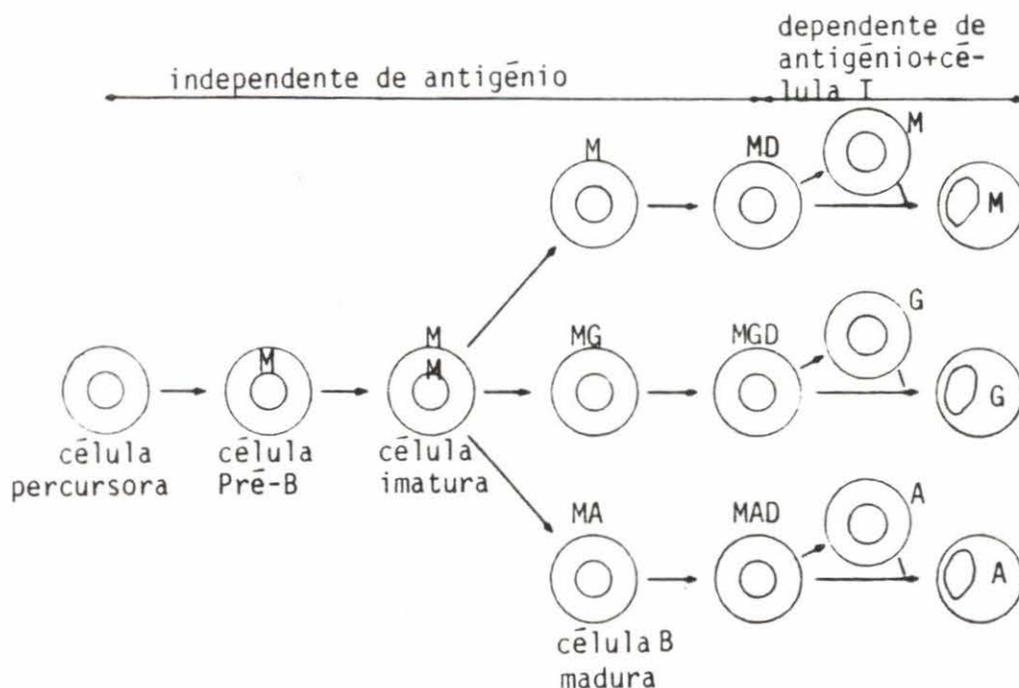


Fig. 1.1. - Diferenciação dos linfócitos B na medula óssea humana. (Baseado em Abney e col., 1977).

Note-se contudo, que todas as moléculas das várias classes de Ig expressas na superfície de cada linfócito B têm idêntica sequência da região variável da Ig em ambas as cadeias, pesada e leve, (Goding e Layton, 1976) diferindo apenas na região constante das cadeias pesadas (região esta que dá o nome à classe de Ig).

Células precursoras originadas na medula óssea ou fígado fetal são atraídas para o timo (Wallis e col., 1975) e aí se diferenciam em linfócitos T, sob acção de alguns "factores tímicos". Estes constituem ainda fonte de intensa investigação e dos vários factores estudados apenas a hormona timopoetina pôde ser provada como exercendo um papel definitivo na maturação dos linfócitos T (Bach e col., 1979).

Um painel de vários anticorpos monoclonais desenvolvido por Reinherz e col., (1980-b; 1981) permitiu delinear três estados principais na maturação dos linfócitos T humanos. Os antigénios de superfície dos timócitos reconhecidos por tais anticorpos monoclonais foram designados T₁, T₂ T₁₀ e os 3 estados de maturação incluem: no estado I (*timócito primário*) T₁₀ e T₉; no estado II (*timócito comum*) T₁₀, T₆, T₄, T₅ e T₈; no estado III (*timócito maduro*), subdividido em *linfócitos T indutores* T₁₀, T₁, T₃ e T₄ e em *linfócitos T supressores* T₁₀, T₁, T₃, T₅ e T₈ (Reinherz e col., 1979-a, b; 1980-b) (Fig. 1.2.).

Os linfócitos B e T maduros deixam os órgãos linfóides primários e migram preferencialmente para o baço (Humphrey, 1980) onde sofrem posterior maturação, sendo então lançados na circulação linfocitária (Howard, 1972), atravessando pois os órgãos linfóides secundários: baço, nódulos linfáticos e tecido linfóide associado ao aparelho respiratório e digestivo. Nestes órgãos os linfócitos B e T colonizam áreas separadas: timo-dependentes (áreas de células T) e timo-independentes

(áreas de células B) (Nieuwenhuis e Ford, 1976).

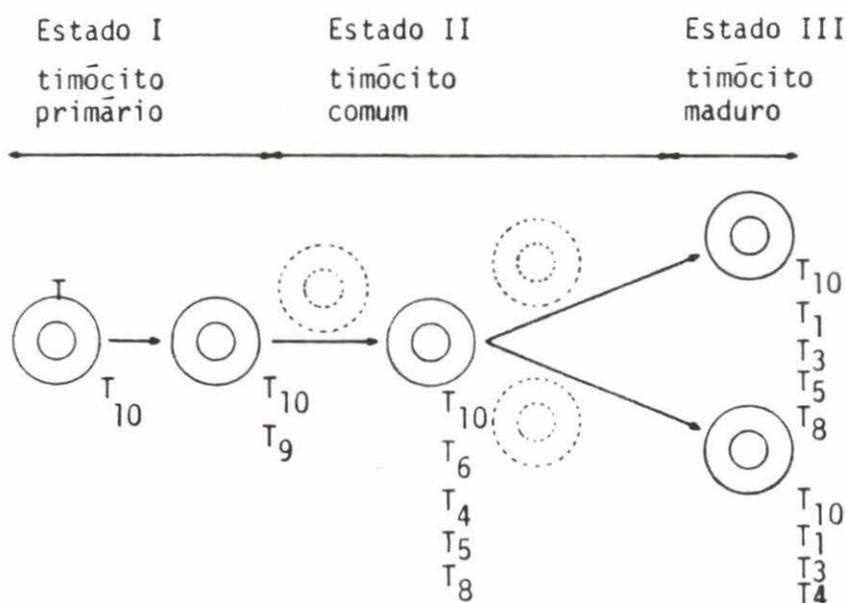


Fig. 1.2. Diferenciação dos linfócitos T no timo humano. Os círculos a cheio representam timócitos em estados específicos de fenótipo definido; os círculos a tracejado representam transição hipotética entre os estados bem definidos. (Baseado em Reinherz e Schlossman, 1980).

2. Funções *in vitro* dos linfócitos humanos

As conclusões de estudos realizados em animais sobre interações celulares na resposta imunológica têm apoiado as teorias deduzidas do estudo de casos de imunodeficiências no Homem. Mas foi o crescente aperfeiçoamento e sofisticação da tecnologia dos últimos 10 anos que proporcionou de uma forma decisiva a caracterização das funções dos linfócitos humanos.

a. Testes funcionais para linfócitos B

É característica principal dos linfócitos B a sua capacidade de se diferenciarem em plasmócitos, secretores de anticorpos, como resposta a estimulação antigénica. Face a um determinado antigénio apenas uma reduzida população de linfócitos B, específicos para aquele antigénio, é estimulada e sofre proliferação e maturação, tal como salienta a teoria da selecção clonal exposta por Burnet (1957) e ainda hoje bem aceite. Ora a detecção desta resposta parcial e específica de linfócitos B só é possível com a aplicação de métodos altamente sensíveis, pelo que se tem ultrapassado este problema da selecção clonal utilizando, na vez de antigénios, activadores policlonais de linfócitos B (APB) capazes de estimular todas (ou quase todas) as células B.

Alguns dos APB comumente utilizados têm maior capacidade de estimulação dos linfócitos B quando os linfócitos T estão presentes no meio de cultura; são eles o "pokeweed mitogen" (PWM) (Greaves e col., 1974; Lohrmann e col., 1974), Proteína A solúvel (Lipsky, 1980), gel poliacrilamida (Galanaud, 1979) e PPD ("purified protein derivative", produto solúvel de *Mycobacterium tuberculosis*) (Ringden e col., 1979). A acção reguladora dos linfócitos T na estimulação dos linfócitos B pelo PWM parece ser efectuada por subpopulações de linfócitos T: as células T indutoras que activam a proliferação dos linfócitos B (Reinherz e col., 1979-b) e as células T supressoras que inibem a mesma proliferação (Moretta e col., 1979 b).

Pelo contrário, outros APB activam mais eficazmente os linfócitos B na ausência dos linfócitos T; são eles LPS (lipopolissacárido de *Escherichia coli*) (Smith e col., 1979), mitogénios solúveis em água de *Nocardia* (Brochier e Lethibichthuy, 1978), de *Staphylococci*

(Ringden e col., 1977) ou de *Salmonellae* (Chen e col., 1981) fixadas em formalina, e virus Epstein-Barr (Bird e Britton, 1979). A grande dificuldade em interpretar os resultados obtidos de estimulações policlonais de linfócitos B reside no facto de que diferentes APB estimulam diferentes subpopulações de linfócitos B (Romagnani e col., 1980; Ault e Towle, 1981).

b. Testes funcionais para linfócitos T

O reconhecimento da importância das interleuquinas como factores reguladores da proliferação dos linfócitos T (revisto em *Immunological Reviews*, 51, 1980) tornou muito complicada a interpretação da proliferação dos linfócitos T em resposta a mitogénios. Além disso cada mitogénio estimula diferente subpopulação de linfócitos T; assim, por exemplo, a Concanavalina-A (Con-A) estimula uma subpopulação que não se sobrepõe exactamente à subpopulação estimulada por fitohemaglutinina (PHA) (Rawson e Huang, 1975). É certamente possível que a resposta dos linfócitos a diferentes mitogénios possa um dia explicar a patogénese de diversas situações de deficiência de células T (Hayward, 1983).

Para além da estimulação mitogénica, os linfócitos T podem ser activados por antigénios de histocompatibilidade estranhos (aloantigénios) obtidos de diferente dador se postos juntamente em cultura (MLC-"mixed lymphocyte culture"). As células T activadas quer por mitogénios quer por aloantigénios são responsáveis pela actividade citotóxica na linfolise mediada por células (CML-"cell-mediated lympholysis") (Sondel e col., 1975) e produzem uma variedade de factores solúveis que afectam diversas funções linfocitárias (Geha e col., 1973; Rocklin e col., 1974). De particular importância é a capacidade de me

mória e de especificidade manifestada pelas células T activadas em MLC contra os linfócitos alogeneicos estimuladores (Solliday e Bach, 1970).

Em contraste com estas células T citotóxicas que requerem um encontro prévio com mitogénios ou aloantigénios estimuladores, existe uma pequena subpopulação de linfócitos sanguíneos que é imediatamente activa em ensaios citotóxicos: as *células assassinas* (células K-"killer cells") que lisam células alvo por meio de anticorpos, detectáveis no ensaio de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC-"antibody-dependent cellular cytotoxicity") (Möller, 1965) e as *células assassinas naturais* (células NK - "natural killer cells") que espontaneamente lisam algumas células alvo, detectáveis no ensaio de citotoxicidade espontânea mediada por célula (SCMC - "spontaneous cell-mediated cytotoxicity") (Pross e Jondal, 1975) que é independente da presença de anticorpo.

3. Receptores e antigénios de membrana dos linfócitos humanos

Apesar de apresentarem distintas vias de maturação e de medirem diferentes funções imunológicas, as subpopulações linfocitárias são morfológicamente indistinguíveis. Assim, a metodologia mais precisa e de mais fácil execução para a identificação daquelas populações heterogêneas é baseada nos marcadores de superfície de membrana expressos pelos linfócitos. Aquelos marcadores incidem em duas categorias principais: receptores e antigénios.

a. Receptores linfocitários

1) Receptores E

A formação espontânea de rosetas (rosetas E^{*}) por parte de uma

* E de eritrócito (de carneiro)

elevada proporção (atê 90%) de linfócitos humanos do sangue periférico com eritrócitos de carneiro, apôs centrifugação conjunta, foi primeiramente descrita por dois grupos de investigadores Coombs e col. (1970-b) e Brain e col. (1970) (Fig. 1.3).

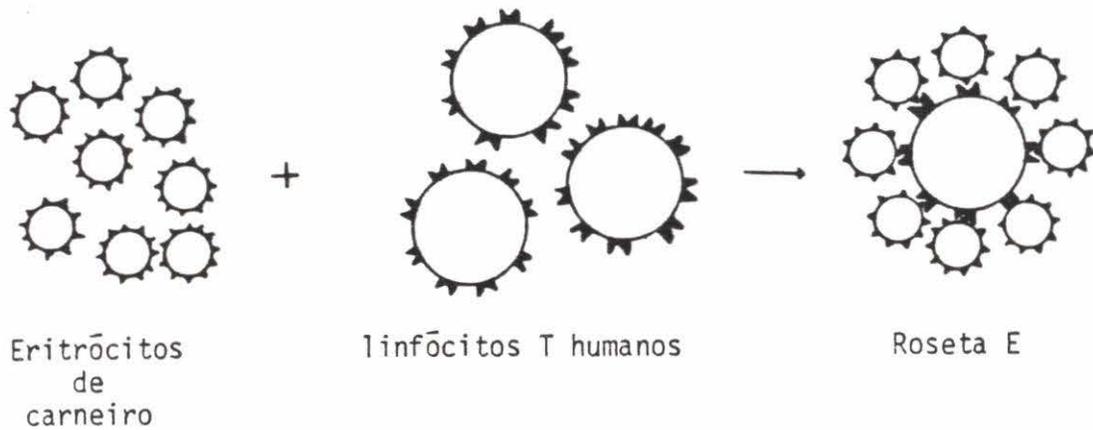


Fig. 1.3. - Diagrama esquemático da formação de Roseta E, obtida apôs centrifugação conjunta de eritrócitos de carneiro e linfócitos humanos.

Desde então intensa investigação se tem desenvolvido com vista a esclarecer tal fenómeno. Assim, foi posteriormente demonstrado que os linfócitos que formam rosetas E são quase exclusivamente células T (Fröland, 1972; Jondal e col., 1972; Papamichael e col., 1972) além de uma pequena proporção (1-6% dos linfócitos sanguíneos) de células B (Bentwich e col., 1973-a; Dickler e col., 1974; Haegert e col., 1978 a). Pouco se conhece do mecanismo da formação da roseta E ou mesmo do seu significado funcional. Sabe-se no entanto que consiste num mecanismo que requer energia (Bentwich e col., 1973-b) pois que só ocorre com linfócitos viáveis, possuidores de actividade metabólica.

A reacção de roseta E é extremamente sensível a variações das condições do meio em que se realiza; são condições óptimas as obtidas pela incubação de 1 hora a 40°C do sedimento formado apôs centrifuga-

ção dos linfócitos humanos com eritrócitos de carneiro. Rosetas E formadas em condições sub-ótimas foram chamadas "ativas" ou "primárias" ("active" ou "early", do inglês) em contraste com as "não ativas" ou "últimas" ("non-active" ou "late") que só se formam em condições ótimas (Wybran & Fudenberg, 1973; Yu, 1975; Hokland e Heron, 1979). Além disso, rosetas "estáveis" têm sido definidas como rosetas rodeando tímócitos que, ao contrário das rosetas de linfócitos sanguíneos, se mantêm intactas mesmo após prolongada incubação a 37°C (Jondal e col., 1972; Galili e Schlesinger, 1975).

Como a reacção de roseta E é relativamente instável e susceptível a rotura mecânica, diversos estudos se têm feito para o desenvolvimento da técnica sempre com a intenção de se encontrar um método para a enumeração dos linfócitos T e que, por outro lado, seja de fácil repetição nos diversos laboratórios. Verificou-se pois que a formação de roseta E pode ser fortalecida e estabilizada pela adição ao meio de reacção de soro humano AB (Bentwich e col., 1973-a), soro de feto bovino (Wybran e col., 1973) ou dextrano ou ficoll (Brown e col., 1975).

Um outro processo de tornar a formação de roseta E mais forte e estável é o tratamento prévio (à reacção com os linfócitos) dos eritrócitos de carneiro com AET (2-aminoetil-iso-tiouronio brometo hidrobrometo) (Kaplan e Clark, 1974), neuraminidase (Weiner e col., 1973; Galili e Schlesinger, 1974; Gilbertsen e Metzgar, 1976) ou papaína (Wilson e col., 1975). O tratamento dos eritrócitos com AET (E-AET) causa alterações estruturais da membrana celular induzidas pela clivagem das pontes S-S em moléculas da sua superfície externa (Chow e Kaplan, 1976); o tratamento com neuraminidase (E-Nase) remove os ácidos siálicos da superfície celular reduzindo assim a sua carga eléctrica (Seaman e Uhlenbruck, 1963); finalmente o tratamento dos eritrócitos de carneiro com a enzima proteolítica papaína (E-Pap) causa a libertação de peptídios da superfície externa da membrana do eri-

trócito. Todos estes tratamentos prévios dos eritrócitos facilitam o contacto das membranas celulares dos eritrócitos de carneiro com as dos linfócitos humanos e deste modo permitem uma mais forte interacção dos respectivos receptores celulares, resultando pois numa intensificação da reacção de roseta E. Esta intensificação da reacção traduz-se quer no aumento do número de linfócitos que reagem com eritrócitos quer no aumento do número de eritrócitos que se ligam a cada linfócito (E-Nase: Weiner e col., 1973; Galili e Schlesinger, 1974; Gilbertsen e Metzgar, 1976; E-Pap: Wilson e col., 1975; E-AET: Moore e Zusman, 1978).

Num estudo comparativo daqueles marcadores convencionais de linfócitos T mostrámos (Carvalho, 1983) que os eritrócitos de carneiro tratados com os diversos reagentes (AET, neuraminidase ou papaina) marcam a mesma população linfocitária pois que todos os indicadores (E-AET, E-Nase e E-Pap) variam paralelamente a sua reactividade nas diversas suspensões linfocitárias: linfócitos totais, suspensões destituídas de linfócitos B e suspensões enriquecidas ou destituídas de linfócitos reactivos com cada um dos referidos indicadores. Pôde-se pois concluir que se se utilizarem condições óptimas para a reacção de roseta E, qualquer dos indicadores é adequado para definir a população de linfócitos T.

A estrutura da membrana linfocitária envolvida na reacção de roseta não é ainda conhecida. No entanto, estudos recentes com anticorpos monoclonais (AcMc) contra linfócitos T humanos, revelaram que o peptídeo de P.M. 50.000 deve estar em associação com o receptor E dos linfócitos T, pois que da imensa variedade de AcMc anti-T utilizados, apenas os que se ligam à molécula de 50.000 daltons (AcMc leu-5: Howard e col. 1981; AcMc 9.6: Kamoun e col., 1981; AcMc D-66: Bernard e col., 1982; AcMc OKT-11: Verbi e col., 1982) são capazes de inibir a reacção de roseta.

2) Receptores Fc

Foi LoBuglio (1967) quem primeiro se referiu ao facto de alguns linfócitos se poderem ligar a complexos de antigénio-anticorpo, mas só em 1972 ficou definitivamente estabelecido que, quer no Rato (Basten e col., 1972-a, b; Cline e col., 1972; Grey e col., 1972; Lee e Paraskevas, 1972) quer no Homem (Dickler e Kunkel, 1972), tal ligação se deve à porção Fc da molécula IgG. O receptor da membrana do linfócito foi então designado por "receptor Fc" (Paraskevas e col.; 1972).

O receptor Fc pode ser demonstrado por diversas técnicas (revisito e discutido por Dickler, 1976), mas os métodos mais amplamente utilizados são os que empregam agregados de IgG ou complexos de eritrócito-anticorpo. O primeiro funciona como um complexo de antigénio-anticorpo clássico (Ishizaka e Ishizaka, 1960) e a sua ligação a linfócitos pode ser detectada tanto por fluorescência (Dickler e Kunkel, 1972) como por autorradiografia (Anderson e Grey, 1974).

Eritrócitos revestidos de anticorpos IgG específico para eritrócito (partículas EA: eritrócito-anticorpo) é o método actualmente mais divulgado (Fig. 1.4). Eritrócitos para EA têm vindo a preparar-se a partir do sangue de Carneiro* (Cline e col., 1972), de Boi (Hallberg e col., 1973), de Homem (Brain e Marston, 1973) e de Galinha (Halloran e col., 1975).

As condições para que os linfócitos formem rosetas com as partículas EA têm sido tema de grande controvérsia. De facto alguns investi

* Eritrócitos de carneiro não devem ser usados para partículas EA se forem destinadas a reacções com linfócitos humanos, pois que os eritrócitos de carneiro por si só reagem com os linfócitos T humanos.

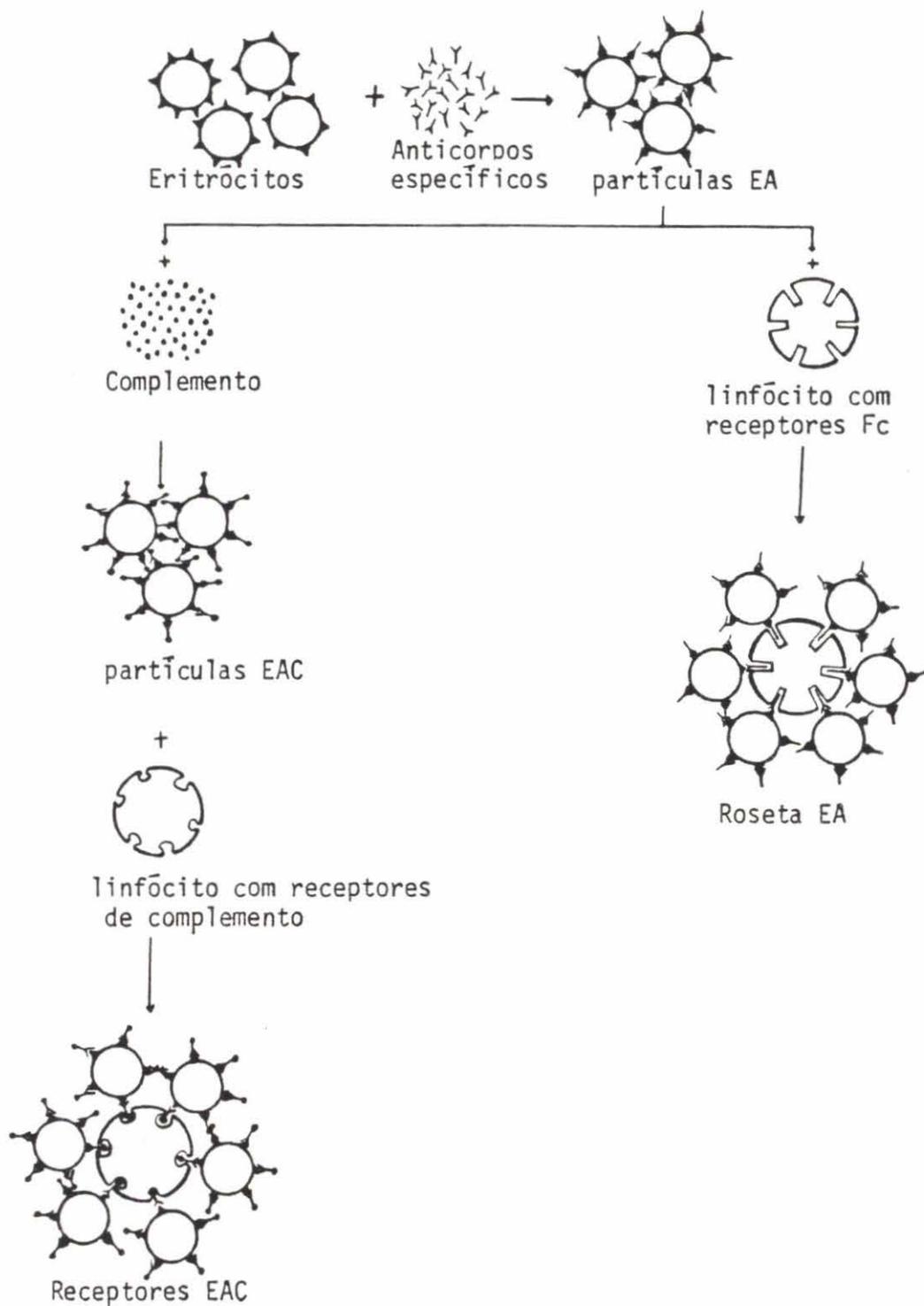


Fig. 1.4. - Diagrama esquemático da formação de rosetas EA e EAC.

Eritrócitos sensibilizados com anticorpos específicos formam partículas EA que identificam os linfócitos possuidores de receptores Fc. A adição de complemento (deficiente em C5) às partículas EA forma partículas EAC que identificam os linfócitos possuidores de receptores de complemento.

gadores (Parish e Hayward, 1974) observaram que a formação de roseta EA era dependente da temperatura de reacção enquanto que outros (Krammer e col., 1975) descreveram que o simples contacto físico (aquando da centrifugação conjunta dos linfócitos com as partículas EA) era suficiente para obtenção de reacção máxima. Por outro lado Parish e Hayward (1974) mostraram que inibidores metabólicos bloqueavam a formação de roseta EA enquanto que Ramasamy e Lawson (1975) nas mesmas condições não observaram qualquer efeito de inibição da reacção de roseta EA.

Além dos receptores para a porção Fc da IgG (receptor $Fc\gamma$ ou $RFc\gamma$) há pequenas populações de linfócitos que também expressam receptores para as porções Fc da IgM ($RFc\mu$) (Moretta e col., 1975), da IgA ($RFc\alpha$) (Gupta e col., 1979; Lum e col., 1979) e da IgE ($RFc\epsilon$) (Gonzalez-Molina e Spiegelberg, 1977).

Um grupo de investigadores italianos chefiado por Moretta tem vindo a desenvolver aturado estudo sobre a relação de expressão de $RFc\gamma$ e $RFc\mu$ pelos linfócitos T humanos activados *in vitro* por mitogénios (Moretta e col., 1976; 1977; 1978a,b; 1979b; 1980; 1981a,b; 1983a). Associaram a expressão de $RFc\mu$ à actividade indutora dos linfócitos T e a presença de $RFc\gamma$ à função supressora dos linfócitos T *in vitro* (Moretta e col., 1977, 1980, 1983) e *in vivo*, em condições patogénicas (Moretta e col., 1979). Sendo pequena a proporção de linfócitos (<5%) que expressam $RFc\alpha$ e $RFc\epsilon$ tem havido dificuldade no estudo de tais receptores de membrana e pouco se conhece da sua função imunológica.

3) Receptores de complemento

Uhr (1965) foi quem primeiro descreveu que uma população de

Linfócitos humanos era capaz de se ligar a complexos de antigênio-anticorpo-complemento. Desde então receptores de complemento foram encontrados em variadas células humanas como plaquetas sanguíneas, eritrócitos, macrófagos, polimorfos e em linhagens de alguns tumores.

Nos linfócitos do sangue periférico humano identificaram-se dois tipos de receptores de complemento (Ross e col., 1973): o *receptor b* (aderência imune) que se liga C3b (um produto de clivagem do componente C3 após acção da enzima convertase C3) e o *receptor d* que se liga C3d (um dos produtos formados a partir de C3b após acção do inactivador C3b) (Revisto por Bianco, 1977).

Os receptores de complemento são geralmente detectados por reacção de roseta com partículas EAC (eritrócito-anticorpo-complemento) que são obtidos de eritrócitos primeiramente revestidos de anticorpos IgM específicos para eritrócito, e seguidamente incubados com soro de murganho de uma estirpe deficiente em C5 (Ross e Polley, 1976) (Fig. 1.4). Esta deficiência natural do componente C5 do complemento permite uma interrupção na sequência da acção do complemento e desta forma evita-se a lise do eritrócito indicador (EAC).

Como alternativa ao método de roseta EAC, podem ser detectados receptores de complemento por partículas de zimogênio revestidas de complemento (Mendes e col., 1973; Huber e Wigzell, 1975) ou por imuno-complexos radiomarcados, contendo complemento (Eden e col., 1973).

b. Antígenos linfocitários

Os linfócitos humanos expressam aloantígenos de superfície codificados pelo complexo de histocompatibilidade principal, denomi

nado HLA ("human leukocyte antigen"). Aqueles aloantigênicos têm vindo a ser detectados por técnicas serológicas utilizando-se, como fonte de anticorpos específicos contra antígenos HLA, soros de: (i) mulheres multíparas, (ii) receptores de diversas transfusões sanguíneas e (iii) primatas imunizados com linfócitos humanos.

Imunoglobulina de superfície e outros antígenos linfocitários têm-se detectado com hetero-antisoros e, mais recentemente, com anticorpos monoclonais. Estes últimos têm-se mostrado extremamente úteis não só na definição de populações linfocitárias mas também na delimitação de vários estados de maturação (ver Fig. 1.2) (Reinherz e Schlossman, 1980) e de activação (Corte e col., 1981).

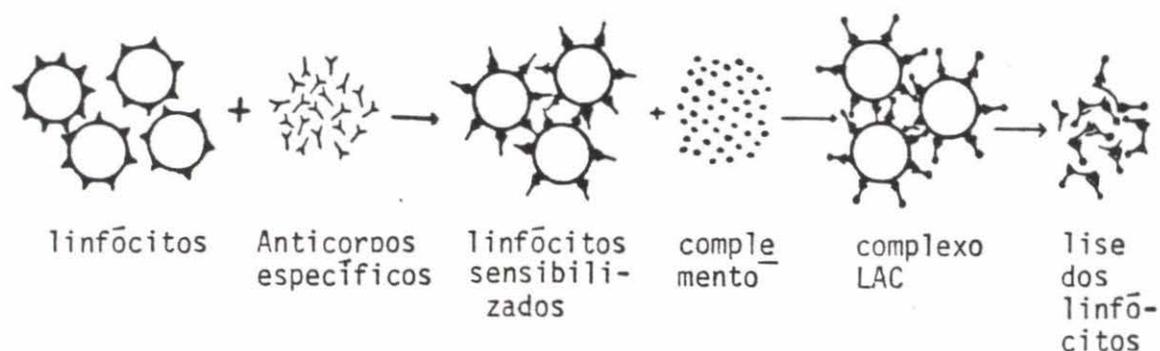
Têm-se desenvolvido vários métodos para a detecção de antígenos linfocitários sendo os de uso mais generalizado: (i) citotoxicidade mediada por complemento, (ii) imunofluorescência e (iii) reacções de roseta.

1) Citotoxicidade mediada por complemento

A tipagem de haplotipos HLA é geralmente realizada por citotoxicidade mediada por complemento que é uma técnica baseada na susceptibilidade da lise dos linfócitos na presença de anticorpo específico e complemento (Fig. 1.5. a). As células lisadas podem então ser estimadas pela coloração com corantes específicos para células mortas (por exemplo azul de tripano) (Humphrey e Dourmashkin, 1969) ou pela libertação de ^{51}Cr de células previamente marcadas (Wigzell, 1965).

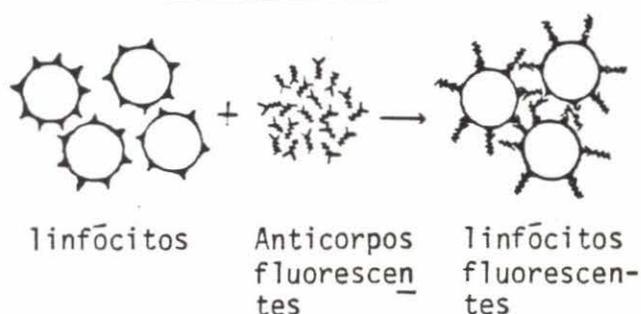
A citotoxicidade mediada por complemento embora sendo uma técnica simples e de fácil utilização, apresenta algumas desvantagens: (i) a citotoxicidade depende da resistência relativa dos diver-

a) Citotoxicidade mediada por complemento

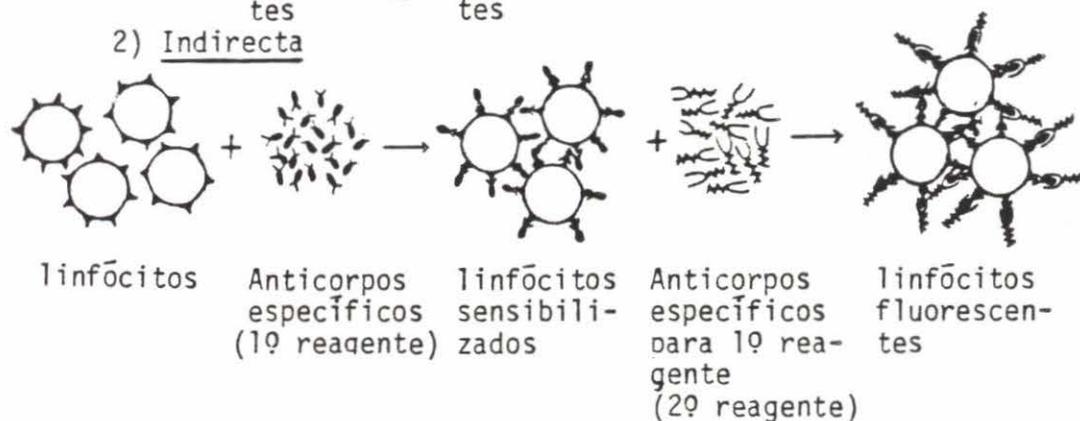


b) Imunofluorescência

1) Directa (IFD)



2) Indirecta



c) Reacção de roseta antiglobulina directa (RRAD)

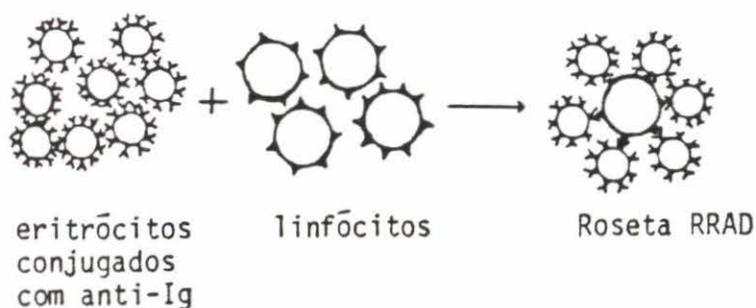


Fig. 1.5. - Diagrama esquemático das técnicas imunológicas mais generalizadas para identificação de linfócitos possuidores de antígenos de superfície.

tos tipos de células; (ii) diferentes remessas de complemento apresentam diferentes níveis de eficiência lítica, (iii) alguns anti-soros, particularmente alguns anticorpos monoclonais, reagem com linfócitos mas não fixam complemento, e por consequência podem dar falsos resultados negativos e (iv) o método não é quantitativo, permitindo apenas selecção negativa de populações linfocitárias.

2) Imunofluorescência

Populações linfocitárias portadoras de determinado antigénio podem ser identificadas por fluorescência, quer por teste directo quer por teste indirecto. No teste directo os linfócitos são directamente ligados a anticorpos específicos marcados com fluoresceína (IFD: imunofluorescência directa) (Fig. 1.5. b₁). No teste indirecto os linfócitos revestidos de anticorpos (1º reagente) são visualizados através de um segundo anticorpo (marcado com fluoresceína) específico para o primeiro anticorpo, isto é, uma imunoglobulina anti-imunoglobulina fluorescente (Fig. 1.5. b₂).

Os linfócitos fluorescentes podem então ser determinados por contagem ao microscópio de fluorescência ou por contagem automática obtida pelo FACS ("fluorescent-activated cell sorter"). O FACS tem a grande vantagem de poder: (i) quantificar, (ii) seleccionar, (iii) recuperar separadamente a população marcada com fluorescência da população não marcada e (iv) apresentar os resultados computarizados sob a forma algébrica ou gráfica. Tem contudo o inconveniente de ser um processo demorado devido à análise de célula após célula, restringindo assim o número de células a serem processadas. É no entanto o elevado custo de aquisição e manutenção de tão sofisticado aparelho que

impede a utilização generalizada deste método tão eficiente.

3) Reacção de roseta antiglobulina directa (RRAD)

A RRAD consiste na reacção de linfócitos com eritrócitos conjugados (método de CrCl_3) com imunoglobulina anti-imunoglobulina, realizada durante uma sã centrifugação (Fig. 1.5.c). Os linfócitos que expressem imunoglobulina de superfície (células B) formam rosetas que podem ser facilmente quantificadas em microscopia óptica.

O procedimento para a realização da RRAD bem como a sua utilização na detecção de linfócitos portadores de imunoglobulina (Ig) no Homem e noutras espécies animais foi descrito por Coombs e col.(1977). É de especial importância a escolha do eritrócito ao qual se conjuga a Ig anti-Ig assim como o seu tratamento enzimático prévio de forma a conferir maior sensibilidade ao teste (Coombs e col., 1977; Carvalho, 1983).

A conjugação da Ig anti-Ig aos eritrócitos é realizada pela reacção com CrCl_3 que de uma forma ainda pouco clara interfere com a porção Fc da Ig, evitando assim a sua ligação ao receptor Fc do linfócito (Haegert e col., 1978).

Outra característica apresentada pela RRAD é a sua capacidade de separação dos linfócitos reactivos dos não reactivos pela centrifugação da suspensão celular usada na RRAD, em gradiente de densidade. Obtém-se assim a destituição (ou remoção) da população linfocitária portadora de Ig de superfície (Parish e Hayward, 1974).

C. A CONTROVERSIA NA DEMARCAÇÃO DE POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS
DO SANGUE HUMANO; OBJECTIVOS DO PRESENTE ESTUDO.

No início dos anos 70 tinha-se como certo que os linfócitos B eram possuidores dos seguintes marcadores de membrana: (i) imunoglobulina de superfície membranar (IgSm) (Pernis e col., 1971), (ii) receptores da porção Fc de imunoglobulina (Cline e col., 1972; Jondal, 1974), (iii) receptores de complemento C₃ (Bianco e col., 1970) e (iv) moléculas "Ia-like" ou HLA-DR (Schlossman e col., 1976). Pelo contrário os linfócitos T eram definidos pela ausência daqueles marcadores e capazes de formarem rosetas com eritrócitos de carneiro (Lay e col., 1971; Jondal e col., 1972).

Com o desenvolvimento da tecnologia e de estudos mais cuidados foi surgindo alguma controvérsia sobre esta distinção estanque de linfócitos B e T, com marcadores de membrana específicos para cada população.

Assim, verificou-se a existência de uma população nula ("null population") primeiramente descrita por Frøland e Natvig (1973) que não expressava IgSm nem receptores para eritrócitos de carneiro. Esta população tem sido fonte de grande controvérsia, representando 0% (Haegert, 1978 a, b; Pepys e col., 1981) ou até 20% (Horwitz e Lobo, 1975) dos linfócitos totais do sangue periférico humano.

Foi também descrita a existência de uma pequena população de linfócitos (<5%) possuidores de ambos os marcadores de células B e T, isto é, linfócitos que expressam IgSm e formam rosetas E (Dickler e col., 1974; Haegert e col., 1978). Esta população duplamente marcada pode aumentar de proporção se se expuserem os rece-

ptores E encobertos em alguns dos linfócitos B após tratamento com neuraminidase (Bentwich e col., 1973-b) com fosfolipase A (Hanaumi e col., 1976) ou com proteínas básicas (Hokland e col., 1981).

Verificou-se também a existência de uma pequena proporção de linfócitos sanguíneos que ligam avidamente Ig pelos seus receptores Fc mas que não expressam Ig intrínseca. Ao conjunto de tais linfócitos chamou-se "subpopulação L" (Horwitz e Lobo, 1975) e "terceira população" (Ferrarini e col., 1980). Estes mesmos linfócitos, após tratamento com neuraminidase, formam também rosetas com eritrócitos de carneiro (Ferrarini e col., 1975), sugerindo pois que

constituem uma subpopulação de linfócitos T, portadores de receptores Fc.

Do mesmo modo, estudos aturados mostram que os linfócitos portadores de receptores de complemento constituem parte não só da população B ($IgSm^+$) mas também da população nula (Hokland, 1981).

As células assassinas "K", ("Killer cells") actuantes no teste ADCC (ensaio de citotoxicidade celular dependente de anticorpo), foram incluídas por Chess e col. (1975) na população possuidora de receptores de complemento, enquanto que Horwitz e Garret (1977) e Ferrarini e col. (1975; 1980) as incluíram respectivamente na "população L" e na "terceira população", populações estas possuidoras de receptores Fc mas desprovidas de receptores de complemento. As células NK ("natural killer") que espontaneamente lisam células tumorais *in vitro* no teste SCMC (ensaio de citotoxicidade espontânea mediada por célula) têm sido incluídas nas populações $IgSm^+$, T^+ (formadora de rosetas E) e nula (West e col., 1977; Eremin e col., 1978).

Reinherz & Schlossman (1980) identificaram antigénios nos linfócitos T denominados T_4 e $T_{5/8}$ que definem subpopulações distintas, respectivamente, a T-auxiliar e a T-supressora.

A molécula antigénica Ia caracterizada no murganho (Shreffler e Davis, 1975) e denominada no Homem HLA-DR ou "Ia-like" (Schlossman e col., 1976) faz parte do sistema antigénico de histocompatibilidade e está envolvido no reconhecimento celular de antigénio e interacções celulares (Puri e Lonai, 1980; Reinherz *et al.*, 1983). Estudos iniciais com alo-antiseros mostraram que o antigénio HLA-DR estava presente nos linfócitos B ($IgSm^+$) e numa pequena proporção de células $IgSm^-$ e T^- (Winchester e col., 1975-a; Winchester e col., 1976; Schlossman e col., 1976); posteriormente aqueles antigénios foram também encontrados numa reduzida subpopulação de linfócitos T em repouso (Fu e col., 1978) e na maioria dos linfócitos T activados (Evans e col., 1978; Reinherz e col., 1980; Fukui e col., 1984).

Desta breve resenha torna-se evidente a actual indefinição e controvérsia sobre a demarcação de populações linfocitárias do sangue periférico humano. É pois nosso objectivo identificar as diversas populações linfocitárias do sangue humano e, ao avaliarmos a relação entre cada par de marcadores celulares, determinaremos o grau de intercepção das diferentes populações linfocitárias.

Definiremos as populações linfocitárias pelos receptores e antigénios expressos na membrana celular. Deste modo, procederemos à detecção de linfócitos possuidores de (i) receptores E (receptores para eritrócitos de Carneiro), (ii) receptores da porção Fc da IgG , (iii) imunoglobulina de superfície membranar ($IgSm$), (iv) cadeia leve K da $IgSm$, (v) antigénio HLA-DR monomórfico definido por um anticorpo monoclonal (AcMc YCL 6.8) e (vi) antigénio YTH 12.5

definido pelo anticorpo monoclonal (AcMc YTH 12.5) cuja especificidade para linfócitos T será analisada.

Mostraremos que as populações linfocitárias assim definidas por marcadores de membrana não constituem compartimentos celulares separados mas antes se interpenetram. Esta sobreposição de populações apresenta um carácter dinâmico, uma vez que a sua extensão é alterada após estimulação (por mitogénios, alo-antigénios ou antigénios virais) ou após inibição (por drogas imunodepressoras) como provaremos em estudos realizados em culturas celulares e em doentes imunodeprimidos.

D. ESCOLHA E DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA A APLICAR NO PRESENTE ESTUDO

Sendo a imunoglobulina de superfície de membrana (IgSm) o receptor antigénico dos linfócitos B (Pernis e col., 1971), que em conjunto com um segundo sinal independente daquele receptor Ig causa a estimulação e desencadeia a expansão clonal das células B (Coutinho e Möller, 1974), vamos designar por linfócitos B as células linfóides que no estado de repouso expressam IgSm intrínseca. Será pois indiferente referirmo-nos a linfócitos B ou a células Ig⁺.

1. A escolha da RRAD para identificação de linfócitos B

O método mais generalizado para identificar os linfócitos B é a imunofluorescência directa (IFD) (ver Fig. 1.5.b₁) que utiliza imunoglobulina anti-imunoglobulina (anti-Ig) marcada com fluoresceína, directamente contra a IgSm dos linfócitos (Aiuti e col., 1974; Vitetta e Uhr, 1975). A aplicação directa de anticorpos anti-Ig numa população de linfócitos pode originar falsas interpretações quanto à determinação de células portadoras de IgSm intrínseca devido à possibilidade de ligação de Ig do meio à membrana do linfócito pelos seus receptores Fc (RFc). Esta dificuldade pode, no entanto, ser ultra-

passada quer pela incubação prévia dos linfócitos a 37°C em meio isento de soro (Kumagai e col., 1975; Lobo e col., 1975) ou em meio ácido (Kumagai e col., 1975) antes da adição da anti-Ig, quer utilizando reagentes anti-Ig (Fab')₂ pois que sendo desprovidos da porção Fc (devido à clivagem do anticorpo pela pepsina) não se podem ligar ao RFc do linfócito (Winchester e col., 1975-b; Winchester e Fu, 1976).

Coombs e colaboradores desenvolveram em Cambridge testes de roseta que apresentam vantagens sobre a IFD na demonstração de IgSm.

Na reacção de roseta antiglobulina mista (RRAM) os linfócitos são primeiramente incubados com anticorpo anti-Ig livre e posteriormente centrifugados conjuntamente com eritrócitos indicadores, isto é, revestidos de anticorpos contendo determinantes antigénicos específicos para o anticorpo anti-Ig: observa-se reacção de roseta quando os grupos livres do anticorpo anti-Ig fixo à membrana do linfócito se ligam ao eritrócito indicador, pelos determinantes antigénicos do anticorpo que reveste o eritrócito (Coombs e col., 1969; Coombs e col., 1970-a). Neste teste não há interferência dos RFc porque mesmo que o anticorpo anti-Ig se ligue ao RFc do linfócito, aquele fica incapaz de reagir com os determinantes antigénicos presentes nos anticorpos que revestem os eritrócitos (Haegert, 1978 a,b).

Na reacção de roseta antiglobulina directa (RRAD) (ver fig. 1.5.c) o anticorpo anti-Ig é conjugado a eritrócitos indicadores (por meio da reacção com CrCl₃) e depois centrifugado conjuntamente com linfócitos: ocorre reacção de roseta se os linfócitos possuírem Ig para o qual o anticorpo anti-Ig, conjugado a eritrócitos, é específico (Giuliano e col., 1974; Coombs e col., 1977; Ling e col., 1976, Haegert e col., 1978). O CrCl₃ utilizado na reacção de conjugação do anticorpo ao eritrócito interfere com a porção Fc do anticorpo, tornando-o pois incapaz de reagir com o RFc do linfócito (Haegert e

col., 1978); evita-se assim uma potencial complicação na enumeração dos linfócitos possuidores de IgSm.

Além de evitar complicações de formação de rosetas via RfC, quer a RRAD (Haegert e col., 1978; Binns e col., 1979) quer a RRAM (Haegert, 1978-a,b) são técnicas mais sensíveis que a IFD. De facto, aquelas reacções de roseta demarcam uma subpopulação de linfócitos B (IgSm⁺) que é IgSm⁻ pela técnica IFD mas que sintetiza e expressa baixa densidade de IgSm (Haegert e Coombs, 1979); foi então sugerido (Haegert e Coombs, 1979) que a definição de linfócitos B fosse ampliada de forma a incluir não só as células IFD⁺ (marcador convencional de linfócitos B) mas também as células IFD⁻ RRAD⁺; a população IFD⁺, Haegert e Coombs (1979) chamaram B maior e a IFD⁻ RRAD⁺, B menor.

Optamos pelo critério sugerido por Haegert e Coombs (1979) para definição de população B e referir-nos-emos ao longo deste trabalho in diferentemente a linfócitos B e a células Ig⁺ detectadas por reacção de roseta.

Tanto a RRAM como a RRAD realizadas em óptimas condições — isto é, RRAM com linfócitos fixados em formaldeído (Hallberg e col., 1973) ou tratados com neuraminidase (Haegert, 1978 b) e RRAD com linfócitos vivos (Coombs e col., 1977) — dão idênticas percentagens de linfócitos reactivos (Coombs e col., 1977).

No entanto, a RRAD apresenta algumas vantagens relativamente à RRAM: (i) a reacção é máxima com linfócitos vivos, de forma que os linfócitos uma vez isolados e lavados estão prontos para serem testados; (ii) o procedimento é mais rápido, requerendo apenas uma só centrifugação de linfócitos com eritrócitos indicadores; (iii) pode ser facilmente utilizada para detectar determinantes específicos de classes de Ig,

contrariamente à RRAM, pois que é bastante difícil produzir satisfatórios eritrócitos indicadores revestidos de IgA, IgD ou IgE; (iv) a conjugação de anticorpo ao eritrócito indicador pode ser alargado a determinantes antigênicos diferentes de Ig; e finalmente (v) a RRAD pode ser usada para isolar populações (por exemplo, linfócitos B de T) a partir de uma população linfocitária mista.

Por todas as razões acima expostas, decidimo-nos pela utilização de RRAD para detecção dos linfócitos B.

2. Anticorpos monoclonais (AcMc)

A nova tecnologia de fusão celular desenvolvida por Köhler e Milstein (1975) permite a produção de clones "imortais" de células secretoras de anticorpos de uma única especificidade: anticorpos monoclonais (AcMc). Esta técnica consiste na fusão de linfócitos B normais (produtores de anticorpos) com células de uma linhagem tumoral apropriada (mantêm a imortalidade dos clones). Os hibridomas assim obtidos são separados das células não fundidas, colocando-as em meio de cultura selectivo que apenas permite a sobrevivência das células fundidas ou hibridomas. O isolamento de hibridomas individuais é então realizado por diluições sucessivas ou por sementeira em placa. Estes clones podem desenvolver-se quer em meios de cultura quer em líquido ascítico do rato ou do murganho; é, no entanto, no líquido ascítico que se obtêm extraordinárias produções de AcMc.

Convém frisar que um anti-soro mesmo que muito bem desenvolvido contém cerca de 90% de imunoglobulinas com pouca ou nenhuma afinidade para o antigénio, e que os próprios "anticorpos específicos" representam um espectro de moléculas com diferentes afinidades para diversos

determinantes do antigênio. Pelo contrário, um determinado tipo de AcMc contém moléculas todas idênticas (isto é, mesma classe de Ig, alotipo, região variável, estrutura, afinidade e especificidade) pois que todas elas provêm de um único hibridoma.

A produção de diversos AcMc contra antigênios de superfície celular tem permitido a investigação de determinantes antigênicos específicos de linfócitos, diferentes de IgSm, facilitando pois a definição de populações linfocitárias. Tem-se vindo a aplicar a técnica de imunofluorescência indirecta (ver Fig. 1.5. b₂) na qual os linfócitos sensibilizados com o AcMc são detectados com um anti-soro (policlonal) marcado com fluoresceína, contra a Ig do AcMc: as células positivas podem ser enumeradas ao microscópio de fluorescência e separadas das células negativas pelo aparelho FACS (fluorescent-activated cell sorter) (Reinherz e Schlossman, 1980).

O FACS tem sido ultimamente muito utilizado mas é uma técnica deveras dispendiosa e que leva muito tempo para analisar e separar fracções celulares, impondo pois limitação do número de células a processar. Para suprir este problema Egeland e Lea (1982) aplicaram a técnica da reacção de roseta indirecta: as células linfóides sensibilizadas com AcMc (classe IgG, desenvolvido em murganho) foram centrifugadas conjuntamente com eritrócitos conjugados com um soro de coelho anti-IgG de murganho.

Ao contrário da RRAD que utiliza anticorpo conjugado a eritrócitos, a sensibilização de linfócitos com AcMc livre (quer no FACS quer na reacção de roseta indirecta) não exclui a possibilidade de ligação não específica do AcMc pela sua porção Fc ao receptor Fc do linfócito, pelo que devem ser realizados controlos adequados.

3. Adaptação da RRAD ao uso de AcMc no teste RRAdD

Sendo nosso objectivo marcar os linfócitos possuidores de antigênios definidos por anticorpos monoclonais, e tendo em consideração as vantagens anteriormente mencionadas da RRAD, decidimos adaptar este teste ao uso de anticorpos monoclonais (Carvalho, 1983). Assim, a "reacção de roseta anti-*globulina* directa", ou RRAD, que utiliza imunoglobulina sérica (policlonal) anti-Ig conjugada a eritrócitos indiuadores pela acção do CrCl_3 (vêr Fig. 1.5.c) foi modificada, e usouu-se AcMc anti-determinante antigénico conjugado a eritrócitos, no tesute designado por "reacção de roseta anti-*determinante* directa" ou RRAdD.

Estas técnicas de reacção de roseta são teoricamente simples e, de facto, quando a técnica está bem apurada, os resultados são claros e de fácil repetição. A dificuldade consiste unicamente na obtenção de condições óptimas para o teste, uma vez que manuseamos material biológico, tal como eritrócitos provenientes de diversos animais.

Podemos pois dizer que a sensibilidade do teste RRAD bem como a sua clareza de leitura (por vezes dificultada devido à autoaglutinação de eritrócitos conjugados com Ig) depende dos variados factores que foram objecto de detalhado estudo, apresentado no 4º capítulo da nossa tese de M.Sc. (Carvalho, 1983).

De uma forma sucinta podemos afirmar que os pontos mais sensíveis e que requereram maior cuidado na modificação do teste RRAD em RRAdD foram os seguintes: (i) proveniência dos eritrócitos para conjugar o AcMc (isto é, Boi, Carneiro ou Burro), (ii) tratamento enzimático dos eritrócitos antes da conjugação, (iii) concentração do AcMc

e tipo de diluente usado para conjugação aos eritrócitos e (iv) concentração do CrCl_3 para realizar a conjugação.

Descrevemos já (Carvalho, 1983) que o tratamento dos eritrócitos de carneiro com tripsina constitui o melhor sistema para prosseguir a conjugação de AcMc anti-linfócitos de rato, feito em murganhos; tais eritrócitos indicadores foram usados em reacções de roseta (RRAdD) para estudos com linfócitos de rato (5º capítulo da tese de M.Sc.: Carvalho, 1983). Pelo contrário, a hidrólise proteolítica conferida pela papaína, em vez de tripsina, nos eritrócitos de boi, forneceram melhores resultados para a conjugação de AcMc feitos em rato e contra linfócitos humanos (Carvalho, 1983). Note-se que uma vez encontradas as condições óptimas para conjugação, os eritrócitos devem ser sempre obtidos do mesmo animal pois que diferentes animais podem apresentar diferentes graus de auto-aglutinabilidade de eritrócitos (Gleeson-White e col., 1950), sendo os mais eficazes na conjugação para o teste RRAD, os eritrócitos mais aglutináveis (Coombs e col., 1977).

Relativamente à diluição óptima dos diversos AcMc testados, verificou-se que esta devia ser realizada numa solução de Ig normal, pois que em NaCl^* os eritrócitos tendiam a lisar; há pois necessidade de manter um equilibrado nível proteico (Ig) para que a conjugação se realize nas melhores condições (Carvalho, 1983). No entanto a concentração óptima de AcMc para a conjugação era variável e deste modo concluiu-se que para cada reagente será sempre necessário fazer uma titulação. A concentração óptima de CrCl_3 era de 0,021% na proporção de 1:1:2 (V/V/V) de eritrócitos, AcMc e CrCl_3 , respectivamente.

* Na reacção de conjugação não se deve utilizar qualquer solução tampão contendo fosfato, pois que inibe a acção do CrCl_3 .

Uma vez estabelecidas as condições óptimas para conjugação da Ig ao eritrócito, por meio do CrCl_3 , o método de reacção de roseta quer RRAD quer RRAdD, torna-se extremamente eficiente pois é de rápida e fácil aplicação. A Fig. 1.6 mostra o aspecto de uma RRAdD quando observada ao microscópio óptico.

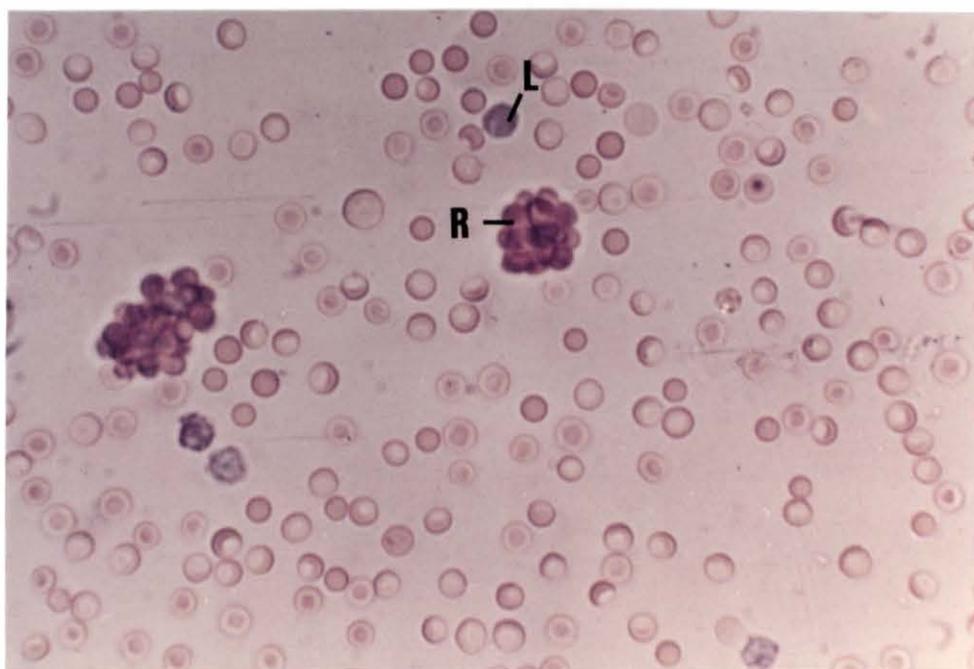


Fig. 1.6. Aspecto típico de reacção de roseta, usando eritrócitos de boi tratados com papaína e conjugados com o AcMc YCL 6.8. R - roseta; L - linfócito livre.

4. Desenvolvimento de técnicas para determinação de populações linfocitárias duplamente marcadas

Foi primordial objectivo do estudo apresentado na tese de M.Sc. (Carvalho, 1983) o desenvolvimento de técnicas que permitissem deter-

minar a intercepção de duas populações linfocitárias definidas por dois marcadores de membrana. Assim, tanto o método de destituição (ou remoção) de populações linfocitárias (Fig.1.7), como o método de reação de roseta mista (Fig.1.8), permitiram a demarcação de quatro subpopulações linfocitárias definidas por cada par de marcadores de membrana (X e Z, por exemplo): X^+Z^- , X^+Z^+ , X^-Z^+ e X^-Z^- .

a. Técnica de destituição celular

Esta técnica foi pormenorizadamente apresentada e discutida no 4º capítulo da nossa tese de M.Sc. (Carvalho, 1983). De uma forma breve podemos referir que o procedimento da destituição celular (Fig. 1.7) consiste em quatro fases:

- 1 - RRAD (ou RRAdD): 1a - com marcador X
ou 1b - com marcador Z
- 2 - Centrifugação em gradiente de densidade de 1a ou 1b para separação das rosetas (isto é, linfócitos X^+ ou Z^+ , respectivamente) dos linfócitos não reagidos (isto é, linfócitos X^- ou Z^- , respectivamente).
- 3 - Recuperação dos linfócitos destituídos de X ou de Z (isto é, suspensões celulares X^- ou Z^- , respectivamente) e subsequente teste de RRAD com marcador Z ou marcador X, respectivamente.
- 4 - Cálculos matemáticos para quantificação das 4 subpopulações: X^+Z^- , X^+Z^+ , X^-Z^+ e X^-Z^- .

Consideremos apenas os cálculos para uma só destituição celular, por exemplo destituição de linfócitos Z. Para facilitar a expli

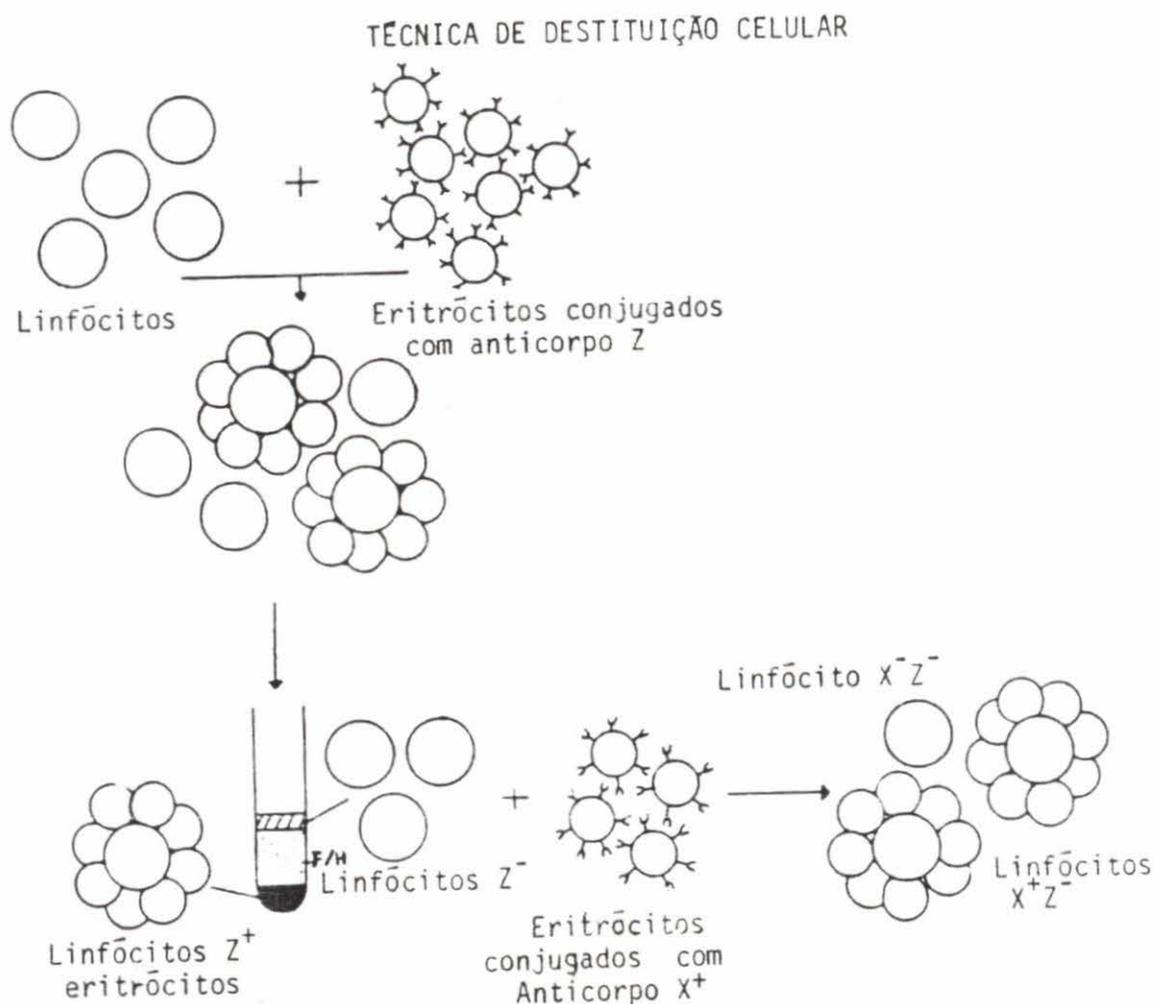


Fig. 1.7. - Diagrama esquemático do método de destituição celular. Após a reacção de formação de roseta dos linfócitos com eritrócitos conjugados com o *anticorpo Z*, a suspensão celular (constituída de linfócitos Z^+ e Z^-) é centrifugada em Ficoll/Hypaque (F/H). Os linfócitos não formadores de rosetas (Z^-) obtidos da interface do F/H são levados a reagir com os eritrócitos indicadores conjugados com o *anticorpo X*, detectando-se linfócitos X^-Z^- e X^+Z^- .

cação tomemos os seguintes valores arbitrários obtidos numa experiência fictícia:

- linfócitos X^+ na suspensão total = 20%
- linfócitos Z^+ na suspensão total = 40%
- linfócitos X^+ na suspensão destituída de Z = 25%
- linfócitos Z^+ na suspensão destituída de Z = 0%

A subpopulação duplamente marcada (X^+Z^+) será aquela que foi removida aquando da destituição celular pelo marcador Z para além das células X^-Z^+ . Esta subpopulação duplamente marcada pode ser quantificada pela diferença da contagem directa do total de células X^+ (20%) e o valor calculado para as células X^+Z^- na suspensão total a partir da contagem das células X^+ obtidas na suspensão destituída de Z (25%).

Os cálculos efectuam-se da seguinte maneira:

- (i) os linfócitos Z^+ na suspensão total eram 40%
- (ii) a suspensão celular destituída de linfócitos Z (suspensão Z^-) constituía pois 60% ($100\% - 40\% = 60\%$) da suspensão total.
- (iii) então os linfócitos X^+ que constituíam 25% da suspensão Z^- , correspondem na suspensão total a 15% das células:

$$\frac{\text{linfócitos } X^+ \text{ em suspensão } Z^- \times \text{linfócitos } Z^- \text{ na suspensão total}}{100\%}$$

$$\text{ou } \frac{25\% \times 60\%}{100\%} = 15\% (X^+ Z^- \text{ na suspensão total})$$

Esta é a subpopulação X^+Z^-

- (iv) 20% dos linfócitos totais eram X^+ , incluindo tanto os X^+Z^- como os X^+Z^+ . Sendo 15% a subpopulação X^+Z^- (alínea iii), então a subpopulação X^+Z^+ será 5% ($20\% - 15\% = 5\%$).

(v) 40% dos linfócitos totais eram Z^+ , incluindo tanto os X^-Z^+ como os X^+Z^+ . Sendo 5% a subpopulação X^+Z^+ (alínea iv), então a subpopulação X^-Z^+ será 35% ($40\% - 5\% = 35\%$).

(vi) a soma das 3 subpopulações positivamente marcadas corresponde a 55% dos linfócitos totais ($15\% + 5\% + 35\% = 55\%$) donde 45% ($100\% - 55\% = 45\%$) são linfócitos não reactivos com qualquer dos marcadores e corresponde pois à subpopulação X^-Z^- .

Por estes cálculos é-nos portanto possível determinar a intercepção (subpopulação X^+Z^+) de 2 populações (X e Z), bem como demarcar quantitativamente as subpopulações marcadas por um, mas não por outro reagente (subpopulações X^+Z^- e X^-Z^+) e ainda a subpopulação não marcada por qualquer dos reagentes (subpopulação X^-Z^-).

b. Reacção de roseta mista (RRM)

A RRM constitui um método que desenvolvemos (Carvalho, 1983) a partir da RRAD e que permite quantificar por leitura directa as 4 subpopulações (X^+Z^- , X^+Z^+ , X^-Z^+ e X^-Z^-) definidas por dois marcadores de membrana (X e Z). Neste método os linfócitos são centrifugados simultaneamente com dois tipos de eritrócitos (X e Z) sendo um destes (X, por exemplo) marcado com fluoresceína (Fig.1.8). Os linfócitos podem então reagir de quatro modos, conforme contêm determinantes antigénicos ou receptores para: (i) ambos os eritrócitos indicadores e assim formam *rosetas mistas* que constituem a subpopulação X^+Z^+ ; (ii) apenas os eritrócitos fluorescentes, e assim formam *rosetas fluorescentes* que constituem a subpopulação X^+Z^- ; (iii) apenas os eritrócitos não fluorescentes, e assim formam *rosetas não fluorescentes* que constituem a

REACÇÃO DE ROSETA MISTA

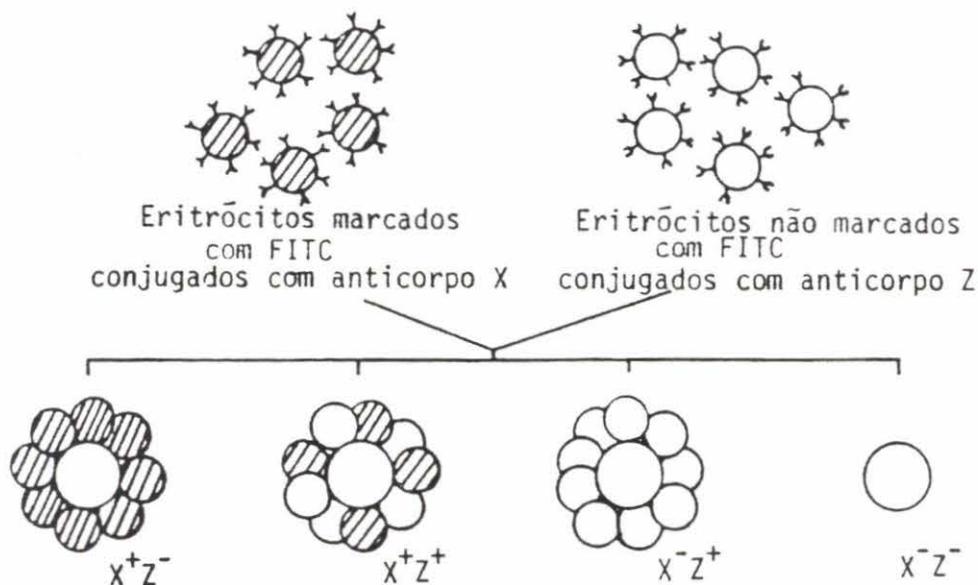


Fig. 1.8. - Diagrama esquemático da técnica de reacção de roseta mista (RRM). Eritrócitos marcados por fluoresceína e não marcados são conjugados, respectivamente com *anticorpo X* e *anticorpo Z*. Ambos os eritrócitos indicadores são levados a reagir com os linfócitos, detectando-se linfócitos reactivos com um só marcador (X^+Z^-), com o outro marcador (X^-Z^+), com ambos (X^+Z^+) ou com nenhum marcador (X^-Z^-).

subpopulação X^-Z^+ ; e (iv) nenhum dos eritrócitos indicadores, surgindo como linfócitos livres que constituem a subpopulação X^-Z^- (Figs. 1.8; 1.9).

Para obter as condições óptimas de reacção foi necessário um longo e trabalhoso estudo técnico-experimental, com sucessivas modificações e constantes alterações, cujos passos mais importantes foram apresentados no 3º capítulo da nossa tese de M.Sc. (Carvalho, 1983). De facto, o tratamento dos eritrócitos com tripsina ou papaína (pH 7) a marcação com FITC (pH 9) e a conjugação com Ig usando $CrCl_3$ (pH 5) constituíam violentas e demasiadas agressões aos eritrócitos, pelo que se tornou difícil coordenar os vários tratamentos de forma a obter eritrócitos adequados às reacções de roseta. Assim, para obter eritrócitos resistentes à hemólise, com intensa fluorescência e com capacidade de reacção idêntica ao do controlo (eritrócitos não marcados com FITC) houve necessidade de os tratar na seguinte sequência: (i) tratamento com tripsina ou papaína, (ii) marcação dos eritrócitos com FITC em tampão K_2HPO_4 , (iii) lavagem em NaCl para remover o fosfato e (iv) conjugação da Ig com $CrCl_3$ em NaCl.

Em estudos de identificação da(s) população(oês) de linfócitos do rato portadora(s) da enzima 5'-nucleotidase (detectada por um AcMc específico) utilizámos os métodos de destituição de populações linfocitárias e de reacção de roseta mista (RRM) (5º capítulo da tese de M.Sc., Carvalho, 1983): ambos os métodos demarcaram idênticas subpopulações definidas por cada par de marcadores de membrana.

Embora seja possível utilizar estes métodos em alternativa, cada um apresenta as suas vantagens e inconvenientes relativamente ao outro. Assim, o estudo de destituição de populações constitui um procedimento experimental demorado e que utiliza grandes quantidades de



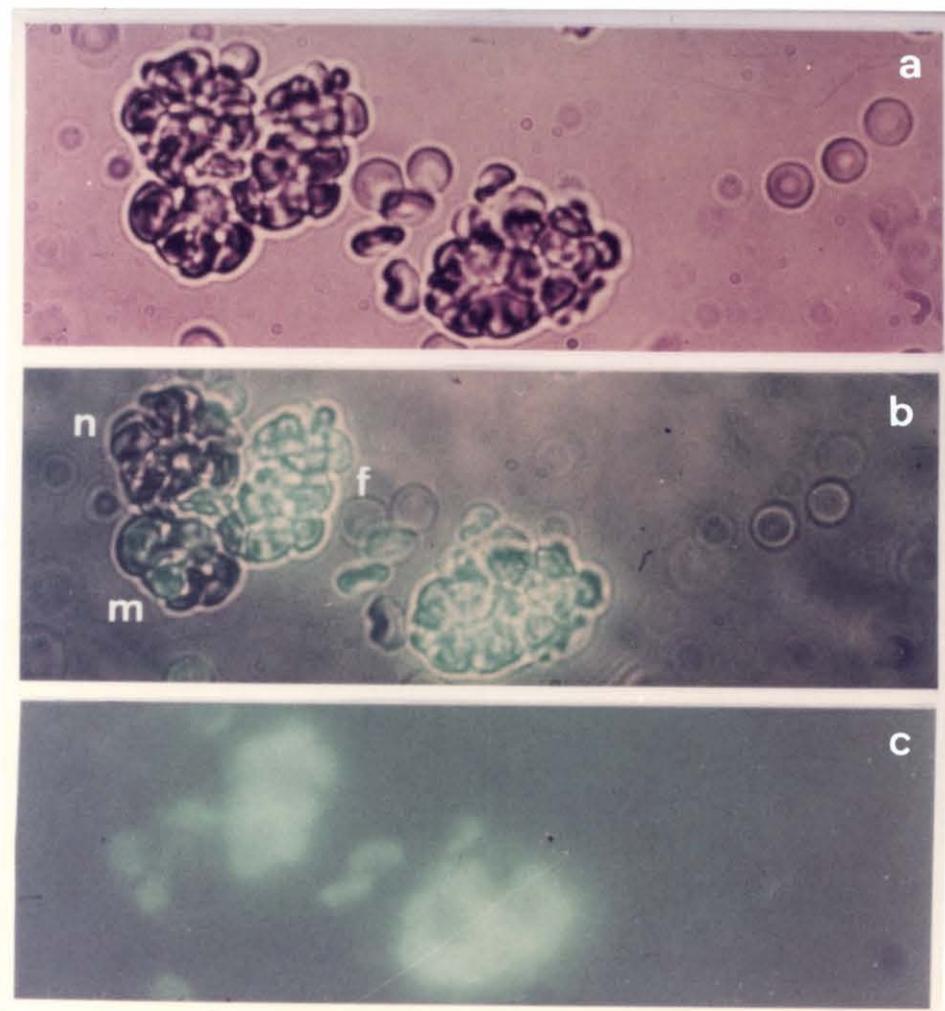


Fig. 1.9 - Exemplo típico do aspecto das três formações de rosetas obtidas pela RRM. Eritrócitos de boi tratados com papaína foram (i) conjugados com o AcMc YCL 6.8 (eritrócito não fluorescente) ou (ii) marcados com fluoresceína e conjugados com o AcMc YTH 12.5 (eritrócito indicador fluorescente); ambos os eritrócitos indicadores foram centrifugados conjuntamente com linfócitos humanos na RRM.

(a) luz do feixe visível

(b) luz do feixe visível e luz ultravioleta

(c) luz ultravioleta

n - roseta não fluorescente (YCL 6.8⁺)

f - roseta fluorescente (YTH 12.5⁺)

m - roseta mista (YCL 6.8⁺ e YTH 12.5⁺)

linfócitos (mínimo de 6×10^6) e os seus resultados necessitam de ser tratados numa sequência de cálculos com vista a obter subpopulações quantificadas. Pelo contrário, a RRM é um método simples, rápido e directo que pode usar apenas $0,5 \times 10^6$ linfócitos e que fornece de imediato uma definição quantitativa das subpopulações linfocitárias; este método tem contudo o inconveniente de só se poder utilizar quando os dois AcMc conjugados aos respectivos eritrócitos não reagirem um com o outro, o que nem sempre acontece.

Na nossa tese de "Master of Science" (Carvalho, 1983) desenvolvemos métodos de marcação dupla (destituição celular e RRM) para identificação de subpopulações linfocitárias do Rato. Incluímos também alguns resultados preliminares obtidos do estudo de indivíduos normais e de doentes submetidos a transplantação cardíaca. Verificámos então que a técnica de RRM podia ser aplicada não só ao estudo de linfócitos do Rato (5º capítulo), mas também ao de linfócitos humanos quer normais (6º capítulo) quer de doentes imunodeprimidos (7º capítulo).

No presente trabalho apresentamos um estudo aprofundado relativo à demarcação de populações linfocitárias do sangue humano. Estas populações definidas por marcadores de membrana serão obtidas pela utilização de pares de marcadores quer pelo método de destituição celular quer pelo de RRM. A análise estatística dos resultados fornecidos por ambos os métodos permitir-nos-ão fazer um estudo comparativo dos mesmos.

Populações linfocitárias de doentes imunodeprimidos serão analisadas apenas pelo método de RRM pois que demonstrámos (Carvalho, 1983) ser esta a única técnica que nos permite utilizar reduzido número de linfócitos, tal como sucede nestes doentes submetidos à acção de agentes imunodepressores.

C A P Í T U L O I I

- MATERIAL E MÉTODOS -

II - MATERIAL E MÉTODOS

A. MATERIAL DE ESTUDO

A.1. Dadores voluntários de sangue

Todos os dadores de sangue eram indivíduos que trabalhavam no laboratório (Departamento de Imunologia, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, G.B.) e que não haviam contraído hepatite.

A.2 . Pacientes receptores de enxerto cardíaco

Os doentes de idades compreendidas entre 22 e 52 anos foram submetidos a transplantação cardíaca no Papworth Hospital (Cambridgeshire, G.B.), tendo todos recebido enxertos de cadáveres humanos, enxertos estes geralmente provenientes de acidentados de viação. Em nenhum dos casos se realizaram testes de histocompatibilidade antecedendo a operação de transplantação. Biópsias regulares pós-operatórias e subsequente estudo histológico, realizado nos Serviços de Anatomia Patológica do mesmo Hospital, permitiram diagnosticar o grau de rejeição do enxerto definido pela infiltração celular e/ou rotura miofibrilar (Billingham, 1981).

Neste nosso estudo os doentes foram divididos em três grupos, considerando o tempo pós-operatório bem como a terapia imunodepressiva aplicada.

A.2.a. Doentes de sobrevida longa, imunodeprimidos por prednisolona e azatioprina

Os pacientes por nós designados de "doentes de sobrevida longa" eram os que haviam sido sujeitos à operação de transplantação há mais de 365 dias (aquando da colheita do sangue) e haviam sido tratados ime

diatamente após a operação com: globulina anti-timócito (GAT) (0,125-1,0 g/dia), prednisolona (1 mg/Kg/dia) e azatioprina (1,5-2,5 mg/kg/dia). A dose de GAT foi diariamente ajustada durante os primeiros 28 dias pós-operatórios de forma a manter o nível de linfócitos T inferior a 50 células/ μ l de sangue. Após aquele tempo, GAT foi administrada apenas quando o doente apresentava sintomas de rejeição. A administração de prednisolona e azatioprina foi gradualmente reduzida durante os 3 meses seguintes à operação, atingindo valores de 0,5 mg/Kg/dia de prednisolona e 0,3 mg/kg/dia de azatioprina.

Estas eram pois as dosagens administradas aos pacientes no momento da colheita das amostras sanguíneas.

A.2.b. Doentes imunodeprimidos por ciclosporina A e prednisolona

A um outro grupo de seis doentes colheram-se amostras de sangue desde o dia da transplantação e durante cerca de 240 dias (8 meses) subsequentes. Imediatamente após a operação estes doentes foram imunodeprimidos com ciclosporina A (6-10 mg/kg/dia) e prednisolona (0,3 mg/kg/dia). Não receberam azatioprina, mas GAT foi-lhes esporadicamente administrada (como indicado nos "Resultados") quando a sintomatologia de imuno-rejeição assim o exigia.

A.2.c. Doentes imunodeprimidos por globulina anti-timócito (GAT) ciclosporina A e prednisolona

A onze pacientes que constituíram o terceiro grupo de receptores de enxerto cardíaco, colheram-se amostras sanguíneas com grande frequência (3 vezes por semana) durante os 30 dias pós-operatório. GAT (0,125-1,0 g/dia) foi-lhes administrada nos 10 dias iniciais conjuntamente com ciclosporina A (6-10 mg/Kg/dia) e prednisolona (0,3 mg/Kg/dia). A imunodepressão foi subsequentemente mantida pela administração de ciclosporina

diatamente após a operação com: globulina anti-timócito (GAT) (0,125-1,0 g/dia), predenisolona (1 mg/Kg/dia) e azatioprina (1,5-2,5 mg/kg/dia). A dose de GAT foi diariamente ajustada durante os primeiros 28 dias pós-operatórios de forma a manter o nível de linfócitos T inferior a 50 células/ μ l de sangue. Após aquele tempo, GAT foi administrada apenas quando o doente apresentava sintomas de rejeição. A administração de predenisolona e azatioprina foi gradualmente reduzida durante os 3 meses seguintes à operação, atingindo valores de 0,5 mg/Kg/dia de predenisolona e 0,3 mg/kg/dia de azatioprina.

Estas eram pois as dosagens administradas aos pacientes no momento da colheita das amostras sanguíneas.

A.2.b. Doentes imunodeprimidos por ciclosporina A e predenisolona

A um outro grupo de seis doentes colheram-se amostras de sangue desde o dia da transplantação e durante cerca de 240 dias (8 meses) subsequentes. Imediatamente após a operação estes doentes foram imunodeprimidos com ciclosporina A (6-10 mg/kg/dia) e predenisolona (0,3 mg/kg/dia). Não receberam azatioprina, mas GAT foi-lhes esporadicamente administrada (como indicado nos "Resultados") quando a sintomatologia de imuno-rejeição assim o exigia.

A.2.c. Doentes imunodeprimidos por globulina anti-timócito (GAT) ciclosporina A e predenisolona

A onze pacientes que constituíram o terceiro grupo de receptores de enxerto cardíaco, colheram-se amostras sanguíneas com grande frequência (3 vezes por semana) durante os 30 dias pós-operatório. GAT (0,125-1,0 g/dia) foi-lhes administrada nos 10 dias iniciais conjuntamente com ciclosporina A (6-10 mg/Kg/dia) e predenisolona (0,3 mg/Kg/dia). A imunodepressão foi subsequentemente mantida pela administração de ciclosporina

A e predenisolona; apenas quando surgiam sintomas de rejeição é que GAT era administrada (tal como indicado nos "Resultados").

B. MÉTODOS

B.1. Preparação de suspensões linfocitárias

Amostras de sangue de indivíduos voluntários (10-30 ml) e de doentes receptores de enxerto cardíaco (10-15 ml) foram obtidos de uma veia da flexura. A prevenção da coagulação do sangue foi realizada por desfibrinação ou pela adição de 20 unidades internacionais de heparina (Paines & Bryne Ltd., Inglaterra) por mililitro de sangue.

As amostras dos doentes que haviam sofrido transplantação cardíaca foram colhidas no Papworth Hospital e seguidamente enviadas (1-2 horas de transporte) para o Addenbrooke's Hospital onde demos seguimento ao isolamento dos linfócitos do sangue.

Isolaram-se pois de imediato as células mononucleares pelo método de Boyum (1968) em gradiente de densidade ($\delta=1,077$) de Ficoll-Hypaque (Flow laboratories, G.B.). Para tal o sangue foi diluído 1:3 (v/v) em PBS*, colocado gota a gota sobre uma camada de 3 cm de altura de Ficoll-Hypaque contido num tubo de centrifuga e centrifugado a 300 g durante 45 minutos, à temperatura ambiente.

Os leucócitos polimorfonucleares (ou granulócitos) e eritrócitos que se depositaram no fundo do tubo durante a centrifugação foram desprezados; pelo contrário, os leucócitos mononucleares (agranulócitos) que ficaram dispostos na interfase (isto é, sobrejacentemente à camada de Ficoll-Hypaque) foram recolhidos com o auxílio de uma pipeta

*PBS ("phosphate-buffered saline) contém NaCl 137mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8 mM e KH₂PO₄ 2 mM (BDH chemicals Ltd., Inglaterra).

de Pasteur.

Após três lavagens em PBS, as células mononucleares foram res-suspensas em meio RPMI 1640 (Flow) contendo 10% de soro de feto bovino (Flow) e tratadas com penta-carbonilo de ferro - $\text{Fe}(\text{CO})_5$ - (GAF, G.B. Co. Ltd) para remover as células fagocíticas ou monócitos. Para tal, as células mononucleares (linfócitos e monócitos) foram incubadas com penta-carbonilo de ferro (50 mg/10 ml de sangue inicial) a 37°C, durante 30 minutos e sob rotação contínua. Terminada a incubação, o frasco contendo a suspensão celular foi colocado sob ação de um forte magnete e a suspensão celular livre removida, deixando ficar aderente às paredes do frasco o penta-carbonilo de ferro bem como o material biológico a ele ligado.

Os linfócitos em suspensão foram então lavados duas vezes em PBS e finalmente ressuspensos em PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (Armour Pharmaceutical Company, Inglaterra) até perfazer a concentração de 2×10^6 linfócitos/ml.

Esta foi a concentração usada nas reações de roseta.

Recolha linfocitária:

DADORES	(linfócitos/ml de sangue colhido)
- dadores voluntários	$0,8-1,2 \times 10^6$
- pacientes receptores de enxerto cardíaco:	
- na ausência de GAT	$0,1-0,6 \times 10^6$
- sob administração de GAT	$0,08-0,30 \times 10^6$

B.2. Preparação da fracção de IgG a partir de soros normais,
de anti-soros e de líquido ascítico

B.2.a. Preparação de IgG a partir de soros normais e de
anti-soros

A fracção de IgG foi preparada a partir de soros normais de Carneiro, Rato e Murganho e dos seguintes anti-soros: (i) anti-Ig humana, feito em Carneiro; (ii) anti-Ig de Rato, feito em Coelho; (iii) anti-Ig de Murganho, feito em Coelho; e (iv) anti-eritrócito de Boi, feito em Coelho.

Para o isolamento da fracção de imunoglobulina, cada soro foi precipitado com sulfato de amônio a 33%, o precipitado dissolvido em água destilada e extensivamente dialisado contra tampão fosfato 52,5 mM a pH 6,5. A presença do tampão evita a perda de IgG, por precipitação, aquando da extensiva diálise requerida para remoção do sulfato de amônia. Após a diálise, a solução foi diluída em 2 volumes de água destilada (obtendo-se assim a concentração de 17,5 mM de tampão fosfato) e aplicou-se a uma coluna de celulose DEAE (DE-52, Whatman Biochemicals Ltd, Inglaterra) que fora previamente equilibrada com tampão fosfato 17,5 mM a pH 6,5. A fracção de IgG obtida da eluição inicial do tampão da coluna, foi precipitada com sulfato de amônia a 50%; este precipitado foi seguidamente dissolvido num pequeno volume de NaCl 0,9% e dialisado contra NaCl (na ausência de fosfato para a Ig poder ser posteriormente conjugada a eritrócitos, por acção do CrCl_3).

O conteúdo proteico das fracções foi determinado por espectrofotometria (espectrofotómetro Bausch & Lomb, modelo Spectronic 710), sendo a densidade óptica lida a 280 nm. Diluiu-se a fracção em NaCl

de forma a se obter a concentração final em proteína de 2 mg/ml.

Procedeu-se em seguida à absorção das fracções IgG com eritrócitos de Carneiro e/ou de Boi a fim de serem ulteriormente usadas na conjugação a eritrócitos da(s) mesma(s) espécie(s). Para tal, lavaram-se os eritrócitos 6 vezes em grandes volumes de PBS, e a cada 0,25 ml de sedimento de eritrócitos adicionou-se 1 ml da fracção de IgG. Deixou-se a suspensão durante 15 minutos à temperatura ambiente (cerca de 20°C) após o que se centrifugou a 300 g. Recolheu-se o sobrenadante que continha agora a fracção destituída de anticorpos contra eritrócitos.

As fracções de Ig assim preparadas estavam aptas a serem conjugadas a eritrócitos, por acção do CrCl_3 .

B.2.b. Preparação da IgG de anticorpos monoclonais (AcMc) a partir de líquido ascítico de Rato

Por cortesia do Dr. Herman Waldmann foi-nos possível trabalhar com os AcMc produzidos no laboratório onde realizamos o presente estudo (Departamento de Imunologia do Addenbrooke's Hospital, Cambridge, G.B.). Os AcMc YCL 6.8, YTH 12.5 e YBM 35.6 foram-nos oferecidos em líquido ascítico de Rato. Sendo todos estes AcMc provenientes de clones de células secretoras de IgG, foi apenas necessário separar a fracção de imunoglobulina da albumina e outras substâncias do líquido ascítico; a imunoglobulina isolada era já IgG pelo que não houve necessidade de filtrar a amostra na coluna de celulose DEAE para separação das restantes imunoglobulinas.

Assim, para isolamento da fracção de IgG centrifugaram-se 5 ml de líquido ascítico durante 15 minutos, a 2000 g e à temperatura ambi

ente. Seguidamente diluiu-se o sobrenadante em PBS 1:2 (v/v) e adicionou-se igual volume de sulfato de amônio saturado. A mistura incubou durante 30 minutos à temperatura ambiente, após o que foi centrifugada como anteriormente. Ressuspendeu-se o sedimento em PBS até refazer o volume inicial (5 ml) e tratou-se de novo com sulfato de amônia.

Por fim o sedimento foi dissolvido num pequeno volume de PBS e exaustivamente dialisado contra NaCl 0.9%. A concentração de proteína foi ajustada a 2 mg/ml por leitura de densidade óptica a 280 nm num espectrofotômetro Bausch & Lomb, modelo spectronic 710.

B.3. Preparação de eritrócitos para reacções de roseta

Sangue de Carneiro e de Boi foi colhido em ACD (ácido-citrato-dextrose: glicose 0,15 M e hidrogeno citrato dissódico 0,10M) e guardados a 4°C até um período máximo de duas semanas. Após centrifugação do sangue a 350 g à temperatura ambiente e durante 10 minutos, retirou-se o plasma bem como os leucócitos depositados sobre a camada de eritrócitos sedimentados no fundo do tubo de centrífuga. Os eritrócitos foram então ressuspensos em PBS e centrifugados como anteriormente. Procedeu-se a 5 lavagens dos eritrócitos, ao fim das quais se ressuspenderam os eritrócitos em PBS.

B.3.a. Tratamento de eritrócitos de Carneiro com neuraminidase, para reacções de roseta E

Os eritrócitos de Carneiro foram tratados com neuraminidase (N-acil-neuraminil-glico-hidrolase, E.C.3,2.1.18 de *Vibrio cholerae*; Behringwerke A-G., Alemanha) a fim de intensificar a ulterior reacção de roseta E com linfócitos humanos. Para tal, diluiu-se 1 unidade/ml

de "Neuraminidase-test" em tampão de ácido acético-acetato pH 5,6 para dar 0,2 U/ml. A 100 μ l deste preparado de enzima juntaram-se 50 μ l de eritrócitos fortemente sedimentados, dando uma concentração final de enzima de 0,133 U/ml. A mistura foi incubada a 37°C, durante 1 hora e à temperatura ambiente. Finda a incubação, os eritrócitos foram lavados três vezes em PBS e ressuspensos também em PBS, ajustando a concentração celular a 1% (V/V).

As células podiam ser utilizadas para reacções de roseta E num período não superior a 10 dias, desde que guardadas a 4°C.

B.3.b. Sensibilização de eritrócitos de Boi com IgG, para a reacção de roseta EA

A técnica de tratar os eritrócitos de Boi com anticorpo específico, para efeitos de detecção de receptores Fc dos linfócitos, foi a descrita por Hallberg e col. (1973). Assim, eritrócitos de Boi a 2% (V/V) em PBS foram sensibilizados com igual volume de IgG purificada anti-eritrócito de Boi (feita em Coelho) na diluição de 1:200 (dose máxima que não causava aglutinação dos eritrócitos). A mistura foi incubada à temperatura ambiente, durante 45 minutos após o que foi centrifugada a 300 g, durante 5 minutos e à temperatura ambiente. As células foram então duas vezes lavadas em PBS e finalmente ressuspensas em PBS até perfazer a concentração de 1% (V/V).

Os eritrócitos sensibilizados com IgG mantinham-se em boas condições durante cerca de 15 dias, desde que guardados a 4°C.

B.3.c. Conjugação de IgG a eritrócitos de Boi, para as reacções RRAD e RRAdD

B.3.c.1) Tratamento de eritrócitos de Boi com papaína

O tratamento dos eritrócitos de Boi com tripsina confere-lhes maior aglutinabilidade e deste modo resulta num aumento do título aglutinante (no teste de hemaglutinação) bem como na intensificação da reacção de roseta com linfócitos (Coombs e col., 1977). Mostramos também (Carvalho, 1983) que o tratamento alternativo dos eritrócitos com papaína conduzia a uma reacção de roseta mais limpa e clara, isto é, evitou-se a autoglutinação de eritrócitos e a aderência de rosetas, facilitando pois a leitura do teste.

No presente estudo procedeu-se pois ao tratamento dos eritrócitos de Boi com papaína (E.C.3.4.22.2. de suco de papaia; BDH Chemicals Ltd., Inglaterra). Assim, a papaína a 0,25% (P/V) foi activada pela adição do dobro do volume de L-cisteína-hidrocloreto monohidratado (Sigma Chemical Company, E.U.A.) a 0,20% (P/V). A mistura foi diluída em fosfato de sódio hidratado 0,1 M a fim de se obter a concentração de 0,25 mg/ml de papaína e 0,4 mg/ml de cisteína. A 1 ml desta mistura diluída juntou-se 1 ml de eritrócitos a 20% (V/V) e incubou-se a 37°C durante 12 minutos tal como descrito por Wilson e col. (1975). Centrifugou-se a suspensão celular, lavaram-se os eritrócitos duas vezes em PBS e finalmente aquelas células foram fortemente sedimentadas, por centrifugação a 350 g durante 10 minutos.

Estes eritrócitos tratados com papaína podiam ser usados para ulteriores tratamentos no prazo de 15 dias, desde que mantidos a 4°C.

B.3.c.2) Conjugação de IgG a eritrócitos de Boi, pela acção do CrCl₃

O procedimento para conjugação da IgG a eritrócitos de Boi foi baseado na técnica descrita por Coombs e col. (1977), todavia com

algumas alterações.

No essencial, as preparações de IgG de soros normais, anti-soros ou anticorpos monoclonais (ver alínea B.2.) foram exaustivamente dialisadas contra NaCl 0.9% (P/V) para remover o fosfato da solução, e a proteína ajustada a 2 mg/ml de solução. A solução mãe de CrCl_3 (BDH) a 1% (e ajustada a pH 5,0 com NaOH) foi diluída em NaCl 0,9% (1:47,5) para dar a concentração de 0,021% de CrCl_3 ; esta diluição realizou-se precisamente antes da reacção de conjugação.

A 1 volume (geralmente 25 μl) de eritrócitos de Boi (tratados com papaína) bem sedimentados (a 350 g durante 5 minutos) juntou-se 1 volume de IgG (2 mg/ml). A mistura eritrócito-anticorpo foi agitada num misturador "Vortex" enquanto se adicionou gota a gota 2 volumes de CrCl_3 a 0,021%, a fim de iniciar a reacção de conjugação. Esta decorreu durante 1 hora à temperatura ambiente e sob rotação lenta. A reacção foi interrompida ao fim daquele período de tempo pela adição de abundante volume de PBS (cerca de 5 ml). Centrifugou-se a mistura, lavaram-se as células duas vezes em PBS e ressuspenderam-se em PBS, a 1% (V/V).

Os eritrócitos conjugados com IgG embora pudessem ser usados satisfatoriamente no prazo de 3 semanas, eram porém preparados quinzenalmente.

B.3.c.3. Provas da eficiência da conjugação

Os eritrócitos conjugados com IgG, depois de bem lavados, foram titulados em placas de microtitulação contendo diluições sucessivas de soro anti-IgG específico. Este havia sido previamente (i) aquecido a 56°C durante 30 minutos para inactivar o complemento bem como (ii) absorvido com eritrócitos de Carneiro e/ou Boi; isto evitava que, (i)

o complemento não lissasse os eritrócitos e (ii) os eventuais anticorpos naturais, presentes no soro, contra eritrócitos não reagissem com os mesmos eritrócitos.

Os eritrócitos conjugados com IgG e adicionados às diluições sucessivas de soro foram deixados sobre uma superfície horizontal durante 45 minutos e à temperatura ambiente de forma a deixar prosseguir a reacção de hemaglutinação. O grau de aglutinação foi anotado à vista desarmada numa escala descendente desde +++ para aglutinação total, até - para ausência de aglutinação. O título aglutinante (ou "end point") era o que apresentava o grau + de aglutinação. Quanto mais eficiente era a conjugação, mais elevado era o título aglutinante, neste teste de hemaglutinação directa.

Quando uma IgG anti-Ig era conjugada a eritrócitos, estes eram também titulados num microtitulador, contendo diluições sucessivas de antigénio, ou seja, de soro da espécie correspondente (também inactivado e absorvido com eritrócitos de Boi), no teste conhecido por hemaglutinação passiva e reversiva. O título aglutinante foi determinado como anteriormente.

Estes testes de hemaglutinação foram realizados sempre que uma nova Ig era estudada na conjugação a eritrócitos. Procurava-se pois encontrar as condições de reacção que permitissem a obtenção de conjugação máxima, reflectida no título aglutinante mais elevado. Contudo, quando a mesma Ig^{*} era sucessivamente conjugada aos mesmos eritrócitos^{**} (em condições óptimas) durante longo período de tempo (meses), apenas esporádicos testes de hemaglutinação eram realizados.

* proveniente da mesma preparação de Ig

** proveniente do mesmo dador

B.3.d. Conjugação de fluorocromo a eritrócitos de Boi,
para a reacção de roseta mista (RRM)

Após diversas tentativas para a obtenção de eritrócitos de Boi conjugados com Ig e com fluorocromo que dessem satisfatórias reacções de roseta, concluímos (Carvalho, 1983) que a melhor coordenação de tratamentos dos eritrócitos era a seguinte: (i) digestão pela papaína, (ii) conjugação do fluorocromo e (iii) conjugação da imunoglobulina.

A 1 volume (geralmente 100 μ l) de eritrócitos de Boi tratados com papaína (vêr alínea B.3.c.1.) e fortemente sedimentados (centrifugados a 350 g durante 10 minutos) adicionou-se 1 volume de PBS e 1 volume de fluoresceína iso-tiocianato (BDH) na concentração de 2 mg/ml de K_2HPO_4 0,15 M. Esta mistura incubou durante a noite (cerca de 18h) a 4°C e sob rotação lenta. Lavaram-se então os eritrócitos três vezes em grandes volumes de NaCl 0,9% e na última centrifugação deixaram-se os eritrócitos fortemente sedimentados. A conjugação da Ig procedeu-se de imediato tal como descrito na alínea B.3.c.2.

Estes eritrócitos tratados com papaína, marcados por fluoresceína e conjugados com Ig eram utilizados num período não superior a uma semana.

B.4. Reacções de roseta

B.4.a. Reacção de roseta E

Uma gota (aproximadamente 35 μ l) de suspensão linfocitária (2×10^6 linfócitos/ml em PBS contendo 1% de albumina sérica bovina - PBS/ASB) (vêr alínea B.1.) foi adicionada a igual volume de eritrócitos de Carneiro tratados com neuraminidase (1% V/V em PBS) (vêr alínea B.3.a).

Esta mistura de linfócitos e eritrócitos foi centrifugada a 300 g, a 4°C e durante um curto período de 2 minutos, após o qual se deixou o tubo, contendo as células sedimentadas, numa tina de gelo durante 1 hora.

Terminada a incubação, as células foram cuidadosamente ressuspensas com uma pipeta de Pasteur e montadas com azul de toluidina (Hopkin & Williams, Ltd., G.B.) entre lâmina e lamela, ambas revestidas de silicone. Para a coloração, um gota de azul de toluidina a 0,2% (p/v) em metanol foi deixada secar ao ar sobre uma lâmina de vidro, após o que se adicionou uma gota de PBS/ASB (para dissolver o corante dessecado) e se juntou à suspensão celular.

Observaram-se as preparações num vulgar microscópio óptico (Wild Heerbrugg M 20, Suíça).

B.4.b. Reacção de roseta antiglobulina (ou antideterminante) directa, RRAD (ou RRAdD)

Uma gota (aproximadamente 35 µl) de suspensão linfocitária (2×10^6 células/ml em PBS/ASB) (ver alínea B.1.) foi adicionada a igual volume de eritrócitos de Boi conjugados com Ig (1% v/v em PBS) (ver alínea B.3.c.). Esta mistura celular foi centrifugada a 300 g, 4°C e durante 2 minutos, após o que se deixou 30 minutos sobre o gelo.

Após a incubação, ressuspenderam-se as células cuidadosamente, coraram-se com azul de toluidina, montaram-se entre lâmina e lamela e observaram-se tal como anteriormente descrito (alínea B.4.a.).

B.4.c. Reacção de roseta mista (RRM)

Nesta reacção, uma gota de eritrócitos marcados com fluoresceí

na e conjugados com Ig (vêr alínea B.3.d.) foi misturada com uma gota de eritrócitos não fluorescentes mas também conjugados com diferente Ig (vêr alínea B.3.c.). A esta mistura de eritrócitos indicadores juntaram-se duas gotas de suspensão linfocitária (2×10^6 células/ml em PBS/ASB) (vêr alínea B.1.). A mistura tripartida foi centrifugada e incubada como na alínea B.4.a..

Após incubação, as células foram cuidadosamente ressuspensas e montadas entre lâmina e lamela (não siliconizadas), e na ausência do corante azul de toluidina.

As preparações observaram-se num microscópio óptico de fluorescência (Microscópio Orthoplan, Leitz Wietzlar, Alemanha) onde se podiam distinguir além dos linfócitos não reagidos, 3 tipos de rosetas: (i) rosetas fluorescentes (linfócitos circundados apenas por eritrócitos fluorescentes), (ii) rosetas não-fluorescentes (linfócitos rodeados apenas de eritrócitos não fluorescentes) e (iii) rosetas mistas (linfócitos cercados de ambos os tipos de eritrócitos: fluorescentes e não fluorescentes).

B.4.d. Reacção de roseta EA

Uma gota de eritrócitos de Boi sensibilizados com IgG específica a 1% v/v em PBS (vêr alínea B.3.b.) foi adicionada a igual volume de suspensão linfocitária (2×10^6 células/ml em PBS/ASB) (vêr alínea B.1.). Esta mistura foi centrifugada e incubada, seguidamente as células foram ressuspensas, coradas e montadas entre lâmina e lamela, e as preparações observadas em microscopia óptica vulgar, tal como se descreveu na alínea B.4.a.

B.5. Destituição de populações linfocitárias formadoras de rosetas

A metodologia foi baseada nos estudos originais de Parish & Hayward (1974), apresentando contudo, algumas modificações. Para a destituição de determinada população linfocitária, 1 ml do eritrócito indicador apropriado (a 1% em PBS) foi adicionado a igual volume de suspensão linfocitária (3×10^6 células/ml em PBS/ASB). Duas ou mais reacções idênticas foram realizadas simultaneamente com vista a evitar o uso de grandes volumes de suspensão linfocitária que se tornam menos eficientes (Carvalho, 1983). Os diversos tubos contendo idênticos reagentes foram centrifugados durante 5 minutos, a $350 g$ e a $40^\circ C$, após o que se procedeu à incubação de 1 hora sobre gelo. Ressuspenderam-se depois as células com uma pipeta de Pasteur e juntaram-se todas as misturas celulares dos diversos tubos contendo idênticos reagentes. Colocaram-se de seguida estas células sobre uma camada de 3 cm de altura de Ficoll-Hypaque ($\delta=1,07$) contido num tubo de centrifuga siliconado. Centrifugou-se a $250 g$, durante 15 minutos e à temperatura ambiente. As rosetas, bem como os eritrócitos livres formaram o sedimento, enquanto que na interfase (sobrejacentemente ao Ficoll-Hypaque) se depositaram os linfócitos que não formaram roseta com os eritrócitos indicadores. Retiraram-se os linfócitos não reactivos, lavaram-se duas vezes em PBS e ressuspenderam-se por fim em PBS/ASB, ajustando-os à concentração de 2×10^6 células/ml para ulteriores reacções de roseta.

B.6. Culturas celulares

B.6.a. Estimulação mitogênica (PHA)

Isolaram-se as células mononucleares a partir do sangue desfi-

brinado (vêr alínea B.1.), em condições assépticas. Após centrifugação em Ficoll-Hypaque, as células mononucleares foram lavadas três vezes em meio RPMI 1640 e ressuspensas na concentração de 2×10^6 células/ml em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro humano AB (inactivado pelo aquecimento a 56°C durante 30 minutos), penicilina (100 unidades internacionais/ml), estreptomicina (100 µg/ml) (Glaxo Laboratories, Ltd., Inglaterra) e glutamina (0,3 mg/ml) (Sigma). Fitohemaglutinina (PHA; Wellcome Diagnostics, Inglaterra) foi adicionada de forma a obter-se uma diluição final de 1/100. As células foram incubadas neste meio durante 7 dias após o que se renovou o meio, contendo agora interleuquina 2 produzida pela Doutora Carol O'Toole que muito amavelmente no-la cedeu. Alimentaram-se as células em cultura de 4 em 4 dias com interleuquina 2 fresca.

B.6.b. Estimulação mitogênica (GAT)

Prepararam-se as células como na alínea B.6.a.. Adicionou-se ao meio de cultura globulina anti-timócito (GAT) equina (Upjohn Co., Kalamazoo, Michigan, USA; Wechter e col., 1979) na concentração final de 1/1000. As células foram mantidas em cultura como anteriormente.

B.6.c. Estimulação alo-antigénica

As células mononucleares preparadas como na alínea B.6.a. foram ajustadas à concentração de 10^6 células/ml (células de resposta) e adicionadas a um igual volume de células mononucleares alogénicas* irradiadas (2000 rad) e também ajustadas à concentração de 10^6 células/ml (células estimuladoras). As células foram mantidas em cultura como na alínea B.6.a..

*Provenientes de diferente dador.

B.6.d. Estimulação por células autólogas transformadas
por vírus Epstein-Barr

Células mononucleares foram transformadas por vírus Epstein-Barr (VEB) pela Doutora Carol O'Toole que gentilmente no-las cedeu. Tal transformação foi realizada pela incubação de células mononucleares com o sobrenadante da linhagem celular B95-8, rico em VEB, e na presença de ciclosporina A, tal como descrito por Bird e col. (1981). Deixaram-se incubar estas células mononucleares durante 5 semanas, de forma a gerarem-se agregados celulares que reflectiam a transformação e proliferação das células.

Ao fim daquele tempo de incubação, irradiaram-se (5000 rad) as células transformadas por VEB (células estimuladoras) e adicionaram-se a igual volume e concentração (10^6 células/ml) de células mononucleares autólogas, extraídas e preparadas de novo como na alínea B.6.a. (células de resposta).



Retiraram-se amostras das várias culturas celulares, em diversos intervalos de tempo (como indicado nos "Resultados") para (i) determinação da proliferação celular e (ii) observação da alteração fenotípica das células; para tal, (i) determinou-se a timidina tritiada incorporada pelas células (ver alínea B.6.e.) e (ii) realizaram-se reacções de roseta.

Para estas reacções, lavaram-se as células retiradas das culturas em PBS por 3 vezes e ressuspenderam-se em PBS/ASB de forma a que

a concentração final ficasse a 2×10^6 células/ml.

B.6.e. Determinação da timidina- $^3\text{[H]}$ incorporada nas células em cultura

Retiraram-se amostras de 0,2 ml (triplicadas) das várias culturas e incubaram-se durante 18 horas com 1 μCi de timidina - $^3\text{[H]}$ (atividade específica 20-25 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$; Radiochemical Centre, Amersham International Ltd., Inglaterra). Terminado aquele tempo, as células foram recolhidas por um colector automático (Titertek Cell Harvester, Alemanha) e os discos de filtro contendo a timidina intracelular foram colocados em 10 ml de fluido de cintilação. A radioactividade foi contada num espectrômetro de cintilação líquida (Packard Tri-Carb Liquid-Scintillation Spectrometer, modelo 3320). O fluido de cintilação consistia numa mistura de 8 g de PPO (2,5-difeniloxazol), 200 mg de POPOP [1,4-bis-(5-feniloxazol-2-il)benzeno], 1 litro de Triton X-100 e Tolueno até um volume total de 2 litros.

B.7. Ensaios imunológicos

B.7.a. "ELISA" para determinação de anticorpos contra citomegalovírus

Os soros dos doentes receptores de enxerto cardíaco foram analisados pelo Laboratório de Saúde Pública (Public Health Laboratory) do Addenbrooke's Hospital quanto à existência de anticorpos contra citomegalovírus (CMV), vírus Herpes Simplex (VHS) e vírus Epstein-Barr (VEB). A técnica de fixação do complemento foi usada na determinação de anticorpos contra CMV e VHS, enquanto que anticorpos para VEB foram detectados por imunofluorescência. Considerou-se haver sero-conversão quando o aumento do título de reacção (antigénio-anticorpo) era superior a quatro.

Quantificamos e qualificamos também os anticorpos contra CMV no teste "ELISA" ("Enzyme Linked Immuno-sorbent assay"), que foi uma modificação do ensaio radioimune descrito por Kangro (1980). Para tal, as frações de IgM e IgG foram preparadas a partir dos soros por filtração em Sephacryl S 300. O antígeno de CMV OREA 04/05 e o seu control OREE 04/05 (Behring Diagnostics) foram diluídos em água destilada: 1/50 para o ensaio de IgG e 1/10 para o de IgM. Colocaram-se 60 µl do antígeno diluído nas concavidades de placas microtituladoras (Limbro S-MVC-96 PVC microtitre plate) e secaram-se ao ar quente (de secador de cabelo) durante 30 minutos. Após arrefecimento das placas, estas foram tratadas com formalina a 10%, durante 5 minutos e à temperatura ambiente. Lavaram-se as placas duas vezes em PBS contendo 0,08% (V/V) de Tween 20 (Dulbecco). Para reduzir a ligação não específica, incubaram-se as placas com PBS/Tween contendo 2% de soro normal de Coelho durante 18 horas, a 40°C. Após lavagem das placas com PBS/Tween, adicionaram-se a cada concavidade alíquotas de 50 µl de soro inteiro ou fracionado em diluições sucessivas (duplicadas) em PBS/Tween contendo 5% de soro normal de Coelho. As placas recobertas de antígeno fixado foram então incubadas com os soros durante 1 hora à temperatura ambiente para determinação de IgG e a 37°C para a de IgM. Após 3 lavagens com PBS/Tween adicionou-se 50 µl de conjugado específico de peroxidase na diluição ótima, previamente determinada. Assim, usou-se: (i) soro anti-IgG humana, feito em Coelho (conjugado de peroxidase γ-específico; P214, Dako) diluído 1/500 em PBS/Tween, contendo 5% de soro normal de Coelho; (ii) soro anti-IgM humana, feito em Coelho (conjugado de peroxidase μ-específico; P 212, Dako) diluído 1/500 em PBS/Tween, contendo 5% de soro normal de Coelho. Fez-se incubação de 1 hora à temperatura ambiente para o ensaio de IgG e a 37°C para o de IgM. Após mais 3 lavagens

como as anteriores, adicionou-se a cada concavidade das placas 60 μ l de reagente corante: 100 mg de O-fenileno diamina (Sigma) misturadas com 40 μ l de peróxido de hidrogênio a 30% e 100 ml de tampão citrato 0,075M a pH 5,0. Passados 20 minutos interrompeu-se a reação com H_2SO_4 3M.

Leu-se a densidade óptica (D.O.) a 492 nm num espectrofotômetro "Multiskan" (Flow Laboratories).

B.7.b. Ensaio de antiglobulina relacionada com infecção

A metodologia foi baseada na que Koritz e col. (1980) desenvolveram no nosso laboratório. IgG human agregada pelo aquecimento foi conjugada a eritrócitos humanos do grupo O tratados com quimotripsina (de pâncreas bovino do tipo II, Sigma) usando o método do $CrCl_3$ (ver alínea B.3.c.2). Estes foram titulados numa placa de microtitulação contendo diluições sucessivas de soro. Os títulos aglutinantes foram determinados como na alínea B.3.c.3).

B.7.c. Determinação da IgM total

Determinou-se a IgG total pelo teste de hemaglutinação passiva e reversiva (ver alínea B.3.c.3)). Para tal, usaram-se eritrócitos de Carneiro tratados com tripsina e conjugados com a fracção de IgG de soro anti-IgM humana.

A especificidade do reagente foi também verificada num teste de hemaglutinação passiva e reversiva, tal como descrito por Coombs e col. (1978). Os títulos aglutinantes foram determinados como anteriormente mencionado na alínea B.3.c.3).

B.8. Metodologia estatística usada no tratamento dos resultados

Os dados obtidos nas reacções de roseta foram tratados estatisticamente de acordo com os métodos descritos por Sokal e Rohlf (1967), sendo a maioria dos resultados apresentados como médias aritméticas incluídas nos respectivos intervalos de confiança ao nível de 95%.

Para comparação estatística das médias foi utilizado o teste t de Student, sendo consideradas significativas todas as diferenças em que $P > 0,05$. No caso particular em que o mesmo indivíduo foi testado para dois tratamentos utilizou-se o "teste t para comparação emparelhada".

Os limites de confiança para a média bem como os testes de significância foram efectuados nos dados normalizados por intermédio da transformação angular.

Todos os cálculos estatísticos (excepto o teste t para comparação emparelhada) foram realizados no Microcomputador TRS-80, pertença do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e cujos programas foram cuidadosamente elaborados em linguagem Basic pela Prof. Doutora Maria Helena Moreira, a quem agradecemos toda a excelente colaboração.

C A P Í T U L O I I I

- RESULTADOS -

III - RESULTADOS

A. ESTUDO DA INTERRELAÇÃO DE POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

1. Marcação da população T

A população E^+ , ou seja a população linfocitária possuidora de receptores de eritrócitos de Carneiro, conhecida como população T (Jon dal e col., 1972; Fiöland, 1972; Papamichael e col., 1972) pode ser identificada por eritrócitos tratados quer com AET (2-amino-etil-iso-tiouronio brometo hidrobrometo), ou com Nase (neuraminidase), ou com papaína, ou mesmo com eritrócitos não tratados, desde que se usem as condições óptimas de reacção (3º Capítulo da tese de M.Sc., Carvalho, 1983).

No presente trabalho pretendemos comparar a demarcação da população linfocitária E^+_{Nase} (definida pela reacção de roseta E, com eritrócitos de Carneiro tratados com neuraminidase) com a população de linfócitos marcados com o anticorpo monoclonal (AcMc) YTH 12.5 na reacção de roseta antideterminante directa (RRAdD).

Para tal recolheu-se sangue de dadores voluntários, cujos linfócitos isolados foram testados em paralelo na reacção de roseta E e na RRAdD.

Os valores médios das rosetas E^+ e das rosetas YTH^+ obtidos na suspensão linfocitária total e nas suspensões destituídas de células B ou de células YTH^+ apresentam-se acompanhados dos respectivos intervalos de confiança, cujos limites superior e inferior foram determinados ao nível de 95% (Fig. 3.1.). Importa salientar que a média dos da

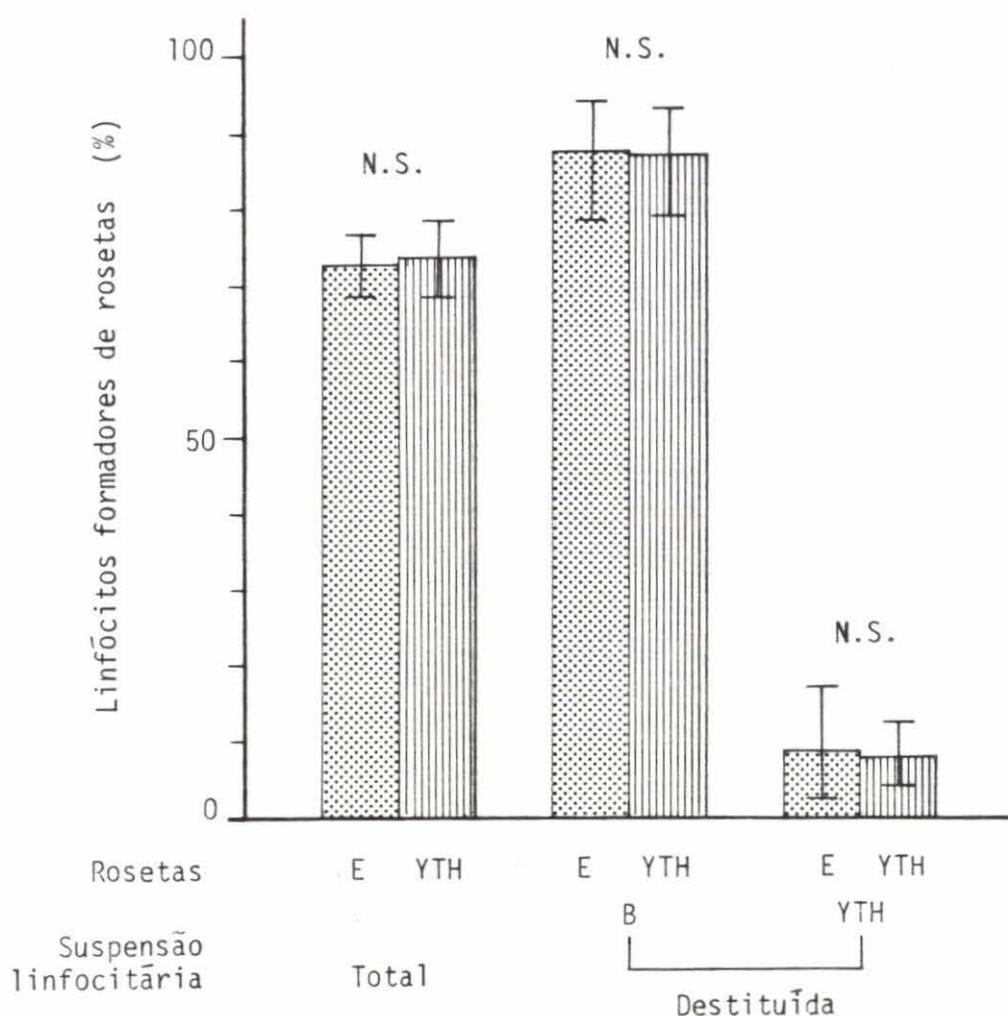


Fig. 3.1. Comparação entre a formação de rosetas E e a de rosetas YTH nas seguintes suspensões linfocitárias: total, destituída de linfócitos B e destituída de linfócitos YTH. Eritrócitos de Carneiro tratados com neuraminidase (reação de roseta E) e eritrócitos de Boi conjugados com AcMc YTH 12.5 (RRAdD) foram independentemente levados a reagir com os linfócitos das várias suspensões celulares. Os intervalos de confiança das médias foram calculados ao nível de 95%. N.S. As médias das amostras não são significativamente diferentes ($P >> 0,05$).

dos pode não coincidir com o ponto médio do intervalo de confiança pois que tivēmos de realizar o trabalho estatístico com os dados normalizados pela "transformação angular" (vêr alínea B.8. de "Material e Métodos").

Os testes de significância da diferença das médias efectuaram-se pelo método do "teste t para comparação emparelhada" uma vez que trabalhāmos pares de dados (rosetas E e rosetas YTH) obtidos a partir de cada dador (vêr alínea B.8. de "Material e Métodos").

Com efeito, o teste t para comparação emparelhada indicou que as diferenças entre os pares de dados não eram significativamente diferentes ($P \gg 0,05$) em qualquer das suspensões celulares: (i) na suspensão total $t_{15} = 0,52$, com $0,5 < P < 0,9$; (ii) na suspensão destituída de linfócitos B $t_5 = 0,28$, com $0,5 < P < 0,9$; (iii) e na suspensão destituída de linfócitos YTH^+ $t_2 = 1,10$, com $0,2 < P < 0,4$.

Não sendo as diferenças significativas ($P \gg 0,05$) concluímos que os eritrócitos de Carneiro (rosetas E) e o AcMc YTH 12.5 (rosetas YTH) detectavam idênticas populações linfocitárias.

O facto de as proporções de rosetas E e de rosetas YTH serem semelhantes na suspensão celular total, não indica por si só que os eritrócitos E_{Nase} e os eritrócitos conjugados com o AcMc YTH 12.5 reajam com as mesmas células. No entanto a variação em paralelo das percentagens de rosetas E e de rosetas YTH tanto nas suspensões linfocitárias destituídas de células B como nas destituídas de células YTH^+ (Fig. 3.1), sugere-nos que os marcadores celulares (E_{Nase} e AcMc YTH 12.5) reagem com os mesmos linfócitos.

Pode pois concluir-se que ambos os indicadores celulares demarcam a mesma população linfocitária—a população de células T.

2. Marcação de diversas populações linfocitárias

Com base nos resultados obtidos na alínea anterior, decidimos prosseguir a identificação dos linfócitos T pelo método da RRAdD, usando o anticorpo monoclonal YTH 12.5.

Utilizámos também o anticorpo monoclonal YCL 6.8 conjugado a eritrócitos de Boi, pelo método do CrCl_3 , a fim de ser também usado na RRAdD. Este AcMc é específico para determinantes monomórficos da molécula HLA-DR (Waldmann, comunicação pessoal), molécula esta designada por "Ia-like", ou simplesmente "Ia", por ser idêntica à molécula Ia do Rato.

A determinação das condições óptimas de reacção dos eritrócitos conjugados com YTH 12.5 ou com YCL 6.8 foi assunto de estudo minucioso apresentado no 4º capítulo da nossa tese de M.Sc. (Carvalho, 1983). No presente trabalho usámos pois as condições óptimas que se descrevem nos "Material e Métodos" (alíneas B.3.c. e B.4.b.).

Para marcação dos linfócitos portadores de Ig de superfície (linfócitos B) utilizou-se um anticorpo policlonal contra Ig humana (Ig anti-Ig) feito em Carneiro. Esta Ig anti-Ig foi preparado no nosso laboratório e o método de reacção de roseta antiglobulina directa (RRAD) foi o descrito por Coombs e col. (1977) (ver alíneas B.3.c. e B.4.b. de "Material e Métodos").

A determinação da proporção de linfócitos que expressam a cadeia leve K de Ig (parte dos linfócitos B) foi realizada pelo método de RRAdD com um anticorpo monoclonal específico, anti-cadeia K humana (α -Ck) feito em Murganho.

Os linfócitos possuidores de receptores para a porção F_C da IgG, foram detectados pela reacção de roseta EA, usando eritrócitos de Boi sensibilizados com anticorpo específico (IgG purificada), feito em Coelho (ver alíneas B.3.b. e B.4.d. de "Material e Métodos").

Dos estudos realizados na suspensão linfocitária isolada do sangue de diversos dadores voluntários, verificou-se que, da população total de linfócitos, $75,1 \pm 5,3$ % (média \pm SEM) (n=76) eram células T; $19,4 \pm 6,4$ % (n=97) eram células B; $13,8 \pm 6,1$ % (n=21) expressavam a cadeia leve K; $15,6 \pm 7,6$ % (n=66) possuíam o antigénio Ia; e $22,6 \pm 3,3$ % (n=21) expressavam receptores para F_C .

Na Fig. 3.2. apresentam-se as médias das diversas populações linfocitárias acompanhadas dos seus respectivos limites de confiança determinados ao nível de 95%.

Este estudo mostra a representatividade de cada população linfocitária (definida por marcador de membrana) na suspensão de linfócitos sanguíneos. Dado que cada população é determinada *per se* não nos é possível concluir se algumas das células positivas para determinado marcador o são também para outro.

3. Determinação da interpenetração de pares de populações

É nosso propósito, nesta secção, determinarmos a correlação entre pares de populações linfocitárias definidas por marcadores de membrana.

São quatro as subpopulações que se obtêm a partir de cada par de marcadores de membrana. Assim, se considerarmos os marcadores X e Z , podemos delinear (i) a subpopulação positiva para X mas negativa para Z (X^+Z^-), (ii) a subpopulação duplamente marcada (X^+Z^+), (iii) a posi-

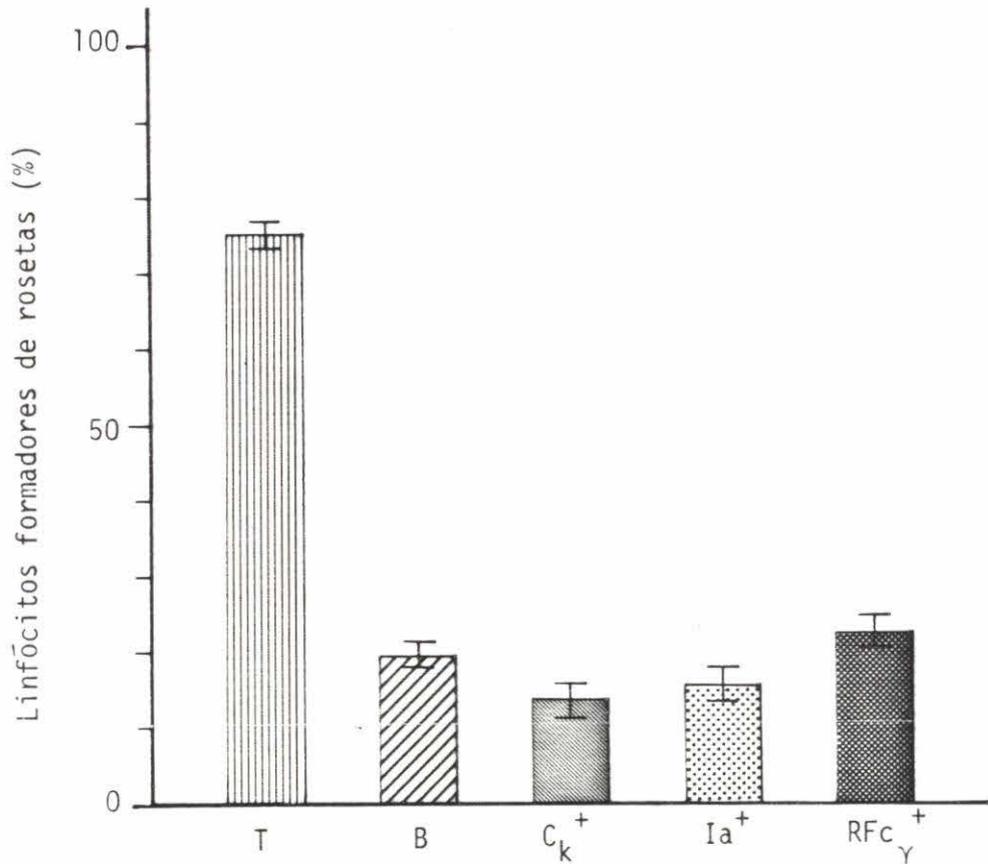


Fig. 3.2. Proporções das diversas populações linfocitárias definidas por marcadores de membrana. Os linfócitos formam rosetas com eritrócitos de Boi conjugados com AcMc YTH 12.5 (linfócitos T), com Ig anti-Ig humana (linfócitos B), com AcMc anti-cadeia K humana (linfócitos C_k^+) e com AcMc 6.8 (linfócitos Ia^+); os linfócitos formam também rosetas com eritrócitos de Boi sensibilizados com anti-IgG (linfócitos RFc_γ^+). Os intervalos de confiança das médias foram determinados ao nível de 95%.

tiva para Z mas negativa para X (X^-Z^+) e (iv) a subpopulação negativa para ambos os marcadores (X^-Z^-).

Foram dois os métodos aplicados na determinação das 4 subpopulações linfocitárias. O método da *destituição celular* (DC) foi desenvolvido e discutido na nossa tese de M.Sc., quando aplicado ao estudo de populações linfocitárias do Rato (5º Capítulo da tese de M.Sc., Carvalho, 1983). A técnica de *reação de roseta mista* (RRM) é um método mais eficiente que a destituição celular, e foi também por nós desenvolvida nos 3º e 5º capítulos da mesma tese (Carvalho, 1983). A descrição de ambos os métodos, bem como as suas vantagens e inconvenientes, encontram-se sumariamente apresentados na parte final da "Introdução" do presente trabalho.

3.a. Correlação entre as populações B e C_k^+

Por definição, os linfócitos B são as células linfóides capazes de sintetizar e expressar Ig endógena na superfície externa da membrana. Todavia a enumeração dos linfócitos B tem sido motivo de grande controvérsia devido ao facto de alguns linfócitos (provavelmente não B) terem a capacidade de adsorver Ig do meio pelos seus receptores de Fc e darem portanto falsos resultados positivos de células B.

Sabe-se que 2/3 dos linfócitos B segregam e expressam a cadeia K de Ig e que o outro 1/3 segrega e expressa a cadeia λ . Se nas nossas condições de experiência houvesse linfócitos que adsorvessem Ig citofílica do meio, aqueles linfócitos ficariam revestidos de variadas Igs, umas Igs constituídas por cadeias K e outras por cadeias λ . Isto porque o processo de adsorção é de natureza não especí

fica.

No presente estudo realizamos a RRM com o AcMc anti-cadeia K (marcador de linfócitos C_k^+) e a Ig anti-Ig humana (marcador de linfócitos Ig^+). A observação de uma proporção de linfócitos C_k^+ superior a 2/3 relativamente às células Ig^+ , indicaria que o AcMc estava a detectar não só as verdadeiras células B produtoras de Ig de cadeia K, mas também outros linfócitos que haviam adsorvido inespecificamente cadeias K e λ de Ig.

Os resultados do Quadro I mostram, tal como se esperava, que todas as células C_k^+ se incluem na população B (subpopulação $B^+C_k^+$) porquanto a subpopulação $B^-C_k^+$ era inexistente. A subpopulação $B^+C_k^-$ corresponde a $10,3 \pm 3,1\%$ (variando entre 7,0% e 15,5%) dos linfócitos totais enquanto que a subpopulação $B^+C_k^+$ representa $20,8 \pm 7,3\%$ (variando entre 9,0% e 32,5%) dos linfócitos. Por conseguinte, a subpopulação duplamente marcada ($B^+C_k^+$) constitui $65,96 \pm 6,40\%$ (variando entre 52,94 e 75,81%) da população B total. A relação entre as duas populações, B e C_k^+ , encontra-se representada no diagrama da Fig. 3.3-A.

Estes resultados mostram pois que além de todas as células C_k^+ serem Ig^+ (B), representam também cerca de 2/3 (ou 66%) das células B.

Podemos pois concluir que nas condições em que realizamos as experiências, não é provável que tenha havido adsorção de Ig citofílica pelos receptores Fc dos linfócitos. Deste modo, podemos concluir que os linfócitos marcados pela Ig anti-Ig humana são verdadeiros linfócitos B, células estas produtoras e possuidoras de Ig na superfície externa da sua membrana.

QUADRO I

As quatro subpopulações obtidas por RRM entre o marcador de células B (Ig anti-Ig humana) e o de células C_k^+ (AcMc anti- C_k).

DADOR	Percentagem da suspensão linfocitária total				Percentagem das células B^+ C_k^+	
	$B^+C_k^-$	$B^+C_k^+$	$B^-C_k^+$	$B^-C_k^-$	Também C_k^+ $\frac{B^+C_k^+}{B^+} \times 100$ (a)	Também B^+ $\frac{B^+C_k^+}{C_k^+} \times 100$ (b)
8	8,0	9,0	0,0	83,0	52,94	100,00
9	7,0	11,0	0,0	82,0	61,11	100,00
11	7,0	17,5	0,0	75,5	71,43	100,00
10	10,0	19,5	0,0	70,5	66,10	100,00
12	12,0	19,5	0,0	68,5	61,90	100,00
13	10,0	20,0	0,0	70,0	66,67	100,00
14	7,5	23,5	0,0	69,0	75,81	100,00
15	14,5	26,5	0,0	59,0	64,63	100,00
16	11,5	28,5	0,0	60,0	71,25	100,00
20	15,5	32,5	0,0	52,0	67,71	100,00
X_{DPM}^+	$10,3 \pm 3,1$	$20,8 \pm 7,3$	$0,0 \pm 0,0$	$69,0 \pm 9,9$	$65,96 \pm 6,40$	$100,00 \pm 0,00$

(a) a população B^+ é dada pela soma das subpopulações $B^+C_k^-$ e $B^+C_k^+$

(b) a população C_k^+ é dada pela soma das subpopulações $B^+C_k^+$ e $B^-C_k^+$

NOTA: A intercepção da população B com a população C_k^+ é dada pela subpopulação $B^+C_k^+$

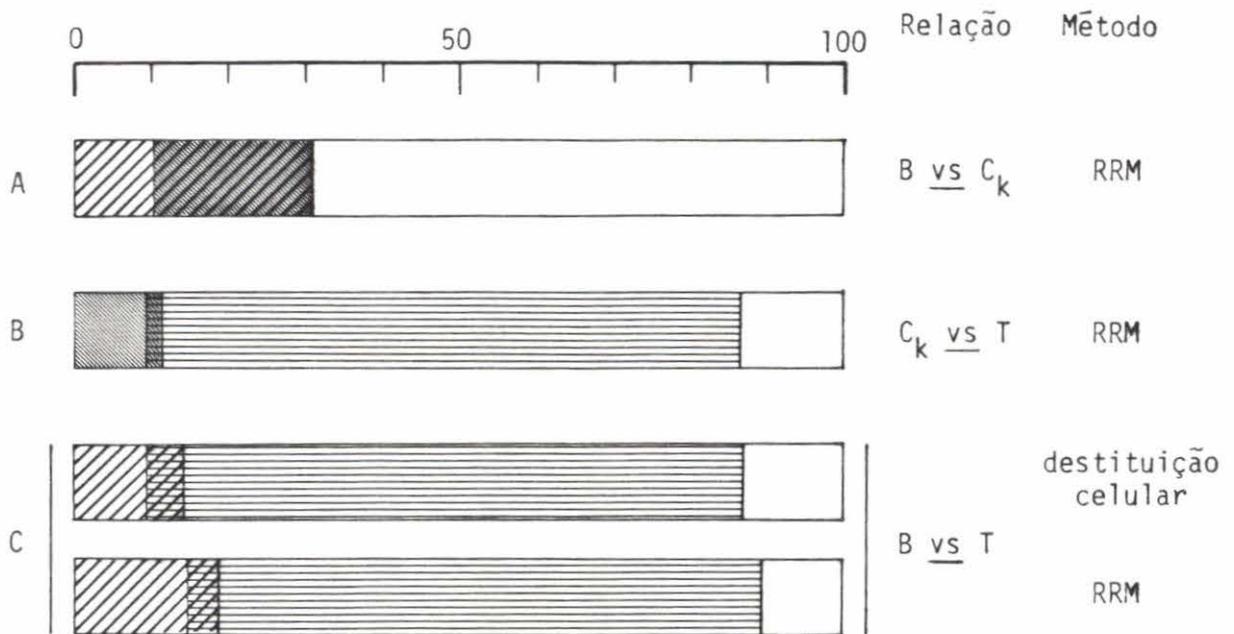


Fig. 3.3. Diagrama mostrando a correlação das populações:

- (A) B e C_k^+ : subpopulações $B^+C_k^-$ (///), $B^+C_k^+$ (▨), e $B^-C_k^-$ (□);
- (B) C_k^+ e T: subpopulações $C_k^+T^-$ (■), $C_k^+T^+$ (▨), $C_k^-T^+$ (≡) e $C_k^-T^-$ (□);
- (C) B e T: subpopulações B^+T^- (///), B^+T^+ (▨), B^-T^+ (≡) e B^-T^- (□).

Note-se que a subpopulação $C_k^+T^+$ ($2,1 \pm 1,7\%$) corresponde a cerca de 2/3 da subpopulação B^+T^+ ($3,9 \pm 2,7\%$).

3.b. Correlação entre as populações B e T

Tem sido descrita a existência de uma pequena proporção de linfócitos que expressam simultaneamente marcadores de células B e de células T, ou seja, Ig de superfície e receptores para eritrócitos de Carneiro (Bentwich e col., 1973-a; Dickler e col., 1974; Haegert e col., 1978-a). Por outro lado tem sido também referida uma população que não expressa qualquer daqueles marcadores, a 'população nula', como foi primeiramente designada por Fröland e Natvig (1973). A existência desta população tem sido no entanto negada por Haegert (1978-a; 1978-b) e Pepys e col. (1981).

As populações B e T têm sido determinadas por contagens independentes das células B e T, numa mesma suspensão linfocitária: se a soma das proporções encontradas atingirem os 100%, nega-se a existência da população nula; pelo contrário, demonstra-se a existência de tal população quando a soma das proporções de B e T é menor que a totalidade dos linfócitos.

No nosso estudo procedemos à realização de marcação dupla, isto é, utilizamos simultaneamente dois marcadores celulares. Tanto o método de destituição celular como o método de reacção de roseta mista (RRM) permitiram não só determinar as proporções de linfócitos B e T, como também nos informaram relativamente às proporções da população duplamente marcada, B^+T^+ , e da população nula, B^-T^- .

O Quadro II mostra que os linfócitos B que não expressam o antígeno YTH 12.5 (subpopulação B^+T^-) constituem $9,3 \pm 3,1\%$ da população linfocitária (variando entre 5,0% e 14,0%) de acordo com os resultados obtidos pelo método de destituição celular; ou $14,9 \pm 7,1\%$ (varian

As quatro subpopulações obtidas por destituição celular (a) e por RRM (b) entre o marcador de linfócitos B (Ig anti-Ig humana) e o de linfócitos T (AcMc YTH 12.5)

MÉTODO	DADOR	Porcentagem da suspensão linfocitária total				Porcentagem das células	
		B ⁺ T ⁻	B ⁺ T ⁺	B ⁻ T ⁺	B ⁻ T ⁻	B também T	T também B
						$\frac{B^+T^+}{B^+} \times 100$	$\frac{B^+T^+}{T^+} \times 100$
a	1	10,0	0,0	84,0	6,0	0,00	0,00
	1	14,0	0,0	69,0	17,0	0,00	0,00
	2	7,0	1,0	58,0	34,0	12,50	1,70
	3	5,0	6,0	78,0	11,0	54,55	7,14
	4	12,5	6,5	77,0	4,0	34,21	7,78
	5	8,5	7,0	67,5	17,0	45,16	9,40
	6	8,5	8,0	71,0	12,5	48,48	10,13
	6	12,0	8,0	74,0	6,0	40,00	9,76
	7	6,0	9,0	77,5	7,5	60,00	10,40
	$\bar{x} \pm DPM$	9,3 [±] 3,1**	5,0 [±] 3,7*	72,9 [±] 7,6*	12,3 [±] 9,3*	32,76 [±] 22,39*	6,26 [±] 4,42*
b	8	10,0	0,0	79,0	1,0	0,00	0,00
	9	9,0	1,0	30,0	0,0	10,00	1,10
	10	13,0	1,0	31,0	5,0	7,14	1,22
	11	14,0	1,0	76,0	9,0	6,67	1,30
	12	18,0	2,0	68,0	12,0	10,00	2,86
	13	22,5	3,0	63,0	5,5	11,76	4,17
	14	17,5	3,0	72,0	7,5	14,63	4,00
	4	3,0	5,0	53,0	33,0	35,71	8,62
	15	26,0	5,0	67,0	2,0	16,13	6,34
	16	27,0	5,0	63,0	5,0	15,62	7,35
	17	5,5	5,0	62,0	27,5	47,61	7,46
	6	9,0	7,0	70,0	14,0	43,75	9,09
	6	6,0	8,0	70,0	16,0	57,14	10,26
	18	12,0	8,0	76,0	4,0	40,00	9,52
		$\bar{x} \pm DPM$	14,9 [±] 7,1**	3,9 [±] 2,7*	71,1 [±] 9,1*	10,1 [±] 9,8*	22,58 [±] 18,26*

Em cada subpopulação as médias obtidas pelos métodos a e b não são significativamente diferentes;

* ao nível de 95% (P>0,05)

** ao nível de 99% (0,01<P<0,05)

do entre 5,5% e 27,0%) quando determinado por RRM.

A população que expressa Ig de superfície e o antígeno YTH 12.5 (subpopulação $B^{+}T^{+}$) representa $5,0 \pm 3,7\%$ (variando entre 0,0% e 9,0%) ou $3,9 \pm 2,7\%$ (variando entre 0,0% e 8,0%) dos linfócitos totais, conforme determinado, respectivamente, por destituição celular ou por RRM (Quadro II).

A subpopulação $B^{-}T^{+}$ é constituída pelos linfócitos que contêm o antígeno YTH 12.5 e que não expressam Ig. Esta subpopulação $B^{-}T^{+}$ representa $72,9 \pm 7,6\%$ (variando entre 58,0% e 84,0%) ou $71,1 \pm 9,1\%$ (variando entre 53,0% e 90,0%) dos linfócitos totais, tal como determinado, respectivamente, por destituição celular ou por RRM (Quadro II).

Finalmente a subpopulação $B^{-}T^{-}$ constitui a denominada população nula e representa $12,8 \pm 9,3\%$ (variando entre 4,0% e 34,0%) ou $10,1 \pm 9,8\%$ (variando entre 0,0% e 33,0%) da totalidade dos linfócitos como calculado, respectivamente, pelo método de destituição celular ou por RRM (Quadro II).

A análise da significância das médias foi realizada nos dados normalizados pela transformação angular (ver "Material e Métodos"). As médias obtidas por destituição celular e por RRM não diferem significativamente ($P > 0,05$), considerando as subpopulações $B^{+}T^{+}$, $B^{-}T^{+}$ e $B^{-}T^{-}$ (Quadro II,*). No entanto, as médias encontradas pelos dois métodos para a subpopulação $B^{+}T^{-}$ são significativamente diferentes ao nível de 95%, mas já não o são, contudo, ao nível de 99%, pois que $0,01 < P < 0,05$ (Quadro II,**).

As médias obtidas pelos dois métodos de marcação dupla foram integradas no diagrama da Fig. 3.3.-C. Deste diagrama torna-se eviden

te a semelhança da demarcação das subpopulações linfocitárias. Apenas a subpopulação B^+T^- surge ligeiramente menor quando determinada pelo método de destituição celular, em comparação com o estudo realizado por RRM.

Deste trabalho pode pois concluir-se que há de facto uma população de linfócitos que não são expressa Ig de superfície (marcador de células B) como também possui o antigénio YTH 12.5 (marcador de células T). Esta subpopulação B^+T^+ constitui pois a intercepção das populações B e T.

A existência da população nula é também evidente, embora esta seja bastante variável de dador para dador. Na nossa casuística registamos um dador que a não possuía (nº 9, Quadro II).

Observa-se ainda do Quadro II que a subpopulação duplamente marcada (B^+T^+) constitui $32,76 \pm 22,99\%$ ou $22,58 \pm 18,26\%$ (conforme o método utilizado: destituição celular ou RRM, respectivamente dos linfócitos B, variando entre 0,00% e 60,00% (destituição celular) ou entre 0,00% e 57,14% (RRM).

Do mesmo modo, a subpopulação B^+T^+ representa $6,26 \pm 4,42\%$ ou $5,28 \pm 3,58\%$ (método de destituição celular ou por RRM, respectivamente) da totalidade dos linfócitos T, variando no primeiro método de 0,00% a 10,40% e no segundo de 0,00% a 10,26% (Quadro II).

3.c. Correlação entre as populações T e C_k^+

Neste estudo pretendemos determinar a correlação entre os linfócitos T (marcados pelo AcMc YTH 12,5) e os linfócitos que expressam a cadeia K da Ig (marcados pelo AcMc anti- C_k).

Verificamos que apenas uma reduzida população de linfócitos expressava ambos os marcadores ($2,1 \pm 1,7\%$, variando de 0,0% a 6,0%) (Quadro III e Fig. 3.3-B).

Comparando esta subpopulação $T^+C_k^+$ com a subpopulação T^+B^+ (Quadro II-b e Fig. 3.3-C) verifica-se que a média observada de $T^+C_k^+$ ($2,1 \pm 1,7\%$) (Quadro III e Fig. 3.3-B) se aproxima dos 2/3 calculados a partir da média de T^+B^+ ($3,9 \pm 2,7\% \times 2/3 = 2,6 \pm 1,8\%$), média esta calculada mas que se aproxima da obtida pelo método de RRM.

Estes resultados confirmam as conclusões anteriormente referidas: (i) existe uma subpopulação de linfócitos que expressa ambos os marcadores de células B e de células T (B^+T^+) e (ii) não ocorreu adsorção de Ig citofílica por células "não-B". Se tivesse havido adsorção de Ig do meio pelos receptores de Fc dos linfócitos, esta seria naturalmente não específica o que levaria a encontrarmos (contrariamente ao observado) uma subpopulação $T^+C_k^+$ muito superior a 2/3 da subpopulação T^+B^+ .

3.d. Correlação entre as populações B e Ia^+

O antigénio HLA-DR, "Ia-like" ou simplesmente Ia tem sido detectado na superfície externa dos linfócitos B, dos monócitos e das células da população nula (Winchester e col., 1975; Humphreys e col., 1976; Winchester e col., 1976; Schlossman e col., 1976).

Foi objectivo desta alínea verificar se os linfócitos B (células que, por definição, sintetizam e expressam Ig de superfície) também podem ser identificados pela presença do antigénio Ia. O mesmo é perguntar se a população de células B e a de células Ia^+ são uma e a mesma população linfocitária.

QUADRO III

As quatro subpopulações obtidas por RRM, entre o marcador de células T (AcMc YTH 12.5) e o de células C_k^+ (AcMc anti- C_k).

DADOR	Percentagem da suspensão linfocitária total				Percentagem das células	
	$T^+C_k^-$	$T^+C_k^+$	$T^-C_k^+$	$T^-C_k^-$	T também C_k^+	C_k^+ também T
					$\frac{T^+C_k^+}{T^+} \times 100$	$\frac{T^+C_k^+}{C_k^+} \times 100$
8	71,0	0,0	7,0	22,0	0,00	0,00
9	89,0	1,0	8,0	2,0	1,11	22,22
11	75,0	1,0	10,5	13,5	1,32	17,39
10	81,0	1,0	13,5	4,5	1,23	6,70
12	76,0	2,0	9,0	13,0	2,56	18,18
13	73,0	2,0	8,0	17,0	2,67	20,00
14	75,0	2,0	6,5	16,5	2,60	2,35
6	73,0	3,0	10,0	14,0	3,94	23,08
6	61,0	3,0	12,0	24,0	4,69	20,00
18	78,0	6,0	8,0	8,0	7,14	42,85
$\bar{X}^{\pm}DPM$	$75,2^{\pm}7,2$	$2,1^{\pm}1,7$	$9,3^{\pm}2,2$	$13,5^{\pm}7,1$	$2,73^{\pm}2,08$	$19,27^{\pm}11,17$

Procedemos pois à análise de células B e de células Ia^+ existentes nas três suspensões linfocitárias: (i) total, (ii) destituída de células B e (iii) destituída de células Ia^+ (Fig. 3.4). O método estatístico de "comparação emparelhada" (ver alínea B.8. de "Material e Métodos") permitiu-nos relacionar as proporções de células B com as de células Ia^+ para cada dador. Assim, os cálculos estatísticos indicaram que as diferenças entre os pares de dados (proporção de células B e de células Ia^+) em cada dador eram significativamente diferentes: na suspensão linfocitária total essa diferença é muito evidente pois que $P < 0,05$ ($0,001 < P < 0,01$); nas suspensões destituídas de células B e de células Ia^+ $P < 0,05$ ($0,02 < P < 0,05$) (Fig. 3.4).

Deste estudo pode pois concluir-se que a população de linfócitos que expressa Ig de superfície é distinta da população que expressa o antigênio Ia.

Para determinarmos a relação entre aquelas duas populações procedemos à determinação das quatro subpopulações (B^+Ia^- , B^+Ia^+ , B^-Ia^+ e B^-Ia^-) pelos métodos de destituição celular e de RRM (Quadro IV). As médias das subpopulações obtidas pelos dois métodos não são significativamente diferentes pois que em todos os casos o teste t de Student mostrou que $P > 0,05$.

A subpopulação B^+Ia^- constitui $10,1 \pm 5,1\%$ (variando entre 2% e 16,5%) ou $8,0 \pm 5,9\%$ (variando entre 2,0 e 16,0%) dos linfócitos totais conforme, respectivamente, determinado pelo método de destituição celular ou RRM (Quadro IV).

A subpopulação duplamente marcada B^+Ia^+ representa $7,7 \pm 4,6\%$ (variando entre 2,0% e 14,0%) ou $11,8 \pm 7,0\%$ (variando entre 3,0% e 27,0%) de acordo com o método aplicado, destituição celular ou RRM,

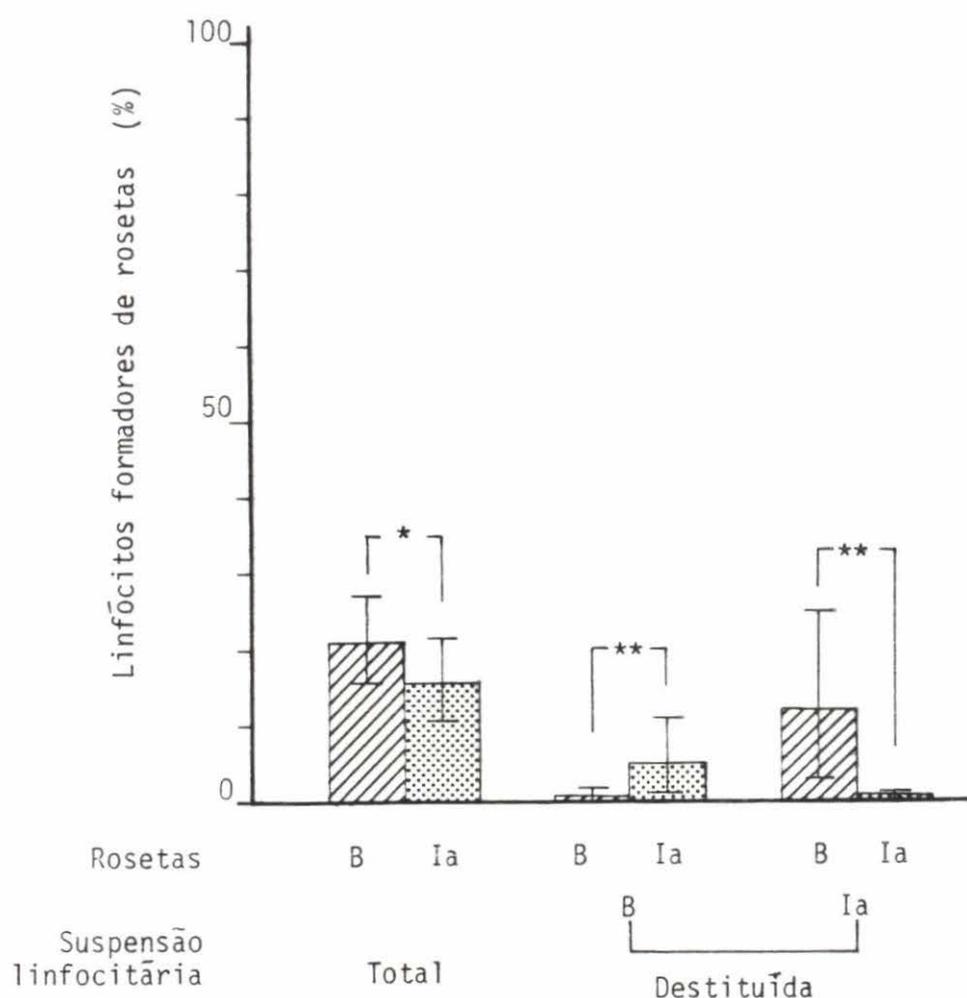


Fig. 3.4. Comparação entre a proporção de linfócitos que expressam Ig de superfície (células B) e o antigênio Ia (células Ia⁺), nas seguintes suspensões linfocitárias: total, destituída de linfócitos B e destituída de linfócitos Ia⁺. Eritrócitos de Boi tratados com papaína e conjugados com Ig anti-Ig humana (marcador de células B) ou com AcMc YCL 6.8 (marcador de células Ia⁺) foram independentemente levados a reagir com linfócitos das várias suspensões celulares.

Os intervalos de confiança das médias foram calculadas ao nível de 95%.

O "teste t para comparação emparelhada" indicou que as diferenças entre os pares de dados (proporção de células B e de células Ia⁺) de cada dador são significativamente diferentes:

* $P < 0,05$; $0,001 < P < 0,01$

** $P < 0,05$; $0,02 < P < 0,05$

QUADRO IV

As quatro subpopulações obtidas por destituição celular (a) e por RRM (b) entre o marcador de linfócitos B (Ig anti-Ig humana) e o de linfócitos Ia⁺ (AcMc YCL 6.8).

MÉTODO	DADOR	Percentagem da suspensão linfocitária total				Percentagem das células	
		B ⁺ Ia ⁻	B ⁺ Ia ⁺	B ⁻ Ia ⁺	B ⁻ Ia ⁻	B também Ia ⁺	Ia também B
						B ⁺ Ia ⁺ x 100 B ⁺	B ⁺ Ia ⁺ x 100 Ia ⁺
a	1	7,5	2,0	2,5	88,0	2,11	44,44
	2	14,0	3,0	0,5	82,5	17,65	85,71
	2	13,5	3,5	0,5	82,5	20,59	87,50
	1	16,5	5,5	4,5	73,5	25,00	55,00
	3	2,5	7,5	3,0	87,0	75,00	71,43
	3	2,0	8,0	2,0	88,0	80,00	80,00
	6	12,5	12,0	13,0	62,5	48,98	48,00
	6	11,0	13,5	5,0	70,5	55,10	72,97
	6	11,0	14,0	11,0	64,0	56,00	56,00
	$\bar{X} \pm \text{DPM}$	10,1 [±] 5,1*	7,7 [±] 4,6*	4,7 [±] 4,5*	77,6 [±] 10,2*	42,27 [±] 27,11*	66,76 [±] 16,3*
b	1	12,0	3,0	2,5	82,5	20,00	54,55
	21	11,0	7,0	11,0	71,0	38,89	38,89
	3	5,0	9,0	3,0	83,0	64,29	75,00
	22	2,0	11,0	7,0	80,0	84,62	61,11
	22	2,0	11,0	3,0	84,0	84,62	78,57
	4	2,0	13,0	0,5	84,5	86,67	96,30
	6	14,0	13,0	4,0	69,0	48,15	76,47
	23	16,0	27,0	4,5	52,5	62,79	85,71
		$\bar{X} \pm \text{DPM}$	8,0 [±] 5,9*	11,8 [±] 7,0*	4,3 [±] 3,3*	75,8 [±] 11,1*	61,30 [±] 24,30*

Em cada subpopulação as médias obtidas pelos métodos a e b não são significativamente diferentes (*): P>0,05.

respectivamente (Quadro IV).

A subpopulação B^-Ia^+ constitui $4,7 \pm 4,5\%$ (variando entre 0,5% e 13,0% se determinada por destituição celular e $4,3 \pm 3,3\%$ (variando entre 0,5% e 11,0%) se determinado por RRM (Quadro IV).

Finalmente, a subpopulação negativa para ambos os marcadores corresponde a $77,6 \pm 10,2\%$ (variando entre 62,5% e 88,0%) ou a $75,8 \pm 11,1\%$ (variando entre 52,5% e 84,5%) conforme determinado por destituição celular ou por RRM (Quadro IV).

Na Fig. 3.5-A apresenta-se o diagrama das médias das quatro subpopulações obtidas pelos dois métodos: destituição celular e RRM. Nesta Fig. 3.5-A tornam-se claramente evidentes os linfócitos B que não são Ia^+ (subpopulação B^+Ia^-) e os linfócitos Ia^+ que não expressam Ig de superfície (subpopulação B^-Ia^+). A subpopulação duplamente marcada surge ligeiramente mais alargada ($11,8 \pm 7,0\%$) quando determinada por RRM do que quando obtida por destituição celular ($7,7 \pm 4,6\%$).

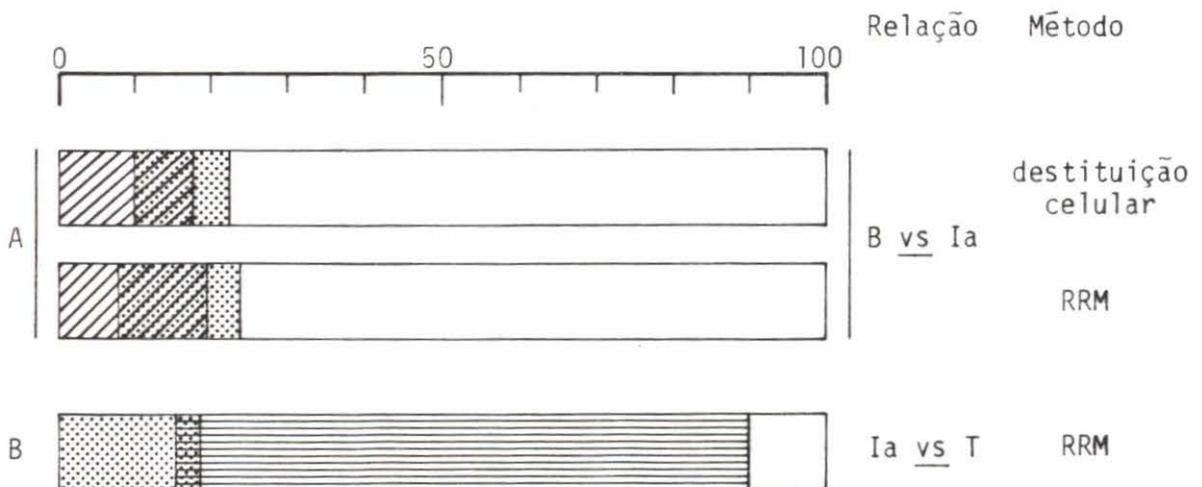


Fig. 3.5 - Diagrama mostrando a correlação das populações:

- (A) B e Ia^+ : subpopulações B^+Ia^- (///), B^+Ia^+ (x/x), B^-Ia^+ (●●●) e B^-Ia^- (□);
- (B) Ia^+ e T: subpopulações Ia^+T^- (●●●), Ia^+T^+ (x/x), Ia^-T^+ (≡) e Ia^-T^- (□).

O presente estudo confirma que a população de linfócitos B é distinta da população de linfócitos Ia⁺, se bem que a intercepção das mesmas (dada pela subpopulação B⁺Ia⁺) seja relativamente elevada. De facto, observa-se que a subpopulação duplamente marcada corresponde a 42,27[±]27,11% (por destituição celular) ou a 61,30[±]24,30% (por RRM) dos linfócitos B (Quadro IV); do mesmo modo, verifica-se que 66,76[±]16,30% (por destituição celular) ou 70,80[±]18,40% (por RRM) dos linfócitos Ia⁺ possuem também Ig de superfície.

3.e. Correlação entre as populações T e Ia⁺

A existência de uma pequena proporção de linfócitos T possuidores de antigénio Ia na sua membrana externa tem sido motivo de alguma controvérsia. Evans e col. (1978) em ensaios de citotoxicidade (em que mediram a libertação de ⁵¹Cr dos linfócitos lisados com anti-soros policlonais e complemento) e Reinherz e col. (1979) usando anticorpos monoclonais no FACS (Fluorescence-activated cell sorter) não detectaram aquela população duplamente marcada T⁺Ia⁺. Pelo contrário, outros investigadores (Albrechtsen, 1977; Fu e col., 1978; Yu e col., 1980, Schuurman e col., 1980) demonstraram a existência de uma proporção de 4-10% dos linfócitos T em repouso que expressavam o antigénio Ia⁺, usando anti-soros e imunofluorescência indirecta.

Naqueles estudos os linfócitos T eram inicialmente isolados após o que realizavam o teste para determinação do antigénio Ia.

No nosso estudo aplicámos o método de RRM em que fizemos reagir simultaneamente o indicador de linfócitos T (AcMc YTH 12.5 conjugado a eritrócitos fluorescentes de Boi) e o marcador de linfócitos

Ia⁺ (AcMc YCL 6.8 conjugado a eritrócitos de Boi não fluorescentes).

Observamos uma população de $3,4 \pm 2,0\%$ (variando entre 1,5% e 7,0%) de linfócitos que apresentavam os antigênicos YTH 12.5 e YCL 6.8, isto é, linfócitos T⁺Ia⁺ (Quadro V e Fig. 3.5-B). Esta subpopulação corresponde a $4,12 \pm 2,36\%$ (variando entre 2,14% e 8,33%) dos linfócitos T e a $21,03 \pm 12,33\%$ (variando entre 6,21% e 42,86%) dos linfócitos Ia⁺.

Os nossos resultados confirmam pois a descrição de outros autores (Albrechtsen, 1977; Fu e col., 1978; Yu e col., 1980; Schuurman e col., 1980) sobre a subpopulação de linfócitos T (4-10%) que expressa o antigênio Ia⁺.

Do Quadro V também se observa que dos linfócitos totais: $71,2 \pm 5,4$ (variando entre 62,0% e 81,0%) constituem a subpopulação T⁺Ia⁻; $15,4 \pm 8,9$ (variando entre 3,0% e 31,0%) formam a subpopulação T⁻Ia⁺; e $9,2 \pm 8,0$ (variando entre 1,0% e 27,0%) representam a subpopulação T⁻Ia⁻.

3.f. Correlação entre as populações B e RFc_γ⁺

Receptores de membrana para a porção Fc da IgG (RFc_γ) têm sido detectados em linfócitos B (Dickler e Kunkel, 1972), tendo alguns autores sugerido que os RFc_γ se restringiam à população B (Cline e col., 1972; Jondal, 1974).

Nesta secção apresentamos a correlação da população B (linfócitos que expressam Ig de superfície) com a população RFc_γ⁺. Para tal usamos a RRM com eritrócitos de Boi conjugados com Ig anti-Ig humana (marcador de células B) e eritrócitos de Boi revestidos de IgG (puri

QUADRO V

As quatro subpopulações obtidas por RRM entre o marcador de linfócitos T (AcMc YTH 12.5) e o de linfócitos Ia⁺ (AcMc YCL 6.8).

DADOR	Percentagem da suspensão linfocitária total				Percentagem das células	
	T ⁺ Ia ⁻	T ⁺ Ia ⁺	T ⁻ Ia ⁺	T ⁻ Ia ⁻	T também Ia ⁺	Ia ⁺ também T
					$\frac{T^+Ia^+}{T^+} \times 100$	$\frac{T^+Ia^+}{Ia^+} \times 100$
12	69,0	1,5	22,0	7,5	2,14	6,38
6	78,0	2,0	7,0	13,0	2,50	22,22
9	81,0	2,0	7,5	9,5	2,41	21,05
16	78,0	2,0	17,5	2,5	2,50	10,26
3	71,0	2,0	10,5	16,5	2,74	16,00
14	72,0	2,0	25,0	1,0	2,70	6,90
15	66,0	2,0	30,5	1,5	2,94	6,21
1	68,0	2,0	3,0	27,0	2,86	40,00
4	73,0	2,5	11,5	13,5	3,33	17,87
4	68,0	5,0	10,0	17,0	6,85	33,33
20	62,0	5,0	31,0	2,0	7,46	13,89
20	66,0	6,0	18,0	10,0	8,33	25,00
8	69,0	6,0	8,0	17,0	8,00	42,86
13	76,0	7,0	14,5	2,5	2,86	32,56
$\bar{X} \pm DPM$	71,2 \pm 5,4	3,4 \pm 2,0	15,4 \pm 8,9	9,2 \pm 8,0	4,12 \pm 2,36	21,03 \pm 12,30

ficada) específica para estes eritrócitos (marcador de células RFc_γ^+) (vêr alínea B.3.b. de "Material e Métodos").

O Quadro VI e a Fig. 3.6-A apresentam as subpopulações encontradas: $5,9 \pm 2,7\%$ dos linfócitos totais (variando entre 2,0% e 11,0%) expressam Ig de superfície mas não possuem RFc_γ^+ ; $18,1 \pm 4,6\%$ dos linfócitos (variando entre 11,0% e 22,5%) expressam ambos os marcadores de células B e de células RFc_γ^+ ; $4,4 \pm 2,8\%$ da população linfocitária (variando entre 1,5% e 8,5%) possui RFc_γ^+ mas não expressa Ig de su-

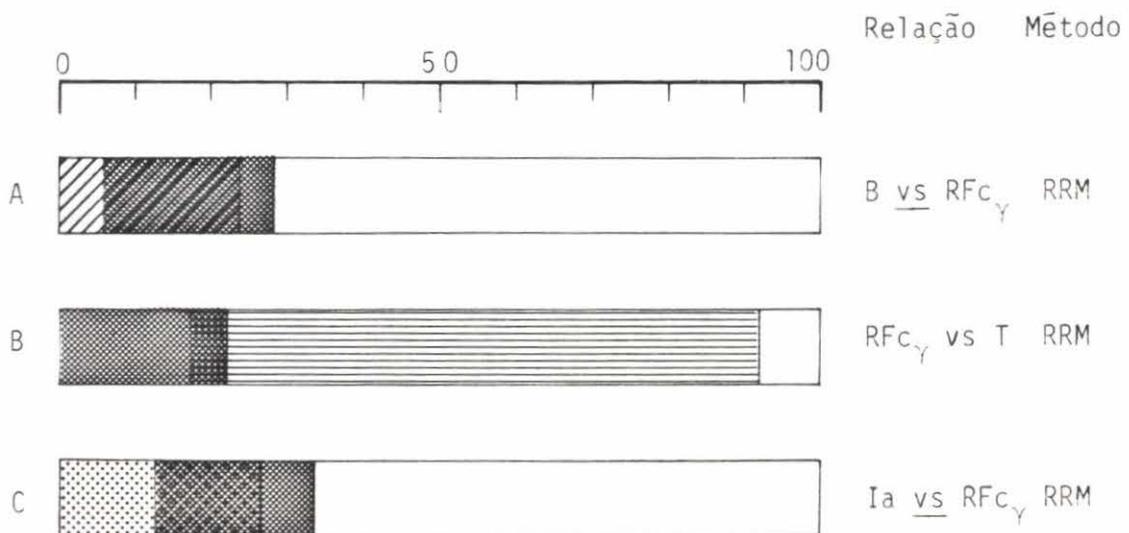


Fig. 3.6 - Diagrama mostrando a correlação das populações:

- (A) B e RFc_γ^+ : subpopulações B^+Fc^- (\diagdown), B^+Fc^+ (\diagup), B^-Fc^+ (\square) e B^-Fc^- (\square).
- (B) RFc_γ^+ e T : subpopulações Fc^+T^- (\square), Fc^+T^+ (\square), Fc^-T^+ (\equiv) e Fc^-T^- (\square).
- (C) Ia^+ e RFc_γ^+ : subpopulações Ia^+Fc^- (\square), Ia^+Fc^+ (\square), Ia^-Fc^+ (\square) e Fc^-T^- (\square).

QUADRO VI

As quatro subpopulações obtidas por RRM entre o marcador de linfócitos B (Ig anti-Ig humana) e o de linfócitos RFc_Y⁺ (IgG purificada, revestindo eritrócitos de Boi)

DADOR	Percentagem da suspensão linfocitária total				Percentagem das células	
					B também Fc ⁺	Fc ⁺ também B ⁺
	B ⁺ Fc ⁻	B ⁺ Fc ⁺	B ⁻ Fc ⁺	B ⁻ Fc ⁻	$\frac{B^+ Fc^+}{B^+} \times 100$	$\frac{B^+ Fc^+}{Fc^+} \times 100$
10	11,0	11,0	2,5	75,5	50,00	81,48
14	6,0	13,0	8,5	72,5	66,67	60,47
12	5,0	17,5	6,0	71,5	77,78	74,47
11	6,0	18,5	2,5	73,0	75,51	88,10
13	6,0	21,5	1,5	71,0	78,18	93,61
15	5,5	22,5	2,5	69,5	80,36	91,84
20	2,0	22,5	7,5	68,0	91,84	76,67
X ±DPM	5,9±2,7	18,1±4,6	4,4±2,8	71,6±2,4	74,33±13,00	80,95±11,62

perfície; e $71,6 \pm 2,4\%$ dos linfócitos não possuem Ig de superfície nem RFc_γ (variando entre 68,0% e 75,5%) (Quadro VI).

Embora sejam elevadas, tanto a proporção de linfócitos B que expressam receptores Fc_γ ($74,33 \pm 13,00\%$, variando entre 50,00% e 91,84%) como a proporção de linfócitos RFc_γ^+ que expressam Ig de superfície ($80,95 \pm 11,62\%$, variando entre 60,47% e 93,61%), estes resultados indicam que as populações B e RFc_γ^+ não são a mesma. Pelo contrário, há cerca de 25,67% ($100\% - 74,33\% = 25,67\%$) de células B que não possuem receptores Fc_γ e cerca de 19,05% ($100\% - 80,95\% = 19,05\%$) de linfócitos RFc_γ^+ que não pertencem à população B.

3.g. Correlação entre as populações T e RFc_γ^+

Foi em 1974 que pela primeira vez se observou que uma reduzida proporção de linfócitos T seriam portadores de RFc_γ (Brown e Greaves, 1974; Dickler e col., 1974), mas foram os trabalhos de Ferrarini e col. (1975), de Samarut e col. (1976) e de Moreta e col. (1976; 1978a; 1979 a,b; 1980) que tornaram clara a existência de tal subpopulação.

Neste nosso trabalho pretendemos calcular a proporção de linfócitos que são simultaneamente T e RFc_γ^+ .

O Quadro VII e a Fig. 3.6.B mostram as quatro subpopulações encontradas na correlação da população T com a RFc_γ^+ . Pode pois observar-se que os linfócitos T que não expressam receptores Fc_γ (subpopulação $\text{T}^+\text{Fc}_\gamma^-$) correspondem a $69,7 \pm 7,4\%$ (variando entre 60,0% e 82,0%) da suspensão linfocitária total. A subpopulação duplamente marcada ($\text{T}^+\text{Fc}_\gamma^+$) constitui $4,6 \pm 2,4\%$ (variando entre 2,0% e 8,0%) dos linfócitos totais. São $17,6 \pm 6,4\%$ (variando entre 10,5% e 29,0%) os linfócitos que possuem receptores de Fc_γ mas que não expressam o antigênio YTH 12.5 ($\text{T}^-\text{Fc}_\gamma^+$).

QUADRO VII

As quatro subpopulações obtidas por RRM entre o marcador de linfócitos T (AcMc YTH 12.5) e o de linfócitos RFc_{γ}^{+} (IgG purificada, revestindo eritrócitos de Boi).

DADOR	Percentagem da suspensão linfocitária total				Percentagem das células	
	$\text{T}^{+}\text{Fc}^{-}$	$\text{T}^{+}\text{Fc}^{+}$	$\text{T}^{-}\text{Fc}^{+}$	$\text{T}^{-}\text{Fc}^{-}$	T também Fc^{+}	Fc^{+} também T ⁺
					$\frac{\text{T}^{+}\text{Fc}^{+}}{\text{T}^{+}} \times 100$	$\frac{\text{T}^{+}\text{Fc}^{+}}{\text{Fc}^{+}} \times 100$
12	62,0	2,0	29,0	7,0	3,13	6,45
11	70,0	2,0	15,0	13,0	2,78	11,76
10	82,0	3,0	10,5	4,5	3,53	22,22
15	68,0	4,0	20,0	8,0	5,56	16,67
13	60,0	6,0	21,0	13,0	9,09	22,22
20	74,0	7,0	16,5	2,5	8,64	29,79
14	72,0	8,0	11,0	9,0	10,00	42,10
$\bar{X}^{\pm}\text{DPM}$	$69,7^{\pm}7,4$	$4,6^{\pm}2,4$	$17,6^{\pm}6,4$	$8,1^{\pm}4,0$	$6,10^{\pm}3,09$	$21,60^{\pm}11,80$

As células que não expressam qualquer daqueles marcadores (T^-Fc^-) representam $8,1 \pm 4,0\%$ (variando entre 2,5% e 13,0%) dos linfócitos totais.

Do mesmo Quadro VII, verifica-se que apenas $6,10 \pm 3,09\%$ (variando entre 2,78% e 10,00%) dos linfócitos T possuem receptores para a porção Fc da Ig. Por outro lado, observa-se também que $21,60 \pm 11,80\%$ (variando entre 6,45% e 42,10%) dos linfócitos RFc_γ^+ expressam o antígeno YTH 12.5 (marcador de células T).

Deste estudo pode pois concluir-se que a subpopulação de linfócitos T possuidora de receptores Fc_γ corresponde a $4,6 \pm 2,4\%$ da população linfocitária total ou a $6,10 \pm 3,09\%$ dos linfócitos T.

3.h. Correlação entre as populações Ia e RFc_γ^+

Nesta última alínea de correlação de populações linfocitárias foi nossa intenção determinar a intercepção da população de linfócitos que expressam o antígeno Ia e a que possui receptores para a porção Fc da Ig.

Realizámos pois a RRM entre os marcadores de populações Ia^+ e RFc_γ^+ , cujas subpopulações se encontram no Quadro VIII e na Fig. 3.6-C. A subpopulação Ia^+Fc^- representa $12,7 \pm 4,3\%$ (variando entre 5,0% e 18,5%) dos linfócitos totais. Os linfócitos duplamente marcados (Ia^+Fc^+) correspondem a $14,1 \pm 4,4\%$ (variando entre 8,0% e 20,0%) da população linfocitária total. São $6,9 \pm 4,1\%$ (variando entre 2,5% e 15,0%) os linfócitos que expressam Rfc_γ^+ mas que não possuem o antígeno Ia (Ia^-Fc^+). Finalmente os linfócitos desprovidos de Ia e de RFc_γ (Ia^-Fc^-) representam $66,4 \pm 5,4\%$ (variando entre 62,5% e 74,5%) da suspensão linfocitária total.

QUADRO VIII

As quatro subpopulações obtidas por RRM entre o marcador de linfócitos Ia^+ (AcMc YCL 6.8) o de linfócitos RFc_{γ}^+ (IgG purificada, revestindo eritrócitos de Boi).

DADOR	Percentagem da suspensão linfocitária total				Percentagem das células	
					Ia^+ também Fc^+	Fc^+ também Ia^+
	Ia^+Fc^-	Ia^+Fc^+	Ia^-Fc^+	Ia^-Fc^-	$\frac{Ia^+Fc^+}{Ia^+} \times 100$	$\frac{Ia^+Fc^+}{Fc^+} \times 100$
14	12,5	8,0	15,0	64,5	39,02	34,78
10	10,0	10,0	5,5	74,5	50,00	64,52
11	15,5	12,0	5,5	67,0	43,64	68,57
20	18,5	13,5	9,0	59,0	42,19	60,00
12	5,0	17,0	6,0	72,0	77,27	73,91
13	15,0	18,0	4,5	62,5	54,55	80,00
15	12,5	20,0	2,5	65,0	61,54	88,89
$\bar{X} \pm DPM$	$12,7 \pm 4,3$	$14,1 \pm 4,4$	$6,9 \pm 4,1$	$66,4 \pm 5,4$	$52,60 \pm 7,25$	$67,24 \pm 17,28$

De toda a população Ia^+ , apenas $52,60 \pm 7,25\%$ (variando entre 39,02% e 77,27%) possuem receptores Fc_{γ} . Do mesmo modo, a subpopulação Ia^+Fc^+ constitui $67,24 \pm 17,28\%$ (variando entre 34,78% e 88,89%) dos linfócitos RFc_{γ}^+ .

4. Heterogeneidade das populações linfocitárias

Na secção 2 deste capítulo, apresentámos as proporções que cada população (T, B, C_k^+ , Ia^+ e RFc_{γ}^+) ocupa na suspensão linfocitária obtida do sangue periférico humano (Fig. 3.2.). Na secção seguinte de terminámos a intercepção de cada par de populações, utilizando técnicas de marcação dupla. Tal intercepção representa pois os linfócitos duplamente marcados.

Nesta secção, apresentamos a heterogeneidade de cada população linfocitária que nos é dada pela intercepção de uma população com cada uma das outras.

4.a. População B

Consideremos nesta alínea a população de linfócitos B, isto é, o conjunto de células linfóides que expressam Ig na superfície externa da sua membrana. Estas células B representam $19,4 \pm 6,4\%$ dos linfócitos sanguíneos totais (ver Fig. 3.2).

Como se observa na Fig. 3.7 os linfócitos B não constituem uma população homogênea pois que são diversas as proporções de células B que expressam os vários marcadores das restantes populações linfocitárias: C_k^+ , T, Ia^+ e RFc_{γ}^+ . De facto, verificámos que da totalidade de linfócitos B: (i) $65,96 \pm 6,40\%$ expressavam a cadeia K da Ig (ver Quadro

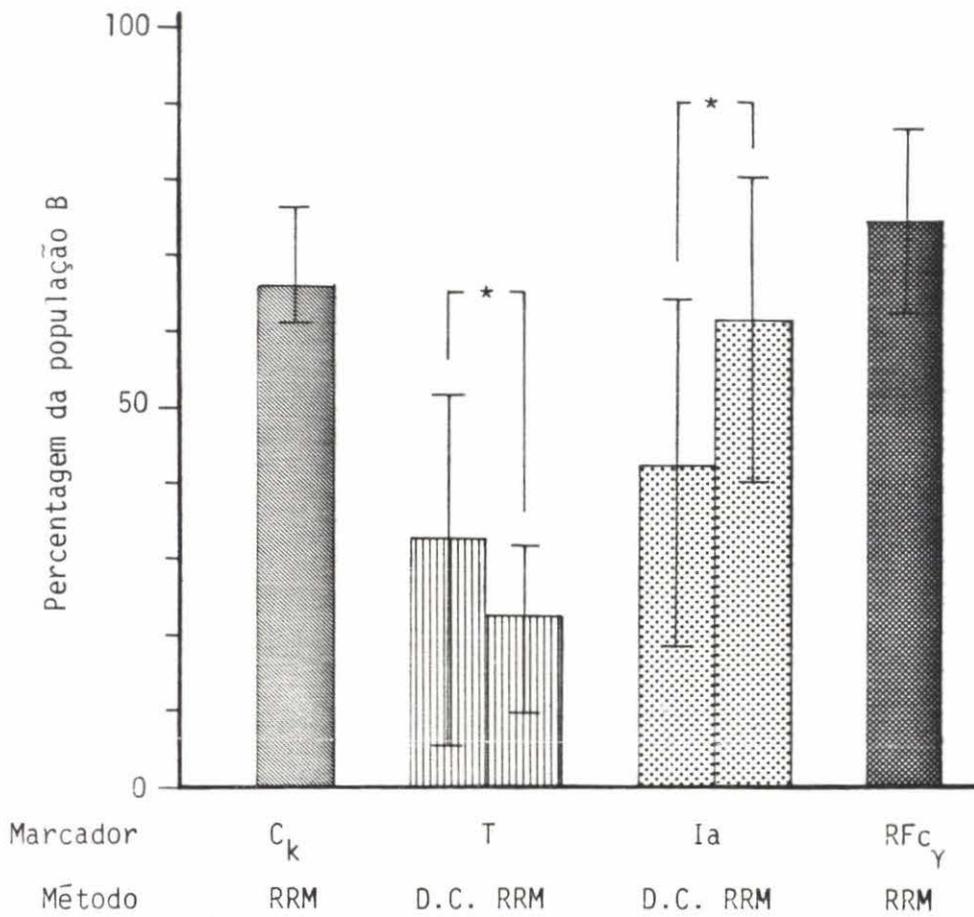


Fig. 3.7. - Heterogeneidade da população de linfócitos B. As médias das proporções dos linfócitos B que também expressam os marcadores de células C_k^+ , T, Ia^+ e RFc_Y^+ foram obtidas dos Quadros I, II, IV e VI respectivamente.

Os intervalos de confiança das médias foram calculados ao nível de 95%.

*As médias obtidas por destituição celular (DC) e por RRM não são significativamente diferentes: $P > 0,05$.

I, coluna 6); (ii) $32,76 \pm 22,99\%$ ou $22,58 \pm 18,26\%$ dos linfócitos B expressavam o antigênio YTH 12,5 (marcador de células T), determinados respectivamente pela técnica de destituição celular ou por RRM (vêr Quadro II, coluna 7); (iii) $42,27 \pm 27,11\%$ ou $61,30 \pm 24,30\%$ das células B eram também Ia^+ , respectivamente por destituição celular ou por RRM (vêr Quadro IV, coluna 7); (iv) $74,33 \pm 13,00\%$ dos linfócitos B possuíam receptores para a porção Fc da IgG (RFc_{γ}) (vêr Quadro VI, coluna 6).

Note-se que na Fig. 3.7 não representamos o desvio padrão para cada média de dados (como o fizemos nos Quadros anteriormente apresentados) mas sim o intervalo de confiança das mesmas médias, cujos limites superior e inferior foram determinados ao nível de 95%. As médias por vezes não coincidem com o ponto médio do intervalo de confiança porque este teve de ser calculado nos dados normalizados pela transformação angular (ver "Material e Métodos" alínea B.8). Estas considerações aplicam-se também aos estudos subsequentes (alíneas 4.b., 4.c. e 4.d.).

4.b. População T

Definimos a população T como o conjunto de células que expressam o antigênio YTH 12.5. Este antigênio que é detectado pelo AcMc YTH 12.5, encontra-se nas mesmas células que formam rosetas E com eritrócitos de Carneiro (vêr alínea 1 do presente Capítulo), células estas que têm sido reconhecidas como linfócitos T (Jondal e col., 1972; Fröland, 1972; Papamichael e col., 1972). A população de linfócitos T constitui $75,1 \pm 5,3\%$ da totalidade dos linfócitos sanguíneos (vêr Fig. 3.2).

A população T não é todavia homogênea pois que contém pequenas proporções (<6,5%) de células que possuem também marcadores das outras populações estudadas neste trabalho (Fig. 3.8): B, C_k⁺, Ia⁺ e RFc_γ⁺. Na verdade observamos que: (i) 6,26[±]4,42% (por destituição celular) ou 5,28[±]3,58% (por RRM) dos linfócitos T possuíam Ig de superfície (marcador de células B) (ver Quadro II, coluna 8); (ii) 2,73[±]2,08% dos linfócitos T expressam a cadeia K da Ig (ver Quadro III, coluna 6); (iii) 4,12[±]2,36% das células T eram também Ia⁺ (ver Quadro V, coluna 6); e (iv) 6,10[±]3,09 da população T possuía também receptores para a porção Fc da IgG (ver Quadro VII, coluna 6) (Fig. 3.8).

4.c. População Ia⁺

A população linfocitária que expressa o antígeno Ia (definida pelo AcMc YCL 6.8) constitui 15,6[±]7,6% dos linfócitos sanguíneos totais (ver Fig. 3.2).

Esta população Ia⁺ apresenta contudo alto grau de heterogeneidade pois que são elevadas as proporções de células Ia⁺ que possuem também marcadores das restantes populações linfocitárias (Fig. 3.9): B, T e RFc_γ⁺. De facto, verificamos que: (i) 66,76[±]16,30% (por destituição celular) ou 70,80[±]18,40% (por RRM) das células Ia⁺ possuíam Ig de superfície (marcador de células B) (ver Quadro IV, coluna 8); (ii) 21,03[±]12,30% dos linfócitos Ia⁺ expressavam o antígeno YTH 12.5 (marcador de células T) (ver Quadro V, coluna 7); e (iii) 52,60[±]7,25% das células Ia⁺ possuíam receptores para a porção Fc da IgG (ver Quadro VIII, coluna 6) (Fig. 3.9).

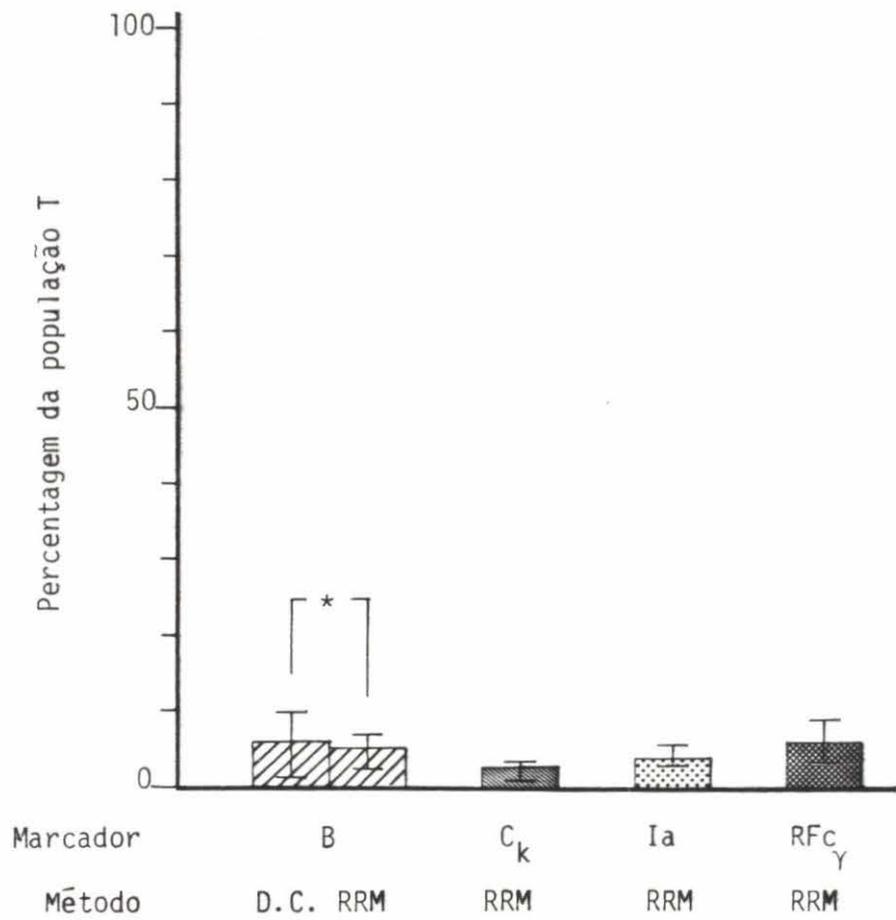


Fig. 3.8 - Heterogeneidade da população de linfócitos T. As médias das proporções dos linfócitos T que também expressam os marcadores de células B, C_k^+ , Ia^+ e RFc_Y^+ foram obtidas respectivamente dos Quadros II, III, V e VII.

Os intervalos de confiança das médias foram calculados ao nível de 95%.

*As médias obtidas por destituição celular (DC) e por RRM não são significativamente diferentes: $P > 0,05$.

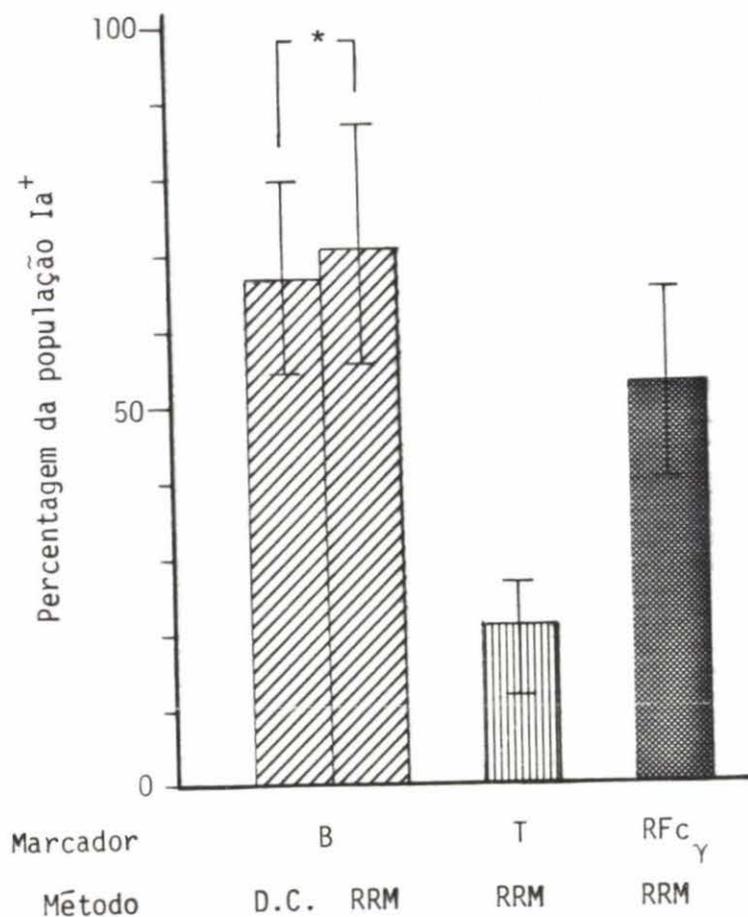


Fig. 3.9. - Heterogeneidade da população de linfócitos Ia⁺. As médias das proporções dos linfócitos Ia⁺ que também expressam os marcadores de células B, T e RFc_γ⁺ foram obtidas respectivamente dos Quadros IV, V e VIII. Os intervalos de confiança das médias foram calculados ao nível de 95%.

*As médias obtidas por destituição celular (DC) e por RRM não são significativamente diferentes: $P > 0,05$.

4.d. População RFc_γ^+

Os linfócitos providos de receptores para a porção Fc da IgG representam $22,6 \pm 3,3\%$ de toda a população de linfócitos sanguíneos (Fig. 3.2).

Os linfócitos RFc_γ^+ distribuem-se pelas diversas populações linfocitárias (Fig. 3.10), pois observamos que: (i) $80,95 \pm 11,62\%$ das células RFc_γ^+ eram linfócitos B (Quadro VI, coluna 7); (ii) $21,60 \pm 11,80\%$ das células RFc_γ^+ eram linfócitos T (Quadro VII, coluna 7); e (iii) $67,24 \pm 17,28\%$ dos linfócitos possuidores de RFc_γ eram células Ia^+ (Quadro VIII, coluna 7).

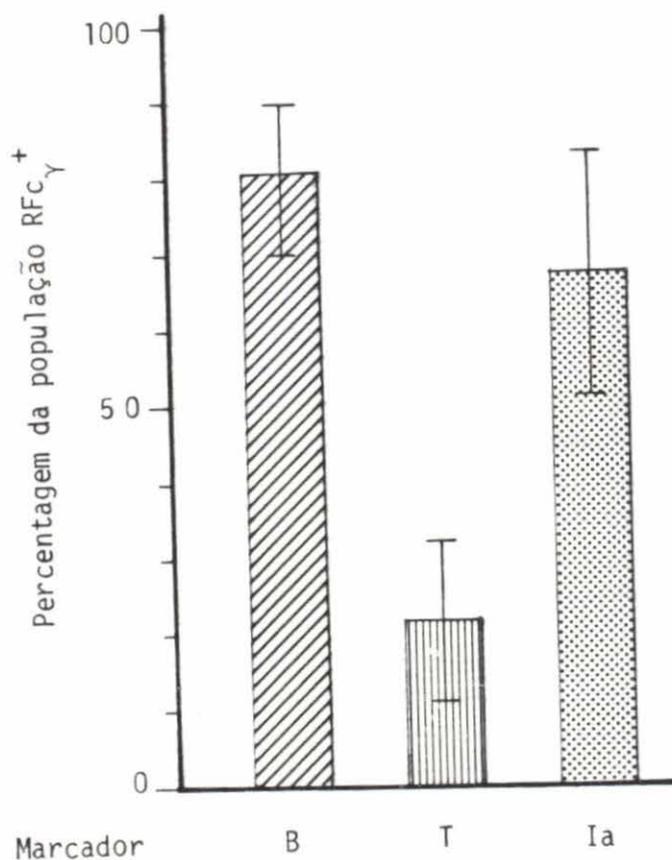


Fig. 3.10 - Heterogeneidade da população de linfócitos possuidores de receptores Fc_Y . As médias das proporções dos linfócitos RFc_Y^+ que também expressam os marcadores de células B, T e Ia^+ foram obtidas dos Quadros VI, VII e VIII.

Os intervalos de confiança das médias foram calculados ao nível de 95%.

B. ESTUDO DAS POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS DE DOENTES IMUNODEPRIMIDOS APÓS TRANSPLANTAÇÃO CARDÍACA

Nesta secção apresentamos um estudo pormenorizado das populações linfocitárias de doentes receptores de enxerto cardíaco e mantidos sob acção de drogas imunodepressoras.

Realizando-se cerca de 12 operações de transplantação cardíaca por ano no Papworth Hospital*, foi-nos possível proceder à análise de amostras sanguíneas de 30 sobreviventes dos 44 doentes até então submetidos à operação de transplantação.

Por uma questão de metodologia, dividimos os doentes que estudamos em três grupos: (i) 13 doentes de sobrevida longa (havam sido operados há mais de 365 dias) que estavam sob tratamento de prednisolona e azatioprina; (ii) 11 pacientes imunodeprimidos durante os primeiros 10 dias pós-operatórios com globulina anti-timócito e ciclosporina A (Cs-A) e subsequentemente apenas com Cs-A; as amostras sanguíneas foram analisadas desde o dia da operação, durante um mês e com a frequência de 2-3 colheitas por semana; (iii) 6 doentes imunodeprimidos com Cs-A desde o dia da operação e durante cerca de oito meses.

As populações B, T e Ia^+ foram determinadas pela reacção de rose ta dos linfócitos com eritrócitos de Boi conjugados, respectivamente, com Ig anti-Ig humana (teste de RRAD), com o AcMc YTH 12.5 e com o AcMc YCL 6.8 (testes de RRAdD) cuja metodologia se descreve nas alíneas B.3.c. e

* Hospital localizado a cerca de 60 Km de Cambridge.

B.4.b de "Material e Métodos". Os linfócitos possuidores de receptores para a porção Fc da IgG ($RFc\gamma^+$) foram enumerados na reacção de roseta com eritrócitos de Boi sensibilizados com a fracção de IgG purificada a partir do anti-soro contra eritrócitos de Boi (teste de roseta EA), tal como descrevemos nas alíneas B.3.b. e B.4.d. de "Material e Métodos".

A detecção de linfócitos T possuidores do antigénio Ia (células TIa^+) ou de receptores $Fc\gamma$ (células TFc^+) foi realizada por meio da reacção de roseta mista (RRM) de acordo com a metodologia descrita nas alíneas B.3.b., B.3.c., B.3.d. e B.4.c. de "Material e Métodos".

1. Estudo das populações linfocitárias de doentes de
sobrevida longa, imunodeprimidos por prednisolona e azatioprina

O regime imunodepressor destes doentes, desde o dia da operação de transplantação, encontra-se descrito na alínea A.2.a. de "Material e Métodos". À data da colheita do sangue estes doentes encontravam-se já desde alguns meses sob administração de prednisolona (0,5 mg/Kg/dia) e azatioprina (0,3 mg/Kg/dia).

1.a. Alteração das proporções das populações linfocitárias

O estudo estatístico permitiu-nos observar que as variâncias das amostras em todas as populações linfocitárias dos doentes eram superiores às variâncias dos respectivos controlos normais (a) (vêr desvios-padrão (b) representados na Fig. 3.11). Esta elevada variân

(a) Dados obtidos nas secções A.2, A.3.e e A.3.g deste capítulo.

(b) Nota: o desvio-padrão é a raiz quadrada da variância.

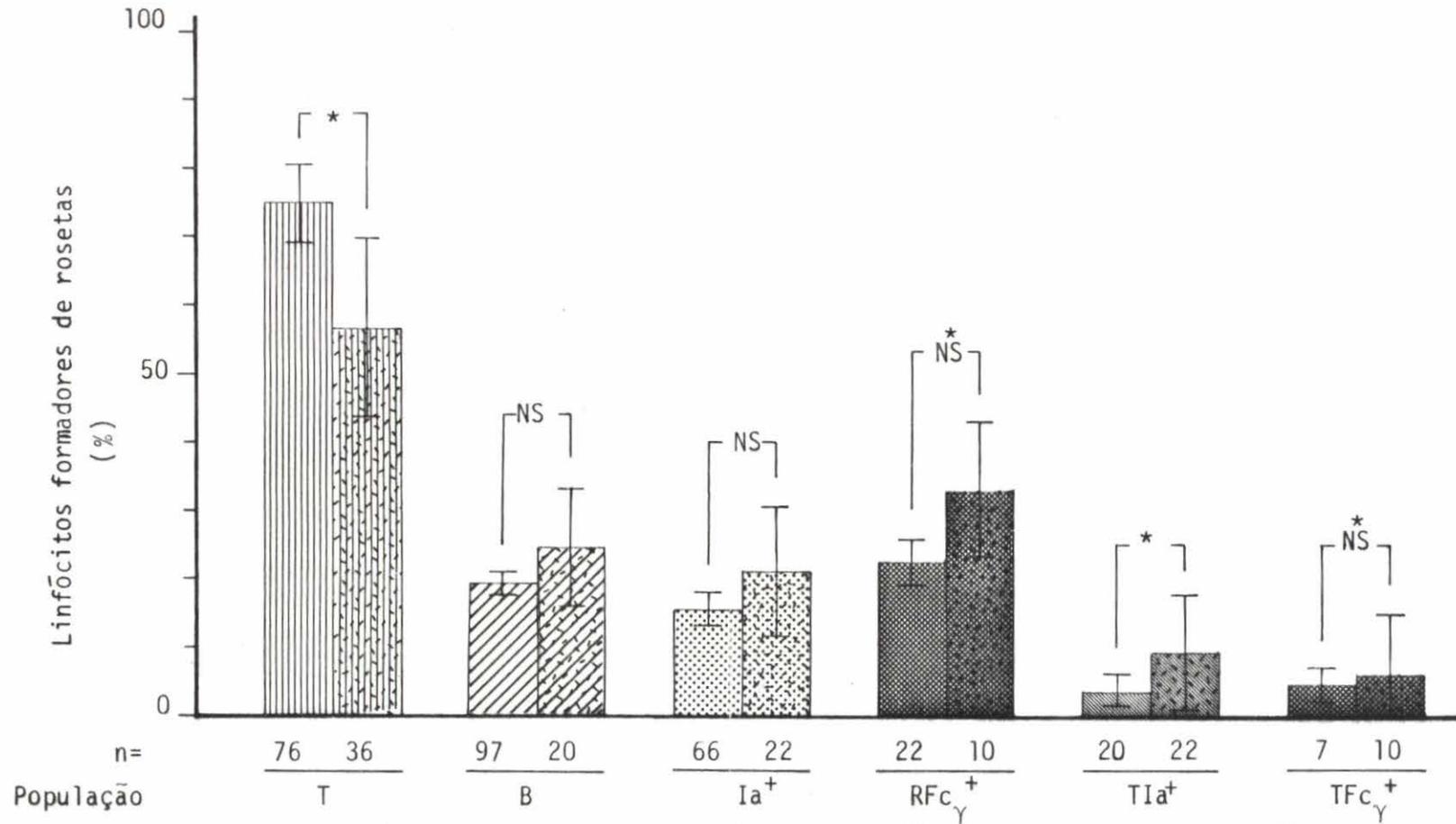


Fig. 3.11. Comparação entre as proporções das diversas populações linfocitárias encontradas em indivíduos normais e em indivíduos imunodeprimidos (•••) com prednisona (0,5 mg/Kg/dia) e azatioprina (0,3 mg/Kg/dia). Representam-se os desvios-padrão das médias; n = tamanho das amostras.

N.S. As variâncias e as médias não são significativamente diferentes ($P > 0,05$).

* As variâncias e as médias são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

NS* As variâncias são significativamente diferentes ($P < 0,05$) mas as médias não o são ($P > 0,05$).

NOTA: No caso de as variâncias das amostras serem significativamente diferentes ($P < 0,05$), utilizou-se o adequado teste t de Student para comparação de duas médias, em que o valor das variâncias foram ponderados na determinação do número de graus de liberdade.

cia reflecte uma maior dispersão dos dados obtidos, nos doentes em relação à observada nas amostragens controlo.

Verificamos que apenas as variâncias das populações T, RFc_Y^+ , TIa^+ e TFc_Y^+ (assinalado com * e NS na Fig. 3.11) eram significativamente mais elevadas ($P < 0,05$) do que os respectivos controlos, pois que as variâncias das restantes populações (B e Ia^+) não diferiam significativamente dos seus controlos normais (assinalado com NS na Fig. 3.11).

É importante salientar que o tamanho das amostras (n) das populações T, B, Ia^+ e RFc_Y^+ dos doentes é consideravelmente menor que o dos respectivos controlos normais (Fig. 3.11). Assim, o aumento do n nas amostragens dos doentes poderia reduzir a variância das mesmas pois que

$$s^2 = \frac{\sum (x-x)^2}{n}$$

onde s^2 é a variância da amostra, $\sum (x-x)^2$ a soma dos quadrados dos desvios da média e n o tamanho da amostra.

De particular interesse é o caso das populações TIa^+ e TFc_Y^+ em que o n das amostras dos doentes é superior ao n dos respectivos controlos e que mesmo assim aquelas apresentam uma variância significativamente maior ($P < 0,05$) que as amostras dos seus controlos normais (Fig. 3.11).

Por outro lado, a comparação estatística das médias (a) mostrou que apenas a média da população T dos doentes ($56,66 \pm 13,02$ com $n=36$)

(a) No caso de as variâncias das amostras serem significativamente diferentes ($P < 0,05$), utilizou-se o adequado teste t de Student para comparação de duas médias, em que os valores das variâncias foram ponderados na determinação do número de graus de liberdade.

se apresenta significativamente menor que a média da população T nos doadores de controlo normal ($75,11 \pm 5,29\%$ com $n=76$) (1º par de colunas da Fig. 3.11).

Pelo contrário, a média da subpopulação TIa^+ encontrada nos doentes ($9,16 \pm 8,62\%$ com $n=22$) apresenta-se significativamente superior à média da respectiva população TIa^+ normal ($3,4 \pm 2,2\%$ com $n=20$) (5º par de colunas da Fig. 3.11).

As médias de todas as outras populações (B , Ia^+ , RFc_{γ}^+ e TFc_{γ}^+) dos doentes não diferiam significativamente das médias dos respectivos controlos normais (Fig. 3.11).

Estes resultados sugerem que as drogas imunodepressoras (prednisona e azatioprina) afectam primordialmente a proporção de células T circulantes no sangue dos doentes. Aquelas substâncias imunodepressoras actuam de forma heterogênea, pois encontramos elevadas variâncias em todas as populações linfocitárias dos doentes, apesar de a sua administração ter sido em função do peso do doente.

1.b. Alterações da quantidade de linfócitos que constituem as diversas populações linfocitárias

Após isolamento dos linfócitos (a) do sangue de doadores normais obtínhamos uma média de $110 \pm 30 \times 10^4$ células por ml de sangue colhido. A recolha linfocitária dos doentes imunodeprimidos era, contudo, consideravelmente menor: $13,5 \pm 7,8 \times 10^4$ por ml de sangue.

(a) Linfócitos separados de eritrócitos e leucócitos polimorfonucleares em gradiente de densidade, e de monócitos por fagocitose (ver alínea B.1. de "Material e Métodos").

Entendemos pois ser importante determinar a quantidade de linfócitos existente, em cada população linfocitária, por ml de sangue, quer nos doentes imunodeprimidos quer nos indivíduos normais. O Quadro IX apresenta as proporções de cada população linfocitária determinada nos doentes imunodeprimidos e o respectivo número de linfócitos (por ml de sangue) que as constituem. Este valor foi calculado a partir (i) da proporção que cada população representava na totalidade de linfócitos e (ii) da recolha linfocitária obtida na mesma amostra de sangue.

As médias da quantidade de linfócitos existentes em cada população linfocitária dos doentes (obtidas do Quadro IX) foram representadas na Fig. 3.12, para comparação com os valores normais. Torna-se claramente evidente o reduzido número de linfócitos que constituem cada população linfocitária dos doentes imunodeprimidos. Assim, encontramos por cada ml de sangue, respectivamente nos indivíduos normais e nos doentes: (i) linfócitos totais: $110,0 \pm 10,0$ (n=96) e $13,5 \pm 7,8$ (n=13); (ii) linfócitos T: $82,61 \pm 5,83$ (n=76) e $7,67 \pm 5,49$ (n=11); (iii) linfócitos B: $21,34 \pm 7,04$ (n=97) e $3,62 \pm 2,62$ (n=11); (iv) linfócitos Ia^+ : $17,16 \pm 8,36$ (n=66) e $2,29 \pm 1,93$ (n=11); (v) linfócitos RFc_{γ}^+ : $24,86 \pm 3,63$ (n=21) e $5,34 \pm 2,58$ (n=7); (vi) linfócitos TIa^+ : $3,74 \pm 2,20$ (n=20) e $1,46 \pm 1,02$ (n=10); e finalmente (vii) linfócitos TFc_{γ}^+ : $5,06 \pm 2,64$ (n=8) e $1,01 \pm 0,88$ (n=8) (Fig. 3.12).

Estes resultados mostram ainda que foi a população T a mais afectada pela acção das drogas imunodepressoras, correspondendo a um decréscimo de 90,72% relativamente ao controlo normal (Fig. 3.12).

QUADRO IX

Quantidade de linfócitos constituintes de cada população linfocitária de doentes de sobrevida longa.

L I N F Ó C I T O S														
DADOR	TOTAIS		T		B		Ia ⁺		RFc ⁺		TIIa ⁺		TFc ⁺	
	p/15 ml (x10 ⁶)	p/ml (x10 ⁴)	%	p/ml (x10 ⁴)	%	p/ml (x10 ⁴)								
3	3,60	24,0	53,0	12,72	26,0	6,24	24,0	5,76	---	----	11,7	2,81	---	---
3	3,75	25,0	60,5	15,12	25,0	6,25	8,5	2,12	33,5	8,38	6,9	1,73	3,5	0,88
3	3,90	26,0	64,0	16,64	29,0	7,54	20,0	5,20	30,0	7,80	4,8	1,25	6,0	1,56
29	1,30	8,7	34,5	3,00	60,0	5,22	22,0	1,91	58,0	5,05	28,6	2,49	30,5	2,65
27	1,30	8,7	50,0	4,35	13,0	1,13	0,0	0,00	13,0	1,57	3,1	0,27	0,0	0,00
19	1,90	12,7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
19	3,00	20,0	38,5	7,70	27,0	5,40	20,0	4,0	33,0	6,60	2,1	0,42	4,9	0,98
17	1,80	12,0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
17	0,85	5,7	66,0	3,76	28,0	1,60	23,0	1,31	42,0	2,39	35,8	2,04	3,4	0,19
18	2,00	13,3	89,0	11,84	13,0	1,73	6,0	0,80	---	---	6,1	0,81	2,4	0,32
20	1,00	6,7	36,0	5,76	13,0	0,87	14,0	0,94	---	---	---	---	---	---
16	1,60	10,6	21,0	2,23	35,5	3,76	25,0	2,65	53,0	5,62	25,0	2,65	14,3	1,52
4	0,35	2,3	54,0	1,24	38,0	0,87	23,0	0,53	---	---	6,6	0,15	---	---
$\bar{x} \pm DPM$	13,50 \pm 7,80		7,67 \pm 5,49		3,62 \pm 2,62		2,29 \pm 1,93		5,34 \pm 2,58		1,46 \pm 1,02		1,01 \pm 0,88	
NORMAIS ($\bar{x} \pm DPM$)	110,0 \pm 10,0		82,61 \pm 5,83		21,34 \pm 7,04		17,16 \pm 8,36		24,86 \pm 3,63		3,74 \pm 2,20		5,06 \pm 2,64	

NOTA: O número de linfócitos existentes em cada população foi determinado a partir da proporção de cada população e da recolha linfocitária da mesma amostra de sangue: $\frac{\text{população (\%)} \times \text{recolha (p/ml)}}{100} = \text{nº de linfócitos } \frac{\text{p/ml}}{\text{de sangue colhido}}$.

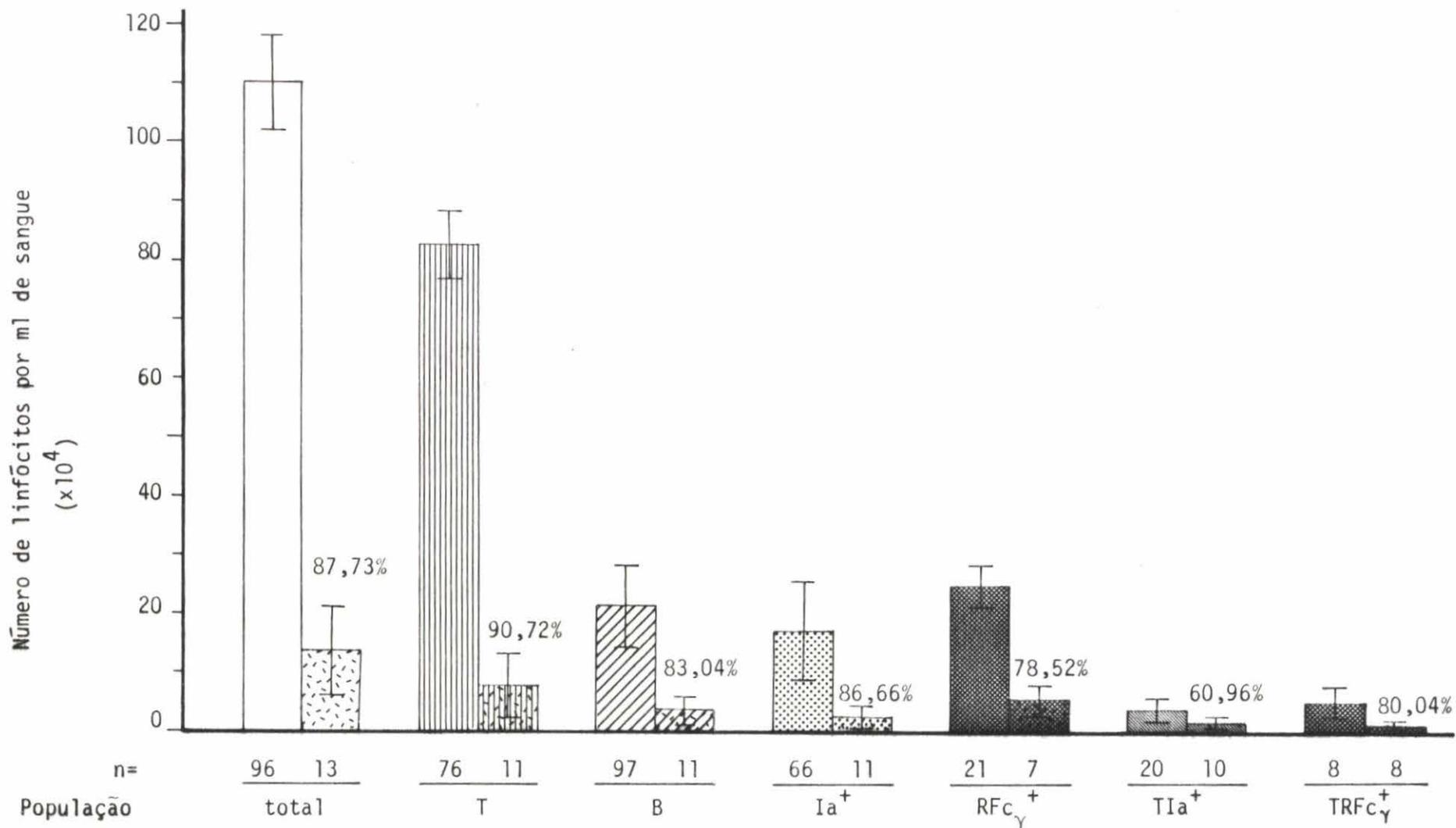


Fig. 3.12. Comparação entre as quantidades de linfócitos constituintes das diversas populações linfocitárias encontradas em indivíduos normais e em indivíduos imunodeprimidos (com prednisona (0,5 mg/Kg/dia) e azatioprina (0,3 mg/Kg/dia)).

Representam-se os desvios-padrão das médias; n = tamanho da amostra.

Em todos os casos as variâncias não são significativamente diferentes (P 0,05) mas são-no as médias (P 0,05). As percentagens indicam o decréscimo, em cada população, da quantidade de linfócitos dos doentes.

2. Estudo das alterações das populações linfocitárias ao longo dos primeiros 30 dias pós-operatórios

O grupo de 11 doentes estudados nesta secção receberam globulin anti-timócito (GAT) e ciclosporina A (Cs-A) desde o dia da operação e durante os 10 dias subsequentes. A partir do 11º dia pós-operatório o tratamento imunodepressivo prosseguiu apenas com Cs-A (para detalhes ver alínea A.2.c. de "Material e Métodos").

De quatro doentes (D-36, D-37, D-38 e D-39) as amostras sanguíneas foram colhidas com intervalo de tempo relativamente longo (1 amostra por semana) o que nos impediu de obter suficiente informação sobre a variação das populações linfocitárias (resultados não apresentados).

Dos restantes sete pacientes conseguimos obter amostras sanguíneas com uma frequência mais elevada: 2-3 colheitas por semana. Tendo dois doentes (D-42 e D-43) falecido logo após o acto operatório, apresentaremos neste trabalho apenas o estudo longitudinal de 5 doentes: D-40, D-41, D-44, D-45 e D-46.

2.a. Alteração da concentração de linfócitos sanguíneos

A Fig. 3.13 mostra claramente a drástica redução da concentração de linfócitos observada nas amostras de sangue obtidas nos 2 primeiros dias pós-operatórios.

Assim, o doente D-40 que antes da operação possuía $120,0 \times 10^4$ linfócitos por ml de sangue (dia 0), passou a ter apenas $13,3 \times 10^4$ após um dia de tratamento imunodepressor (dia 1). Do mesmo modo o

Fig. 3.13. Concentração de linfócitos no sangue de doentes submetidos aos tratamentos de GAT + Cs-A, seguido de Cs-A, desde o dia da operação de transplantação cardíaca.

- (●—●) Doente D-40
- (■—■) Doente D-41
- (▲—▲) Doente D-44
- (⊙—⊙) Doente D-45
- (□—□) Doente D-46
- (□) Concentração de linfócitos no sangue de indivíduos normais (dados obtidos do Quadro IX).
- (⋈) Concentração de linfócitos no sangue de doentes de sobrevida longa (dados obtidos do Quadro IX).

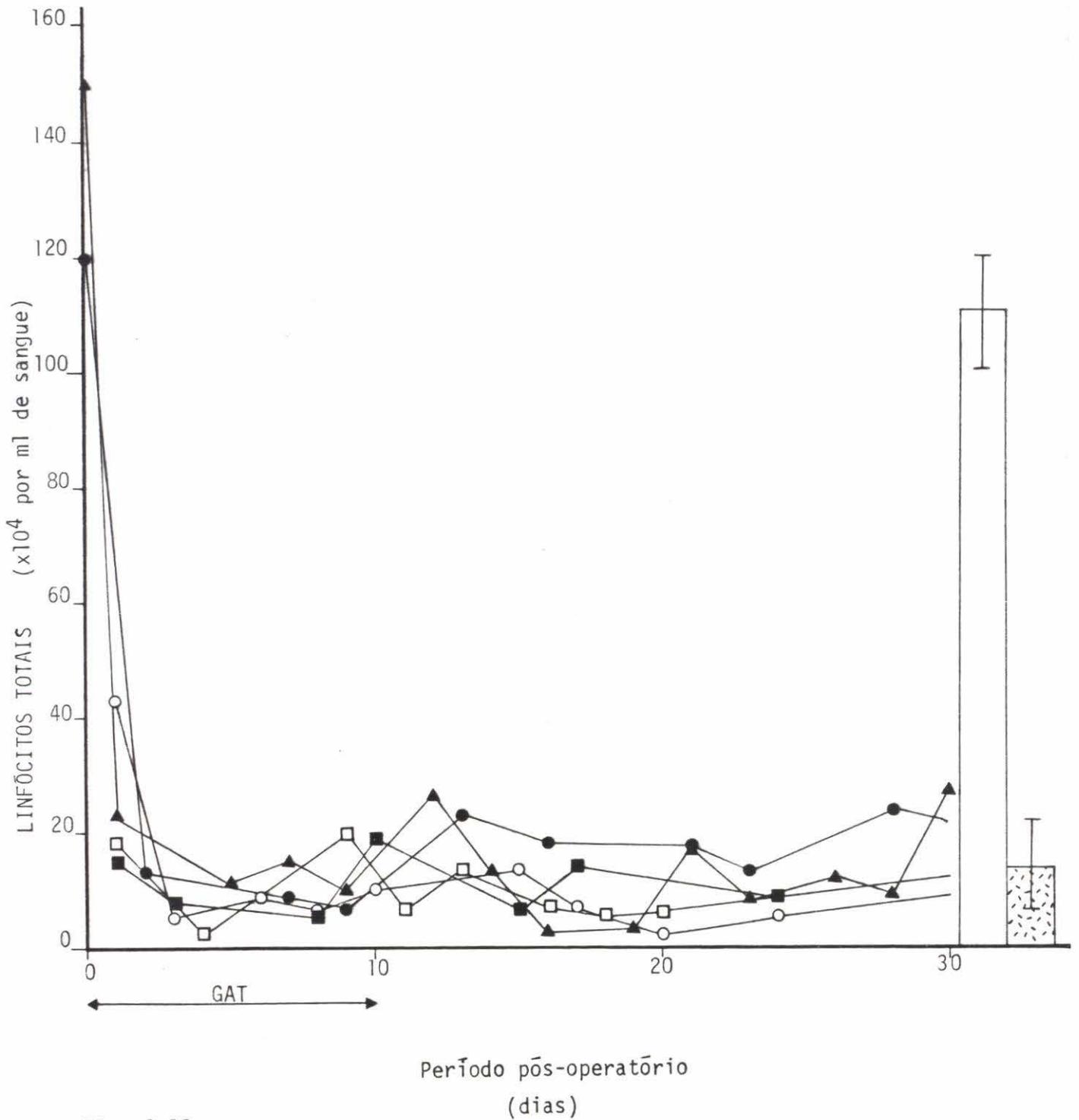


Fig. 3.13

doente D-44 reduziu a sua concentração de linfócitos de $150,0 \times 10^4$ /ml de sangue (dia 0) para $23,3 \times 10^4$ (dia 1) e $11,0 \times 10^4$ (dia 5).

A mesma Fig. 3.13 mostra que não há diferença significativa entre as concentrações de linfócitos detectadas durante a administração de GAT ou após interrupção do mesmo tratamento.

Da mesma Fig. 3.13 também se pode concluir que tanto a dosagem combinada de GAT e Cs-A (10 dias iniciais) como a Cs-A por si só provocam uma redução da concentração de linfócitos idêntica à observada nos doentes de sobrevida longa: $13,50 \pm 7,80 \times 10^4$ linfócitos por ml de sangue (Quadro IX).

2.b. Alteração das populações linfocitárias

2.b.1. População T

Nos primeiros dias pós-operatórios observou-se uma redução significativa da proporção de linfócitos T (Fig. 3.14-a). Assim, e tomando como exemplo o doente D-44 verifica-se que antes da operação (Dia 0) os linfócitos T representavam 78,0% da totalidade de linfócitos, proporção esta incluída nos valores normais ($75,1 \pm 5,3\%$). Nos dias subsequentes, os linfócitos T baixaram para 43,0% (dia 1), 38,0% (dia 2) e 32,5% (dia 5).

Durante os 10 dias de administração de GAT as proporções de linfócitos T de todos os doentes estudados encontravam-se abaixo dos valores observados nos indivíduos normais ($75,1 \pm 5,3\%$) e nos doentes de sobrevida longa ($56,1 \pm 13,0\%$) (Fig. 3.14-a).

Após interrupção do tratamento com GAT observou-se um ligeiro

Fig. 3.14. Alteração da população T (células YTH 12.5⁺) ao longo dos primeiros 30 dias pós-operatórios: (a) proporção da população T; (b) concentração de linfócitos T.

(●—●) Doente D-40

(■—■) Doente D-41

(▲—▲) Doente D-44

(○—○) Doente D-45

(□—□) Doente D-46

a - Proporção de linfócitos T em:

(|||||) Indivíduos normais (vêr alínea A.2)

(|||||) Doentes de sobrevida longa (vêr alínea B.1.a)

b - Concentração de linfócitos T em:

(|||||) Indivíduos normais (vêr Quadro IX)

(|||||) Doentes de sobrevida longa (vêr Quadro IX)

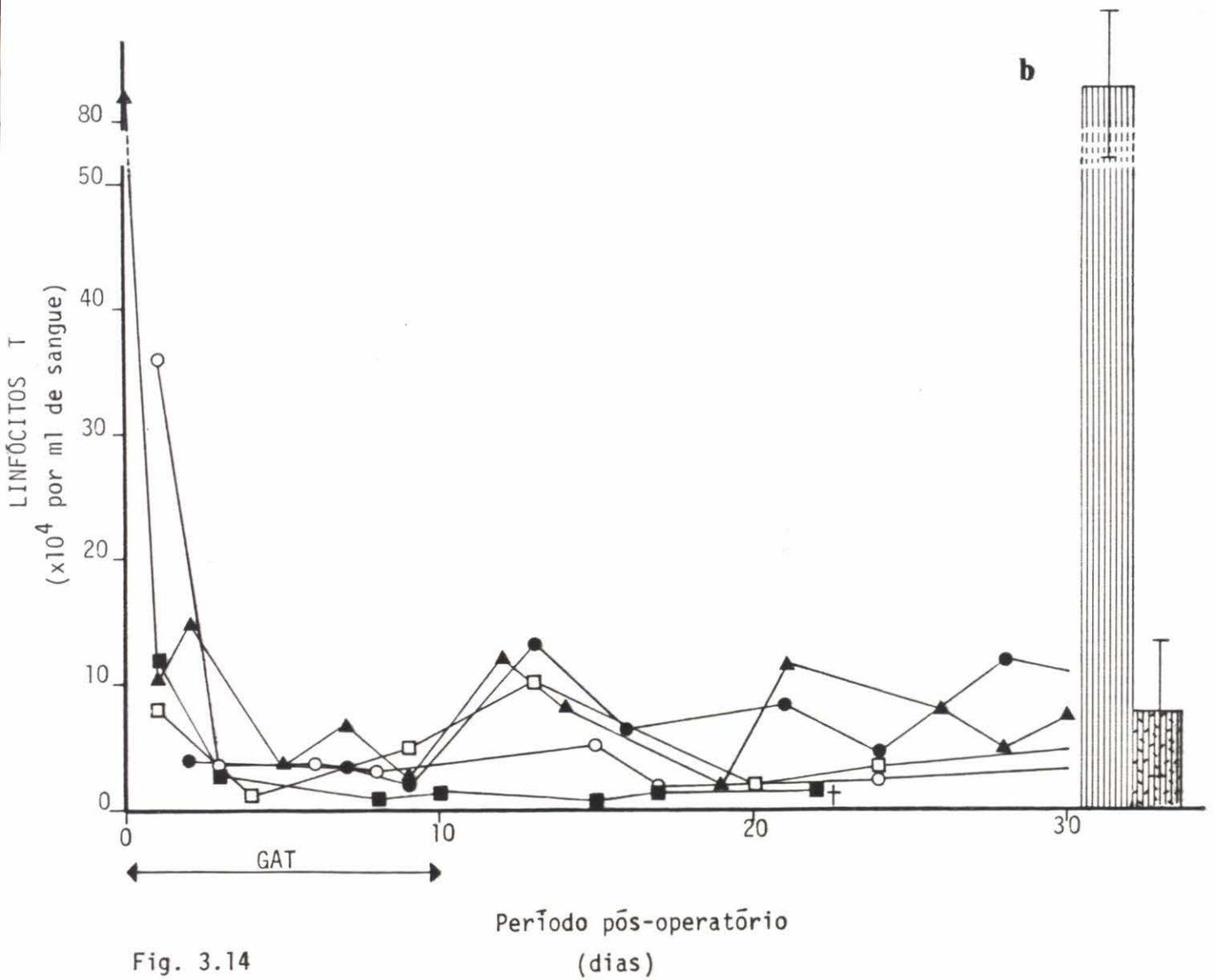
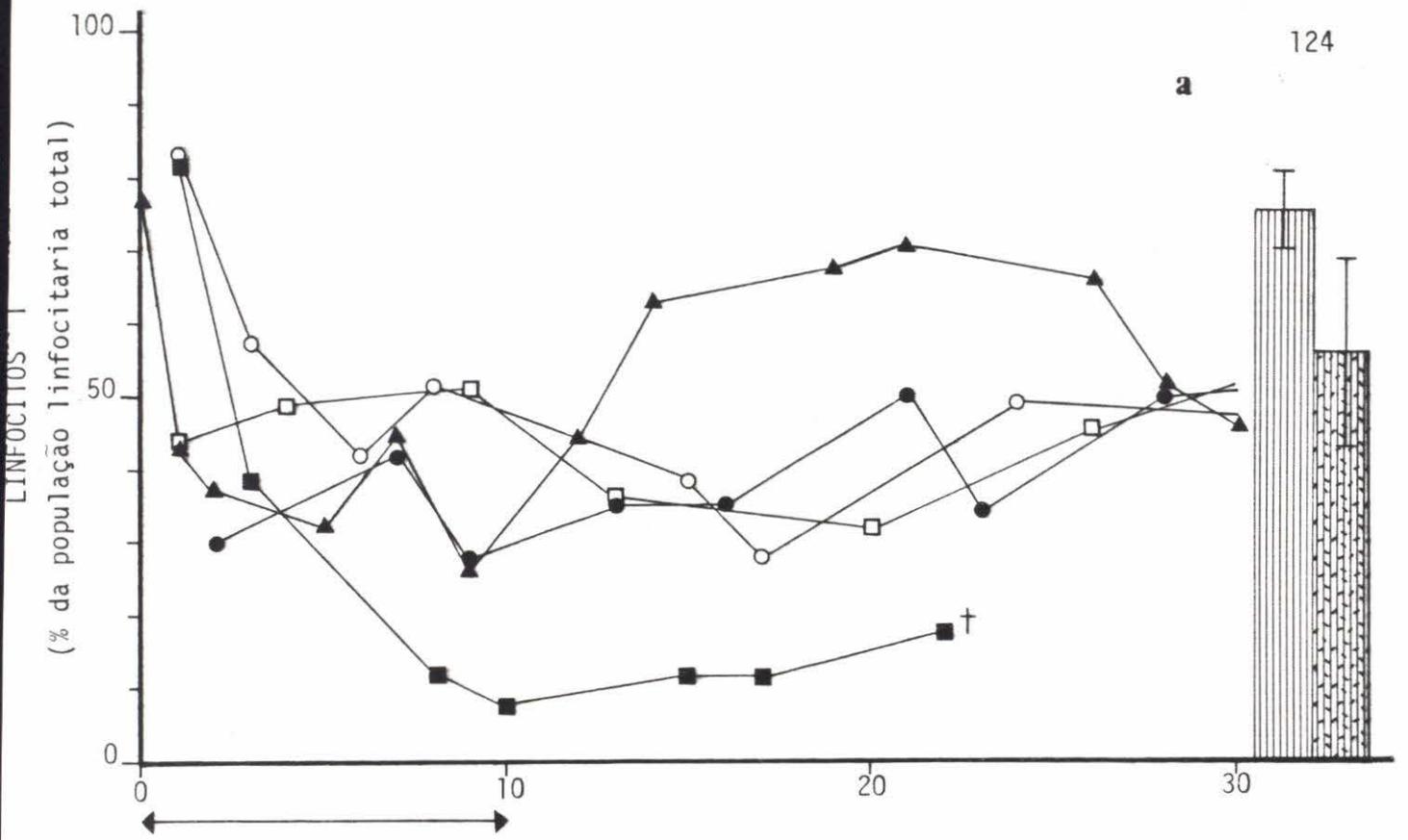


Fig. 3.14

aumento das proporções de linfócitos T, valores estes agora incluídos nos observados nos doentes de sobrevida longa, mas ainda abaixo dos valores normais (Fig. 3.14-a). Apenas um doente (D-41) não atingiu tais valores, vindo também a falecer ao 22º dia pós-operatório.

Para determinarmos a concentração de linfócitos T (quantidade de células T por ml de sangue) de cada doente ao longo dos 30 dias pós-operatórios, recorreremos a cálculos idênticos aos efectuados no Quadro IX e cujos resultados apresentamos na Fig. 3.14-b.

O decréscimo da concentração de linfócitos T nos dias seguintes à operação de transplantação foi drástico, decaindo, por exemplo em D-44, de $82,0 \times 10^4$ linfócitos T por ml de sangue (dia 0) para $10,0 \times 10^4$ (dia 1).

Tal como no estudo da variação da proporção da população T (Fig. 3.14-a), verificamos que durante a administração de GAT também a concentração de linfócitos T (Fig. 3.14-b) decresceu atingindo valores abaixo dos observados nos indivíduos normais ($82,61 \pm 5,83$ células T/ml de sangue) e também abaixo da média encontrada para os doentes de sobrevida longa ($7,67 \pm 5,49$ células T/ml de sangue) (Quadro IX).

Ainda durante este período de tratamento com GAT podemos verificar que a *concentração* de linfócitos T (Fig. 3.14-b) sofreu uma *redução* bastante mais acentuada que a observada para a *proporção* da população T (Fig. 3.14-a). Podemos pois concluir que o tratamento imunodepressor se torna mais evidente quando analisamos a população T em números absolutos e não em termos relativos.

Finda a administração de GAT observa-se um aumento da concentração de linfócitos T que se mantém ao nível dos valores observados

para os doentes de sobrevida longa, mas muito aquém dos indivíduos normais (Fig. 3.14-b).

2.b.2. População B

Contrariamente ao observado no estudo da população T, a proporção de linfócitos B aumentou nos primeiros dias seguintes à operação (Fig. 3.15-a). Picos de elevadas proporções de linfócitos B foram observados nos doentes D-40 (79,0% ao dia 2), D-41 (89,0% ao dia 3), D-44 (91,5% ao dia 7), D-45 (58,5% ao dia 6) e D-46 (60,5% ao dia 2).

Finda a administração de GAT, os linfócitos dos vários doentes tenderam a constituir cerca de 50% da população linfocitária total (Fig. 3.15-a). A partir do dia 15 observou-se uma redução da população B, nunca chegando, no entanto, a atingir a média dos valores observados nos indivíduos normais ($19,4 \pm 6,4\%$) e nos doentes de sobrevida longa ($24,66 \pm 8,65\%$) (Fig. 3.15-a); registou-se apenas a exceção do doente D-41 que neste mesmo período de tempo apresentou um aumento acentuado de linfócitos B e que antecedeu o seu falecimento.

Do estudo relativo à quantidade de linfócitos B existente por ml de sangue, verificamos que houve um decréscimo durante a administração de GAT (Fig. 3.15-b). Esta redução da concentração de linfócitos B foi no entanto menos drástica do que aquela encontrada na população T durante o mesmo período de tempo (Fig. 3.14-b).

Com o fim da tomada de GAT, ao dia 10, observou-se um aumento da concentração de linfócitos B, mas que depois de 4-5 dias retomou os valores antecedentes, mantendo-se assim até ao fim dos 30 dias

Fig. 3.15. Alteração da população B (células SmIg⁺) ao longo dos primeiros 30 dias pós-operatórios: (a) proporção da população B; (b) concentração de linfócitos B.

(●—●) Doente D-40

(■—■) Doente D-41

(▲—▲) Doente D-44

(○—○) Doente D-45

(□—□) Doente D-46

a - Proporção de linfócitos B em:

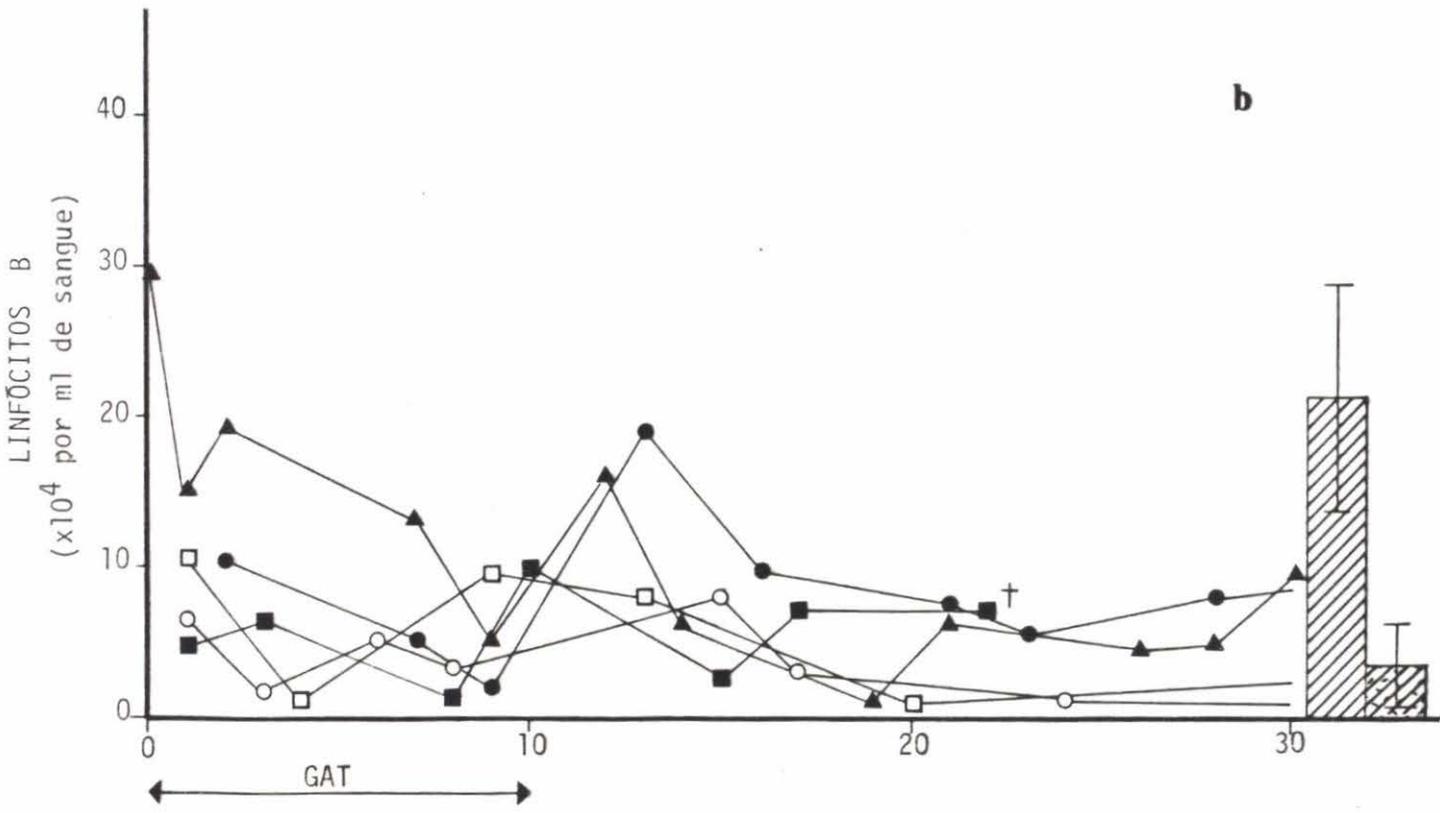
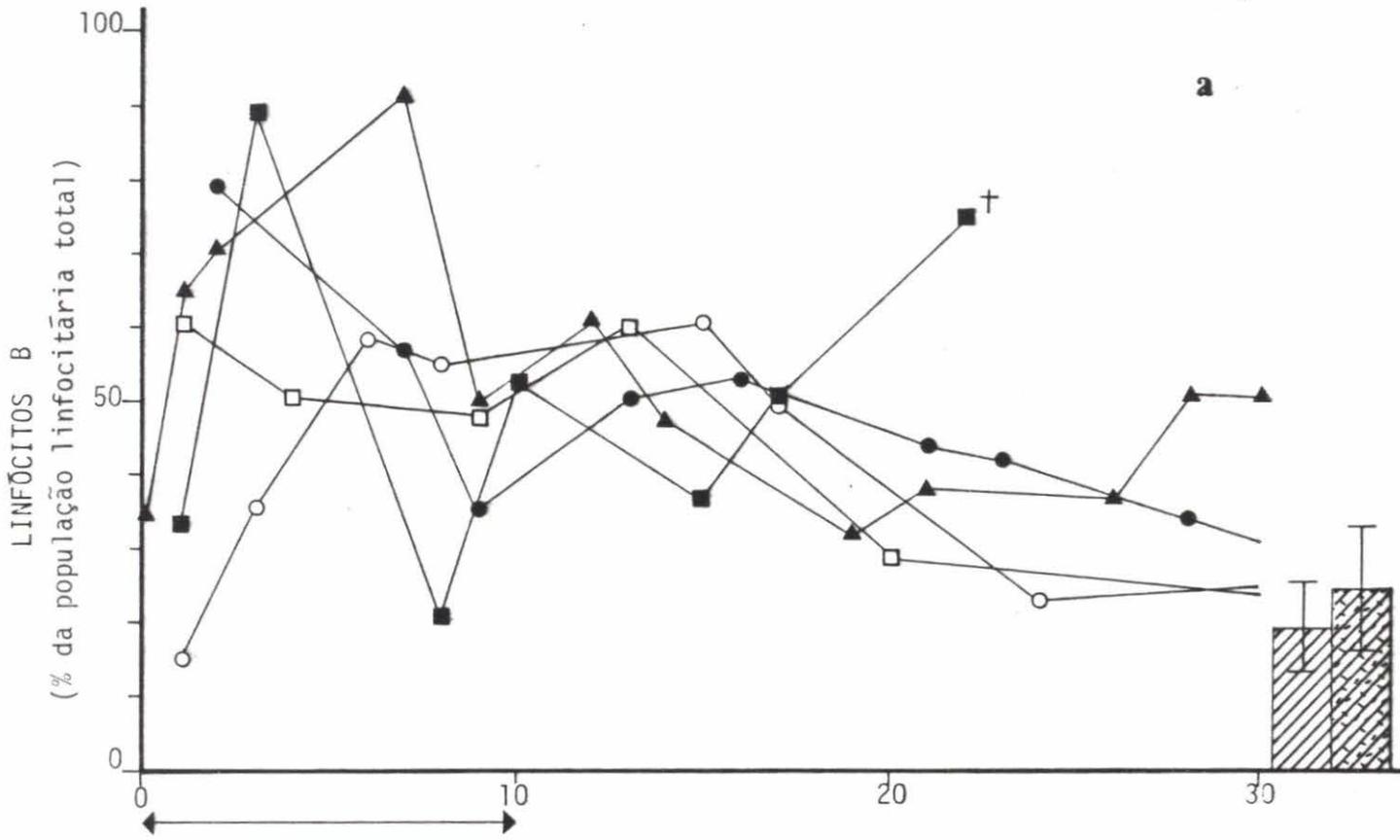
(//) Indivíduos normais (vêr alínea A.2)

(///) Doentes de sobrevida longa (vêr alínea B. 1.a)

b - Concentração de linfócitos B em:

(//) Indivíduos normais (vêr Quadro IX)

(///) Doentes de sobrevida longa (vêr Quadro IX)



Período pós-operatório
(dias)

Fig. 3.15

(Fig. 3.15-b).

Na maioria dos casos estudados (com excepção em alguns dias dos doentes D-40 e D-41) a concentração de linfócitos B manteve-se sempre incluída nos valores observados nos doentes de sobrevida longa e abaixo da média registada nos indivíduos normais (Fig. 3.15-b).

Saliente-se o facto de encontrarmos nos dias subsequentes à operação de transplantação um aumento acentuado da proporção de linfócitos B que correspondeu, no entanto, a um decréscimo da concentração dos mesmos (Fig. 3.15-a e b). Podemos pois concluir que se bem que houve um aumento *relativo* da população B houve na verdade um decréscimo *quantitativo* dos linfócitos B.

2.b.3. População Ia

Durante os 10 dias de tratamento com GAT observou-se um aumento da população Ia que atingiu os seguintes valores: 55,0% no doente D-40, ao dia 9 pós-operatório; 50,0% no doente D-41, ao dia 3; 54,5% no doente D-42, ao dia 5; 30,5% no doente D-45, ao dia 6; e finalmente 38,5% no doente D-46, ao dia 1 (Fig. 3.16-a). Estes níveis de linfócitos Ia⁺ neste período pós-operatório situam-se muito acima dos valores registados não só para indivíduos normais ($15,6 \pm 7,6\%$) mas também para doentes de sobrevida longa ($21,0 \pm 9,5\%$) (Fig. 3.16-a).

Finda a administração de GAT observou-se nos vários doentes uma estabilização da população Ia⁺ ao nível de 20-40% da totalidade de linfócitos. Embora sendo superiores à média encontrada nos indivíduos normais, aquelas proporções de linfócitos Ia situavam-se ao nível dos valores superiores encontrados nos doentes de sobrevida longa (Fig.3.16-a).

Fig. 3.16. Alteração da população Ia^+ ao longo dos primeiros 30 dias pós-operatórios: (a) proporção da população Ia^+ ; (b) concentração de linfócitos Ia^+ .

(●—●) Doente D-40

(■—■) Doente D-41

(▲—▲) Doente D-44

(○—○) Doente D-45

(□—□) Doente D-46

a - Proporção de linfócitos Ia^+ em:

(⊘) Indivíduos normais (vêr alínea A.2)

(⊙) Doentes de sobrevida longa (vêr alínea B.1.a)

b - Concentração de linfócitos Ia^+ em:

(⊘) Indivíduos normais (vêr Quadro IX)

(⊙) Doentes de sobrevida longa (vêr Quadro IX)

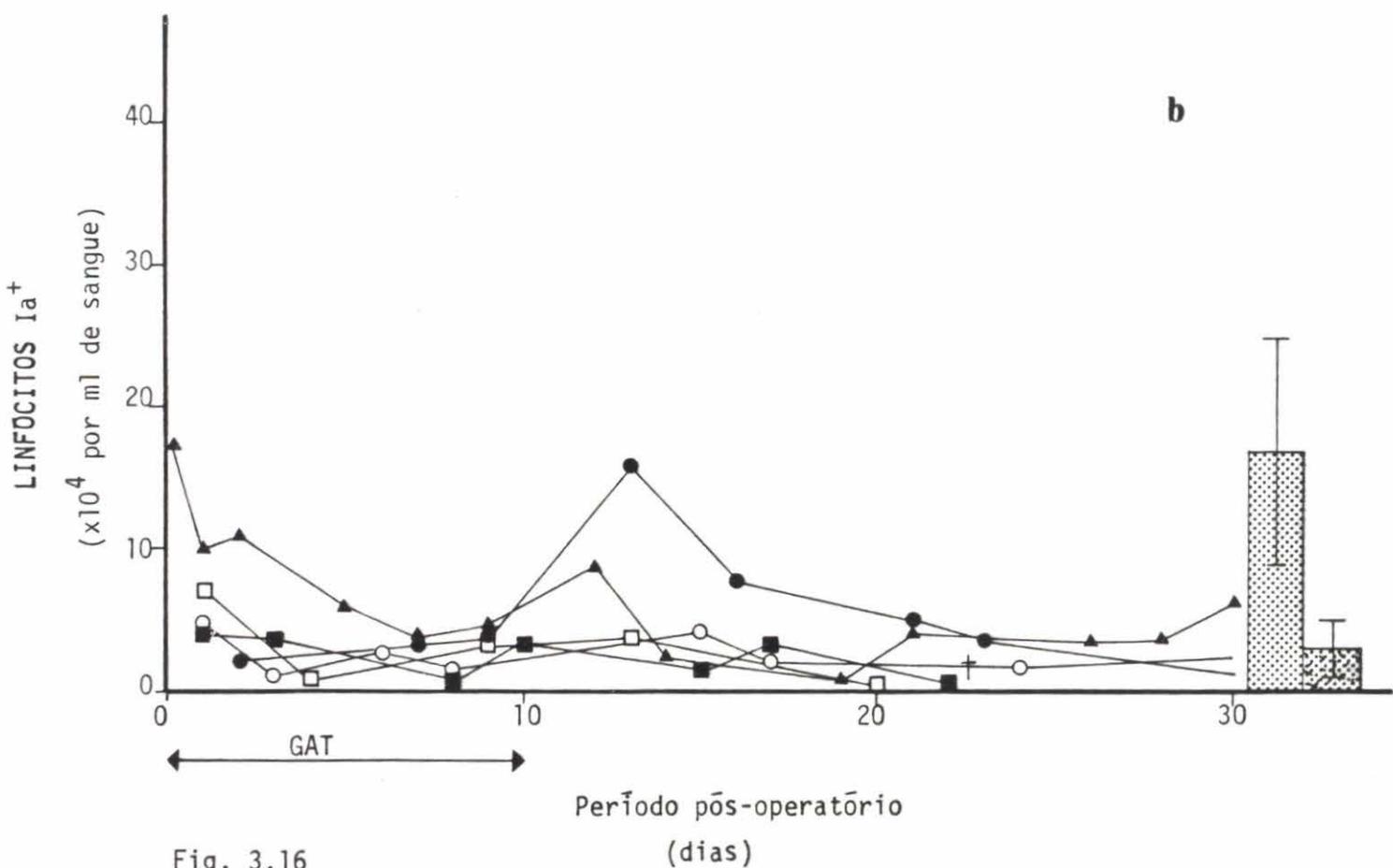
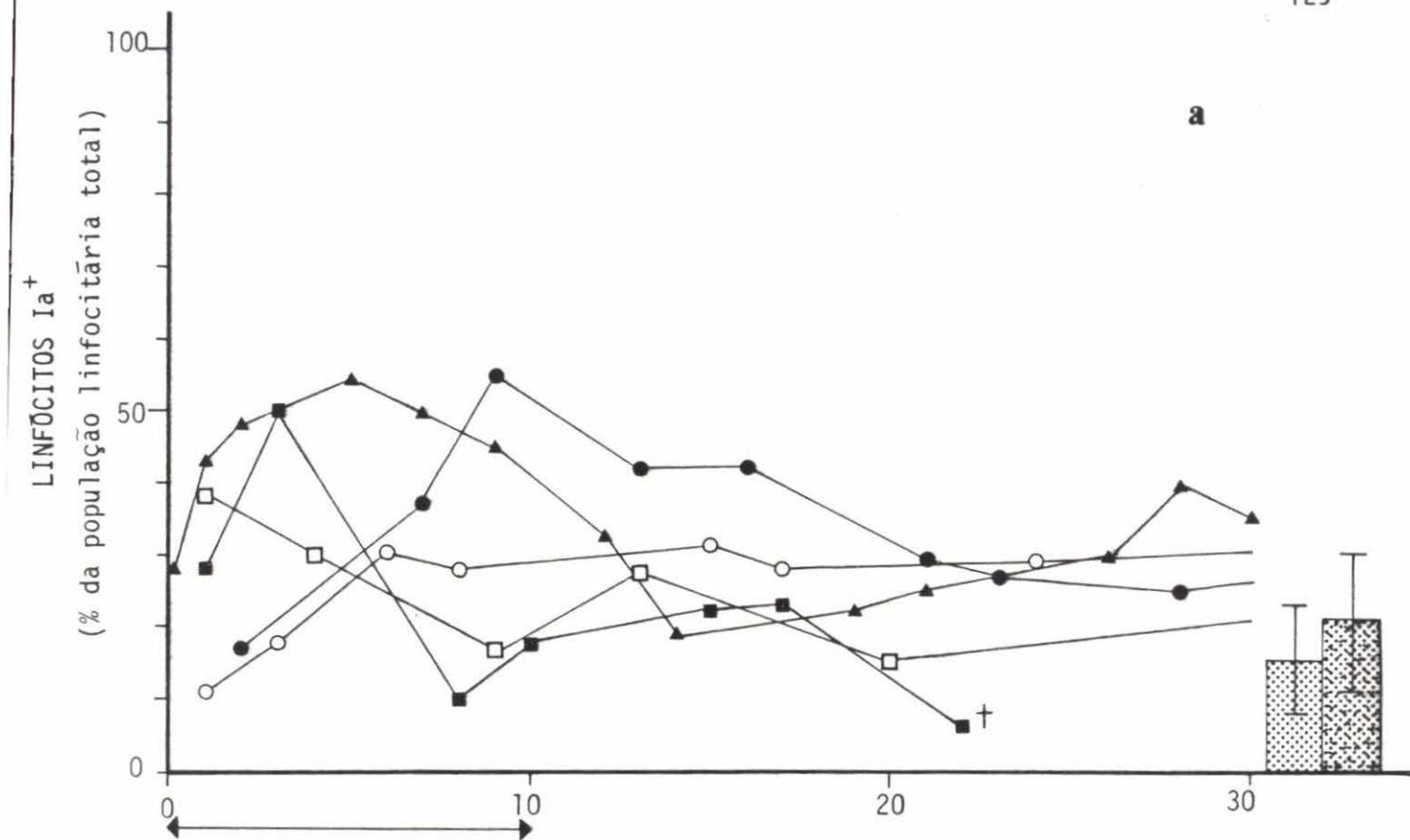


Fig. 3.16

(dias)

Contrariamente ao observado no estudo da proporção de linfócitos Ia^+ (Fig. 3.16-a), observou-se um decréscimo do número de linfócitos Ia^+ por ml de sangue durante a tomada de GAT (Fig. 3.16-b).

Findo o tratamento de GAT verificou-se um aumento da concentração de linfócitos Ia^+ , aumento este que não atingiu no entanto a média observada em indivíduos normais ($17,16 \pm 8,36$ linfócitos por ml de sangue) (Fig. 3.16-b). Com efeito aqueles valores situam-se entre os observados nos doentes de sobrevida longa ($2,29 \pm 1,93$ linfócitos por ml de sangue) (Fig. 3.16-b).

Deste estudo podemos concluir que durante os primeiros 10 dias do pós-operatório, os doentes apresentam um aumento *proporcional* de linfócitos Ia^+ mas que corresponde efectivamente a um decréscimo *quantitativo* dos mesmos. Após o tratamento de GAT a redução proporcional da população Ia^+ acompanha um ligeiro aumento da concentração de linfócitos possuidores do antigénio Ia^+ (Fig. 3.16-a e b).

2.b.4. População RFc_{γ}^+

A população de linfócitos sanguíneos possuidores de receptores para a porção Fc da IgG (população RFc_{γ}^+) foi também analisada ao longo dos 30 dias subsequentes à transplantação cardíaca.

Durante a tomada de GAT nos 10 dias pós-operatórios observou-se uma notável elevação da proporção de linfócitos RFc_{γ}^+ cujos picos atingiram os seguintes valores: 51,0% no doente D-40, ao dia 9 pós-operatório; 73,0% no doente D-41, ao dia 3; 60,0% no doente D-44, ao dia 7; 47,5% no doente D-45, ao dia 8; e 45,5% no doente D-46 ao dia 1 (Fig. 3.17-a).

Fig. 3.17. Alteração da população RFc_γ^+ ao longo dos primeiros 30 dias pós-operatórios: (a) proporção da população RFc_γ^+ ; (b) concentrações de linfócitos RFc_γ^+ .

(●—●) Doente D-40

(■—■) Doente D-41

(▲—▲) Doente D-44

(○—○) Doente D-45

(□—□) Doente D-46

a - Proporção de linfócitos RFc_γ^+ em:

(▒) Indivíduos normais (vêr alínea A.2)

(▓) Doentes de sobrevida longa (vêr alínea B.1.a)

b - Concentração de linfócitos RFc_γ^+ em:

(▒) Indivíduos normais (vêr Quadro IX)

(▓) Doentes de sobrevida longa (vêr Quadro IX)

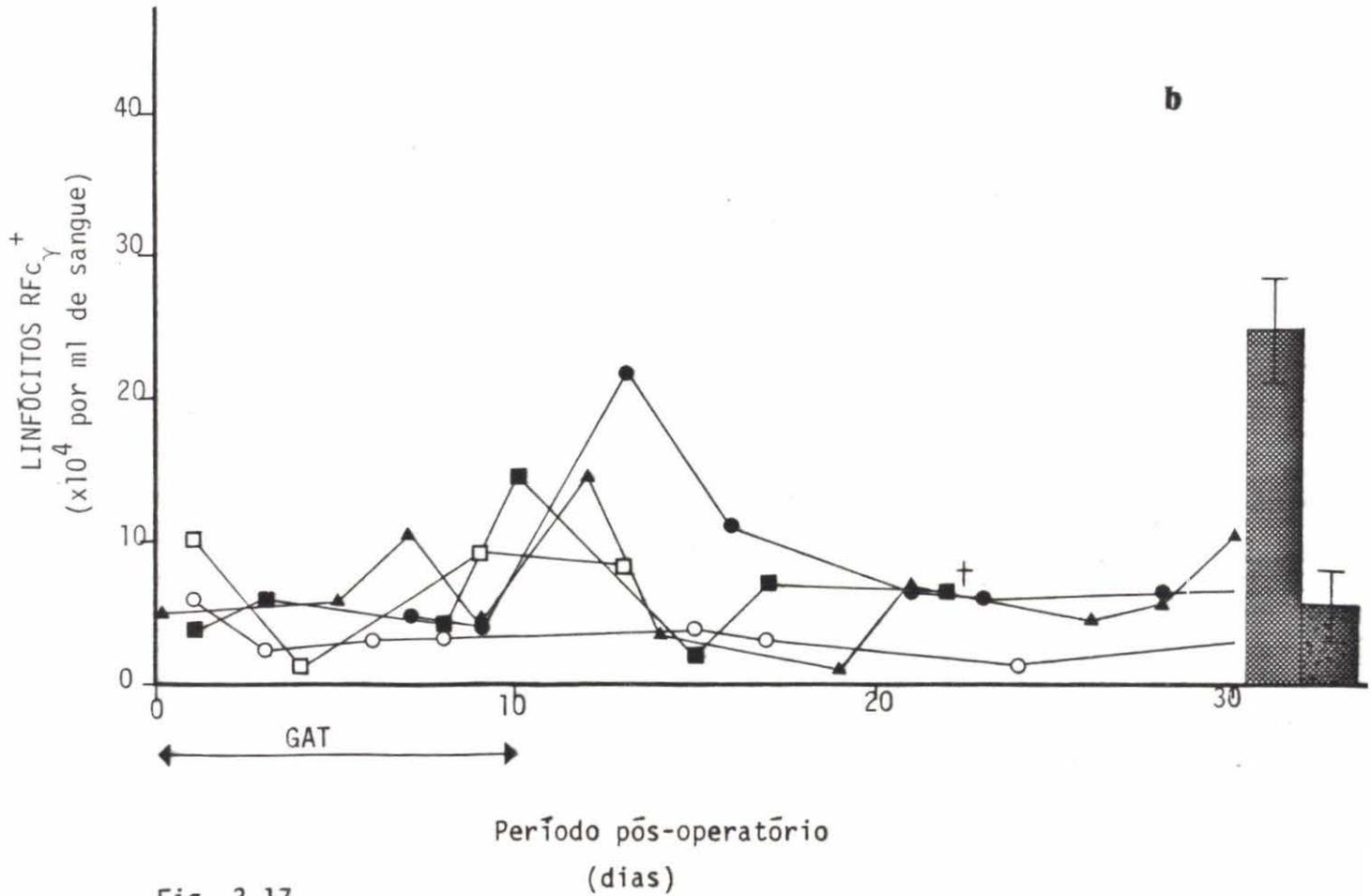
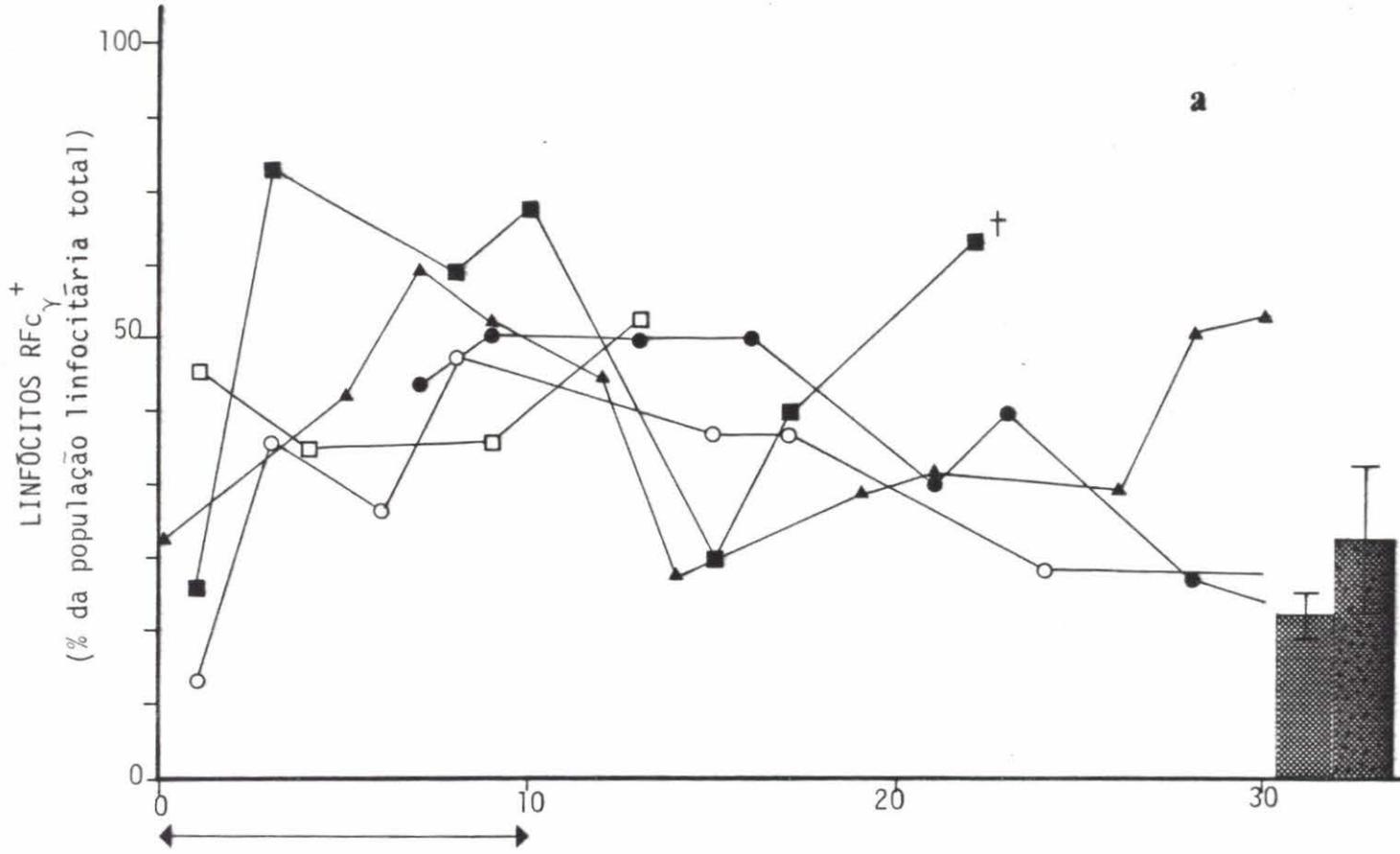


Fig. 3.17

Aquelas elevadas proporções de linfócitos RFc_γ^+ situam-se acima das médias encontradas não só em indivíduos normais ($22,6 \pm 3,3\%$) mas também nos doentes de sobrevida longa ($32,7 \pm 9,8\%$) (Fig. 3.17-a).

Passados os 10 dias de tratamento com GAT observou-se um decréscimo das proporções de linfócitos RFc_γ^+ . Estas proporções se bem que atingissem os níveis registados nos doentes de sobrevida longa, nunca atingiram, contudo, a média encontrada nos indivíduos normais (Fig. 3.17-a). O doente D-41 apresentou um súbito incremento da população RFc_γ^+ (em oposição ao decréscimo observado nos restantes doentes) que antecedeu o seu falecimento.

O aumento da proporção de linfócitos RFc_γ^+ (Fig. 3.17-a) durante os 10 dias subsequentes à transplantação cardíaca foi acompanhado de um decréscimo da concentração de linfócitos RFc_γ^+ (Fig. 3.17-b). Estes baixos valores encontram-se dentro dos observados nos doentes de sobrevida longa ($5,34 \pm 2,58$ linfócitos RFc_γ^+ por ml de sangue) mas muito abaixo dos valores normais ($24,86 \pm 3,63$ linfócitos RFc_γ^+ por ml de sangue) (Fig. 3.17-b).

Após este período de 10 dias sob administração de GAT, detectou-se um aumento da concentração de linfócitos RFc_γ^+ mas que ao dia 15 retomou os valores antecedentes.

2.c. Alteração de subpopulações de linfócitos T

Tendo sido a população T a mais afectada, principalmente em valores absolutos (Fig. 3.14), entendemos aprofundar o estudo da variação das suas subpopulações: TIa^+ e TFc_γ^+ .

O estudo ao longo do tempo da variação da subpopulação TIa^+

O estudo ao longo do tempo da variação da subpopulação TIa^+ mostrou-se-nos deveras importante pois que se tem afirmado que cerca de 40 a 70% dos linfócitos T passam a expressar o antígeno Ia quando activados quer *in vitro* quer *in vivo* (Fu e col., 1978; Evans e col., 1978; Ko e col., 1979).

A estimativa de linfócitos T possuidores de receptores Fc_{γ} poderá também ser uma contribuição importante para a interpretação da actividade funcional dos linfócitos T pois que a sua acção de rejeição poderia fazer-se não só pelo mecanismo de citotoxicidade mediada por células, na ausência de IgG (Cerottini e col., 1971), mas também por citotoxicidade mediada por célula e dependente da presença de anticorpo.

2.c.1) Subpopulação TIa^+

A proporção de linfócitos T possuidores do antígeno Ia apresentou um acentuado aumento nos dias seguintes à operação de transplantação e durante a tomada de GAT. Assim, observamos picos elevados de células TIa^+ nos doentes D-40 ao dia 2 (36,2%), D-41 ao dia 3 (46,2%), D-44 ao dia 2 (34,1%), D-45 ao dia 8 (16,7%) e D-46 ao dia 1 (37,0%) (Fig. 3.18-a).

Estes picos apresentam-se muito elevados se comparados aos valores obtidos em indivíduos normais ($4,12 \pm 2,36\%$) e em doentes de sobrevida longa ($9,16 \pm 8,62$) (Fig. 3.18-a).

Passado o tratamento de GAT observou-se um decréscimo da proporção de linfócitos T possuidores do antígeno Ia. Assim, a subpopulação TIa atingiu valores que se incluíam nos registados nos doentes

Fig. 3.18. Alteração da proporção de linfócitos T possuidores do antígeno Ia (a) ou de receptores Fc_{γ} (b), ao longo dos 30 dias pós-operatórios.

- (●—●) Doente D-40
- (■—■) Doente D-41
- (▲—▲) Doente D-44
- (○—○) Doente D-45
- (□—□) Doente D-46

a - Proporção de linfócitos T possuidores do antígeno Ia em:

- (▨) Indivíduos normais
- (▩) Doentes de sobrevida longa

b - Proporção de linfócitos T possuidores de receptores Fc_{γ} em:

- (▨) Indivíduos normais
- (▩) Doentes de sobrevida longa

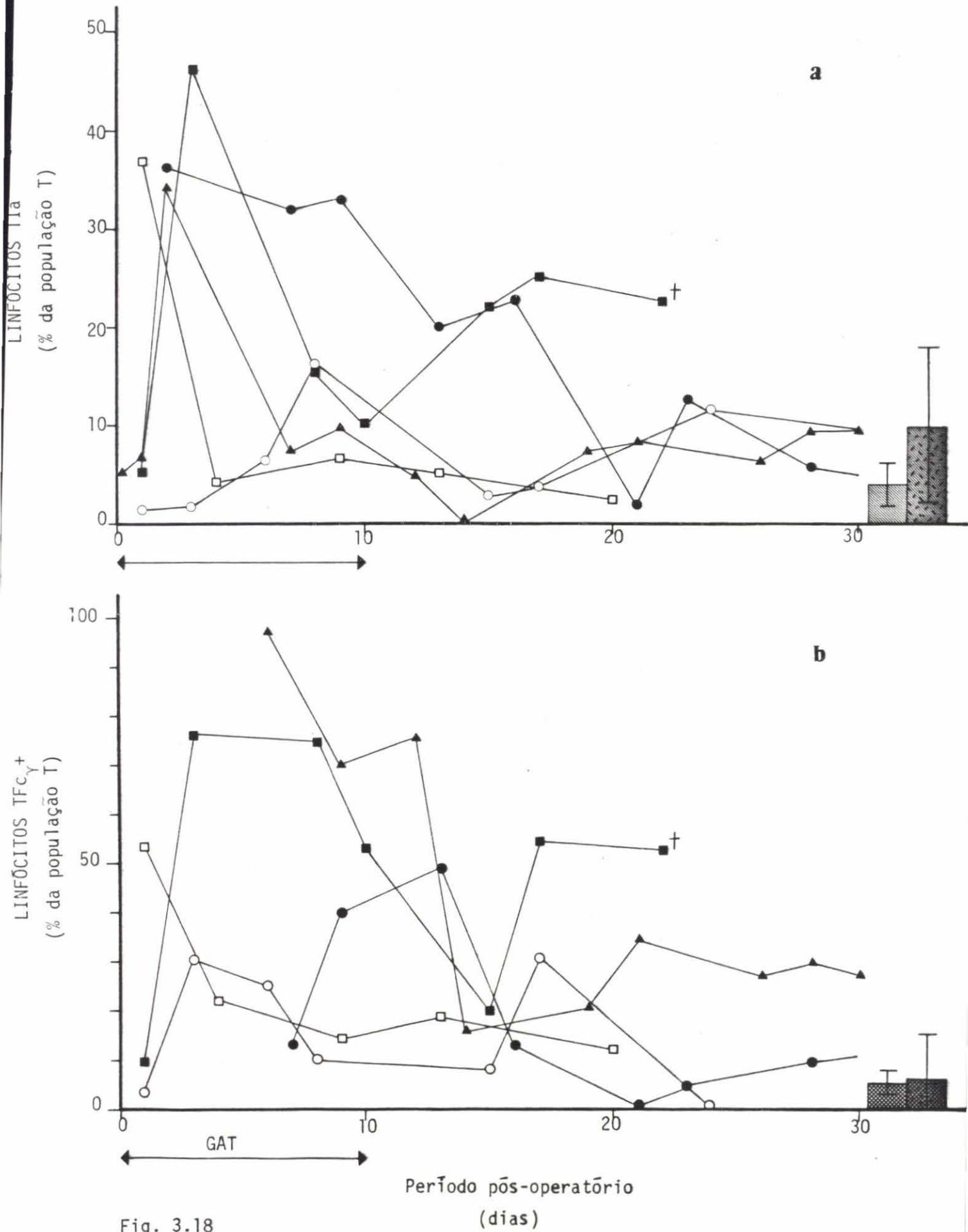


Fig. 3.18

de sobrevida longa, situando-se no entanto ainda acima da média encontrada em indivíduos normais (Fig. 3.18-a).

2.c. 2) Subpopulação TFc_γ^+

Durante os 10 dias pós-operatórios em que os doentes tomavam GAT observamos elevadas proporções de linfócitos TFc_γ^+ (Fig. 3.18-b). O caso mais notável foi detectado no doente D-44 onde quase a totalidade (97,4%) de linfócitos T possuía receptores Fc_γ .

Finda a administração de GAT houve uma redução apreciável de linfócitos T a expressar receptores Fc_γ . Observou-se pois que perto do dia 15 já todos os doentes apresentavam valores que se situavam ao nível dos observados nos doentes de sobrevida longa ($10,59 \pm 9,23\%$) se bem que ainda acima da média registada em indivíduos normais ($6,10 \pm 3,09\%$).

2.d. Alteração das diversas populações e subpopulações observadas no Doente D-44

Tendo obtido amostras sanguíneas do Doente D-44 com elevada regularidade desde o dia da operação de transplantação e ao longo dos 30 dias subsequentes, consideramos ser importante juntar os dados obtidos das alterações das diversas populações em uma só figura (Fig. 3.19). Deste modo, ser-nos-á possível analisar comparativamente a evolução das populações e subpopulações estudadas, tendo em atenção o tratamento imunodepressor do doente.

Foi também objecto de estudo a alteração das subpopulações T auxiliar (T-"helper") e T-supressora (T-"suppressor") identificadas

Fig. 3.19. Populações linfocitárias do doente D-44 observadas durante os primeiros 30 dias pós-operatórios.

a_1, b_1, c_1 e d_1 - alteração das proporções das diversas populações.

a_2, b_2, c_2 e d_2 - alteração da quantidade de linfócitos constituintes de cada população.

n - controlo normal.

d - observação em doentes de sobrevida longa.

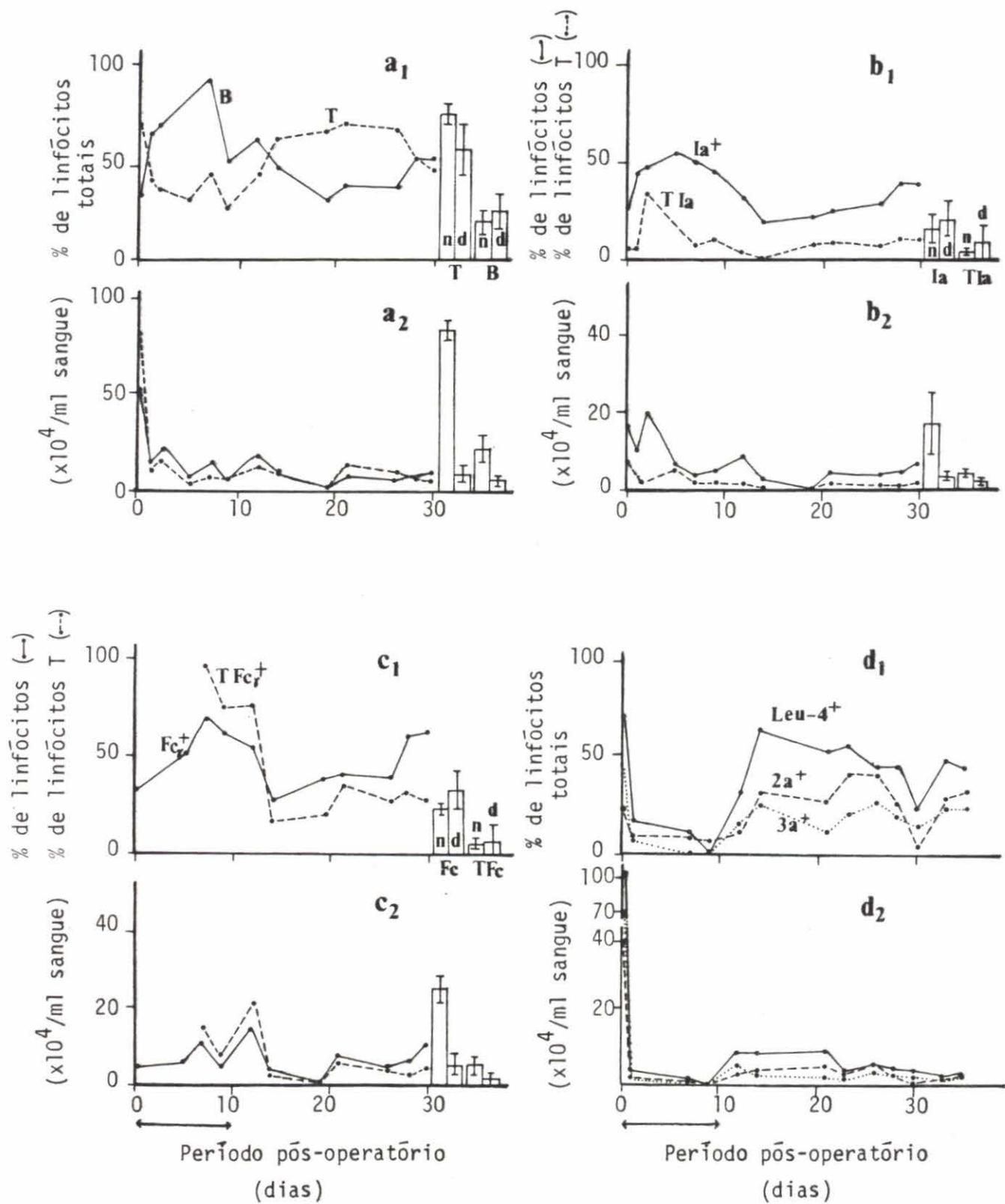


Fig. 3.19

pelos anticorpos monoclonais Leu-3a e Leu-2a, respectivamente (Fig. 3.19-d).

Da análise das alterações das proporções das diversas populações e subpopulações linfocitárias (Fig. 3.19-a₁, -b₁, -c₁ e -d₁) observamos que apenas a população T (Fig. 3.19-a₁) e suas subpopulações T-auxiliar e T-supressora (Fig. 3.19-d₁) decresceram no período de administração de GAT. As restantes populações (B, Ia, TIIa⁺, RFc_γ⁺ e TFc_γ⁺) apresentaram, pelo contrário, uma subida da sua representatividade na população linfocitária total.

Nos indivíduos normais os linfocitários T-auxiliares correspondem a 60% dos linfócitos T totais e os linfócitos T-supressores a 20-30% dos mesmos (Reinherz e Schlossman, 1980). Foram de facto essas as proporções que encontramos no doente D-44 antes do tratamento imunodepressivo (Fig. 3.19-d₁). Durante a administração de GAT houve uma queda de ambas as subpopulações T, tendo-se inclusivamente invertido as suas posições relativas: a subpopulação T-supressora ultrapassou a subpopulação T-auxiliar. Esta inversão relativa manteve-se mesmo após a administração de GAT, sugerindo pois que as drogas imunodepressoras (GAT e/ou ciclosporina A) têm uma acção mais efectiva sobre os linfócitos T-auxiliares do que sobre os T-supressores. Devemos contudo, ter em atenção que estes dados sobre as subpopulações T-auxiliar e T-supressora se referem apenas às observações de um só doente (D-44). Um estudo mais aprofundado sobre a alteração destas subpopulações foi realizado por O'Toole e col. (1985) em simultâneo com o trabalho que ora apresentamos.

Como anteriormente mencionamos (alínea b), a quantidade de linfócitos (por ml de sangue) que constitui cada uma das populações linfocitárias sofreu uma notável redução (Fig. 3.19-a₂, b₂, c₂ e d₂), sendo a população T e suas subpopulações T-auxiliar e T-supressora as mais afectadas.

De uma maneira geral, podemos concluir que a acção conjunta de GAT e ciclosporina A nos 10 primeiros dias subsequentes à operação alteram enormemente as proporções das diversas populações linfocitárias.

Terminada a administração de GAT (mantendo-se apenas o tratamento de ciclosporina A) as mesmas populações recuperam - se bem que não totalmente - mantendo-se desde então nos níveis dos valores encontrados nos doentes de sobrevida longa.

Relativamente à quantidade de linfócitos que constituem cada população linfocitária, parece diminuir imediatamente nos primeiros dias pós-operatórios e manter-se naqueles níveis ao longo dos 30 dias. Estes valores incluem-se nos observados nos doentes de sobrevida longa.

2.e. A globulina anti-timócito (GAT) ligada aos linfócitos causará interferência nas reacções de roseta?

Nas alíneas anteriores analizámos as alterações das populações linfocitárias dos doentes submetidos a tratamento imunodepressivo durante os 30 dias seguintes à operação de transplantação. Fizemos especial referência à acção drástica de GAT no proporcional decréscimo de linfócitos T e no respectivo aumento das restantes populações.

Com vista a obtermos uma interpretação correcta de tais observações, pensámos ser fundamental investigar a capacidade da globulina anti-timócito (GAT) inibir e/ou ampliar a formação das rosetas

tas nos testes RRAD^(a), RRAdD^(b), EA^(c) e RRM^(d) usados nas alíneas antecedentes.

Na verdade, um efeito inibidor ou ampliador causado pela presença de GAT na superfície externa da membrana do linfócito, poderá pôr em causa as interpretações dos estudos anteriores pois que as alterações observadas não seriam mais do que o simples reflexo de um artefacto.

2.e.1. Efeito da adição de GAT na análise fenotípica dos linfócitos sanguíneos

Numa fase inicial observámos a alteração das proporções das diversas populações linfocitárias causada pela adição de GAT ao meio de incubação de linfócitos normais. Estes linfócitos provenientes de indivíduos voluntários foram incubados com diversas concentrações de GAT durante apenas 90 min (Fig. 3.20-a) ou durante toda a noite (Fig. 3.20-b).

Todos os linfócitos possuíam a GAT ligada à membrana, mesmo quando eram usadas baixas concentrações de GAT (0,5 µg/ml) (Fig. 3.20-a e b).

-
- (a) RRAD, Reacção de Roseta Antiglobulina Directa: detecção de linfócitos B.
- (b) RRAdD, Reacção de Roseta Anti-determinante Directa: detecção de linfócitos T e Ia⁺.
- (c) EA, Complexo eritrócito-anticorpo: detecção de linfócitos RFc_γ⁺.
- (d) RRM, Reacção de Roseta Mista: detecção das subpopulações TIa⁺ e TFc_γ⁺.

Fig. 3.20. Efeito da adiçãõ de GAT na anãlise fenotípica dos linfócitos.

A 1 ml de linfócitos sanguíneos normais (4×10^6 células/ml de PBS) adicionou-se igual volume de soluções de GAT diluída a 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$. Após incubaçãõ de 90 minutos à temperatura ambiente (a) ou durante toda a noite a 4°C (b) lavaram-se os linfócitos para remover a GAT excedente. Procedeu-se às reacções de roseta tal como descrevemos nas alíneas B.4.b, B.4.c. e B.4.d. de "Material e Métodos". A GAT equina foi detectada na superfície celular por RRAD utilizando Ig de Coelho anti-Ig equina.

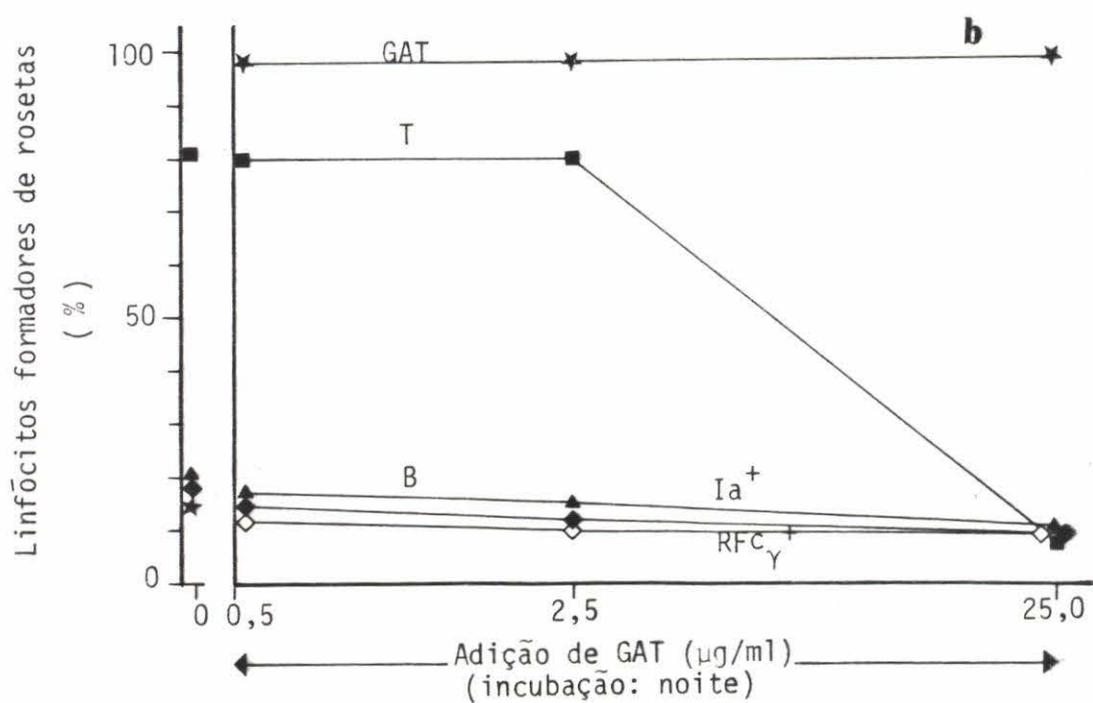
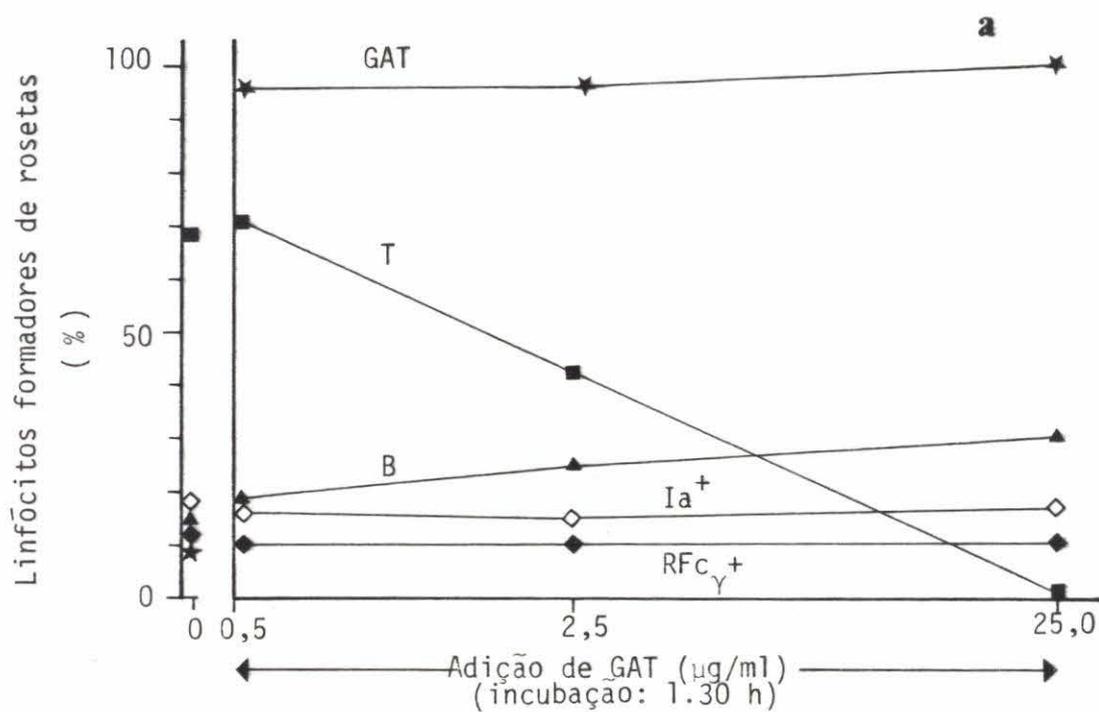


Fig. 3.20

Em estudos preliminares (resultados não apresentados) verificamos que incubando os linfócitos com doses mais diluídas de GAT (0,25-0,025 $\mu\text{g/ml}$), aqueles ainda ligavam alguma Ig. A sua detecção é que se tornou muito difícil pois que as rosetas* formadas pelos linfócitos eram muito fracas, consistindo de apenas 2-5 eritrócitos por linfócito.

A incubação dos linfócitos com GAT, quer durante 90 minutos (Fig. 3.20-a) quer durante toda a noite (Fig. 3.20-b) não causou qualquer interferência na detecção das populações B, Ia^+ e RFc_Y^+ . Apenas detectamos um claro decréscimo na estimativa dos linfócitos T. Na verdade, quando usamos a concentração máxima (25,0 $\mu\text{g/ml}$) de GAT, a detecção de linfócitos T foi totalmente inibida, após 90 minutos de incubação (Fig. 3.20-a), ou quase totalmente, após incubação durante a noite (Fig. 3.20-b).

Estes resultados sugerem que os determinantes antigênicos da GAT (i) se encontram em todos os linfócitos, (ii) são independentes da Ig de superfície dos linfócitos B, (iii) são independentes dos antígenos Ia, (iv) são independentes dos receptores para a porção Fc da IgG, mas (v) estão associados ao antígeno YTH 12.5 e aos receptores de eritrócitos de carneiro (ambos marcadores de linfócitos T).

2.e.2. Efeito da adição de GAT na análise fenotípica das células da medula óssea.

Tendo verificado que a GAT se ligara a todos os linfócitos do sangue periférico, decidimos fazer um estudo idêntico ao anterior,

* Rosetas obtidas por RRAD utilizando Ig de Coelho anti-Ig equina (GAT: globulina anti-timócito, feita em Cavalo).

mas utilizando células da medula óssea por constituírem uma população deveras heterogênea.

A Fig. 3.21 mostra que, de facto, mais de 95% das células da medula óssea reagiram positivamente com a GAT.

O tratamento das células da medula óssea com GAT não causou alteração significativa nas reduzidas populações celulares definidas pela expressão de Ig, receptores Fc_{γ} e antígenos Ia e YTH 12.5.

Este estudo permitiu-nos concluir que a globulina anti-*timócito* (GAT) equina não era específica para linfócitos T pois que aquela revestiu não só todos os linfócitos sanguíneos (Fig. 3.20) mas também todas as células heterogêneas da medula óssea (Fig. 3.21).

2.e.3. Cultura de linfócitos sanguíneos na presença de GAT.

Uma vez que GAT se ligara a todos os linfócitos sanguíneos, achamos importante estudar o efeito daquele agente imunodepressor alteração fenotípica e na proliferação celular de linfócitos em cultura.

Realizámos em paralelo, para efeitos de controlo, culturas de linfócitos estimulados pelo agente mitogénico fitohemaglutinina (PHA).

Na cultura de linfócitos na presença de GAT (Fig. 3.22-a) podemos observar uma acentuada redução de linfócitos T, que no dia 4 atingiu uma proporção de apenas 22% da população linfocitária total. Esta redução de linfócitos T poderá ser atribuída a um efeito de inibição de formação de roseta do teste RRAD específico para células T, causado pelo revestimento destas células por GAT (ver alíneas precedentes), Fig. 3.20 e Fig. 3.21).

Fig. 3.21. Efeito da adiçãõ de GAT na anãlise fenotípica das cãlulas da medula õssea.

A 1 ml de cãlulas da medula õssea de um dador normal (4×10^6 cãlulas/ml de PBS) adicionou-se igual volume de soluçãõ de GAT diluĩda a 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$. Apõs incubaçãõ de 90 minutos ã temperatura ambiente (a) ou durante toda a noite a 4°C (b) lavaram-se as cãlulas para remover a GAT excedente. Procedeu-se ãs reacções de rose-ta como descrevemos nas alĩneas B.4.b, B.4.c e B.4.d de "Material e Mãtodos". A GAT equina foi detectada na superfĩcie celular por RRAD utilizando Ig de Coelho anti-Ig equina.

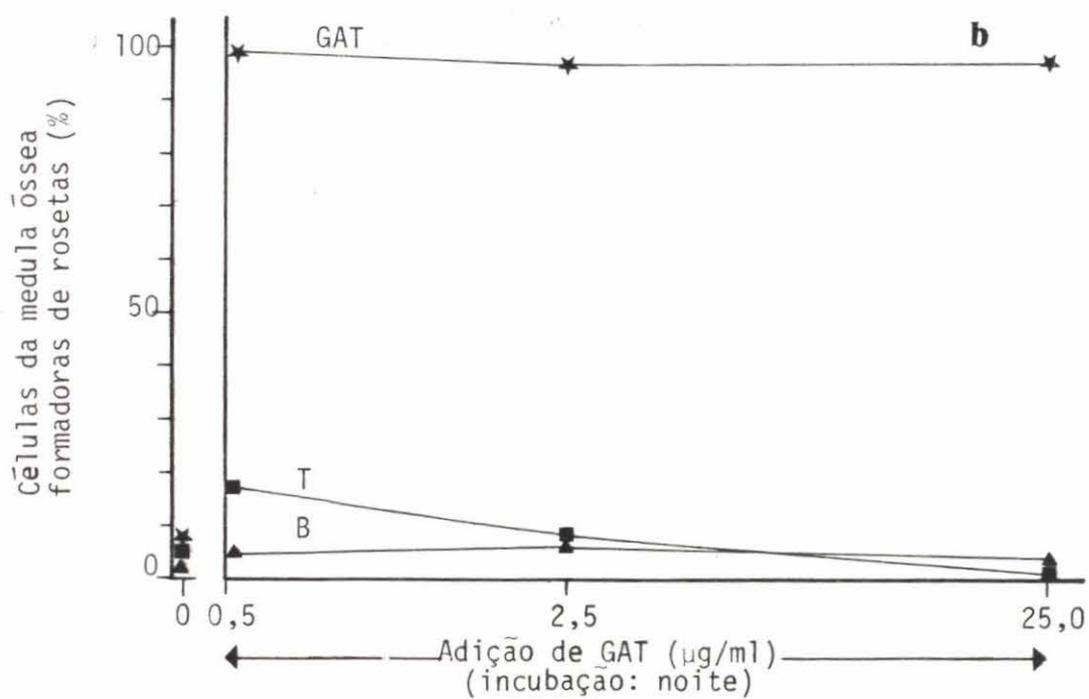
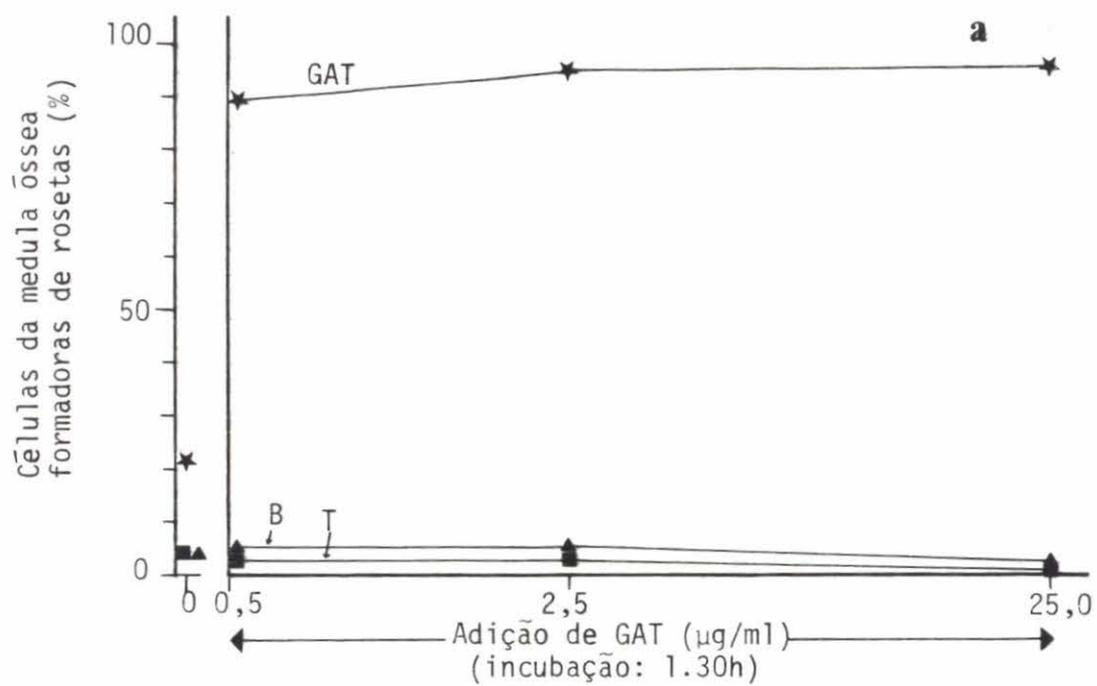


Fig. 3.21

Passados 7 dias de cultura, 90% dos linfócitos apresentavam agora o antigênio YTH 12.5 que identifica os linfócitos T (Fig. 3.22-a). Podemos explicar esta elevada proporção de linfócitos T (comparada com os 22% do dia 4) pela libertação de GAT da superfície dos linfócitos T, tornando-os assim detectáveis pelo teste RRAD específico. Convém recordar que a partir do 7º dia de cultura, e depois de 4 em 4 dias, procedemos à renovação do meio de cultura, utilizando uma solução de interleuquina 2 (ver alínea B.6.b de "Material e Métodos"). Esta renovação do meio proporcionou a remoção de GAT livre e poderá ter facilitado a libertação para o meio de cultura da globulina ligada aos linfócitos.

Podemos pois dizer que estamos perante um fenómeno de "mask" (mascarado) dos linfócitos T devido ao seu revestimento por GAT (dia 4) e de "unmask" (desmascarado), quando aquela GAT se liberta dos linfócitos, deixando os antigénios YTH 12.5 livres para a reacção de identificação (RRAD).

As restantes populações não são afectadas pela presença de GAT na superfície dos linfócitos (ver alíneas precedentes, Fig. 3.20 e Fig. 3.21) pelo que o aumento de células Ia^+ e TIa^+ observado no dia 4 e dia 7, respectivamente (Fig. 3.22-a), reflecte uma activação dos linfócitos em cultura.

Idêntica activação de linfócitos T foi observada no 10º dia de cultura de linfócitos T na presença do mitogénio PHA (Fig. 3.22-b). Estes resultados eram esperados pois que tem sido descrito (Fu e col., 1978; Evans e col., 1978; Ko e col., 1979) que uma proporção (40 a 70%) de linfócitos T activados por mitogénios e aloantigénios passam a expressar o antigênio Ia.

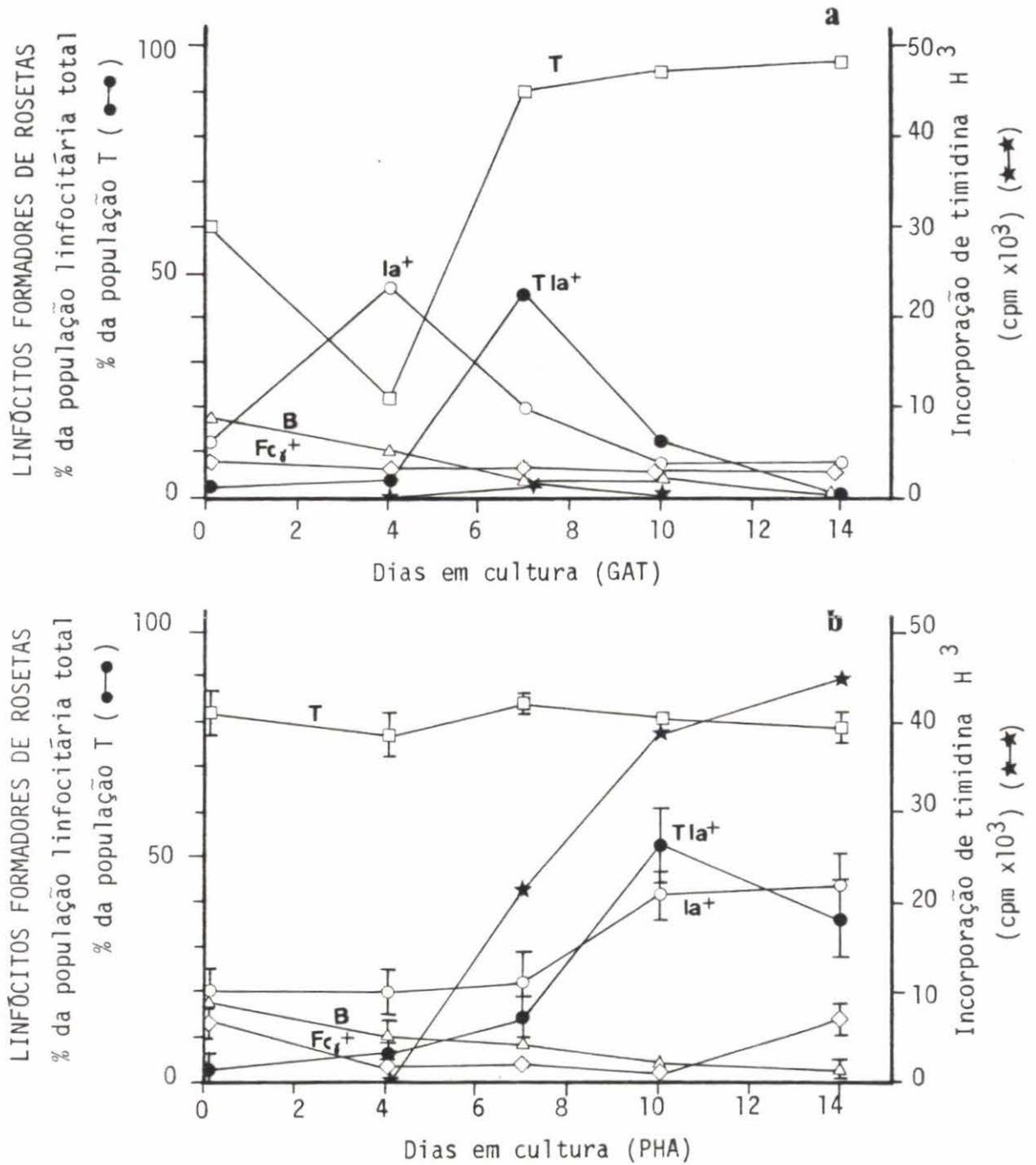


Fig. 3.22. Estimulação mitogênica de linfócitos normais pela GAT (a) e pela PHA (b).

O nosso método de reacção de roseta permitiu-nos ainda distinguir entre as rosetas Ia^+ obtidas no dia 0 e as obtidas no dia 7 de cultura com GAT (Fig. 3.23). De facto, as rosetas do dia 0 apresentam o aspecto normal encontrado nos testes RRAD em que os eritrócitos à volta do linfócito formam como que uma mórula (Fig. 3.23-a), enquanto que no dia 7 a densidade de eritrócitos à superfície do linfócito é bastante mais elevada, apresentando-se a roseta mais condensada. Esta técnica de reacção de roseta específica para o antigénio Ia manifestou-se útil na distinção entre linfócitos pequenos Ia^+ e linfoblastos Ia^+ .

Para estudarmos a proliferação celular em ambas as culturas, adicionámos timidina tritiada aos meios de cultura. Nos dias indicados na Fig. 3.22 retirámos amostras para analisar a timidina marcada que fora incorporada no DNA das células.

Na cultura com PHA só a partir do dia 7 é que detectámos valores significativos de radioactividade: 21.460 ± 322 cpm (dia 7), 39.417 ± 5.066 cpm (dia 10), 45.028 ± 5.369 cpm (dia 14) (Fig. 3.22-b).

A cultura com GAT não provocou proliferação celular pois que a incorporação de timidina tritiada registada se encontrou dentro dos níveis observados no teste de controlo negativo*: controlo negativo, 1.085 ± 313 cpm; cultura de GAT, 2.455 ± 139 cpm (dia 4) e 1.825 ± 203 cpm (dia 7) (Fig. 3.22-a).

Em conclusão, podemos dizer que a presença de GAT no meio de cultura causa uma activação dos linfócitos T (expressão do antigénio

* controlo negativo: células em cultura, às quais não se adicionou GAT (nem qualquer mitogénio).

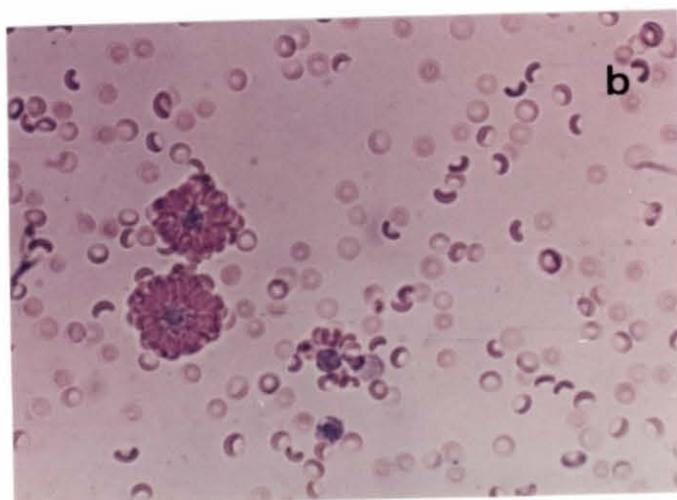
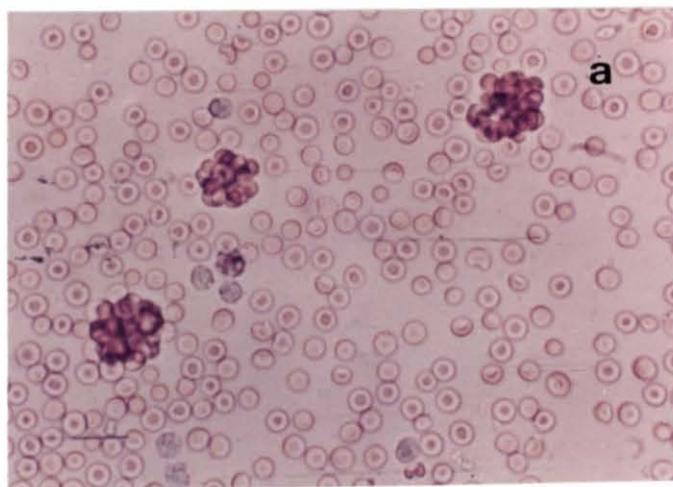


Fig. 3.23. Aspecto das formações de roseta específicas para linfócitos Ia⁺: (a) linfócitos pequenos, (b) linfoblastos após 7 dias de cultura na presença de GAT.

Os linfócitos foram retirados da cultura em GAT (50 µg/ml) no dia 0 (a) e no dia 7 (b) de incubação, lavados e analisados para a exibição do antígeno Ia, no teste RRAD utilizando o anticorpo monoclonal YCL 6.8 (ver alíneas de "Material e Métodos"). Note-se a diferença entre as rosetas de aspecto de mórula (a) e as de aspecto mais condensado (b).

Ia nos linfócitos T), activação esta que, contrariamente à estimulação mitogénica (Fig. 3.22-b), não foi acompanhada de uma proliferação celular (ausência de incorporação de timidina tritiada no DNA celular) (Fig. 3.22-a).

3. Detecção de respostas imunológicas (celulares e humorais) contra infecções por herpesvírus em doentes imunodeprimidos

O terceiro grupo de 6 doentes que observámos haviam sido submetidos a transplantação cardíaca há mais de 30 dias e estavam a ser tratados com ciclosporina A (Cs-A) e prednisolona; GAT e prednisolona eram-lhes administradas quando o seu estado de saúde assim o exigia (para pormenores vêr alínea A.2.b. de "Material e Métodos").

Procedemos à análise de amostras sanguíneas por um período de cerca de 8 meses.

Do estudo ao longo do tempo destes 6 doentes tivémos a oportunidade de detectar esporádicos picos de linfócitos T_{Ia}^+ por volta do 50º a 60º dia pós-operatório. Estes elevados valores de células T_{Ia}^+ sugeriram-nos que talvez estivéssemos perante infecção viral, pois que diversos autores (Reinherz e col. 1980; Tatsumi e col. 1980; Crawford e col. 1981; Carney e col., 1983) registaram aumentos significativos de células T_{Ia}^+ no sangue de indivíduos não imunodeprimidos mas infectados por herpesvírus.

3.a. Células transformadas por VEB causam activação de linfócitos autólogos, *in vitro*

Tendo considerado o aumento de níveis de células T_{Ia}^+ sanguíneas associado à infecção por herpesvírus, decidimos fazer um estudo *in vitro* que nos elucidasse sobre a capacidade de antigénios virais induzirem o aumento da proporção de células T_{Ia}^+ .

Para tal recorreremos à infecção por vírus Epstein-Barr (VEB) de linfócitos provenientes de dadores normais (vêr alínea B.6.d. de "Material e Métodos"). Estes linfócitos transformados por VEB serviram então de células estimuladoras numa cultura de linfócitos normais autólogos. As células de resposta diferiam relativamente às células estimuladoras pelo único facto de não possuírem o antigénio viral.

A Fig. 3.24-a mostra que no 6º dia de cultura dos linfócitos normais com linfócitos autólogos transformados por VEB e irradiados*, já se observavam elevados níveis de linfócitos Ia^+ (48%) e de células T possuidoras do antigénio Ia (34%). Estas populações sofreram ainda um acentuado aumento nos dias subsequentes, atingindo no dia 10 níveis de 55% (Ia^+) e 61% (TIa^+) valores estes que se mantiveram nos dias subsequentes (Fig. 3.24-a).

Uma vez que os antigénios virais foram capazes de, *in vitro*, causar a expressão de Ia em 60% dos linfócitos T (Fig. 3.24-a), resolvemos estudar para efeitos comparativos o desenvolvimento de células TIa^+ numa cultura linfocitária estimulada por antigénios alogeneicos.

Procedemos pois à realização da conhecida "one way-MLC" (Cultura mista unidireccional de linfócitos) em que estimulámos os linfócitos de um indivíduo normal com linfócitos irradiados de um outro dador possuidor de diferentes antigénios de histocompatibilidade (vêr alínea B.6.c. de "Material e Métodos").

A estimulação de linfócitos normais por antigénios virais ou por aloantigénios causaram uma idêntica activação de linfócitos T.

* A irradiação evita a proliferação destas células estimuladoras.

Fig. 3.24 - Culturas mistas de linfócitos (MLC).

a - Estimulação de linfócitos normais por linfócitos autólogos transformados por vírus Epstein-Barr (VEB-AMLC).

b - Estimulação de linfócitos normais por linfócitos irradiados de diferente dador:

- linfócitos estimuladores: HLA-A_{2,26}/B_{13,38}/C₆/DR_{7,8}

- linfócitos de resposta: HLA-A_{7,26}/B_{8,7}/C₇/DR_{2,3}.

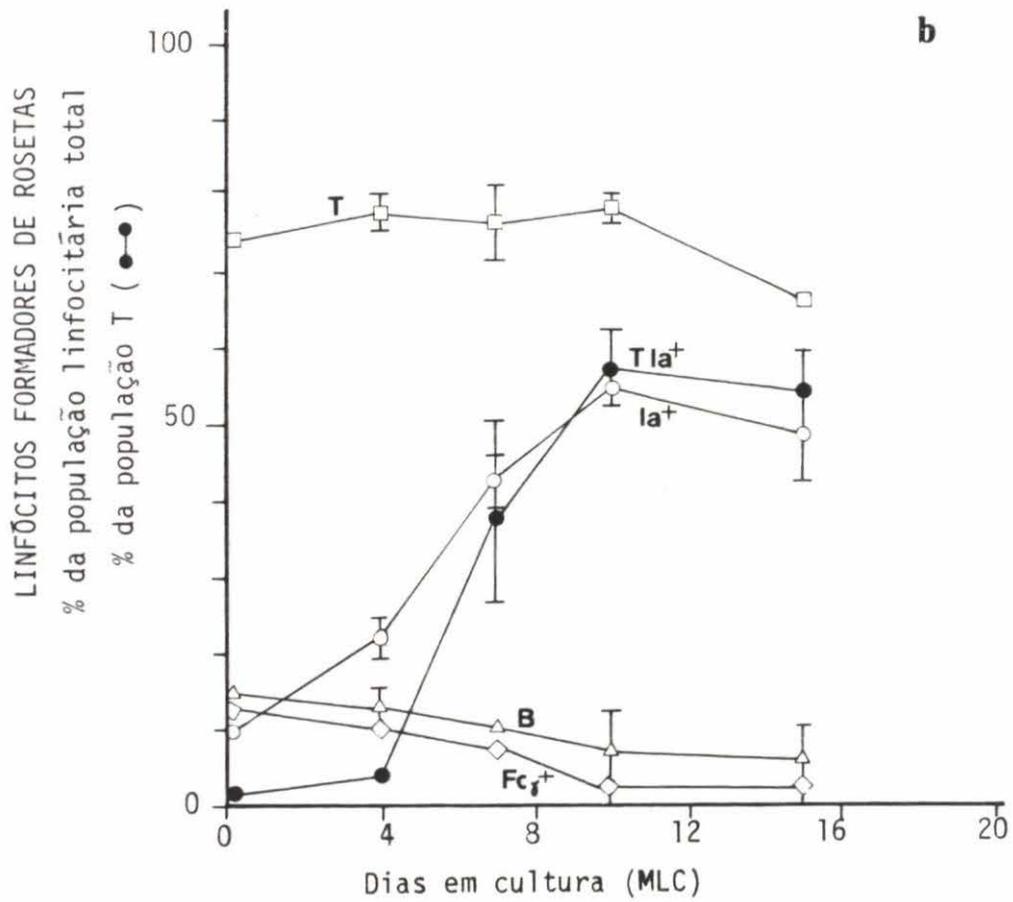
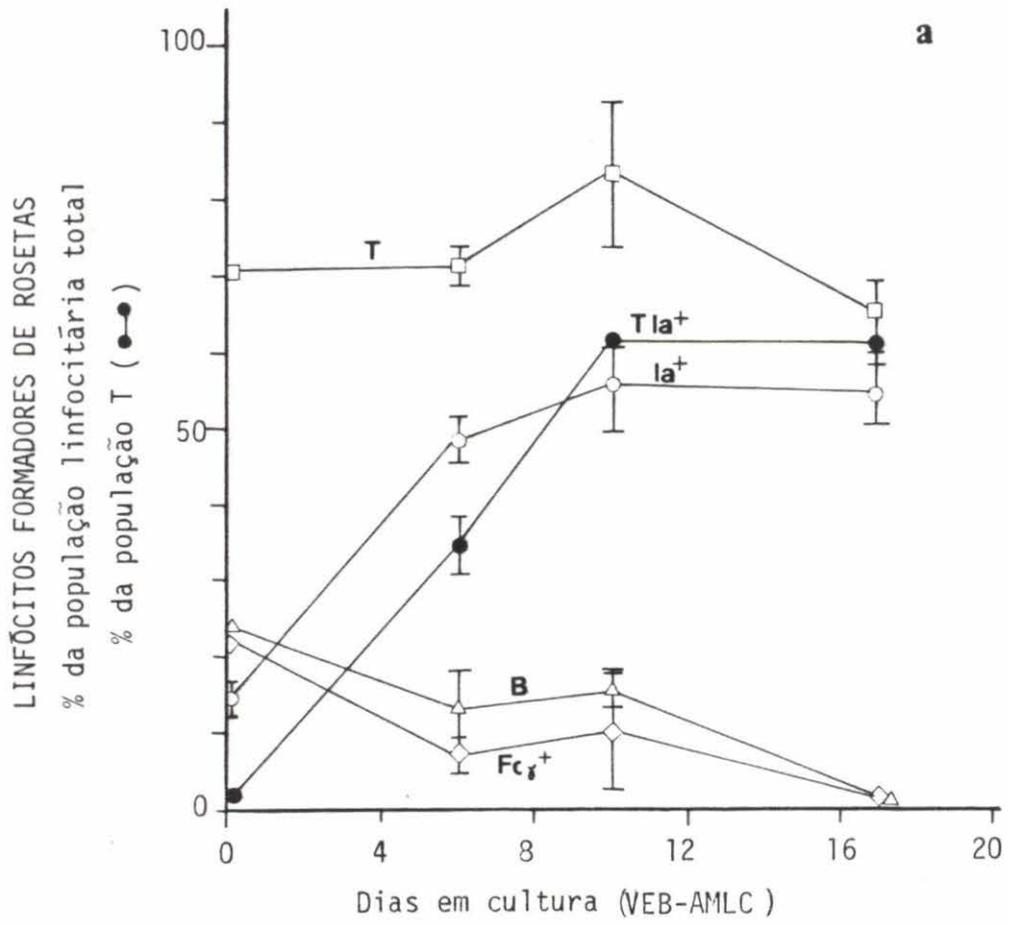


Fig. 3.24

Na verdade, foi no 100º dia que em ambas as culturas celulares detectamos o máximo de células T possuidoras de antígeno Ia: 61% na estimulação por antígeno viral (Fig. 3.24-a) e 57% por aloantígeno (Fig. 3.24-b).

3.b. Relacionamento de elevados níveis de linfócitos TIIa⁺ com infecções por herpesvírus.

Como referimos no início da alínea 3 deste capítulo, ao estudarmos o 3º grupo de doentes que haviam sido submetidos à transplantação cardíaca há mais de 30 dias, detectamos esporádicos picos de linfócitos TIIa⁺ que ocorreram entre o 50º e 60º dia pós-operatório.

Considerando a associação que diversos autores fizeram entre o aumento de linfócitos TIIa⁺ e a infecção por herpesvírus em doentes não imunodeprimidos (Reinherz e col., 1980; Tatsumi e col., 1980; Crawford e col., 1981; Carney e col., 1983) e ainda o facto de o antígeno viral ter causado *in vitro* o desenvolvimento de linfócitos TIIa⁺ (Fig. 3.24-a) decidimos proceder à análise imunoquímica dos soros das mesmas amostras de sangue que obtiveramos para os estudos celulares.

Aqueles soros que haviam sido guardados a -70ºC foram então enviados para o laboratório de Saúde Pública (Public Health Laboratory) do mesmo Hospital onde realizamos o trabalho experimental (Addenbrooke's Hospital). Utilizaram o método de fixação do complemento para detecção de anticorpos contra citomegalovírus (CMV) e contra vírus Herpes simples (VHS), e o teste de imunofluorescência para a detecção de anticor

pos contra o vírus Epstein-Barr (VEB). Considerou-se haver seroconversão quando o título aumentou pelo menos quatro vezes.

Estes dados clínicos bem como os obtidos do próprio Hospital onde se realizaram as operações de transplantação (Papworth Hospital) encontram-se no Quadro X. Exceptuando o doente D-31, podemos observar que a administração de GAT e esteroides se efectuou nos primeiros dias pós-operatórios. Além disso o mesmo Quadro mostra que as datas de seroconversão são independentes das datas de administração de GAT e esteroides ou de transfusão sanguínea.

Assim, as seroconversões do Quadro X indicam que os doentes D-31, D-35 e D-37 sofreram uma infecção primária por CMV seguida de uma reactivação por VEB; os doentes D-34 e D-39 acusaram uma reactivação por CMV, tendo o segundo doente sofrido previamente uma reactivação por VHS.

Na Fig. 3.25 apresentamos as proporções das diversas populações linfocitárias encontradas (i) em indivíduos normais (ver alíneas A.2 e A.3.e deste Capítulo), em (ii) doentes que haviam sofrido enxerto cardíaco a menos de um ano e que não estavam infectados por herpesvírus e em (iii) doentes que haviam feito enxerto cardíaco há menos de um ano mas que estavam infectados por herpesvírus.

Observamos pois que os doentes infectados por herpesvírus possuíam uma população de linfócitos T significativamente menor que os controlos: (i) indivíduos normais e (ii) receptores de enxerto cardíaco, mas não infectados por vírus (Fig. 3.25: 1º grupo de colunas).

Os resultados mostram também que o decréscimo de linfócitos T naqueles doentes infectados por herpesvírus foi acompanhado de um

QUADRO X. Dados clínicos

Doente	DIAS PÓS-OPERATÓRIOS					
	Intravenoso (a)		Transfusão (a) Sanguínea	Seroconversão* (b)		
	GAT	Esteroides		CMV	VEB	V.H.S.
D-31	36-40	36-38 79-81	4,16,38	70	83**	-
D-34	---	10-12 14-16	13,39,88,114	60**	-	-
D-35	11-14 16	11-13 16	12,28,46	56	68**	-
D-37	1-10	25-27	6,57,59,79,137	53	136**	-
D-39	1-11		16,31	120**	-	35**

* Baseado no teste de fixação do complemento para CMV e H.S.

Baseado no teste de imunofluorescência para VEB

* Reactivação

a) Dados fornecidos pelo Papworth Hospital

b) Dados fornecidos pelo "Public Health Laboratory" do Addenbrooke's Hospital

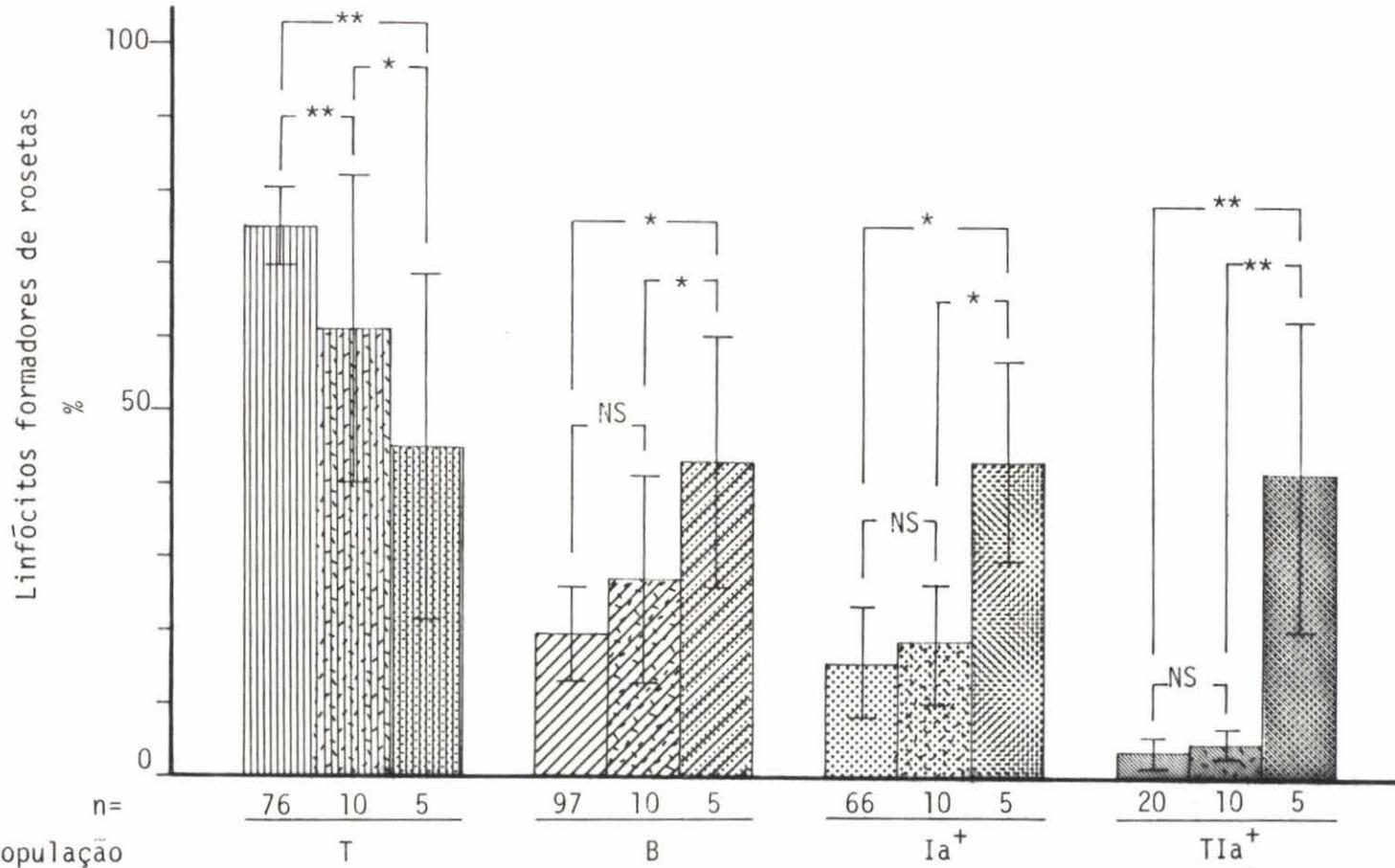


Fig. 3.25 - Comparação entre as médias das diversas populações linfocitárias encontradas em indivíduos normais e em doentes imunodeprimidos mas não infectados por vírus (), e em doentes imunodeprimidos e infectados por herpesvírus ().

Representam-se os desvios-padrão das médias; n = tamanho das amostras.

N.S. As variâncias e as médias não são significativamente diferentes ($P > 0,05$).

* As variâncias são significativamente diferentes ($P < 0,05$) mas as médias não o são ($P > 0,05$).

** As variâncias e as médias são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

NOTA: No caso de as variâncias das amostras serem significativamente diferentes, utilizou-se o adequado teste *t* de Student para comparação de duas médias, em que o valor das variâncias foram ponderadas na determinação do número de graus de liberdade.

proporcional aumento de linfócitos B (Fig. 3.25: 1º e 2º grupo de colunas).

Não se encontraram diferenças significativas entre as médias das populações B, Ia⁺ e TIIa⁺ dos doentes não infectados por herpesvírus e as correspondentes observadas nos indivíduos normais (anotado com NS na Fig. 3.25).

Pelo contrário, os doentes infectados por herpesvírus mostraram um acréscimo significativo de níveis de células B, Ia⁺ e TIIa⁺ comparativamente aos observados quer em indivíduos normais quer em receptores de enxerto cardíaco mas não infectados (Fig. 3.25: 2º, 3º e 4º grupo de colunas).

Note-se que as células TIIa⁺ dos doentes infectados por vírus foram as que mais se destacaram dos respectivos controlos: 41,0[±]21,0% (média [±] DPM) comparado com 3,8[±]3,1% em indivíduos normais e 4,4[±]2,1% em doentes não infectados por vírus (Fig. 3.25: 4º grupo de colunas).

3.c. Estudo da relação de níveis elevados de linfócitos TIIa⁺ e infecções virais, em casos individuais.

Tendo observado na alínea anterior que os doentes infectados por herpesvírus haviam sofrido um acentuado aumento de células TIIa⁺, decidimos apresentar para cada doente o estudo da estimativa de células TIIa⁺ em paralelo com a produção de anticorpos específicos para herpesvírus.

Anticorpos de classes IgM e IgG contra CMV foram determinados pelo método de "ELISA" baseado no de radio-imuno-ensaio descrito por Kangro (1980) (ver alínea B.7.a de "Material e Métodos").

O ensaio de antiglobulina relacionada com infecção (AGRI) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Koritz e col. (1980) (vêr alínea B.7.b. de "Material e Métodos").

A Ig M total foi determinada pelo teste de hemaglutinação passiva e reversiva descrita por Coombs e col. (1978) (vêr alínea B.7.c. de "Material e Métodos").

1) Doente D-31

O elevado pico de linfócitos TIA^+ detectado no doente D-31 nos dias 50-78 pós-operatórios (Fig. 3.26-b) precedeu o aumento dos títulos de anticorpos de classes IgM e IgG contra CMV (Fig. 3.26-a).

A administração de prednisolona ao doente nos dias 78-81 (vêr seta na Fig. 3.26-b) causou um decréscimo acentuado das células TIA^+ de 42% no dia 78 para 5% no dia 81.

Aquela droga causou também uma diminuição muito significativa da concentração de linfócitos TIA^+ : de 45×10^4 células/ml de sangue (dia 78) para $1,5 \times 10^4$ /ml (dia 81). No mesmo período de tempo a concentração de células T baixou de $1,01 \times 10^6$ /ml para $0,33 \times 10^6$ /ml e a de linfócitos totais de $1,69 \times 10^6$ /ml para $0,74 \times 10^6$ /ml de sangue.

O tratamento de prednisolona não afectou, no entanto, os níveis de anticorpos contra CMV (Fig. 3.26-a).

A reactivação por VEB detectada no 83º dia foi acompanhada de uma elevação de células TIA^+ que consistiu em 20% dos linfócitos T, não chegando portanto a atingir os níveis obtidos aquando da infecção por CMV (Fig. 3.26). Este reduzido pico poderá ser atribuído à acção

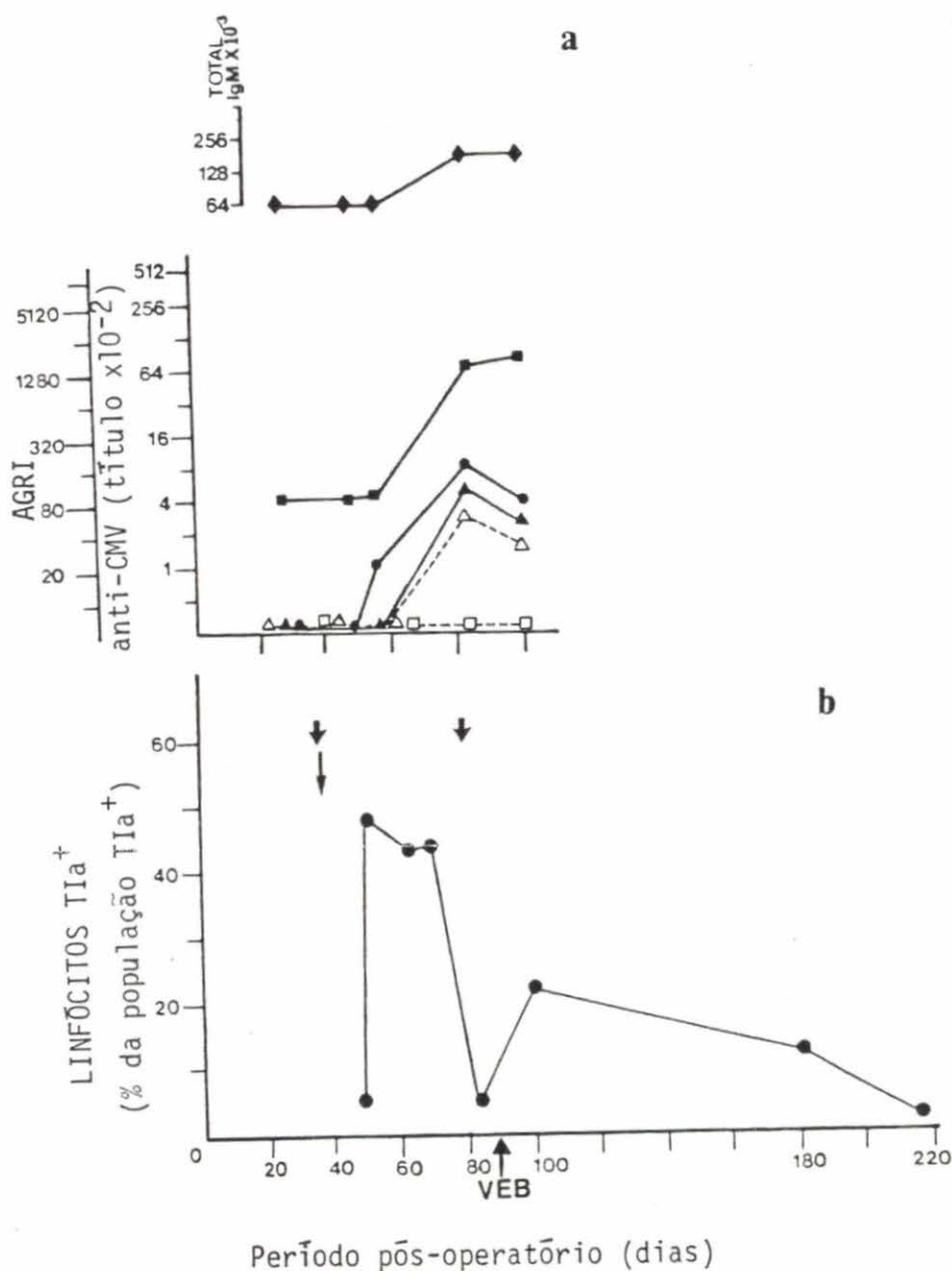


Fig. 3.26 - Comparação de testes seriados, no doente D-31, mostrando a percentagem de células TIIa⁺ (b) e títulos de anticorpos (a) de classes IgM (▲-▲) e IgG (■-■) contra CMV e de AGRI (●-●). Símbolos adertos: controlos com antigénio.
 ↓ - Administração de esteróides.
 ↓ - Transfusão sanguínea.

ainda efectiva de vestígios da prednisolona administrada nos dias anteriores (dias 78 a 81).

O facto de, por um lado, termos detectado antes da infecção viral reduzidos níveis de (i) anticorpos contra CMV (título $<8^*$), (ii) anticorpos de classe IgG contra CMV (título 400) e (iii) de classe IgM contra CMV (título 0), e por outro lado, termos observado durante infecção viral uma elevação da produção de: (i) anticorpos IgG (título: 400 a 6400), (ii) anticorpos IgM (título 0 a 400) ambos específicos para CMV, bem como (iii) IgM total (título: 64×10^3 a 192×10^3) e (iv) AGRI (título: 0 a 160) (Fig. 3.26-a) podemos concluir que ocorreu no doente D-31 uma infecção *primária* por CMV.

2) Doente D-37

O doente D-37, tal como o doente D-31, apresentou elevados picos de linfócitos TIA^+ (Fig. 3.27-b) que precederam o aumento de anticorpos de classes IgM e IgG contra CMV (Fig. 3.27-a)

Neste doente não se administraram drogas imunodepressivas durante a ocorrência dos picos de linfócitos TIA^+ , mas as transfusões sanguíneas efectuadas nos dias 57, 59, 79 e 137 (ver Quadro X) parecem estar relacionados com a redução temporária da população TIA^+ (ver setas na Fig. 3.27-b).

As transfusões sanguíneas não afectaram, no entanto, os níveis de anticorpos contra CMV (Fig. 3.27-a).

* Resultado não apresentado.

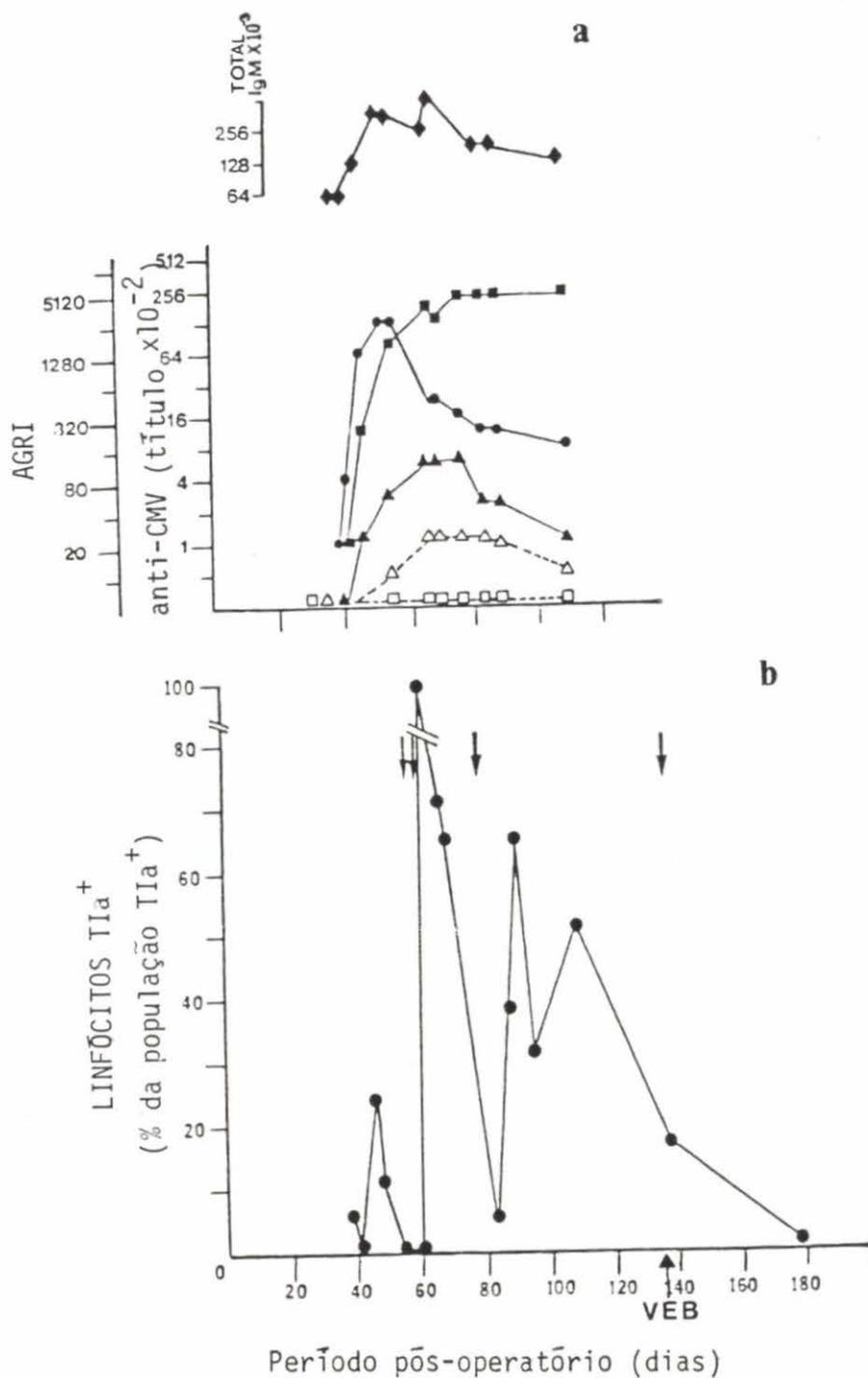


Fig. 3.27 - Comparação de testes seriados, no doente D-37, mostrando a percentagem de células TIIa⁺ (b) e títulos de anticorpos (a) de classes IgM (▲▲) e IgG (■■) contra CMV e de AGRI (●●). Símbolos abertos: controlos com antígeno. ↓ - Transfusão sanguínea.

Embora se tenha detectado no doente D-37 uma reactivação por VEB no dia 136, esta não foi observada em termos de aumento de células TIa^+ muito provavelmente por se lhe ter efectuado uma transfusão sanguínea (Fig. 3.27-b).

Consideramos que este doente possa ter sofrido uma infecção primária por CMV porque, tal como o doente D-31, antes da infecção viral possuía reduzidos níveis de: (i) anticorpos contra CMV (título $<8^*$), (ii) anticorpos de classe IgG contra CMV (título 100) e (iii) de classe IgM contra CMV (título 0) e durante infecção viral observou-se elevação da produção de: (i) anticorpos IgG (título 100 a 12800), (ii) anticorpos IgM (título 0 a 400) ambos específicos para CMV, bem como (iii) IgM total (título: 64×10^3 a 512×10^3) e (iv) AGRI (título: 20 a 2560) (Fig. 3.27-a).

3) Doente D-35

No doente D-35 observamos apenas um modesto pico de linfócitos TIa^+ antecedendo a produção de anticorpos contra CMV (Fig. 3.28). Pensamos que as transfusões sanguíneas recebidas por este doente nos dias 28 e 46 (Quadro X) possam ter dificultado a estimativa da população TIa^+ .

Detectou-se reactivação por VEB 8 dias depois da infecção por CMV mas o aumento de linfócitos TIa^+ não foi muito evidente (Fig. 3.28-b).

Antes da seroconversão de CMV observamos reduzidos níveis de:

* Resultado não apresentado.

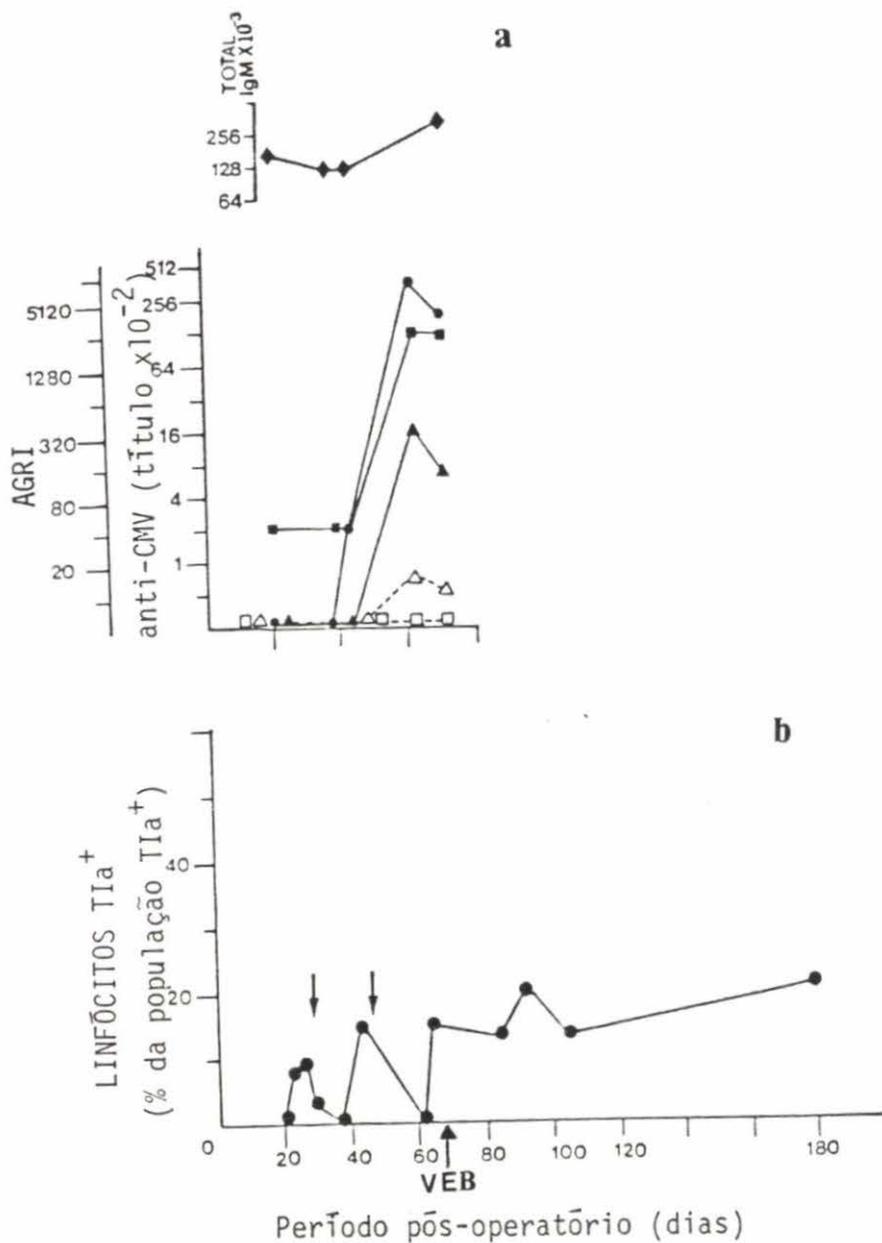


Fig. 3.28 - Comparação de testes seriados, no doente D-35, mostrando a percentagem de células TIA⁺ (b) e títulos de anticorpos (a) de classes IgM (▲▲) e IgG (■■) contra CMV e de AGRI (●●). Símbolos abertos: controlos com antigénio. ↓ - Transfusão sanguínea.

(i) anticorpos contra CMV (título $<8^*$), (ii) anticorpos de classe IgG contra CMV (título 200) e anticorpos de classe IgM contra CMV (título 0) (Fig. 3.28-a). Durante infecção viral detectamos um aumento da produção de: (i) anticorpos IgG (título: 200 a 12800), (ii) anticorpos IgM (título: 0 a 1600) ambos específicos para CMV, bem como (iii) IgM total (título: 128 a 256) e (iv) AGRI (título: 0 a 5120) (Fig. 3.28-a).

Tal como concluímos para os doentes D-31 e D-37, admitimos ter havido no doente D-35 uma infecção primária por CMV.

4) Doente D-34

Embora se tenha detectado uma forte resposta de anticorpos de classe IgG contra CMV, não observamos no doente D-34 qualquer pico de células $T1a^+$ (Fig. 3.29).

Este doente não apresentou infecção por VEB e a infecção por CMV parece ter sido uma *reactivação*.

Na verdade, antes da infecção viral o doente possuía elevados níveis de: (i) anticorpos contra CMV (título $>32^*$) e (ii) anticorpos de classe IgG contra CMV (título 1200); e durante infecção viral apenas se detectou produção de anticorpos específicos de classe IgG (título: 1200 a 51.200) pois que anticorpos IgM contra CMV apresentaram um reduzido aumento (título: 0 a 100) e a IgM total bem como a AGRI não mostraram qualquer incremento (Fig. 3.29-a).

* Resultado não apresentado.

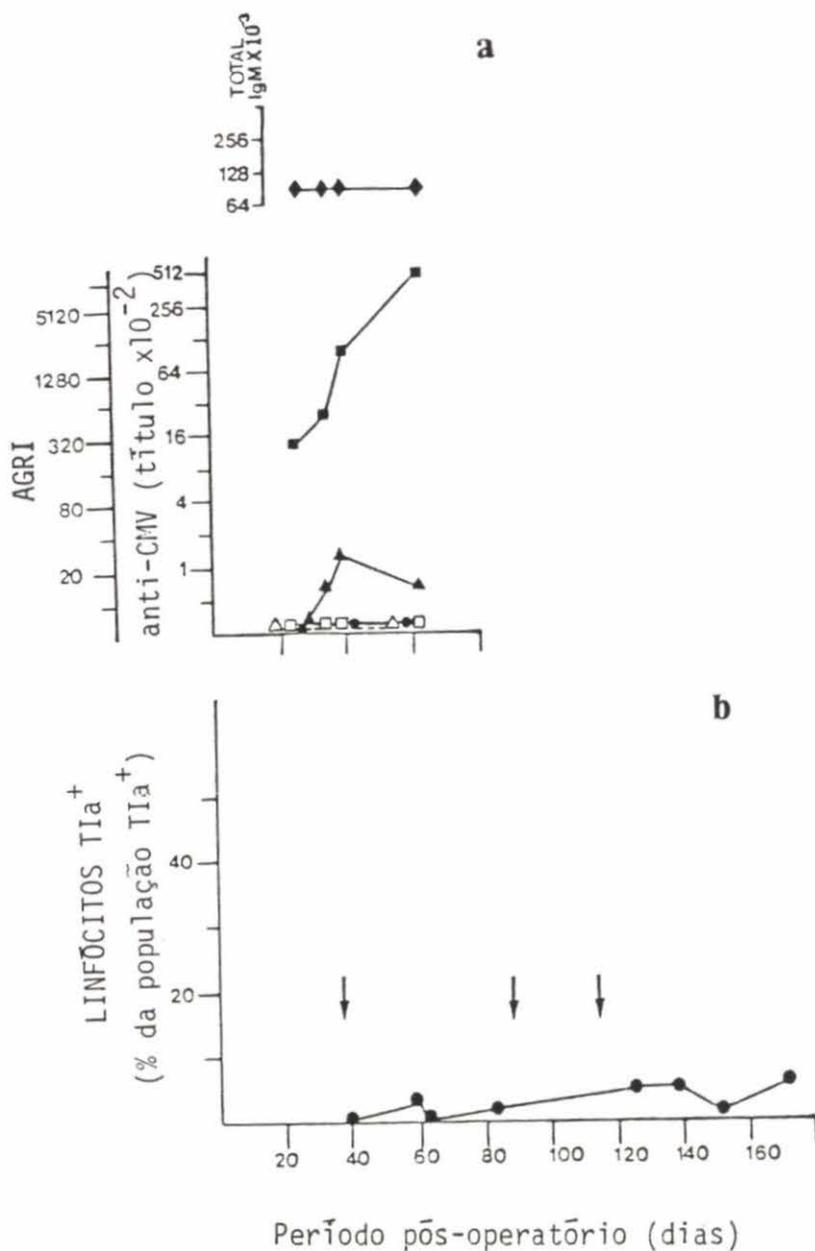


Fig. 3.29 - Comparação de testes seriados, no doente D-34, mostrando a percentagem de células TIIa⁺ (b) e títulos de anticorpos (a) de classes IgM (▲▲) e IgG (■■) contra CMV e de AGRI (●●). Símbolos abertos: controlos com antígeno. ↓ - Transfusão sanguínea.

5) Doente D-39

Relacionamos o pico de linfócitos T_{Ia}^+ do doente D-39 com a infecção por vírus herpes simples (VHS) e não por CMV (Fig. 3.30).

De facto, não detectamos qualquer variação na produção de anticorpos contra CMV quer de classe IgG quer de classe IgM, nem na formação de AGRI (Fig. 3.29-a). A detecção de anticorpos de classe IgG contra CMV (título: 1600) sugere que o doente D-39 sofrera antes da presente análise serológica uma infecção por CMV.

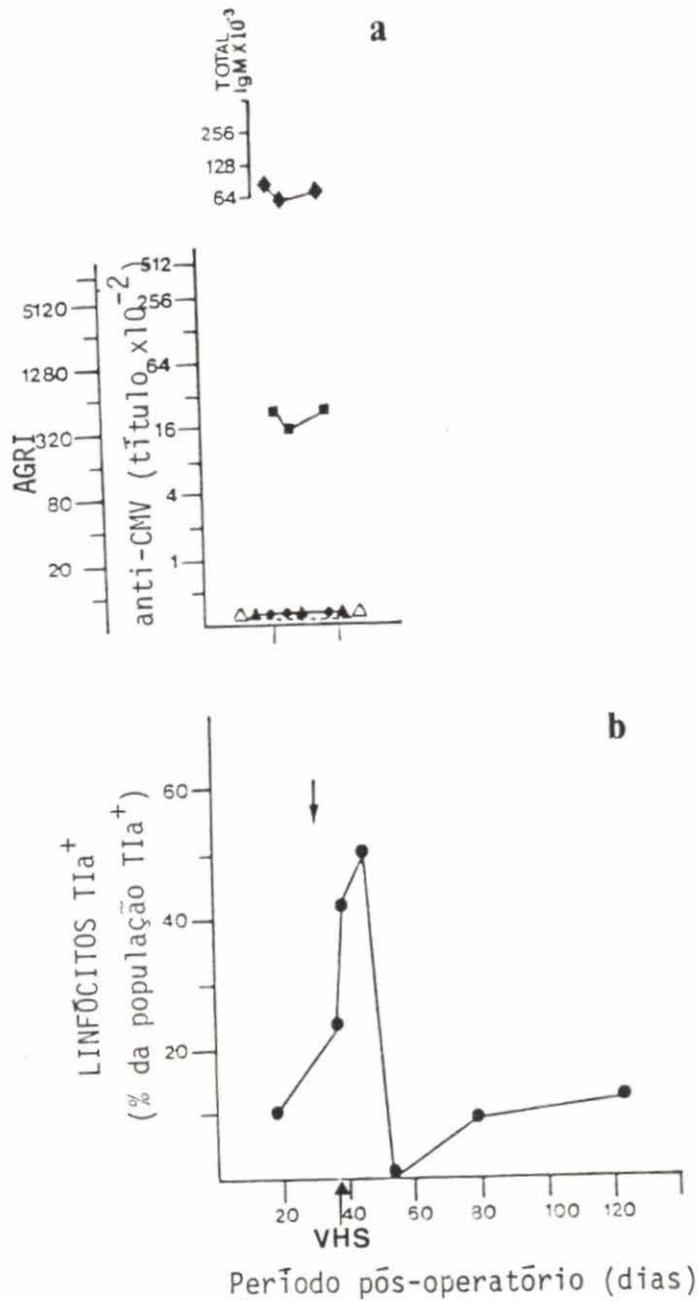


Fig. 3.30 - Comparação de testes seriados, no doente D-39, mostrando a percentagem de células TIIa⁺ (b) e títulos de anticorpos (a) de classes IgM (▲—▲) e IgG (■—■) contra CMV e de AGRI (●—●). Símbolos abertos: controlos com antígeno. ↓ - Transfusão sanguínea.

C A P Í T U L O I V

- DISCUSSÃO -

IV. DISCUSSÃO

Os linfócitos do sangue humano têm sido compartimentados em diversas populações linfocitárias de acordo com a presença de determinadas estruturas celulares na membrana plasmática (i.e., imunoglobulina; *receptores*: (i) de complemento, (ii) da porção Fc da imunoglobulinas e (iii) de eritrócitos de carneiro; e *antigénios* tal como os detectados: (i) em todos os linfócitos T, (ii) nos linfócitos T auxiliares e (iii) nos linfócitos T supressores) e ainda pelas suas capacidades funcionais demonstradas *in vitro* (i.e., activação linfocitária por mitogéneos e aloantigénios, linfólise mediada por célula, citotoxicidade celular dependente de anticorpo e actividade celular NK, "natural killer" (para revisão vêr Hokland, 1981).

No presente estudo utilizámos reacções de roseta para detectar as populações linfocitárias. A reacção de roseta antiglobulina directa (RRAD) permitiu identificar os linfócitos B, i.e., as células possuidoras de imunoglobulina de superfície membranar (IgSm). A reacção de roseta anti-determinante directa (RRADd) foi utilizada para identificar não sô os linfócitos T (i.e., as células possuidoras do antigénio detectado pelo anticorpo monoclonal YTH 12.5) mas também os linfócitos Ia⁺ (i.e., as células portadoras do antigénio monomórfico codificado pelo sistema HLA-DR, detectado pelo anticorpo monoclonal YCL 6.8) e os linfócitos C_k⁺ (i.e., as células possuidoras da cadeia leve K da imunoglobulina, detectada por um anticorpo monoclonal específico). Os linfócitos possuidores de receptores para a porção Fc da IgG (RFc_Y⁺) foram identificados pela reacção de roseta EA, utilizando eritrócitos recobertos por IgG específica.

As reacções eram simples de realizar e pouco dispendiosas. Foi,

no entanto, necessário prestar atenção a pequenos pormenores de ordem técnica, incluindo nomeadamente: (i) a preparação dos eritrócitos para suporte dos anticorpos, (ii) as condições do anticorpo (concentração, diluente) usado na reacção de conjugação aos eritrócitos e (iii) realização da reacção de roseta. Uma vez atingidas as condições óptimas de reacção, então o método apresentava-se dotado de elevada sensibilidade e de grande facilidade de repetição experimental.

O aperfeiçoamento das condições para a execução das reacções de roseta encontra-se descrito na nossa tese de "Master of Science" (Carvalho, 1983). Naquela dissertação evidenciamos também a semelhança de resultados obtidos pelos dois métodos de marcação dupla: destituição celular e reacção de roseta mista (RRM). Além de ser um método simples, rápido e directo, a RRM utiliza pequenas quantidades de linfócitos ($\sim 0,5 \times 10^6$) pelo que se apresentou extremamente útil para a delimitação de subpopulações duplamente marcadas em doentes sob tratamento imunodepressor, uma vez que nestes doentes a recolha linfocitária era muito baixa ($0,08 - 0,6 \times 10^6$ células/ml de sangue).

A. POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM DADORES SAUDÁVEIS

1. A população B

Neste estudo identificámos os linfócitos B pelo método de RRAD que é mais sensível que o da imunofluorescência directa (IFD), podendo detectar a IgSm distribuída em menor densidade na superfície celular (Haegert, 1978 a,b; Haegert e col., 1978; Binns e col., 1979). Desse modo, a população B definida pela RRAD é heterogênea, incluindo tanto os linfócitos possuidores de densa IgSm como os portadores de reduzida concentração de IgSm, ou seja, inclui não só as células ti-

picamente B (IFD⁺) mas também as células IFD⁻RRAD⁺, respectivamente.

Tem sido sugerido que os linfócitos com IgSm pouco densa, formam a população L (L de "labile" do inglês, instável) possuindo IgG citofílica adsorvida pelos seus receptores Fc de elevada avidéz (Horwitz & Lobo, 1975; Lobo & Horwitz, 1976). Estas células possuem elevada actividade lítica (actividade de células K) e não são estimuladas pelo mitogénio pokeweed, PWM (Horwitz & Garrett, 1977). Lobo e col. (1975) referem ainda que a Ig adsorvida é rapidamente libertada ao fim de 1 hora de incubação dos linfócitos a 37°C, pois que observaram uma redução da quantidade de linfócitos corados por fluoresceína no teste IFD. Pelo contrário, Haegert e col. (1978) mostraram que não há redução do número de linfócitos formadores de roseta no teste RRAD mesmo após a referida incubação que supostamente causa a eluição da Ig citofílica.

Com vista a clarificar a questão de todos os linfócitos RRAD⁺ (de IgSm em alta e baixa densidade) (i) serem ou não verdadeiras células B (produtoras da sua própria IgSm) ou (ii) se porventura estariam também incluídas células L, resolvemos testar os linfócitos para dois marcadores simultaneamente. Assim, usámos o anticorpo sérico anti-Fab e o AcMc anti-cadeia leve K, no teste RRM. Três situações eram de esperar: (i) o AcMc α -C_k podia reagir com cerca de 2/3 da totalidade de células IgSm⁺, o que indicaria que as células definidas pela RRAD eram verdadeiras células B; (ii) contudo, se mais de 2/3 das células IgSm⁺ fossem C_k⁺, então o AcMc α -C_k teria detectado não só os linfócitos B mas também todos os linfócitos portadores de Ig citofílica; (iii) finalmente as células C_k⁺ poderiam apresentar-se em menor proporção que os 2/3 da totalidade das células IgSm⁺,

sugerindo que o AcMc não estaria a ser utilizado nas suas óptimas condições de reacção.

No nosso estudo o AcMc α -C_k foi utilizado em condições saturantes e por conseguinte a última situação acima referida não se aplica. De facto, os resultados mostraram que o AcMc reagiu com 2/3 da totalidade de células IgSm⁺ (Quadro I e Fig. 3.3) sugerindo que todas as células IgSm⁺ detectadas pela RRAD eram linfócitos B sintetizadores e expressores de Ig: 2/3 de cadeia K e 1/3 de cadeia λ . Infelizmente não nos foi possível adquirir um AcMc, ou um anti-soro, contra a cadeia leve λ para ser usado na situação complementar \bar{a} do AcMc anti-C_k.

Na verdade se parte das células RRAD⁺ fossem linfócitos portadores de Ig citofílica, então o AcMc α -C_k reagiria com *todas* estas células porque elas adsorveriam de forma não específica tanto as moléculas de cadeia K como as de cadeia λ e por conseguinte a proporção de células C_k⁺ seria superior aos 2/3 das células IgSm⁺.

Em conclusão, este estudo sugere que nas nossas condições experimentais, as células formadoras de roseta no teste RRAD eram linfócitos B que expressavam a sua própria Ig sintetizada.

Não podemos deixar de fazer notar que tanto nas experiências realizadas por Haegert e col. (1978) como no nosso trabalho, os linfócitos foram isolados dos monócitos por tratamento de penta-carbonilo de ferro (incubação a 37°C, durante 30 min) enquanto que Horwitz & Lobo (1975), Lobo e col. (1975) e Lobo & Horwitz (1976) utilizaram suspensões de células mononucleares onde se encontravam também monócitos que eram identificados por microscopia de contraste de fase. Ora é do conhecimento geral que os monócitos possuem receptores de Fc de elevada avidéz e que a sua distinção relativamente aos linfócitos em micros

copia óptica é de veras difícil. Apresenta-se-nos pois admissível que o decréscimo de células fluorescentes, de 32% para 9%, observado por Lobo e col. (1975) fosse devido à eluição da Ig adsorvida por *monócitos*.

Num artigo recente de Wilson e col. (1984) sugere-se que a técnica de RRAD detecta a Ig inata dos linfócitos B e também a Ig citofílica passivamente adsorvida. Esta conclusão foi tirada do facto de observarem uma queda do número de células IgSm⁺ após 3 horas de incubação dos linfócitos a 37°C. Naquele artigo compararam também diversos procedimentos para isolamento dos linfócitos e em qualquer dos casos encontraram mais células IgSm⁺ do que a soma das células C_k⁺ e C_λ⁺, resultados estes que não comentam nem discutem. A única diferença entre a técnica de Wilson e col. (1984) e a nossa reside no anticorpo utilizado para identificar os linfócitos IgSm⁺: o de Wilson e col. foi o T379/4 e o nosso o Z668F, ambos produzidos em Carneiro, no mesmo laboratório. O excesso de células IgSm⁺ que Wilson e col. (1984) encontraram pode ser atribuído à possibilidade de o anticorpo T379/4 ou fazer reacção cruzada ou estar contaminado por anticorpos que reajam com determinantes antigénicos diferentes da IgSm.

Contrastando também com os resultados de Wilson e col. (1984), Pepys e col. (1981) descrevem que a soma de células C_k⁺ (15.5%) e C_λ⁺ (7,9%) é igual ao número de células marcadas (i) quando ambos os marcadores de células C_k e C_λ são utilizados simultaneamente (isto é, as células apresentam ou a cadeia K ou a cadeia λ, de forma exclusiva) (ii) ou quando um anticorpo convencional contra Ig é utilizado. Pepys e col. (1981) utilizaram um imuno-ensaio de elevada sensibilidade em que F(ab')₂ contra Ig humana era marcada pela fosfatase alcalina a fim de detectar as células IgSm⁺; para aumentar a sensibilidade

de do teste adicionaram ao meio de incubação dos linfócitos complexos de fosfatase alcalina e $F(ab')_2$ anti-fosfatase alcalina.

O presente estudo apoia as observações de Pepys e col. (1981) sugerindo que os linfócitos B detectados por métodos muito sensíveis possuem IgSm estrutural e não Ig passivamente adsorvida. Aqueles autores também confirmam a heterogeneidade dos linfócitos B anteriormente descrita por Haegert & Coombs (1979): (i) células "B-major" (IFD^+) facilmente detectadas (ii) e células "B-minor" ($IFD^-/RRAD^+/$ imuno-ensaio⁺) apenas detectadas por técnicas muito sensíveis.

2. A população T

Os nossos estudos mostraram que quer as rosetas-E quer a RRAD, utilizando o anticorpo monoclonal YTH 12.5, definiram a mesma população linfocitária, a população T (Fig. 3.1). O AcMc YTH 12.5 bloqueia a ligação do AcMc OKT3, sugerindo que ambos reconhecem o mesmo determinante antigénico, a molécula T3 (Cobbold & Waldmann, 1984). O AcMc OKT3 é um marcador dos linfócitos T do sangue humano periférico (Reinherz e col. 1979-a) e reage com um polipeptídeo de 20 KD (Reinherz e col., 1983), peptídeo este que provavelmente não se encontra associado ao receptor para eritrócitos de Carneiro existente nos linfócitos T humanos (Verbi e col., 1982) pois não inibe (nem o AcMc YTH 12.5 inibe; Carvalho, 1983) a formação de roseta E.

Diversos anticorpos monoclonais têm sido utilizados para clarificar a natureza do receptor para eritrócitos de Carneiro existente nos linfócitos T humanos. Dos vários AcMc da série OKT contra antígenos da superfície externa da membrana dos linfócitos T, apenas o AcMc OKT 11 bloqueia a formação de roseta E e se liga a um poli-

peptídeo de aproximadamente 50 KD (Verbi e col., 1982). Da série de AcMc Leu sô o Leu-5 inibe a reacção de roseta E e também este se liga a um polipeptídeo de 40 a 50 KD (Howard e col., 1981). O AcMc anti-D66 também inibe a formação de roseta E e liga-se a um polipeptídeo de 50 KD (Bernard e col., 1982). Estes resultados indicam que o polipeptídeo de 50 KD está intimamente associado ao receptor para eritrócitos de Carneiro existente nos linfócitos T humanos.

3. Interrelação das populações B e T

A delineação das populações B e T obtida por métodos de reacção de roseta (usando imunoglobulina anti-Fab e o AcMc YTH 12.5, respectivamente) desenhou quatro fenótipos diferentes: (i) células B (B^+T^-), representando $12,1 \pm 5,1\%$ da totalidade dos linfócitos sanguíneos; (ii) células duplamente marcadas (B^+T^+), correspondendo a $4,4 \pm 3,2\%$ dos linfócitos totais; (iii) células T (B^-T^+), sendo $72,0 \pm 8,4\%$ de todos os linfócitos; e (iv) células nulas ("Null cells") (B^-T^-), representando $11,5 \pm 10,0\%$ dos linfócitos sanguíneos (Quadro II e Fig. 3.3).

Tanto a destituição de uma população como a reacção de roseta mista indicaram que as células B e T não formavam populações completamente distintas, com antígenos diferenciais expressos separadamente. Pelo contrário, parece delinear-se um espectro compreendendo numa extremidade células possuidoras de IgSm em elevada densidade (B^+T^-), depois células com menor concentração de IgSm e expressando também o antígeno T (B^+T^+), de seguida células possuidoras do antígeno T mas sem IgSm (B^-T^+) e na outra extremidade células sem apresentarem marcadores B e T detectáveis (B^-T^-). É de admitir-se que possam ocorrer vários níveis de densidade de IgSm e do an-

tigênio T e assim a sua detecção como células B ou T, respectivamente, esteja dependente da sensibilidade do método usado.

Idêntico espectro foi sugerido por Hokland (1981) no qual se encontram células com grande quantidade de IgSm numa extremidade, e na outra células com elevada avidéz para a formação de rosetas E e sem possuírem IgSm detectável; no meio deste espectro encontram-se as células possuidoras de ambos os marcadores celulares (B^+E^+), cuja proporção pode ser aumentada pela exposição dos receptores E escondidos nas células B ao tratarem-se os linfócitos com neuraminidase (Bentwich e col., 1973-b), com fosfolipase A (Hanaumi e col., 1976) ou com proteínas básicas (Hokland e col., 1981).

Poder-se-ia argumentar que a subpopulação duplamente marcada (B^+T^+) não seja mais do que uma proporção de células T fixando Ig do soro pelos seus receptores Fc. Contudo o presente estudo com o AcMc contra a cadeia leve K indicou que o fenômeno de fixação de Ig citofílica, nas nossas condições experimentais, não ocorreu. Na verdade observamos que as células C_k^+ representavam 2/3 não só da totalidade dos linfócitos B (Quadro I e Fig. 3.3) como também das células B^+T^+ (Quadros II e III e Fig. 3.3).

A subpopulação B^-T^- , que tem sido amplamente referida como "população nula" (primeiramente descrita por Fröland & Natvig, 1973) ou "terceira população" (Ferrarini e col., 1980) representou, nas nossas observações, $11,5 \pm 10,0\%$ da população linfocitária total. Contudo alguns investigadores (Haegert e col., 1978; Pepys e col., 1981) não encontraram tal população. Na verdade nós observamos uma enorme variação na proporção desta subpopulação B^-T^- , de 0,0% até 34,0% com média \pm DPM de $11,5 \pm 10,0\%$ (Quadro II), de entre os indivíduos

estudados. Por conseguinte os nossos resultados indicam que a controvérsia relativa à existência ou não existência da população nula não é devido ao método utilizado na sua detecção mas é essencialmente dependente do dador linfocitário.

4. A população Ia^+

As moléculas Ia são codificadas pelos genes Ir e foram primeiramente caracterizadas no Rato. As estruturas humanas correspondentes fazem parte do complexo de histocompatibilidade maior, HLA, e designam-se por antigénios "Ia-like" ou de Classe II (Schlossman e col., 1976). Os antigénios "Ia-like" ou simplesmente antigénios Ia, estão relacionados com o reconhecimento celular do antigénio (Puri & Lonai, 1980) e intervêm em interacções celulares tal como na função T auxiliar em que as células $OKT4^+$ se ligam aos antigénios Ia presentes nas células alvo (Reinherz e col., 1983). A molécula Ia é constituída por duas subunidades polipeptídicas (cadeia α de 34 KD e cadeia β de 29 KD) que não se encontram ligadas por pontes dissulfurosas (Billing e col., 1976; Springer e col., 1977) e possuem ácidos glicosídicos à superfície celular (Lloyd e col., 1981).

Tem-se observado moléculas Ia na superfície de linfócitos B, monócitos e numa subpopulação de células nulas (Winchester e col., 1975-a; Humphreys e col., 1976; Winchester e col., 1976; Schlossman e col., 1976).

Utilizando métodos de marcação dupla observámos que a maioria (mas não todas) das células Ia^+ ($68,78 \pm 17,35\%$, Quadro IV e Fig. 3.9) se incluíam na população B. Verificámos também que $21,03 \pm 12,3\%$ (Quadro V e Fig. 3.9) das células Ia^+ eram linfócitos T. Os resultados in

dicam que s̄o $51,79 \pm 25,70\%$ (Quadro IV e Fig. 3.7) dos linf̄ocitos B expressavam o antiḡenio Ia⁺ e que $4,12 \pm 2,36\%$ dos linf̄ocitos T possuíam detectáveis moléculas Ia (Quadro V e Fig. 3.8).

Embora tivéssemos encontrado idênticas proporções de linf̄ocitos B (IgSm⁺) e linf̄ocitos Ia⁺ ($19,4 \pm 6,4\%$ e $15,6 \pm 7,6\%$, respectivamente, Fig. 3.2) os estudos de marcação dupla mostraram que a presença do antiḡenio Ia por si s̄o, na membrana celular, não pode ser usado como marcador específico de linf̄ocitos B.

Tem sido descrito que linf̄ocitos T activados, quer *in vitro* quer *in vivo*, expressam o antiḡenio Ia (Fu e col., 1978; Evans e col., 1978; Ko e col., 1979; Charron e col., 1979). A presença do antiḡenio Ia nos linf̄ocitos T em repouso tem sido tema de grande controvérsia. Alguns autores negam ter encontrado tal subpopulação T Ia⁺ quer utilizando anti-soros heterólogos policlonais seguido de ensaio de citotoxicidade com ⁵¹Cr (Evans e col., 1978) quer utilizando anticorpos monoclonais e "FACS" ("Fluorescence Activated Cell Sorter") (Reinherz e col., 1979-b). Pelo contrário, outros investigadores (Albrechtsen e col., 1977; Fu e col., 1978; Yu e col., 1980; Schuurman e col., 1980), utilizando anti-soros heterólogos policlonais e imunofluorescência indirecta observaram cerca de 4-10% de linf̄ocitos T expressando antiḡenios Ia. Em todos estes estudos o marcador de células Ia⁺ foi aplicado à população de linf̄ocitos T previamente isolada. No nosso trabalho realizamos a técnica de marcação dupla e simultânea, a RRM, tendo verificado que $4,12 \pm 2,36\%$ dos linf̄ocitos T em repouso possuíam o antiḡenio Ia (Quadro V e Fig. 3.8).

O número de linf̄ocitos T expressando o antiḡenio Ia aumenta

para 40-70% após estimulação *in vitro* ou *in vivo* (Fu e col., 1978; Evans e col., 1978; Charron e col., 1979; Ko e col., 1979), indicando activação celular. Idênticas elevações de células $TIIa^+$ foram observadas no presente estudo, quer em experiências *in vitro*: (i) estimulação mitogênica (por PHA e GAT) (Fig. 3.22), (ii) cultura de linfócitos mista (MLC) (Fig 3.24), e (iii) MLC com linfócitos autólogos transformados por vírus Epstein-Barr (Fig. 3.24); quer em estudos *in vivo*: durante infecção viral em doentes imunodeprimidos após transplantação cardíaca (Fig. 3.27 a 3.30). Estes resultados serão discutidos na seção B deste Capítulo.

5. A população RFc_{γ}^+

Trabalhos iniciais sobre a distribuição de receptores Fc_{γ} pelas populações linfocitárias indicavam que apenas os linfócitos B possuíam tais receptores (Cline e col., 1972; Jondal, 1974). Outros (Brown & Greaves, 1974), registaram que apenas a maioria dos linfócitos B expressava tal receptor. Mais recentemente Samaru e col. (1976) e Hokland e col., (1978) registaram ainda menores proporções dos linfócitos B com RFc_{γ} . Numa tentativa de determinarem a proporção de linfócitos com ambos os marcadores, Gergely e col., (1977) utilizaram marcação dupla: (i) anti-soro fluorescente contra Ig humana (para marcação de células B) e (ii) complexos de eritrócito-anticorpo EA, (para marcação de células RFc_{γ}^+ ; a reduzida percentagem de células B (11%) portadoras de receptores Fc_{γ} foi atribuída a uma possível interferência do soro anti-Ig na reacção de roseta EA.

Para determinarmos a proporção de linfócitos B possuidores de receptores Fc_{γ} e de IgSm utilizamos também um sistema de marcação dupla: (i) eritrócitos fluorescentes de Boi foram conjugados com anti-

-Ig (marcador de células B) e (ii) eritrócitos não fluorescentes de Boi foram sensibilizados com Ig anti-eritrócito de Boi (marcador de células RFc_γ^+); ambos os eritrócitos indicadores foram levados a reagir simultaneamente com os linfócitos na RRM. Como os reagentes não faziam reacção cruzada puderam ser utilizados conjuntamente sem causarem interferência na capacidade dos linfócitos formarem as rosetas. O nosso estudo mostrou que $74,33 \pm 13,00\%$ dos linfócitos B possuíam receptores para a porção Fc da IgG (Quadro VI e Fig. 3.7).

Além disso, a RRM entre os marcadores de células T e de células RFc_γ^+ mostrou que $4,6 \pm 2,4\%$ dos linfócitos totais eram TFc_γ^+ e que $6,10 \pm 3,09\%$ das células T possuíam receptores Fc_γ (Quadro VII e Fig. 3.8). Estes resultados confirmam as observações de uma pequena subpopulação de células TFc_γ^+ descritas por Hallberg e col. (1973), Brown e Greaves (1974) e Dickler e col. (1974).

Os linfócitos $\text{RFc}_\gamma^+ \text{Ia}^+$ representaram $14,4 \pm 4,4\%$ da população linfocitária total, correspondendo a $52,60 \pm 7,25\%$ de linfócitos Ia^+ possuidores de RFc_γ (Quadro VIII e Fig. 3.9) e a $67,24 \pm 17,28\%$ dos linfócitos RFc_γ^+ portadores do antigénio Ia (Quadro VIII e Fig. 3.10).

Embora 14% dos linfócitos totais possuam receptores Fc_γ e antigénios Ia (Quadro VIII e Fig. 3.9), estas duas estruturas parece não estarem associadas pois que a inibição com AcMc contra antigénio Ia não causa interferência na capacidade dos linfócitos formarem rosetas EA (Dobloug e Oyen, 1981).

Kaszubowski e col. (1980) descrevem que o aumento de células TIIa^+ após estimulação mitogénica é devido ao aumento da percentagem de células TFc_γ^+ a expressarem o antigénio Ia. Os nossos resultados contrariam tais observações uma vez que a activação celular após es

timulação por PHA ou GAT causou um aumento das células T_{Ia}^+ (até ca. 50%) enquanto que as células RFc_{γ}^+ sofreram uma redução significativa (de ca. 12% para < 5%) (Fig. 3.22). Estudos de inibição realizados por Indiveri e col. (1980) indicam também que não há qualquer relação entre a expressão *de novo* de antígenos Ia nas células T activadas e os receptores Fc ou os receptores para eritrócitos de carneiro.

Observamos também a existência de receptores Fc_{γ} tanto em linfócitos B^- como em linfócitos T^- (Quadro VI e VII, respectivamente e Fig. 3.6), estando pois de acordo com observações anteriores relativas à população nula possuir receptores Fc_{γ} (Fröland & Natvig, 1973; Lobo e col., 1975; Horwitz & Lobo, 1975; Arbeit e col., 1977; Hokland e col., 1978; Horwitz & Bakke, 1984).

6. Um modelo para a interpenetração das diversas populações linfocitárias.

Na Fig. 4.1 tentamos visualizar a relação entre as diversas subpopulações linfocitárias humanas (B , T , Ia^+ e RFc_{γ}^+) baseada na análise de marcação dupla. Neste modelo a sobreposição das populações T com B (4,4%), T com Ia^+ (3,4%), T com RFc_{γ}^+ (4,6%) foram incluídas na mesma população, formando pois uma subpopulação quadruplamente marcada: $IgSm^+(B)$, $YTH 12.5^+(T)$, Ia^+ e RFc_{γ}^+ .

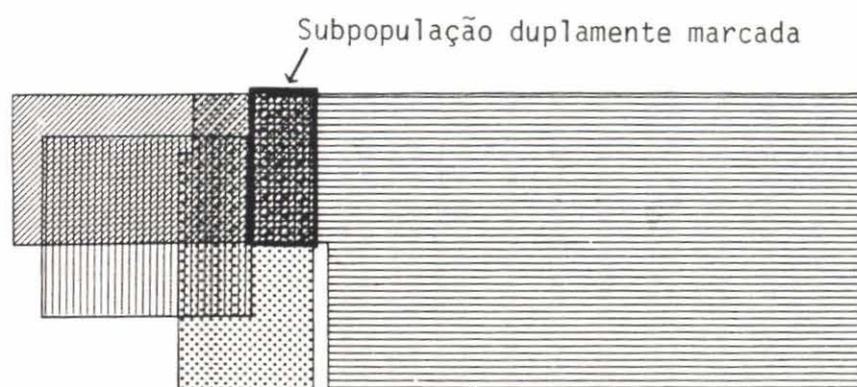


Fig. 4.1

Para provar a existência de tal subpopulação quadruplamente marcada teríamos que ter utilizado os quatro marcadores celulares si multaneamente na RRM. Na verdade fizemos ainda a tentativa de utilizar três tipos de eritrócitos indicadores, tendo sido um marcado com fluoresceína, outro com rodamina e o terceiro não marcado. Infelizmente tornava-se muito difícil distinguir as rosetas duplamente das triplamente marcadas ao microscópio equipado para fluoresceína e para rodamina. Obviamente que a utilização de quatro marcadores celulares simultaneamente iria ainda complicar mais o sistema.

Se bem que não comprovada, tal subpopulação quadruplamente marcada no sangue periférico poderá reflectir uma característica fun cional e/ou um grau de maturação dos linfócitos.

B. POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM DOENTES RECEPTORES DE ENXERTO CARDÍACO

Graças ao aperfeiçoamento das técnicas cirúrgicas, a rejeição do enxerto e a susceptibilidade à infecção tornaram-se a maior limitação ao sucesso da transplantação cardíaca. O melhoramento dos regimes imunodepressores para controlo da rejeição tem permitido prolongar o período de sobrevivência dos doentes. Tais tratamentos imunodepressores baseiam-se em experiências anteriores obtidas na transplantação renal. Assim, têm-se utilizado protocolos de tratamento triplo empregando: (i) corticosteroides, como a prednisolona; (ii) agentes anti-metabólicos, como a azatioprina; (iii) e globulina heteróloga anti-timócito humano (GAT).

Nos últimos anos este protocolo convencional tem vindo a ser substituído pela terapia por ciclosporina A (Cs-A) com considerável sucesso na transplantação do rim, do pâncreas e do fígado (Klaus, 1981; Green, 1982).

No presente trabalho investigámos o efeito de tratamentos imunodepressores nas subpopulações linfocitárias de doentes receptores de enxerto cardíaco. Por uma questão metodológica dividimos os doentes em três grupos: (i) doentes de sobrevida longa (tinham sido operados há mais de um ano) mantidos com azatioprina e prednisolona, e que haviam recebido GAT durante os 28 dias seguintes à operação; (ii) doentes pós-operados mantidos em Cs-A e prednisolona cujas subpopulações linfocitárias foram analisadas para o efeito da administração de GAT nos 10 dias seguintes à transplantação; e (iii) doentes imunodeprimidos com Cs-A e prednisolona, e que haviam recebido GAT esporadicamente.

O diagnóstico histológico de rejeição foi determinado por biópsias regulares do coração transplantado. Não foram observados sinais de rejeição em nenhum dos doentes aquando do nosso estudo (O'Toole e col., 1985).

A recolha linfocitária obtida das amostras de sangue destes doentes era significativamente mais baixa ($13,50 \pm 7,80 \times 10^4$ células/ml) do que a obtida de indivíduos normais ($110,00 \pm 10,00 \times 10^4$ células/ml). Tanto nas amostras dos doentes como nas dos indivíduos controlo (i) o sangue fora desfibrinado, (ii) as células mononucleadas separadas por centrifugação em ficoll/hypaque (F/H) e (iii) os linfócitos isolados após tratamento por penta-carbonilo de ferro.

Poder-se-ia argumentar que a baixa recolha linfocitária dos doentes fosse devida a uma "fuga" dos linfócitos afectados pelas drogas da interface do F/H para o sedimento. Contudo a análise diferencial das amostras de sangue total dos doentes, realizada no Papworth Hospital, mostrou haver redução dos linfócitos circulantes (resultados não apresentados), indicando que ocorrera linfocitopenia nestes doentes tratados com drogas imunodepressoras.

1. Terapia por corticosteroides e azatioprina

Muitos investigadores têm vindo a estudar o mecanismo de acção dos corticosteroides em diferentes tecidos. Esta questão foi revista por Fauci e col. (1976) que sugeriu três hipóteses para a acção de tais imunodepressores. A primeira diz que os corticosteroides podem interagir directamente com a membrana celular e assim alterar a sua estabilidade e configuração, o que poderá causar alterações no padrão da circulação linfocitária. A segunda hipótese sugere que os corticosteroides reajam com um receptor de membrana, que migrem para o núcleo

celular e que a \bar{t} induzam nova s \bar{i} ntese proteica. A terceira hip \bar{o} tese \bar{e} a de que os corticosteroides podem activar o AMP c \bar{i} clico com o fim de modelar determinadas fun \bar{c} oes celulares, como a s \bar{i} ntese proteica. Provavelmente estes mecanismos n \bar{a} o se excluem, antes pelo contr \bar{a} rio, podem concorrer para as modifica \bar{c} oes observadas nos diferentes tipos celulares durante terapia por corticoster \bar{o} ides. Tais modifica \bar{c} oes po \bar{d} em explicar a redistribui \bar{c} ao das c \bar{e} lulas, que se manifesta pela sua sa \bar{i} da da circula \bar{c} ao para irem colonizar outros compartimentos do cor \bar{p} o (Hedman & col., 1984).

Azatioprina \bar{e} um agente anti-metab \bar{o} lico usado na terapia imunodepressora e anti-inflamat \bar{o} ria. O seu modo de ac \bar{c} ao nas c \bar{e} lulas lin \bar{f} oides n \bar{a} o \bar{e} conhecido.

a. Efeito dos corticoster \bar{o} ides e da azatioprina nas fun \bar{c} oes dos linf \bar{o} цитos

T \bar{e} m-se realizado diversos estudos *in vitro* com vista a conhecer-se o fen \bar{o} meno de imunossupress \bar{a} o das fun \bar{c} oes das c \bar{e} lulas mononucleadas. Metilpredenisolona causa 74% de supress \bar{a} o no teste de citotoxicidade mediada por linf \bar{o} цитos (Rosenberg & Lysz, 1978); aquela subst \bar{a} ncia \bar{e} eficaz quando aplicada quer durante as primeiras 24 horas dos 7 dias do per \bar{i} odo de sensibiliza \bar{c} ao, quer ao fim de 3 horas de incubac \bar{a} o com as c \bar{e} lulas alvo dos linf \bar{o} цитos sensibilizados. Assim, aqueles autores (Rosenber & Lysz, 1978) consideram que o mecanismo de ac \bar{c} ao da metilpredenisolona se manifesta tanto na supress \bar{a} o da gera \bar{c} ao de linf \bar{o} цитos citot \bar{o} xicos como na supress \bar{a} o da actividade citotoxica dos linf \bar{o} цитos especialmente sensibilizados.

Diversos grupos de investigadores (Sazaki e col., 1979; Ten Ber \bar{g} e e col., 1981; 1982; Guillou e col., 1982) t \bar{e} m observado redu \bar{c} oes si

gnificativas na actividade das células assassinas naturais, "NK" (do inglês "Natural Killer cells") e na citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), desempenhada por células assassinas, "K" (do inglês "killer cells"), em doentes sob tratamento de prednisolona e azatioprina. Mais recentemente observou-se que apenas a administração de azatioprina (Shih e col., 1982; Prince e col., 1984), e não a de prednisolona (Prince e col., 1984) causa a redução das actividades de NK e ADCC dos doentes.

A adição de azatioprina aos meios de cultura durante as primeiras 24 horas de incubação dos linfócitos na reacção de linfócitos mista ("MLR") causa uma significativa redução da proliferação celular (Bach & Bach, 1972).

Do mesmo modo, os linfócitos de indivíduos voluntários sujeitos ao tratamento de prednisolona apresentam uma redução significativa da capacidade de serem estimulados por PHA ou por alo-antígenos (Heilman, 1972; Fauci & Dale, 1974; Webel e col., 1974).

No entanto a estimulação dos linfócitos B de dadores tratados com esteróides não difere da estimulação observada em indivíduos para controlo, e o efeito auxiliar ou supressivo das células T não foi possível ser demonstrado (Heilman, 1972; Webel e col., 1974).

Em oposição ao efeito dos esteroides, Dimitriu e Fauci (1978) observaram que as células B são altamente sensíveis à activação pelo PWM enquanto que os linfócitos T supressores são menos sensíveis e os T auxiliares são resistentes ao efeito *in vitro* da azatioprina.

b. Efeito dos corticosteroides e da azatioprina na redistribuição das subpopulações linfocitárias

A administração de corticosteróides causa a linfocitólise em

diferentes graus de acordo com a espécie animal em estudo, tendo Claman (1972) classificado as espécies animais em "esteróide-sensíveis" e "esteróides-resistentes". Alguns roedores (Rato branco, Ratinho e Coelho) são esteróide-sensíveis pois que a lise dos linfócitos ocorre rapidamente após a administração de corticosteróides (Claman e col., 1971, enquanto que os linfócitos humanos, do Macaco e da Cobaia são resistentes ao efeito citolítico imediato (Caron, 1969; Claman e col., 1971; Fauci e col., 1976). Por não se ter tido em atenção estas diferenças de sensibilidade dos linfócitos provenientes de espécies diferentes, surgiram consideráveis confusões na literatura referente ao efeito da administração de corticosteróides nos linfócitos humanos circulantes.

A administração de corticosteróides causa no Homem uma temporária linfocitopenia (Forsham e col., 1948), mas a lise ou morte celular não parece ocorrer uma vez que mesmo a adição de concentrações supra-farmacológicas de corticosteróides *in vitro* em suspensões de linfócitos do sangue periférico humano (Caron, 1969) ou de timócitos (Claman e col., 1971) não causa citólise nem morte celular.

A alteração da configuração molecular da membrana do linfócito causada pela administração destas drogas, resulta numa evidente alteração do seu padrão de circulação (Gesner & Ginsburg, 1969; Woodruff & Gesner, 1968). Mesmo em espécies esteróide-sensíveis a linfocitopenia causada por corticosteróides é uma consequência da redistribuição dos linfócitos que saem da circulação, indo acumular-se noutros compartimentos linfóides como a medula óssea (Levine & Claman, 1970; Cohen e col., 1970; Cohen, 1972; Berney, 1974). Mais do que a lise celular, a redistribuição das populações linfocitárias tem sido descrita para as espécies estero-resistentes idênticas ao Homem (Claman,

1972). Embora ainda não tenha sido provado, tem-se vindo a considerar que os efeitos dos agentes imunodepressores na membrana celular dos linfócitos sejam a justificação para a redistribuição das células que deixam assim a circulação sanguínea para colonizarem outros compartimentos do corpo (Fauci e col., 1976; Hedman e col., 1984).

A administração a pessoas voluntárias de doses simples de corticosteróides como 400 mg de hidrocortisona intravenosamente (Fauci & Dale, 1974); 60 mg (Yu e col., 1974) ou 80 mg (Fauci, 1976) de prednisolona oralmente; 1 gr de prednisolona intravenosamente (Coburg e col., 1970); ou 8-1000 mg de metilprednisolona intravenosamente (Webel e col., 1974) causa uma evidente linfocitopenia que é máxima 4-6 horas após a tomada da droga. Os níveis linfocitários geralmente voltam ao normal ao fim de 24 horas; contudo, se doses exageradas (500-1000 mg) forem administradas, então são necessárias 48 horas para que se atinjam os valores normais (Webel e col., 1974).

Esta linfocitopenia provocada por corticosteróides envolve tanto linfócitos formadores de rosetas E (células T) como não formadores (células B); são, no entanto, as células T circulantes as mais afectadas (Fauci & Dale, 1974; Yu e col., 1974; Fauci, 1976).

Doentes receptores de enxerto renal mantidos sob tratamento combinado de prednisolona e azatioprina apresentam um decréscimo significativo do número de linfócitos T e B circulantes (Dimitriu & Fauci, 1978; Chatenoud e col., 1981; Ten Berge e col., 1981).

No presente trabalho estudamos o efeito do duplo tratamento imunodepressor, prednisolona e azatioprina, nos doentes que haviam recebido o enxerto cardíaco há mais de um ano. Observamos que a população T (células YTH 12,5⁺) foi mais afectada do que a população B

(células SmIg⁺); na verdade, encontramos: (i) uma redução de 90,72% nas células T e apenas 83,04% nas células B (em termos de concentração celular) em relação aos dados normais (Fig. 3.12) e (ii) um decréscimo significativo apenas na proporção de células T já que a população B não se apresentou significativamente diferente relativamente ao controlo (Fig. 3.11).

Observamos um claro decréscimo na quantidade de linfócitos constituintes de cada subpopulação linfocitária (T, B, Ia⁺, RFc⁺, TIIa⁺ e TFC⁺) (Fig. 3.12). Contudo o estudo das alterações das proporções dos linfócitos nestes doentes mostrou que apenas as células T apresentavam uma média significativamente inferior ($56,66^{\pm 13,02\%}$) relativamente ao controlo normal ($75,11^{\pm 5,29\%}$) enquanto que as células TIIa⁺ surgiam mais elevadas ($9,16^{\pm 8,62\%}$) do que o normal ($3,40^{\pm 2,0\%}$) (Fig. 3.11).

O nosso estudo sugere que o tratamento imunodepressor de prednisolona e azatioprina afecta principalmente a população T e que dentro desta são as células TIIa⁻ as que apresentam maior redução relativa. Ficou no entanto por esclarecer se foram as células TIIa⁻ que sofreram preferencial remoção da circulação ou se uma maior proporção de células T passou a expressar o antígeno Ia.

Em recentes estudos Chatenoud e col. (1981) e Dupont e col. (1983) mostraram que em doentes receptores de enxerto renal os linfócitos T auxiliares/indutores (OKT4⁺) são mais sensíveis ao efeito da terapia por prednisolona e azatioprina do que os linfócitos T supressores/citotóxicos (OKT8⁺).

2. Terapia por globulina anti-timócito (GAT)

Os soros anti-linfócito T evitam a produção de anticorpos diri-

gidos a antigênicos dependentes do timo, sugerindo que inactivam ou eliminam as células T auxiliares (Mitchison, 1971). A administração, a doentes receptores de enxerto cardíaco, de globulina anti-timócito (GAT) feita em Coelho ou Cavalo determina o aumento de anticorpos séricos específicos, ao mesmo tempo que a população T decresce (Bieber e col., 1977; English e col., 1982; Harkiss e col., 1983-a,b). O regime imunodepressor de GAT diminui a severidade da rejeição e prolonga o tempo até surgir o primeiro fenómeno de rejeição dos transplantes do rim (Cosimi, 1976; Thomas e col., 1979) e do coração (Bieber e col., 1977; English e col., 1982).

No presente estudo analisamos a redistribuição das subpopulações linfocitárias causada pela administração de GAT, ciclosporina A (Cs-A) e predenisona durante os primeiros 10 dias pós-operatórios, após o que foram mantidos só com Cs-A e predenisona (ver A.2.c. de "Material e Métodos"). Durante o período de 30 dias após transplantação não foram observados fenómenos de rejeição (O'Toole e col., 1985) de acordo com as biopsias regulares efectuadas no Papworth Hospital.

Foi nossa intenção determinar a percentagem de linfócitos circulantes transportando GAT equina na membrana celular, durante a administração de GAT, para o que usamos imunoglobulina anti-Ig de cavalo conjugada a eritrócitos de Boi, realizando o teste RRAD. Infelizmente verificamos que este reagente fazia reacção cruzada com a IgSm das células B (resultados não apresentados) o que nos levaria a contar falsas células GAT positivas.

Contudo, Parsa e col. (1979) observaram que em doentes receptores de enxerto renal, cerca de 70% dos linfócitos circulantes transportavam GAT na superfície membranar, determinação esta realizada pe

lo teste de imunofluorescência, utilizando soro anti-Ig de Cavalo, feito em Bode. Os mesmos autores (Parsa e col., 1979) dizem também que os linfócitos portadores de GAT deixam de ser detectados 3-4 dias depois da cessação da tomada de GAT.

a. Efeito da GAT na quantidade de linfócitos constituintes das subpopulações linfocitárias

Imediatamente após a transplantação e durante a administração de GAT, Cs-A e predenisolona, observamos um decréscimo acentuado da concentração de linfócitos (nº de células/ml de sangue) (Fig. 3.13). Estes reduzidos valores encontravam-se ao nível dos doentes de sobrevida longa (mantidos em predenisolona e azatioprina) e mantiveram-se baixos mesmo após paragem da tomada de GAT. Estes dados indicam que tanto a GAT com Cs-A e predenisolona como apenas Cs-A e predenisolona são tratamentos imunodepressores capazes de manter a concentração de linfócitos sanguíneos a baixos níveis.

Durante os 10 dias de administração de GAT, as populações T (YTH 12.5⁺), B (IgSm⁺), Ia⁺ (YCL 6.8⁺) e RFc_γ⁺ (rosetas EA⁺) apresentaram redução da quantidade de linfócitos constituintes de cada população (Fig. 3.14-b, 3.15-b, 3.16-b e 3.17-b). Exceptuando as células T, todas as outras populações atingiram os valores encontrados nos doentes de sobrevida longa. Na verdade, os linfócitos T sofreram uma queda ainda mais drástica durante o tratamento com GAT, atingindo valores ainda menores do que os observados nos doentes de sobrevida longa (Fig. 3.14-b).

Após paragem da administração de GAT (dia 10) os linfócitos T aumentaram a sua concentração atingindo os níveis encontrados nos doentes de sobrevida longa (Fig. 3.14-b). Estes resultados indicam que

a GAT constituía o agente imunodepressor causador do baixo nível de células T.

Todos estes resultados sugerem que: (i) a GAT é mais eficaz na redução dos linfócitos T que nas outras populações e (ii) a GAT conjuntamente com a prednisolona e a Cs-A é mais eficiente do que a prednisolona e Cs-A sô, ou do que a prednisolona e azatioprina (doentes de sobrevida longa) na remoção dos linfócitos T da circulação sanguínea.

b. Efeito da GAT na proporção das subpopulações de linfócitos circulantes

Em termos relativos observámos que a terapia por GAT (com Cs-A e prednisolona) causa um decréscimo apenas da população T (Fig. 3.14-a). Pelo contrário, as subpopulações B, Ia⁺, RFc_γ⁺, TIa⁺ e TFc_γ⁺ aumentam as suas proporções durante os primeiros 10 dias de tratamento por GAT (Fig. 3.15-a, 3.16-a, 3.17-a e 3.18-a e -b). Após cessação da administração de GAT detectámos um aumento de células T que atingiram os níveis obtidos nos doentes de sobrevida longa.

Estes resultados sugerem que a GAT afecta principalmente os linfócitos T. Na verdade, observámos um decréscimo de células T tanto em valores absolutos (quantidade de células constituintes da população por ml de sangue) como em termos relativos (percentagem de células T, da população linfocitária total). Além disso, o decréscimo da população T foi acompanhado de um aumento relativo de células TIa⁺ e TFc_γ⁺ (Fig. 3.18-a e -b) sugerindo que, ou (i) as células TIa⁻ e TFc_γ⁻ sofreram uma remoção preferencial, ou (ii) as células T restantes na circulação adquiriram a superfície membranar antigénios Ia e receptores Fc_γ.

Realizando testes de imunofluorescência indirecta, Chatenoud e col. (1981) afirmam que a GAT (mais azatioprina) produz em receptores de enxerto renal uma redução da população T (OKT3⁺) e que esta não é selectiva para as subpopulações T auxiliar/indutora (OKT4⁺) ou supresora/citotóxica (OKT8⁺).

Num recentes trabalho efectuado nos nossos e noutros doentes receptores de enxerto cardíaco, todos do Papworth Hospital, O'Toole e col. (1985) descrevem que parte (8 em 12) dos pacientes estudados apresentam uma inversão da razão das subpopulações T auxiliar *versus* T supresora (Leu-3a/Leu-2a), mas que esta só ocorre depois da cessação da administração de GAT, isto é, sempre depois do dia 10.

Chatenoud e col. (1981) registaram, em receptores de enxerto renal apresentando normal funcionamento do rim e mantidos com azatioprina e esteróis, uma redução relativa das células T auxiliares (OKT4⁺). Foi também sugerido (Mitchison, 1971; Chatenoud e col., 1981; Cosimi e col., 1981) que as células T auxiliares desempenham papel fundamental na rejeição do enxerto e que a sua manutenção a baixos níveis é fundamental para a prevenção da rejeição.

c. Efeito da GAT na análise fenotípica das células linfóides

Nas considerações acima referidas evidenciámos os efeitos drásticos da GAT na redução dos linfócitos T e também no aumento relativo das outras subpopulações. Com vista à obtenção de uma correcta interpretação dos nossos resultados, decidimos investigar a capacidade da GAT inibir e/ou aumentar a formação de rosetas nos testes RRAD, RRADd e EA. Na verdade, quer a inibição quer a incrementação das reacções de roseta causada pela presença da GAT na superfície dos linfócitos poderia eventualmente pôr em causa as interpretações dos estudos an-

teriores pois que alterações observadas não seriam mais do que o simples reflexo de um artefacto.

Tanto os linfócitos sanguíneos (Fig. 3.20) como as células da medula óssea (Fig. 3.21) incubadas com GAT (0,5-25 $\mu\text{g/ml}$) durante 90 minutos (Fig. 3.20-a e Fig. 3.21-a) ou durante toda a noite (Fig. 3.20-b e Fig. 3.21-b) ficaram quase totalmente (>94%) recobertos por GAT. Não observamos alterações nas células YTH 12.5⁺ nem nas IgSm⁺ da medula óssea (Fig. 3.21).

Nos linfócitos sanguíneos totalmente recobertos por GAT detectamos uma redução muito significativa das células T (mas não das células B, Ia⁺ ou RFc_Y⁺) quando doses de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ ou superiores de GAT eram adicionadas ao meio (Fig. 3.20). Estes resultados indicam que só há inibição da reacção do AcMc YTH 12.5 com o antigénio T quando elevadas concentrações de GAT são adicionadas ao meio de cultura.

Na situação *in vivo*, os doentes receptores de enxerto cardíaco receberam menos de 15 mg/Kg de GAT, parte da qual é metabolizada e levada para o sistema reticulo-endotelial responsável pela fagocitose e digestão de antigénios (Howard e col., 1968; Abdou e col., 1980). Parece-nos pois razoável admitir que a quantidade de GAT ligada aos linfócitos dos doentes receptores de enxerto cardíaco é demasiado baixa para causar inibição da reacção de roseta para detecção do antigénio YTH 12.5, marcador de células T. Assim, assumimos que as considerações acima referidas são correctas.

Este estudo sugere ainda que a globulina anti-*timócito* (GAT) não é específica para linfócitos T pois que reagiu não só com todos os linfócitos sanguíneos como também com as células tão heterogêneas como são as da medula óssea. Além disso este trabalho indica que os

determinantes antigénicos da GAT (i) estavam expressos em todos os linfócitos e células da medula óssea, (ii) não estavam relacionados com a IgSm, o antigénio Ia ou com o receptor Fc_{γ} e (iii) que poderiam estar associados ao antigénio YTH 12.5 (marcador de células T).

Para Parsa e col. (1979) o antigénio da GAT e os receptores para eritrócitos de carneiro (convencional marcador de células T) não são idênticos. Os nossos resultados mostraram também que o antigénio YTH 12.5 (nosso marcador de células T), que é independente do receptor para eritrócitos (ver alínea A.2 deste capítulo), estava associado aos antigénios da GAT.

d. Estimulação de linfócitos com GAT *in vitro*

Em ambas as culturas celulares estimuladas por GAT (Fig. 3.22-a) ou por PHA* (Fig. 3.22-b) os linfócitos T sofreram activação uma vez que detectámos o desenvolvimento de células T_{Ia}^{+} (Fu e col., 1978; Evans e col., 1978; Ko e col., 1979) no dia 7 ou 10 de cultura, com GAT ou com PHA, respectivamente. Contrariamente aos observado na cultura com PHA, não observámos proliferação celular na cultura com GAT, de acordo com a determinação da incorporação de timidina tritiada no DNA celular (Fig. 3.22).

O facto de a GAT ter activado os linfócitos T mas não ter induzido a sua proliferação, mereceu-nos a maior atenção, e assim decidimos analisar em pormenor as alterações celulares na cultura com GAT. Considerámos que as elevadas concentrações de GAT utilizadas na cultura devem ter afectado a detecção de linfócitos T ($YTH 12.5^{+}$) no dia 4, pro-

*PHA - fitohemaglutinina, geralmente utilizada para estimulação *in vitro* de linfócitos T.

vavelmente devido à elevada densidade de moléculas de GAT ligadas ao respectivo antigénio da membrana linfocitária, e deste modo, mascarando o antigénio YTH 12.5 (ver alínea anterior). Com a renovação do meio de cultura no dia 7, a GAT livre em solução, foi removida e os linfócitos ao libertarem para o novo meio (contendo interleuquina 2, mas livre de GAT) moléculas de GAT permitiram a exposição do antigénio YTH 12.5⁺ e deste modo facilitaram a detecção das células T, agora desmascaradas.

A ausência de proliferação celular pode ter sido devida à supressão da actividade mitótica causada pela forte ligação da GAT à membrana do linfócito durante os primeiros 7 dias de cultura. Pensamos que tal fenómeno de supressão mitótica seja dependente da dose de GAT aplicada pelo que entendemos que deverão ser realizados estudos ulteriores, esclarecedores de tal fenómeno, logo que as condições técnico-laboratoriais no-lo permitam.

3. Terapia por ciclosporina A (Cs-A)

As notáveis propriedades da ciclosporina A (Cs-A) foram inicialmente descritas por Borel e col. em 1976. Além da observação de que a Cs-A induz tolerância ao enxerto numa grande variedade de animais de estudo (Bordes-Aznar & Tilney, 1982; Borel & Lafferty, 1983), verificou-se que esta droga afecta ambas as respostas imunológicas, celular e humoral (Borel e col., 1976; Kunkl & Klaus, 1980; Pereira e col., 1983), manifestando-se essencialmente ao nível celular (Borel e col., 1976; Homan e col., 1979; Borel & Lafferty, 1983).

A ciclosporina A actua preferencialmente nos linfócitos T, de modo especial durante estimulação mitogénica das células imunocompetentes (White e col., 1979; Wiesinger & Borel, 1980), e inibe a actividade das células NK ("Natural Killer cells") (Borel e col., 1976; Introna e col.,

1981). A Cs-A também inibe a resposta proliferativa das células T a alo-antigênicos e lectinas mitogênicas em testes *in vitro*, provavelmente devido à sua fixação aos receptores para concanavalina A, fitohemaglutinina e antigênicos HLA-DR (Leoni e col., 1978; White e col., 1979; Palacios & Möller, 1981; Palacios, 1982-a). Alguns investigadores sugeriram ainda que a administração de Cs-A pode causar degenerescência dos clones T sensíveis ao antigênio.

Este agente imunodepressor interfere em determinados estudos da reacção de rejeição do enxerto, afectando a proliferação das células linfóides. Assim, a Cs-A inibe a libertação da linfoquina derivada de macrófago (interleuquina 1 ou IL-1) e a derivada de células T auxiliares (IL-2) (Bunjes e col., 1981; Andrus & Lafferty, 1982). Os macrófagos Ia⁺ activados por antigênio libertam IL-1, que por sua vez vai activar os linfócitos T auxiliares que passam a elaborar IL-2 (Watson, 1981). A interleuquina 2 promove a proliferação celular dos linfócitos sensibilizados assim como a libertação de interferão, cuja produção é também afectada pela Cs-A (Kalman & Klimpel, 1983). Este efeito parece estar associado à inibição induzida pela Cs-A na actividade das células NK (Introna e col., 1981).

Embora a Cs-A impeça a diferenciação das células precursoras dos linfócitos T citotóxicos (T_{cp}) em linfócitos T citotóxicos maduros (CTL, do inglês "Cytotoxic T Lymphocytes") (Bunjes e col., 1981; Andrus & Lafferty, 1982; Morris e col., 1983), aquela droga não afecta nem o reconhecimento da IL-2 pelas células T_{cp} nem reduz a actividade citotóxica das células CTL previamente geradas (Burckhardt & Guggenheim, 1979; Morris, 1981). Estas informações permitem pois admitir que a Cs-A actua nos fenómenos iniciais da transformação das células T; uma vez activadas, a proliferação das células T sensíveis à IL-2 é unicamente depen-

dente da existência de IL-2 (Britton & Palacios, 1982).

Pelo contrário, as células T supressoras são activadas na presença de Cs-A e até parece adquirirem a capacidade de responderem a estas interleuquinas (Routhier e col., 1980; Hess & Tutschka, 1980; Hess e col., 1982). Deste modo, a aceitação a longo prazo do enxerto é devida não só à supressão da secreção de IL-2, mas também à excepcional eficiência das células T supressoras que devem desempenhar um papel primordial na sobrevivência do enxerto (Kupiec-Weglinski e col., 1984).

a. Efeito da Cs-A e da prednisona na redistribuição das subpopulações linfocitárias

Os linfócitos incubados com Cs-A a concentrações imunossupressoras (<50 ng/ml) deixam de ligar o AcMc OKT3 (feito em ratinho), de acordo com a detecção com anticorpo fluorescente contra anticorpo de ratinho (Kung e col., 1979) e apresentam também um decréscimo significativo da citólise exercida pelo AcMc OKT3 e complemento (Palacios, 1982-b). Deste modo, tem sido proposto que a Cs-A ocupe o mesmo receptor ou um muito próximo do do AcMc OKT3, nos linfócitos T (Britton & Palacios, 1982). Receptores estes que coincidem com a estrutura dos linfócitos T responsável pelo reconhecimento do antigénio (Chang e col., 1981).

Os doentes receptores de transplante cardíaco, imunodeprimidos com Cs-A e prednisona apresentaram uma redução acentuada das células T (YTH 12.5⁺), enquanto que o ligeiro aumento das células B (IgSm⁺), Ia⁺ (YCL 6.8⁺) e TIIa⁺ (YTH 12.5⁺ - YCL 6.8⁺) não era estatisticamente significativo (Fig. 3.25). Ambos os AcMc YTH 12.5 e OKT3 reconhecem o mesmo determinante antigénico, ou se diferentes, eles estão intimamente associados (Cobbold & Waldmann, 1984). Assim, o decréscimo de células T observado nos doentes sob tratamento por Cs-A pode ser devido à inibi-

ção causada pela presença de Cs-A na membrana dos linfócitos e deste modo interferir com o antigénio YTH 12.5 (ou OKT3). Contudo, recentemente Morris (1983) não observou variações na população de células OKT3⁺ em doentes receptores de enxerto renal e imunodeprimidos com Cs-A. Considerando esta situação *in vivo* correcta, então o significativo decréscimo de células T que observámos nos doentes receptores de enxerto cardíaco era provavelmente devido à acção da prednisona (ver alínea B.1.b. deste Capítulo).

Nem os linfócitos T auxiliares (OKT4⁺) nem os T supressores (OKT8⁺) são bloqueados pela presença de Cs-A em cultura celular (Kung e col., 1979). Por outro lado, também não há variação das proporções das subpopulações OKT4⁺ e OKT8⁺ nos doentes receptores de enxerto renal, sob tratamento imunodepressor com Cs-A, embora a concentração das células T auxiliares sofra redução (Morris, 1983).

b. Activação dos linfócitos durante infecção por Herpesvírus

Os vírus herpes simples (H.S.), herpes zoster, Epstein-Barr (VEB) e citomegalovírus (CMV) constituem um grupo de vírus (Dulbecco & Grisberg, 1973) que infectam muitas espécies animais e que possuem muitas propriedades em comum. Todos possuem um envólucro de estrutura icosaédrica, os viriões contêm DNA de cadeia dupla, conduzem a uma citopatologia focalizada, e podem instalar-se de forma vitalícia no hospedeiro após infecção primária.

Doentes que desenvolvam mononucleose por infecção de CMV ou de VEB, tanto espontaneamente (geralmente por transmissão por contacto) como por sucessivas transfusões sanguíneas, apresentam durante a infecção aguda um decréscimo de células T auxiliares (OKT4⁺) e um aumento proporcional de células T supressoras (OKT8⁺) (quer em termos rela

tivos quer em valores absolutos), levando a uma inversão da razão normal entre linfócitos auxiliares e supressores (Reinherz e col., 1980-a; Carney e col., 1981; 1983). Também Schroff e col. (1982) observaram um declínio sequencial da razão entre células T auxiliares e supressoras ($\text{Leu } 3^+/\text{Leu } 2^+$) em doentes receptores de medula óssea, com infecção de CMV.

Tal como por exemplo Alberchtsen (1977), Fu e col. (1978), Yu e col. (1980), Schuurman e col. (1980) também nós detectámos que $4,12 \pm 2,36\%$ (Quadro V) dos linfócitos em repouso de indivíduos normais expressavam o antigénio Ia (subpopulação T Ia^+). A estimulação *in vitro* de linfócitos normais com células autólogas transformadas por VEB resultou numa activação de linfócitos T; isto é, observámos um aumento de células T Ia^+ que atingiu 61% da população total, no 100 dia de cultura (Fig. 3.24-a). Esta activação celular induzida por antigénios codificados pelo VEB foi semelhante à observada na estimulação linfocitária por alo-antigénios, na cultura mista de linfócitos (Fig. 3.24-b). Detectámos também um idêntico aumento de células T Ia^+ nos doentes receptores de enxerto cardíaco, imunodeprimidos por Cs-A e que desenvolviam infecção primária de CMV (Figs. 3.26 e 3.27) ou reactivação de herpes simples (Fig. 3.30).

Saliente-se o facto de que estes doentes *imunodeprimidos* desenvolveram, durante infecção de herpesvírus, células T activadas que atingiram proporções tão ou mais elevadas (50 - 100% de células T Ia^+) que as observadas durante infecção aguda de VEB em doentes *não imunodeprimidos* (62 - 82%, Tatsumi e col., 1980; 32 - 70%, Pizzolo e col., 1981). Embora as proporções fossem tão elevadas como as dos indivíduos não imunodeprimidos, os transplantados cardíacos, tinham um nível de linfócitos circulantes muito mais baixo ($0,1 - 0,6 \times 10^6/\text{ml}$ de

sangue, comparado com $0,8 - 1,2 \times 10^6$ /ml em indivíduos normais).

Se bem que o duplo tratamento imunodepressor de Cs-A e prednisona causaram uma redução do número de linfócitos circulantes (principalmente de células T), estes resultados sugerem que os linfócitos remanescentes mantiveram a capacidade de superar as infecções de herpesvírus quer pela produção de anticorpos séricos contra antígenos de CMV, VEB ou H.S. (Figs. 3.26-a a 3.30-a) quer pela activação de células T (Fig. 3.26-b a 3.30-b).

As células TIa^+ desenvolvidas durante mononucleose infecciosa em doentes imunodeprimidos, receptores de enxerto renal, têm sido atribuídas à subpopulação de células T supressoras ($OKT8^+$) (Crawford e col., 1981-a; 1981-b) tendo também sido sugerido por Carney e col. (1983) que tais células são específicas e exclusivas para antígenos relacionados com herpesvírus, pois que são incapazes de responder a outra qualquer estimulação antigénica ou mitogénica.

Os doentes que estudámos estavam sob tratamento imunodepressor de Cs-A e prednisona, terapia esta que parece facilitar o desenvolvimento de infecções por herpesvírus (Preiksaitis e col., 1983). Na verdade a transformação *in vitro* por VEB de células B de indivíduos normais seropositivos para VEB é controlada por linfócitos T pois que a proliferação de células B transformadas só ocorre se as células T forem removidas da cultura ou inactivadas pela adição de Cs-A ao meio de cultura (Bird e col., 1981). Por outras palavras, as células T de memória provenientes de dadores seropositivos para VEB presentes na cultura celular são capazes de montar uma resposta citotóxica específica dirigida contra os focos proliferativos de células autólogas infectadas por VEB, causando a sua regressão (Moss e col., 1978; Rickin

son e col., 1979).

Crawford e col. (1981-b) referem ainda que dois dos sete doentes receptores de enxerto renal tratados com Cs-A desenvolveram espontaneamente linhas celulares transformadas por VEB e os linfócitos de todos os sete doentes foram incapazes de provocar a regressão dos focos proliferativos.

Estes estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que a Cs-A desempenha um papel inibitório da actividade dos linfócitos T responsáveis pela prevenção da proliferação das células B transformadas. Deste modo é razoável supormos que a administração por longos períodos de tempo de Cs-A possa vir a ocasionar uma elevada incidência de infecção por VEB (geralmente reactivação uma vez que a infecção primária ocorre durante a infância, na maioria dos indivíduos; Miller, 1975) seguida de linfoma (Green, 1982). No entanto, não há ainda dados na literatura reveladores de que se desenvolvam linfomas em doentes receptores de transplantes e imunodeprimidos por Cs-A.

Em conclusão, podemos afirmar que os nossos resultados se encontram em aparente contradição com a informação adquirida *in vitro* sobre o efeito imunodepressor da Cs-A nos linfócitos T, uma vez que os doentes receptores de enxerto cardíaco, sob tratamento de Cs-A (200 - 500 ng/ml/dia) desenvolveram activação de linfócitos T (aumento percentual de células TIa^+) que estava relacionada quer com a infecção primária (demonstrada pelo aumento de IgM anti-viral) quer com a reactivação (aumento sō de IgG anti-viral de herpesvīrus). Este estudo indica pois que a administração de Cs-A não causou a imunossupressão dos linfócitos T, pois sofreram activação, nem dos linfócitos B, pois produziram os anticorpos contra os herpesvīrus.

Os resultados de Baldwin e col. (1982) estão de acordo com os nossos, uma vez que também detectaram elevação dos níveis de IgM e de imunocomplexos de IgM durante a infecção primária por CMV, em transplantados renais. Em transplantados cardíacos descrevemos também (O'Toole e col., 1984) o desenvolvimento de resposta primária e secundária contra a infecção por herpesvírus.

A administração intravenosa de metilprednisolona causou uma temporária e aparente depressão selectiva dos níveis de células TIa^+ detectáveis, sem haver decréscimo dos níveis de anticorpos contra herpesvírus (Fig. 3.26). As transfusões sanguíneas produziram efeitos idênticos (Fig. 3.26 - 3.30), e pensamos dever ter-se sempre em consideração tais efeitos quando se estudam as subpopulações de linfócitos. O efeito supressor (em vez de estimulador) da transfusão sanguínea nas células TIa^+ sugere que estes doentes têm uma resposta alterada às células alogeneicas.

O aumento de células TIa^+ no sangue não se relaciona com a rejeição do enxerto (O'Toole e col., 1985), mas a sua detecção constitui um bom indicador antecipado da infecção viral.

C. NOTAS FINAIS

1. Alterações fenotípicas dos linfócitos

O elevado potencial que os linfócitos possuem para alterar o seu fenótipo é bem demonstrado na sequência de estados da maturação dos linfócitos T e B.

A maturação dos linfócitos T, processada no timo, envolve alterações sequenciais dos antigénios expressos na membrana celular, identificados pelo anticorpos monoclonais OKT (Reinherz & Schlossman,

1980; 1981) tendo sido definidos três estados principais na diferenciação celular. Alguns destes antigênicos perdem-se quando o linfócito T maduro deixa o timo e entra na circulação (vêr Fig. 1.2).

Os linfócitos B apresentam também três estados principais de maturação, maturação esta que ocorre no fígado fetal ou na medula óssea do adulto. Tais estados têm sido caracterizados em função da imunoglobulina expressa na membrana celular do linfócito. Assim, no seu estado primário, a célula pré-B sintetiza mas não expressa IgSm. Posteriormente apresenta IgSm M e finalmente no estado maduro os linfócitos B expressam IgD, IgG e/ou IgA. A IgSm D é perdida quando os linfócitos B se transformam em células da memória ou em células plasmáticas secretoras de anticorpos de classe IgM, IgG ou IgA (vêr Fig. 1.1).

O último estado de maturação dos linfócitos é a activação celular que ocorre acompanhada de alterações fenotípicas: os linfócitos T adquirem antigênicos Ia, indicando a sua activação (Figs. 3.22, 3.24, 3.26 - 3.30), e os linfócitos B transformam-se em células plasmáticas, secretoras de uma só classe de imunoglobulina, perdendo a IgSm que as revestia (Wilson e col., 1973).

A heterogeneidade dos linfócitos circulantes foi clarificada no presente estudo. Demonstramos que populações linfocitárias perfeitamente distintas, fixas e imutáveis não existem no sangue humano; pelo contrário, os linfócitos expressam várias combinações de receptores e antigênicos (Figs. 3.3, 3.5, 3.6 e 4.1). Alguns destes receptores e antigênicos podem aumentar ou reduzir a sua representatividade na população linfocitária, de acordo com a sua situação: (i) estado de activação em resposta a agentes mitogênicos (Fig. 3.22), alo-antigênicos (Fig. 3.24-b) e virais (Figs. 3.24-a, 3.26 - 3.30); (ii) sob acção imunodepressora (figs. 3.11 - 3.19).

2. Marcadores de membrana e função dos linfócitos

A relação entre marcadores de membrana e a função dos linfócitos está ainda por esclarecer. Muitas são as funções dos linfócitos que têm sido exaustivamente estudadas: (i) *respostas proliferativas* a antigênicos solúveis (ex. PPD), a antigênicos de membrana (ex. alo-antigênicos e antigênicos virais) e a mitogênicos (ex. PHA); (ii) *respostas citotóxicas*, como a linfólise mediada por célula (actividade de células K e NK); (iii) *produção de mediadores* como a interleuquina 2 (anteriormente designada por TCGF) e interferão; (iv) *funções reguladoras* (auxiliar/citotóxica) nas interações celulares do tipo T-T, T-B e T-macrófago.

Das funções acima referidas apenas as actividades auxiliar e supressora dos linfócitos T têm sido relacionadas com marcadores de membrana: (i) a função auxiliar relaciona-se com as células possuidoras do antigénio OKT4 e receptor TFc_{μ} (Reinherz e col., 1979-b; Moretta e col., 1977; 1979-a); (ii) e a função supressora com as células expressoras do antigénio OKT5 e receptor TFc_{γ} (Reinherz e col., 1980-b; Moretta e col., 1977; 1979-b). Contudo, as subpopulações definidas por antigénio e receptores ($OKT4^{+} - TFc_{\mu}$ ou $OKT5 - TFc_{\gamma}$) apresentam pouca correlação (Reinherz e col., 1980-b) indicando que estes antigénios e receptores definem subpopulações ligeiramente diferentes.

Mais recentemente Reinherz e col. (1983) construíram um modelo no qual os antigénios T3 (marcador de todas as células T), T4 (marcador das células T auxiliares) e T8 (marcador das células T supressoras) constituem as estruturas necessárias para o reconhecimento da célula alvo: (i) o antigénio T3 em associação com uma glicoproteína

T_{in} (restrita a clones individuais de células T) formam a estrutura responsável pela ligação ao antígeno específico: (i) o antígeno T4 liga-se à região monomórfica das moléculas de classe I do sistema HLA; (iii) e o antígeno T8 faz ligação à região monomórfica das moléculas de classe II.

A definição de subpopulações linfocitárias através de marcadores de membrana tem algumas limitações pois apenas uma parte das células que expressa um determinado marcador pode ser responsável pela função que frequentemente (e incorrectamente!) é atribuída à fracção total de células; assim, as funções celulares devem ser apenas válidas para a subpopulação considerada como um todo, e não para células isoladas (Corte e col., 1982). O mesmo é dizer que na heterogeneidade de células circulantes, a função de células individuais não pode ser simplesmente extrapolada para a presença de um determinado marcador.

Um método para estabelecer uma correlação precisa entre marcador(es) celular(es) e função(ões) é a *clonagem*. É possível obter-se expansão clonal a partir de um só linfócito (Meuer e col., 1983; Morretta e col., 1983-b) e nessa população homogênea pode analisar-se o seu fenótipo e relacioná-lo com a sua actividade funcional. A utilização de clones bem caracterizados em diversas combinações parece-nos ser um método promissor para o estudo da correlação entre as características funcionais e fenotípicas das subpopulações linfocitárias.

3. Diagnóstico de infecções virais pelo aumento da subpopulação T_{IIa}^+

Não é ainda sabido se a distribuição relativa das diversas subpopulações linfocitárias ou se as suas funções no sangue periférico reflectem as existentes nos órgãos linfóides. Também pouco é conhecido

sobre o efeito de agentes imunodepressores nos órgãos linfóides. Embora muito se possa aprender de estudos realizados em animais roedores, tal informação não poderá ser transferida sem sentido crítico para a situação humana.

Tendo em conta que a amostra sanguínea é geralmente a única fonte disponível de material de estudo, a questão que se nos coloca é se as alterações das proporções ou as funções dos linfócitos do sangue periférico serão (ou não) de valor diagnóstico, terapêutico e prognóstico no decurso dos diferentes estados da doença.

Infecções por citomegalovírus (CMV) ou por vírus Epstein-Barr (VEB) causam aumentos, em termos proporcionais e absolutos, de células T_{Ia}^+ no sangue de indivíduos não imunodeprimidos (Reinherz e col., 1980-a; Tatsumi e col., 1980; Crawford e col., 1981-a; Carney e col., 1983). Nós acabamos de demonstrar neste trabalho que em doentes imunodeprimidos a infecção por CMV ou VEB causou também aumento, tanto ou mais elevado, das células T_{Ia}^+ no sangue periférico, picos estes que não estavam de modo algum relacionados com a rejeição do enxerto. Desta forma parece-nos que a estimativa de células T_{Ia}^+ representa um método útil para o diagnóstico de infecções por herpesvírus.

RESUMO

Existe actualmente grande indefinição e controvérsia relativamente à demarcação de populações linfocitárias do sangue periférico humano que resultam fundamentalmente de pequenas divergências de protocolos utilizados em diferentes laboratórios. Foi dentro deste âmbito que desenvolvemos estudos com vista à identificação e determinação do grau de intercepção das diferentes populações linfocitárias.

Para tal empregamos técnicas comumente utilizadas - testes de marcação simples e de Destituição Celular (DC) - e uma técnica por nós previamente desenvolvida (Carvalho, 1983) de marcação dupla - Reacção de Roseta Mista (RRM).

Para identificação de (i) linfócitos B, (ii) linfócitos T, (iii) linfócitos possuidores do antigénio Ia (células Ia⁺) e (iv) linfócitos apresentando a cadeia leve K da imunoglobulina (células C_k⁺) usamos testes de Reacção de Roseta Antiglobulina (ou anti-determinante) Directa - RRAD ou RRAdD - utilizando, respectivamente, (i) imunoglobulina anti-Fab humana, (ii) anticorpo monoclonal (AcMc) contra determinante antigénico presente em linfócitos T humanos, (iii) AcMc contra o antigénio Ia humano e (iv) AcMc contra a cadeia leve K humana. Os linfócitos possuidores de receptores para a porção Fc da IgG foram detectados pela reacção de roseta EA, usando eritrócitos de Boi sensibilizados com anticorpo específico, IgG purificada.

Os testes simples indicaram que da população total de linfócitos sanguíneos, 75,1[±]5,3% (média [±] DPM) (n=76) eram células T; 19,4[±]6,4% (n=97) eram células B; 13,8[±]6,1% (n=21) expressavam a cadeia K; 15,6[±]7,6% (n=66) possuíam o antigénio Ia; e 22,6[±]3,3% (n=21) expressavam

receptores para Fc_{γ} .

Dos testes de marcação dupla pudemos concluir que não existe uma separação perfeita entre linfócitos B e linfócitos T, pois observamos que da totalidade de linfócitos sanguíneos $5,0 \pm 3,7\%$ (por DC) ou $3,9 \pm 2,7\%$ (por RRM) possuíam ambos os marcadores de linfócitos B e de T.

Verificamos também que da totalidade de *linfócitos B* do sangue periférico, (i) $32,76 \pm 22,99\%$ (por DC) ou $22,58 \pm 18,26\%$ (por RRM) possuíam o antígeno dos linfócitos T; (ii) $65,96 \pm 6,40\%$ (por RRM) eram portadores da cadeia leve K; (iii) $42,27 \pm 27,11\%$ (por DC) ou $61,30 \pm 24,30\%$ (por RRM) possuíam o antígeno Ia; e (iv) $74,33 \pm 13,00\%$ (por RRM) apresentavam receptores para a porção Fc da IgG.

Do mesmo modo, da totalidade de *linfócitos T* registamos que (i) $6,26 \pm 4,42\%$ (por DC) ou $5,28 \pm 3,58\%$ (por RRM) possuíam Ig de superfície; (ii) $2,73 \pm 2,08\%$ (por RRM) apresentavam a cadeia K; (iii) $4,12 \pm 2,36\%$ (por RRM) expressavam o antígeno Ia; e (iv) $6,10 \pm 3,09\%$ (por RRM) possuíam receptores Fc_{γ} .

Com base nos valores obtidos construímos um modelo bidimensional que permite visualizar a interrelação das diversas subpopulações linfocitárias, facilitando assim a interpretação e discussão dos resultados.

Observamos alterações nas proporções das subpopulações de linfócitos humanos em culturas *in vitro* após estimulação mitogênica (fitohemaglutinina, PHA), alogênica (cultura mista de linfócitos, MLC) ou viral (MLC com linfócitos autólogos transformados por vírus Epstein-Barr). O aumento de células Ia^+ foi apreciável (de $<20\%$ atingiram $40-60\%$ da totalidade de linfócitos) e resultou da notável elevação da

proporção de linfócitos T que adquiriram o antígeno Ia (de <5% atingiram 50-60% dos linfócitos T).

Alterações das subpopulações linfocitárias em doentes receptores enxerto cardíaco, mantidos sob tratamento imunodepressor, constituíram objecto de estudo pormenorizado. Em doentes que haviam sido submetidos à transplantação há mais de um ano e que recebiam tratamento diário de predenisona e azatioprina, observámos um decréscimo acentuado do número de linfócitos constituintes de cada subpopulação linfocitária tendo sido a população de células T a mais afectada, apresentando uma redução de 90,72% relativamente ao controlo normal. Em termos de valores percentuais a população T sofreu uma redução significativa ($56,66 \pm 13,02\%$) em relação ao controlo normal ($75,11 \pm 5,29\%$). Pelo contrário, as células TIa^+ apresentavam-se significativamente mais elevadas ($9,16 \pm 8,62\%$) do que em indivíduos normais ($3,40 \pm 2,20\%$).

A administração de globulina anti-timócito (GAT) aos doentes durante os 10 dias imediatamente após a operação de transplantação, causou um decréscimo ainda mais acentuado do número de células constituintes das diversas subpopulações linfocitárias. Foi também a população T a que sofreu redução mais acentuada em termos percentuais, enquanto que as subpopulações TIa^+ e TFc_Y^+ aumentaram a sua proporção.

Em doentes imunodeprimidos com ciclosporina A e predenisona observámos no período de dois a cinco meses após transplantação cardíaca o surgimento de infecções por herpesvírus. Durante a infecção observámos uma redução de linfócitos T e um proporcional aumento de linfócitos B; os elevados níveis de células TIa^+ encontrados foi devido à elevação da proporção de linfócitos T a expressarem o antígeno Ia. Os picos de células TIa^+ relacionavam-se com a infecção primária por citomegaloví-

rus ou com a reactivação por vírus Epstein-Barr ou por vírus do herpes simples; aqueles picos formaram-se antes da produção máxima de IgM e IgG anti-viral e sofreram regressão com a administração intravenosa de metilprednisolona ou transfusão sanguínea. Pelo contrário, a produção de anticorpos não foi sensível a tais tratamentos. Não encontramos correlação entre o desenvolvimento de células TIa^+ e a rejeição de enxerto. Estes resultados indicam que o tratamento imunodepressor administrado aos doentes receptores de enxerto cardíaco não impede o desenvolvimento de mecanismos celulares e humorais capazes de superar as infecções por herpesvírus.

Do presente estudo podemos concluir que as populações linfocitárias humanas não formam compartimentos perfeitamente estanques, e que o aumento ou redução da expressão de receptores e/ou antigénios, como resultado da resposta imunológica dos linfócitos, evidencia a natureza dinâmica e mutável das populações linfocitárias.

S U M M A R Y

There is some controversy concerning the specificity of membrane markers identifying lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. In this work, lymphocyte subpopulations and the level of overlap in their markers was studied by single marker tests, Cell Depletion (CD) and by double marker assays. Mixed Rosetting Reactions (MRR), were done as described earlier in a M.Sc. thesis (Carvalho, 1983). These analyses were done on healthy and immunosuppressed heart transplant recipients.

Direct antiglobulin (or antideterminant) rosetting reactions were used to identify (i) B lymphocytes, (ii) T lymphocytes, (iii) lymphocytes exhibiting Ia antigens (Ia⁺ cells) and (iv) lymphocytes expressing the K chain of immunoglobulin (Ck⁺ cells) using, respectively, (i) a sheep IgG anti-human Fab immunoglobulin, (ii) a rat monoclonal antibody (McAb) to a human T cell antigen, (iii) a rat McAb to the monomorphic portion of human Ia antigen, and (iv) a mouse McAb to human K light chain of immunoglobulin. Lymphocytes exhibiting receptors for the Fc portion of IgG were detected by EA rosetting reaction, using ox erythrocytes sensitized with IgG purified specific antibody.

Of the total blood lymphocyte population, single marker tests showed that 75.1[±]5.3% (n=76) were T cells, 19.4[±]6.4% (n=97) were B cells, 13.8[±]6.1% (n=21) expressed the K chain molecule, 15.6[±]7.6% (n=66) exhibited the Ia antigen, and 22.6[±]3.3% (n=21) expressed Fc_γ receptors.

Double tests indicated that B and T lymphocytes did not form absolutely distinct lymphocyte populations since 5.0[±]3.7% (by CD) or 3.9[±]2.7% (by MRR) of total lymphocytes expressed both surface Ig and the T marker.

Of the total peripheral blood B lymphocytes, (i) 32.76[±]22.99% (by CD) or 22.58[±]18.26% (by MRR) exhibited the T antigen, (ii) 65.96[±]6.40% (by MRR) expressed the K light chain, (iii) 42.27[±]27.11% (by CD) or 61.30[±]24.30% (by MRR) expressed the Ia antigen, and (iv) 74.33[±]13.00% (by MRR) exhibited Fc_γ receptors.

Similarly, of the total T lymphocytes, (i) 6.26[±]4.42% (by CD) or 5.28[±]3.58% (by MRR) showed surface Ig, (ii) 2.73[±]2.08% (by MRR) ex-

pressed the K light chain, (iii) $4.12 \pm 2.36\%$ (by MRR) exhibited the Ia antigen, and (iv) $6.10 \pm 3.09\%$ (by MRR) showed receptors for the Fc_{γ} portion of IgG.

Based on the degree of overlap between each pair of lymphocyte populations I drew a two-dimensional model which permits to visualize the interrelationship of the various lymphocyte populations.

Alterations of the proportions of lymphocytes expressing Ia antigen were observed in *in vitro* cultures following mitogenic (phytohaemagglutinin, PHA), allogeneic (mixed lymphocyte culture, MLC) or viral (MLC with Epstein-Barr virus transformed autologous lymphocytes) stimulations. Significant increases in Ia^{+} cells (from 20% up to 40-60% of total lymphocytes) were observed and resulted from an increase of the proportion of T cells that acquired the Ia antigen (from 5% up to 50-60% of T lymphocytes).

Alterations of lymphocyte subpopulations of heart transplant recipients, maintained under immunosuppressive therapy, was studied in detail. Patients who received a graft one year or more before and were receiving a daily treatment of prednisolone and azathioprine showed a drastic decrease of all lymphocyte subpopulations in which the T cell was the most affected one, exhibiting a decrease of 90.72% in absolute numbers. In percentage, T cells showed a significant reduction ($56.66 \pm 13.02\%$ as compared with $75.11 \pm 5.29\%$ in normals). In contrast, $TIIa^{+}$ cells were significantly higher ($9.16 \pm 8.62\%$) than in normal persons ($3.40 \pm 2.20\%$).

Antithymocyte globulin (ATG) administration during the first 10 days following the transplantation caused an even more profound decrease, in absolute numbers, of all lymphocyte subpopulations. The proportion of the T cell population was very reduced whereas both $TIIa^{+}$ and TFc_{γ} marked cells increased their proportions: from about 4% to 50% and from about 6% to 60%, respectively.

In patients immunosuppressed with cyclosporin A and prednisone I observed, in the period from two to five months post-transplantation, infections with herpesviruses. During infections (particularly by cytomegalovirus, CMV) there was a lower percentage of T cells with proportional increase in B cells: the high levels of Ia^{+} cells was mainly due to the expression of Ia antigens on T lymphocytes. Peaks of $TIIa^{+}$

cells were associated with primary CMV infection and reactivation of Epstein-Barr virus. Activated TIIa⁺ cells appeared before the maximal IgM and IgG anti-viral titres. Intravenous methylprednisolone and blood transfusions selectively reduced TIIa⁺ cell numbers but CMV-specific antibody titres were not affected by these treatments. No correlation was found between the levels of TIIa⁺ cells in the blood and graft rejection episodes. These results suggest that the immunosuppressive treatment given to heart transplant recipients does not impede the activation of cellular and humoral responses to these herpesvirus infections.

From the present study it was concluded that the markers used to delineate human lymphocyte subpopulations are not exclusive to these subpopulations, and that an increase or reduction in the expression of these receptors and/or antigens, as a result of the immune response of lymphocytes, shows the dynamic nature of lymphocytes.

BIBLIOGRAFIA

- ABDOU, N., Amare, M., Sagawa, A. & Abdou, N.L. (1980) Suppressor T cell in tolerance to deaggregated horse anti-human thymocyte globulin in man. *Transplantation* 29, 324.
- ABNEY, E.R., Cooper, M.D., Kearney, J.F., Lawton, A.R. & Parkhouse, R.M.E. (1977) A model for the development of immunoglobulin isotype diversity. In "Immune System, Genetics and Regulation" p.313. (Editores: Sercarz, E.E., Herzenberg, L.A. & Fox, F.). Academic Press, New York, E.U.A.
- AIUTI, F., Cerottini, J.C. & Coombs, R.R.A. (1974) Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. *Scand. J. Immunol.* 3, 521.
- ALBRECHTSEN, D., Solheim, B.G. & Thorsby, E. (1977) The presence of Ia-like determinants on a subpopulation of human T lymphocytes. *Immunogenetics* 5, 149.
- ANDERSON, C.L. & Grey, H.M. (1974) Receptors for aggregated IgG on mouse lymphocytes. Their presence on thymocytes, thymus-derived and bone marrow-derived lymphocytes. *J. Exp. Med.* 139, 1175.
- ANDRUS, L. & Lafferty, K.J. (1982) Inhibition of T-cell activation by cyclosporin A. *Scand. J. Immunol.* 15, 449.
- ARBEIT, R.D., Henkart, P.A. & Dickler, H.B. (1977) Differences between the Fc receptors of two lymphocyte subpopulations of human peripheral blood. *Scand. J. Immunol.* 6, 873.
- AULT, K.A. & Towle, M. (1981) Human B lymphocyte subsets 1. IgG-bearing B cell response to pokeweed mitogen. *J. Exp. Med.* 153, 339.
- BACH, M.A. & Bach, J.F. (1972) Activities of immunosuppressive agents *in vitro*. II. Different timing of azathioprine and methotrexate in inhibition and stimulation of mixed lymphocyte reaction. *Clin. Exp. Immunol.* 11, 89.
- BACH, M.A., Fournier, C. & Bach, J.F. (1979) Biological activities and site of action of the circulating thymic factor. In "Cell Biology and Immunology of Leukocyte Function. 12th International Leukocyte Culture Conference" p.177. (Editor: Quastel). Academic Press, New York, E.U.A.

- BALDWIN, W.M., Vanes, A., Valentyn, R.M., Van Gemert, G.W., Daha, M.R. & Vanes, L.A. (1982) Increased IgM and IgM immune complex like material in the circulation of renal transplant recipients with primary cytomegalovirus infections. *Clin. Exp. Immunol.* 50, 515.
- BASTEN, A., Miller, J.F.A.P., Sprent, J. & Pye, J. (1972) A receptor for antibody on B lymphocytes. I. Method of detection and functional significance. *J. Exp. Med.* 135, 610.
- BENTWICH, Z., Douglas, S.D., Siegal, F.P. & Kunkel, H.G. (1973a) Human lymphocyte-sheep erythrocyte rosette formation: some characteristics. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1, 511.
- BENTWICH, Z., Douglas, S.D., Skutelsky, E. & Kunkel, H.G. (1973b) Sheep red blood cell binding to human lymphocytes treated with neuraminidase; enhancement of T cell binding and identification of a subpopulation of B cells. *J. Exp. Med.* 137, 1532.
- BERNARD, A., Gelin, C., Raynald, B., Pham, D., Gosse, C. & Boumsell, L. (1982) Phenomenon of human T cells rosetting with sheep erythrocytes analyzed with monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 155, 1317.
- BERNEY, S. (1974) Characterization of glucocorticosteroid-induced changes in lymphocyte circulation in the rat. *Clin. Research* 22, 414.
- BIANCO, C. (1977) Plasma membrane receptors for complement. In "Biological Amplification Systems in Immunology". (Editors: Day, N. K. & Good, R.A.). Plenum Publishing Corporation, New York, E.U.A.
- BIANCO, C., Patrick, R. & Nussenzweig, V. (1970) A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes. I. Separation and characterization. *J. Exp. Med.* 132, 702.
- BIEBER, C.P., Griep, R.B., Oyer, P.E., David, L.A. & Stinson, E.B. (1977) Relationship of rabbit ATG serum clearance rate to circulating T-cell level, rejection onset and survival in cardiac transplantation. *Transplant. Proc.* 9, 1031.
- BILLING, R., Rafizadeh, B., Drew, I., Hartmen, R., Gale, R. & Terasaki, P. (1976) Human B lymphocyte antigens expressed by lymphocytic and myelocytic leukemia cells. I. Detection by rabbit antisera. *J. Exp. Med.* 144, 167.

- BILLINGHAM, M.E. (1981) Diagnosis of cardiac rejection by endocardial biopsy. *Heart Transplantation* 1, 25.
- BINNS, R.M., Licence, S.T., Symons, D.B.A., Gurner, B.W., Coombs, R.R.A. & Walters, D.E. (1979) Comparison of the direct antiglobulin rosetting reaction (DARR) and direct immunofluorescence (DIF) for demonstration of SIg-bearing lymphocytes in pigs, sheep and cattle. *Immunology* 36, 549.
- BIRD, A.G. & Britton, S. (1979) A new approach to the study of human B lymphocyte function using an indirect plaque assay and a direct cell activator. *Immunol. Rev.* 45, 41.
- BIRD, A.G., McLachlan, S.M. & Britton, S. (1981) Cyclosporin A promotes spontaneous outgrowth *in vitro* of Epstein-Barr virus induced B cell lines. *Nature* 289, 300.
- BORDES-AZNAR, J. & Tilney, N.L. (1982) Cyclosporin A: a more specific immunosuppressive agent? *J. Clin. Surg.* 1, 53.
- BOREL, J.F., Feurer, C., Gubler, H.U. & Stähelin, H. (1976) Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6, 468.
- BOREL, J.F. & Lafferty, K.J. (1983) Basic science summation. *Transplant. Proc.* 15, 3097.
- BOYUM, A. (1968) Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21 (supl. 97), 77.
- BRAIN, P., Gordon, J. & Willetts, W.A. (1970) Rosette formation by peripheral lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 6, 681.
- BRAIN, P. & Marston, R.H. (1973) Rosette formation by human T and B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 3, 6.
- BRITTON, S. & Palacios, R. (1982) Cyclosporin A - usefulness, risks and mechanism of action. *Immunological Rev.* 65, 5.
- BROCHIER, J. & Lethibichthuy, C. (1978) Human B cell differentiation induced by various mitogens and its T cell control. In "Human Lymphocyte Differentiation. INSERM Symposium 8" pag.69. (Editores: Serrou, B & Rosenfeld, C.). Amsterdam, Holanda.

- BROWN, C.S., Halpern, H. & Wortis, H.H. (1975) Enhanced rosetting of sheep erythrocytes by human peripheral blood T cells in the presence of dextran. *Clin. Exp. Immunol.* 20, 505.
- BROWN, G. & Greaves, M.F. (1974) Cell surface markers for human T and B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 4, 302.
- BUNJES, D., Hardt, C., Rollinghoff, M. & Wagner, H. (1981) Cyclosporin A mediates immunosuppression of primary cytotoxic T cell responses by impairing the release of interleukin 1 and interleukin 2. *Eur. J. Immunol.* 11, 657.
- BURCKHARDT, J.J. & Guggenheim, B. (1979) Cyclosporin A: *in vivo* and *in vitro* suppression of rat-T lymphocyte function. *Immunology* 36, 753.
- BURNET, F.M. (1957) A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Aust. J. Sci.* 20, 67.
- CARNEY, W.P., Iacoviello, V. & Hirsch, M.S. (1983) Functional properties of T lymphocytes and their subsets in cytomegalovirus mononucleosis. *J. Immunol.* 130, 390.
- CARNEY, W.P., Rubin, R.H., Hoffman, R.A., Hansen, W.P., Healey, K. & Hirsch, M.S. (1981) Analysis of T lymphocyte subsets in cytomegalovirus mononucleosis. *J. Immunol.* 126, 2114.
- CARON, G.A. (1969) The effect of antimetabolites and corticosteroids on lymphocyte transformation *in vitro*. In "Proceedings of the Third Annual Leucocyte Culture Conference" pag.287. (Editor: Rieke, W.O.). New York, E.U.A.
- CARVALHO, G.S. (1983) Lymphocyte subpopulations defined by cell surface markers using rosetting reactions. *Tese de Mestrado (Master of Science, M.Sc. degree)* Cambridge, G.B.
- CHANG, T., Kung, P. & Gingses, S. (1981) Does OKT3 monoclonal antibody react with an antigen recognition structure on human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1805.
- CHARRON, D.J., Benike, C., Engleman, E. & McDevitt, H.O. (1979) Human lymphocyte subpopulations: studies with monoclonal Ia antibodies. *Blood* 54 (Supl. 1), 82a.

- CHATENOUD, L., Kreis, H., Jungers, P. & Bach, J.F. (1981) The effect of immunosuppressive agents on T cell subsets, as evaluated by use of monoclonal anti T-cell antibodies. *Transplant. Proc.* 13, 1651.
- CHEN, W-Y., Munoz, J., Fudenberg, H.H., Tung, E. & Virella, G. (1981) Polyclonal activation of human peripheral blood B lymphocytes by formaldehyde fixed *Salmonella paratyphi B*. *J. Exp. Med.* 153, 365.
- CHESS, L., Levine, H., MacDermott, R.P. & Schlossman, S.F. (1975) Immunologic functions of isolated human lymphocyte subpopulations. VI. Further characterization of the surface Ig negative E-rosette negative (null cell) subset. *J. Immunol.* 115, 1483.
- CHOW, Y.M. & Kaplan, M.E. (1976) Effects of thiols on sheep erythrocytes resulting in enhanced rosette formation with human T lymphocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 153, 102.
- CLAMAN, H.N. (1972) Corticosteroids and lymphoid cells. *N. Engl. J. Med.* 287, 388.
- CLAMAN, H.N., Moorhead, J.W. & Benner, W.H. (1971) Corticosteroids and lymphoid cells *in vitro*. I. Hydrocortisone lysis of human, guinea pig, and mouse thymus cells. *J. Lab. Clin. Med.* 78, 499.
- CLINE, M.J., Sprent, J., Warner, N.L. & Harris, A.W. (1972) Receptors for immunoglobulin on B lymphocytes and cells of a cultured plasma cell tumor. *J. Immunol.* 108, 1126.
- COBBOLD, S.P. & Waldmann, H. (1984) Therapeutic potential of monovalent monoclonal antibodies. *Nature* 308, 460.
- COBURG, A.J., Gray, S.H. & Katz, F.H. (1970) Disappearance rates and immunosuppression of intermittent intravenously administered prednisolone in rabbits and human beings. *Surg. Gynecol. Obstet.* 131, 933.
- COHEN, J.J. (1972) Thymus-derived lymphocytes sequestered in the bone marrow of hydrocortisone-treated mice. *J. Immunol.* 108, 841.
- COHEN, J.J., Fischback & Claman, H.N. (1970) Hydrocortisone resistance of grafts *vs* host activity in mouse thymus, spleen and bone marrow. *J. Immunol.* 105, 1146.
- COOMBS, R.R.A., Feinstein, A. & Wilson, A.B. (1969) Immunoglobulin determinants on the surface of human lymphocytes. *Lancet* ii, 1157.

- COOMBS,R.R.A., Edebo,L., Feinstein,A. & Gurner,B.W. (1978) The class of antibodies sensitizing bacteria measured by mixed reverse passive antiglobulin haemagglutination (MrPAH). *Immunology* 34, 1027.
- COOMBS,R.R.A., Gurner,B.W., Janeway,C.A., Wilson,A.B., Gell,P.G.H. & Kelus,B.S. (1970a) Immunoglobulin determinants on the lymphocytes of normal rabbits. I. Demonstration by the mixed antiglobulin reaction of determinants recognized by anti- γ , anti- μ , anti-Fab and antiallotype sera, anti-As4 and anti-As6. *Immunology* 18, 417.
- COOMBS,R.R.A., Gurner,B.W., Wilson,A.B., Holm,G. & Lindgren,B. (1970b) Rosette formation between human lymphocytes and sheep red cells not involving immunoglobulin receptors. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 39, 658.
- COOMBS,R.R.A., Wilson,A.B., Eremin,O., Gurner,B.W., Haegert,D.G., Lawson,Y.A., Bright,S. & Munro,A. (1977) Comparison of the direct antiglobulin rosetting reaction with the mixed antiglobulin rosetting reaction for the detection of immunoglobulin on lymphocytes. *J. Immunol. Methods* 18, 45.
- CORTE,G., Mingari,M.C., Moretta,A., Damiani,G., Moretta,L. & Bargellesi,A. (1982) Human T cell subpopulations defined by a monoclonal antibody. I. A small subset is responsible for proliferation of allogeneic cells or to soluble antigens and for helper activity for B cell differentiation. *J. Immunol.* 128, 16.
- CORTE,G., Moretta,L., Damiani,G., Mingari,M.C. & Bargellesi,A. (1981) Surface antigens specifically expressed by activated T-cells in humans. *Eur. J. Immunol.* 11, 162.
- COSIMI,A.B. (1976) Randomized clinical trials of antithymocyte globulin in cadaver renal allograft recipients: importance of T cell monitoring. *Surgery* 80, 155.
- COSIMI,A.B., Burton,R.C., Kung,P.C., Colvin,R., Goldstein,G., Lifter,J., Rhodes,W. & Russell,P.S. (1981) Evaluation in primate renal allograft recipients of monoclonal antibody to human T-cell subclasses. *Transplant. Proc.* 13, 499.
- COUTINHO,A. & Möller,G. (1974) Immune activation of B cells. Evidence for one non-specific triggering signal not delivered by the Ig receptors. *Scand. J. Immunol.* 3, 133.

- CRAWFORD, D.H., Brickell, P., Tidman, N., McConnell, I., Hoffbrand, A.V. & Janossy, G. (1981a) Increased numbers of cells with suppressor T cell phenotype in peripheral blood of patients with infectious mononucleosis. *Clin. Exp. Immunol.* 43, 291.
- CRAWFORD, D.H., Edwards, J.M.B., Sweny, P., Hoffbrand, A.V. & Janossy, G. (1981b) Studies on long-term T-cell-mediated immunity to Epstein-Barr virus in immunosuppressed renal allograft recipients. *Inter. J. Cancer* 28, 705.
- DICKLER, H.B. (1976) Lymphocyte receptors for immunoglobulin. *Adv. Immunol.* 24, 167.
- DICKLER, H.B., Adkinson, N.F. & Terry, W.D. (1974) Evidence for individual human peripheral blood lymphocytes bearing both B and T cell markers. *Nature* 247, 213.
- DICKLER, H.B. & Kunkel, H.G. (1972) Interactions of aggregated gamma globulin with B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 136, 191.
- DIMITRIU, A. & Fauci, A.S. (1978) Activation of human B lymphocytes. XI. Differential effects of azathioprine on B lymphocytes and lymphocyte subpopulations regulating B cell function. *J. Immunol.* 121, 2335.
- DOUBLOUG, I. & Oyen, O. (1981) Per-og postoperativ aksidentell hypotermi. *Tidsskr Nor Lægeforen* 101, 261.
- DULBECCO, R. & Grisberg, H.S. (1973) Herpesvirus. In "Microbiology" p.1239. (Editores: Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsburg, H.S. & Woods, W.B., Jr.). Harper & Row, Haegerstown, Middlesex, E.U.A.
- DUPONT, E., Schandene, L., Devos, R., Lambermont, M. & Wybran, J. (1983) Depletion of lymphocytes with membrane markers of helper phenotype: a feature of acute and chronic drug-induced immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.* 51, 345.
- EDEN, A., Bianco, C. & Nussenzweig, V. (1973) Mechanism of binding of soluble complexes to lymphocytes. *Cell. Immunol.* 7, 459.
- EGELAND, T. & Lea, T. (1982) A rapid rosette technique for quantification and separation of mononuclear cell subsets using monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 55, 213.

- ENGLISH, T.A.H., McGregor, C., Wallwork, J. & Cory-Pearce, R. (1982) Aspects of immunosuppression for cardiac transplantation. *Heart Transplantation* 1, 280.
- EREMIN, O., Coombs, R.R.A., Plumb, D. & Ashby, J. (1978) Characterization of the human natural killer (NK) cell in blood and lymphoid organs. *Int. J. Cancer* 21, 42.
- EVANS, R.L., Faldetta, T.J., Humphreys, R.E., Pratt, D.M., Yunis, E.J. & Schlossman, S.F. (1978) Peripheral human T cells sensitized in mixed leukocyte culture synthesis and express Ia-like antigens. *J. Exp. Med.* 148, 1440.
- FAUCI, A.S. (1975) Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. I. Redistribution of circulating T and B lymphocytes to the bone marrow. *Immunology* 28, 669.
- FAUCI, A.S. (1976) Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. II. Differential effects of *in vivo* hydrocortisone, prednisolone and dexamethasone on *in vitro* expression of lymphocyte function. *Clin. Exp. Immunol.* 24, 5.
- FAUCI, A.S. & Dale, D.C. (1974) The effect of *in vivo* hydrocortisone on subpopulations of human lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 53, 240.
- FAUCI, A.S., Dale, D.C. & Balow, J.E. (1976) Glucocorticosteroid therapy: mechanisms of action and clinical considerations. *Ann. Intern. Med.* 84, 304.
- FERRARINI, M., Cadoni, A., Franzi, A.T., Ghigliotti, C., Leprini, A., Zicca, A. & Grossi, C.E. (1980) Ultrastructure and cytochemistry of human peripheral blood lymphocytes. Similarities between the cells of the third population and T_G lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 10, 562.
- FERRARINI, M., Moretta, L., Abrile, R. & Durante, M.L. (1975) Receptors for IgG molecules on human lymphocytes forming spontaneous rosettes with sheep red cells. *Eur. J. Immunol.* 5, 70.
- FORSHAM, P.H., Thorn, G.W. & Prunty, F.T.G. (1948) Clinical studies with pituitary adrenocorticotrophin. *J. Clin. Endocrinol.* 8, 15.
- FRÖLAND, S.S. (1972) Binding of sheep erythrocytes to human lymphocytes. A probable marker of T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 1, 269.

- FRÖLAND, S.S. & Natvig, J.B. (1973) Identification of three different human lymphocyte populations by surface markers. *Transplant. Rev.* 16, 114.
- FU, S.M., Chiorazzi, N., Wang, C.Y., Montazery, G., Kunkel, H.G., Ko, H.S. & Gottlieb, A.B. (1978) Ia-bearing T lymphocytes in man. Their identification and role in the generation of allogeneic helper activity. *J. Exp. Med.* 148, 1423.
- FUKUI, K., Kakumu, S., Murakami, H., Kuriki, J., Yoshioka, K. & Sakamoto, N. (1984) Increased peripheral blood Ia positive T cells and their effect on autologous mixed lymphocyte reaction in chronic active liver disease. *Clin. Exp. Immunol.* 58, 90.
- GALANAUD, P. (1979) *In vitro* antibody response to trinitrophenyl polyacrylamide beads. *Immunol. Rev.* 45, 141.
- GALILI, U. & Schlesinger, M. (1974) The formation of stable E-rosettes after neuraminidase treatment of either human peripheral blood lymphocytes or of sheep red blood cells. *J. Immunol.* 112, 1628.
- GEHA, R.S., Schneeberger, E., Rosen, F.S. & Merler, E. (1973) Interaction of human thymus derived and non-thymus derived lymphocytes *in vitro*. Induction of proliferation and antibody synthesis in B lymphocytes by a soluble factor released from antigen-stimulated T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 138, 1230.
- GERGELY, P., Bakacs, T., Cornain, S. & Klein, E. (1977) Fc receptors on B lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 28, 99.
- GESNER, B.M. & Ginsburg, V. (1964) Effects of glycosidases on the fate of transfused lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52, 755.
- GILBERTSEN, R.B. & Metzgar, R.S. (1976) Human T and B lymphocyte rosette tests: effect of enzymatic modification of sheep erythrocytes (E) and the specificity of neuraminidase-treated E. *Cell. Immunol.* 24, 97.
- GIULIANO, V.J., Jasin, H.E., Hurd, E.R. & Ziff, M.J. (1974) Enumeration of B lymphocytes in human peripheral blood by a rosette method for the detection of surface-bound immunoglobulin. *J. Immunol.* 112, 1494.

- GLEESON-WHITE, M.H., Heard, D.H., Mynors, L.S. & Coombs, R.R.A. (1950) Factors influencing the agglutinability of red cells: the demonstration of a variation in the susceptibility to agglutination exhibited by the red cells of individual oxen. *Br. J. Exp. Pathol.* 31, 321.
- GODING, J.W. & Layton, J.E. (1976) Antigen-induced co-capping of IgM- and IgD-like receptors on murine B cells, *J. Exp. Med.* 144, 82.
- GONZALEZ-MOLINA, A. & Spiegelberg, H.L. (1977) A subpopulation of normal human peripheral B lymphocytes that bind IgE. *J. Clin. Invest.* 59, 616.
- GREAVES, M.F., Janossy, G. & Doenhoff, M. (1974) Selective triggering of human T and B lymphocytes *in vitro* by polyclonal mitogens. *J. Exp. Med.* 140, 1.
- GREEN, C. (1982) Cyclosporin A. Therapeutic promise maintained. *Immunol. Today* 3, 121.
- GREY, H.M., Kubo, R.T. & Cerottini, J.C. (1972) Thymus derived (T) cell immunoglobulins. Presence of a receptor site for IgG and absence of large amounts of "buried" Ig determinants on T cells. *J. Exp. Med.* 136, 1323.
- GUILLOU, P.J., Hegarty, J., Ramsden, C., Davison, A.M., Will, E.J. & Giles, G.R. (1982) Changes in human natural killer activity early and late after renal transplantation using conventional immunosuppression. *Transplantation* 33, 414.
- GUPTA, S., Platsoucas, C.D., Schulof, R. & Good, R.A. (1979) Receptors for IgA on a subpopulation of human T and B lymphocytes. *Cell. Immunol.* 45, 469.
- HAEGERT, D.G. (1978a) Observations on the number of immunoglobulin-bearing lymphocytes in human peripheral blood with the mixed antiglobulin-rosetting reaction and direct immunofluorescence. *J. Immunol.* 120, 124.
- HAEGERT, D.G. (1978b) Technical improvements in the mixed antiglobulin rosetting reaction with consequent demonstration of high numbers of immunoglobulin-bearing lymphocytes in viable preparations of human peripheral blood. *J. Immunol. Methods* 22, 73.

- HAEGERT, D.G. & Coombs, R.R.A. (1979) Do human B and null lymphocytes form a single immunoglobulin-bearing population? *Lancet* *ii*, 1051.
- HAEGERT, D.G., Hurd, C. & Coombs, R.R.A. (1978) Comparison of the direct antiglobulin rosetting reaction with direct immunofluorescence in the detection of surface membrane immunoglobulin on human peripheral blood lymphocytes, *Immunology* *34*, 533.
- HALLBERG, T., Gurner, B.W. & Coombs, R.R.A. (1973) Opsonic adherence of sensitized ox red cells to human lymphocytes as measured by rosette formation. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* *44*, 500.
- HALLORAN, P., Schirmacher, V. & David, C.S. (1975) Specificity and significance of inhibition of Fc receptor-binding by anti-H-2 sera. *Immunogenetics* *2*, 345.
- HANAUMI, K., Abo, T. & Kumagai, K. (1976) Exposure by phospholipase A of receptors for sheep erythrocytes on human B cells. *Nature* *259*, 124.
- HARKISS, G.D., Brown, D.L., Cory-Pearce, R. & English, T.A.H. (1983a) Serial analysis of circulating immune complexes, complement, and antithymocyte globulin antibodies in heart transplant recipients. *J. Clin. Immunol.* *3*, 117.
- HARKISS, G.D., Brown, D.L., Smith, D.J. & Nagington, J. (1983b) Antibody moieties within circulating immune complexes in heart transplant recipients. *Clin. Exp. Immunol.* *51*, 21.
- HAYWARD, A.R. (1983) Phenotypes and functional tests for human lymphocytes. *Clin. Immunol. Allergy* *1*, 485.
- HEDMAN, L.A., Röckert, L-L. & Lundin, P.M. (1984) The effect of steroids on the circulating lymphocyte population. VI. Studies of the thoracic duct T- and B-lymphocyte populations after neonatal thymectomy and prednisolone treatment. An immunofluorescence study in the rat. *Int. J. Immunopharmac.* *6*, 357.
- HEILMAN, D.H. (1972) Characteristics of the action of cortisol on human leukocytes cultured with phytohaemagglutinin (PHA) and pokeweed mitogen. *Fed. Proc.* *31*, 776.
- HESS, A.D. & Tutschka, P.J. (1980) Effect of cyclosporin A on human lymphocyte responses *in vitro*. *J. Immunol.* *124*, 2601.

- HESS, A.D., Tutschka, P.J., Pu, Z. & Santos, G.W. (1982) Effect of cyclosporin A on human lymphocyte responses *in vitro*. IV. Production of T cell stimulatory growth factors and development of responsiveness to these growth factors in CsA-treated primary MLR cultures. *J. Immunol.* 128, 360.
- HOKLAND, M., Hokland, P. & Heron, I. (1978) Two small lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. I. Purification and surface marker profiles. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 57, 435.
- HOKLAND, P. (1981) Human peripheral blood lymphocytes: isolation, subset characterization and *in vitro* properties. Review of the literature of the 1970s. *Acta Pathol. Microbiol. Scandinavia (Sect. Immunol.) Supl.* 277, 7.
- HOKLAND, P. & Heron, I. (1979) Functional characterization *in vitro* of two human T-cell subpopulations with different affinities to sheep erythrocytes. *Scand. J. Immunol.* 9, 333.
- HOKLAND, P., Heron, I. & Larsen, B. (1981) Effects of basic proteins on spontaneous rosette formation between human lymphocytes and xenogeneic erythrocytes. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 65, 212.
- HOMAN, W.P., Fabre, J.W. & Morris, P.J. (1979) Nature of the unresponsiveness induced by cyclosporin A in rats bearing renal allografts. *Transplantation.* 28, 439.
- HORWITZ, D.A. & Bakke, A.C. (1984) An Fc receptor-bearing, third population of human mononuclear cells with cytotoxic and regulatory function. *Immunol. Today* 5, 148.
- HORWITZ, D.A. & Garrett, M.A. (1977) Distinctive functional properties of human blood lymphocytes: a comparison with T lymphocytes, B lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.* 118, 1712.
- HORWITZ, D.A. & Lobo, P.I. (1975) Characterization of two populations of human lymphocyte bearing easily detectable surface immunoglobulin. *J. Clin. Invest.* 56, 1464.
- HOWARD, F.D., Ledbetter, J.A., Wong, J., Bieber, C.P., Stinson, E.B. & Herzenberg, L.A. (1981) A human T lymphocyte differentiation marker defined by monoclonal antibodies that block E-rosette formation. *J. Immunol.* 126, 2117.

- HOWARD, J.C. (1972) The life span and recirculation of marrow-derived small lymphocytes from the rat thoracic duct. *J. Exp. Med.* 135, 185.
- HOWARD, R.J., Dougherty, S.F. & Mergenhagen, S.E. (1968) Prolongation of skin homografts by rabbit anti-mouse lymphocyte serum in mice rendered tolerant to rabbit gamma globulin, *J. Immunol.* 101, 301.
- HUBER, C. & Wigzell, H. (1975) A simple rosette assay for demonstration of complement receptor sites, using complement-coated zymosan beads. *Eur. J. Immunol.* 5, 432.
- HUMPHREY, J.H. (1980) Macrophages and the differential migration of lymphocytes. In "Blood Cell and Vessel Walls; Functional Interactions", *CIBA Foundation Symposium 71*, 287, Excerpta Medica, Amsterdam, Holanda.
- HUMPHREY, J.H. & Dourmashkin, R.R. (1969) The lesion in cell membrane caused by complement. *Adv. Immunol.* 11, 75.
- HUMPHREYS, R.E., McCune, J.M., Chess, L., Herrman, H.D., Malenka, D. J., Mann, D.L., Parham, P., Schlossman, S.F. & Strominger, J.L. (1976) Isolation and immunologic characterization of a human, B lymphocyte specific, cell surface antigen. *J. Exp. Med.* 144, 98.
- INDIVERI, F., Wilson, B.S., Russo, C. & Quaranta, V. (1980) Ia-like antigens on human T lymphocytes; relationship to other surface markers, role in mixed lymphocyte reactions, and structural profile. *J. Immunol.* 125, 2673.
- INTRONA, M., Allavena, P., Spreafico, F. & Mantovani, A. (1981) Inhibition of human natural killer activity by cyclosporin A. *Transplantation* 31, 113.
- ISHIZAKA, K. & Ishizaka, T. (1960) Biologic activity of aggregated gamma-globulin. II. Study of various methods for aggregation species differences. *J. Immunol.* 85, 163.
- JONDAL, M. (1974) Surface markers on human B and T lymphocytes. IV. Distribution of surface markers on resting and blast-transformed lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 3, 739.

- JONDAL, M., Holm, G. & Wigzell, H. (1972) Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non immune rosettes with sheep red blood cells. *J. Exp. Med.* 136, 207.
- KALMAN, V.K. & Klimpel, G.R. (1983) Effects of cyclosporine on the production of various interferons. *Transplant. Proc.* 15, 2383.
- KAMOUN, M., Martin, P.J., Hansen, J.A., Brown, M.A., Siadak, A.W. & Nowinski, R.C. (1981) Identification of a human T lymphocyte surface protein associated with the E-rosette receptor. *J. Exp. Med.* 153, 207.
- KANGRO, H.O. (1980) Evaluation of a radioimmunoassay for IgM-class antibodies against cytomegalovirus. *Br. J. Exp. Pathol.* 61, 512.
- KAPLAN, M.E. & Clark, C. (1974) An improved rosetting assay for detection of human T lymphocytes. *J. Immunol. Methods* 5, 131.
- KASZUBOWSKI, P.A., Goodwin, J.S. & Williams, R.C. (1980) Ia antigen on the surface of a subfraction of T cells that bear Fc receptors for IgG. *J. Immunol.* 124, 1075.
- KLAUS, G.G.B. (1981) The effects of cyclosporin A on the immune system. *Immunol. Today* 2, 83.
- KO, H.S., Fu, S.M., Winchester, R.J., Yu, D.T. Y. & Kunkel, H.G. (1979) Ia determinants on stimulated human T lymphocytes. Occurrence on mitogen and antigen-stimulated T cell. *J. Exp. Med.* 150, 246.
- KORITZ, T.N., Gurner, B.W., Chalmers, D.G. & Coombs, R.R.A. (1980) Measure of rheumatoid factor in human sera by passive haemagglutination of human erythrocytes carrying immunoglobulin linked by chromic chloride. *J. Immunol. Methods* 32, 1.
- KÖHLER, G. & Milstein, C. (1975) Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificities. *Nature* 256, 495.
- KRAMMER, P.H., Hudson, L. & Sprent, J. (1975) Fc-receptors, Ia-antigens, and immunoglobulin on normal and activated mouse T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 142, 1403.

- KUMAGAI, K., Abo, T., Sekizawa, T. & Sasaki, M. (1975) Studies of surface immunoglobulins on human B lymphocytes. I. Dissociation of cell-bound immunoglobulins with acid pH or at 37°C. *J. Immunol.* 115, 982.
- KUNG, P., Goldstein, G. & Reinherz, E. (1979) Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigen. *Science* 206, 377.
- KUNKL, A. & Klaus, G.G.B. (1980) Selective effects of cyclosporin A on functional B cell subsets in the mouse. *J. Immunol.* 125, 2526.
- KUPIEC-WEGLINSKI, Filho, M.A., Strom, T.B. & Tilney, N.L. (1984) Sparing of suppressor cells: a critical action of cyclosporine. *Transplantation* 38, 97.
- LAY, W.H., Mendes, N.F., Bianco, C. & Nussenzweig, V. (1971) Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocytes. *Nature* 230, 531.
- LEE, S.T. & Paraskevas, F. (1972) Cell surface-associated gamma globulins in lymphocytes. *J. Immunol.* 109, 1262.
- LEONI, P., Garcia, R.C. & Allison, A.C. (1978) Effects of cyclosporin A on human lymphocytes in culture. *J. Clin. Lab. Immunol.* 1, 67.
- LEVINE, M.A. & Claman, H.N. (1970) Bone marrow and spleen: dissociation of immunologic properties by cortisone. *Science* 167, 1515.
- LING, N.R., Bishop, S. & Jeffris, R. (1976) Use of antibody-coated red cells for the sensitive detection of antigen and in rosette tests for cells bearing surface immunoglobulins. *J. Immunol. Methods* 15, 279.
- LIPSKY, P.E. (1980) Staphylococcal protein A, a T regulated polyclonal activator of human B cells. *J. Immunol.* 125, 155.
- LLOYD, K.O., Ng, J. & Dippold, W.G. (1981) Analysis of the biosynthesis of HLA-DR glycoproteins in human malignant melanoma cell lines. *J. Immunol.* 126, 2408.
- LOBO, P.I. & Horwitz, D.A. (1976) An appraisal of Fc receptors on human peripheral blood B and L lymphocytes. *J. Immunol.* 117, 939.

- LOBO, P.I., Westervelt, F.B. & Horwitz, D.A. (1975) Identification of two populations of immunoglobulin-bearing lymphocytes in man. *J. Immunol.* 114, 116.
- LOBUGLIO, A.F., Cotran, R.S. & Jandl, J.H. (1967) Red cells coated with immunoglobulin G: binding and sphering by mononuclear cells in man. *Science* 158, 1582.
- LOHRMANN, H.P., Novikovs, L. & Graw, R.G. (1974) Cellular interactions in the proliferative response of human T and B lymphocytes of phytomitogens and allogeneic lymphocytes. *J. Exp. Med.* 139, 1553.
- LUM, L.G., Muchmore, A.V., Keren, D., Decker, J., Koski, I., Strober, W. & Blaese, R.M. (1979) A receptor for IgA on human T lymphocytes. *J. Immunol.* 122, 65.
- McCONNELL, I., Munro, A. & Waldmann, H. (1981) B lymphocytes. In "The Immune System. A course on the molecular and cellular basis of immunity" p. 124. Blackwell Scientific Publications, 2a edição, Oxford, G.B.
- MENDES, N.F., Tolnai, M.E.A., Silveira, N.P.A., Gilbertsen, R.B. & Metzgar, R.S. (1973) Technical aspects of the rosette tests used to detect human complement receptor (B) and sheep erythrocyte-binding (T) lymphocytes. *J. Immunol.* 111, 860.
- METCALF, E.S. & Klinman, N.R. (1976) *In vitro* tolerance induction in neonatal murine B cells. *J. Exp. Med.* 143, 1327.
- MEUER, S.C., Fitzgerald, K.A., Hussey, R.E., Hodgdon, J.C., Schlossman, S.F. & Reinherz, E.L. (1983) Clonotypic structures involved in antigen-specific human T cell function. Relationship to the T3 molecular complex. *J. Exp. Med.* 157, 705.
- MILLER, G. (1975) Epstein-Barr herpes virus and infectious mononucleosis. *Progr. Med. Virol.* 20, 84.
- MITCHISON, N.A. (1971) The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. V. Use of antilymphocyte serum to deplete animals of helper cells. *Eur. J. Immunol.* 1, 68.
- MOORE, A.L. & Zusman, J. (1978) Conditions enhancing the percentage and size of E-rosettes formed by T lymphocytes. *J. Immunol. Methods* 23, 275.

- MORETTA, A., Mingari, M.C., Cerottini, J.C., Fauci, A.S. & Moretta, L. (1983a) Relationship between expression of Fc_γ receptor or Ia antigens and cytolytic activities of alloactivated human T cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 26, 232.
- MORETTA, A., Mingari, M.C., Colombatti, M. & Moretta, L. (1981a) Fc receptors on human T lymphocytes: loss of Fc_μ and expression of Fc_γ receptors by T cell stimulated in mixed lymphocyte reaction. *Scand. J. Immunol.* 13, 447.
- MORETTA, A., Pantaleo, G., Moretta, L., Cerottini, J.C. & Mingari, M. C. (1983b) Direct demonstration of the clonogenic potential of every human peripheral blood T cell. *J. Exp. Med.* 157, 743.
- MORETTA, L., Ferrarini, M. & Cooper, M.D. (1978a) Characterization of human T-cell subpopulations as defined by specific receptors for immunoglobulins. *Contemp. Top. Immunobiol.* 8, 19.
- MORETTA, L., Ferrarini, M., Durante, M.L. & Mingari, M.C. (1975) Expression of a receptor for IgM by human T cells *in vitro*. *Eur. J. Immunol.* 5, 565.
- MORETTA, L., Ferrarini, M., Mingari, M.C., Moretta, A. & Webb, S. R. (1976) Subpopulations of human T cells identified by receptors for immunoglobulins and mitogen responsiveness. *J. Immunol.* 117, 2171.
- MORETTA, L., Mingari, M.C. & Moretta, A. (1979a) Human T cell subpopulations in normal and pathologic conditions. *Immunol. Rev.* 45, 163.
- MORETTA, L., Mingari, M.C., Moretta, A. & Cooper, M.D. (1979b) Human T lymphocyte subpopulations: studies of the mechanism by which T cells bearing Fc receptors for IgG suppress T-dependent B cell differentiation induced by pokeweed mitogen. *J. Immunol.* 122, 984.
- MORETTA, L., Mingari, M.C., Moretta, A., Haynes, B.F. & Fauci, A. S. (1980) T cell Fc receptors as markers of functional human lymphocyte subsets, *in* "Immunology 80. Progress in Immunology IV". p. 223. (Editores: Fougereau & Dausset, J.), Amsterdam, Holanda.

- MORETTA, L., Mingari, M.C. & Romanzi, C.A. (1978b) Loss of Fc receptors for IgG from human T lymphocytes exposed to IgG immune complexes. *Nature* 272, 618.
- MORETTA, L., Moretta, A., Canonica, G.W., Bacigalupo, A., Mingari, M. C. & Cerottini, J.C. (1981b) Receptors for immunoglobulins on resting and activated human T cells. *Immunol. Rev.* 56, 141.
- MORETTA, L., Webb, S.R., Grossi, C.E., Lydyard, P.M. & Cooper, M.D. (1977) Functional analysis of two human T-cell subpopulations: help and suppression of B-cell responses by T cells bearing receptors for IgM or IgG. *J. Exp. Med.* 146, 184.
- MORRIS, P.J. (1981) Cyclosporin A. *Transplantation* 32, 349.
- MORRIS, P.J. (1983) Renal transplantation. *Transplant. Proc.* 15, 1902.
- MORRIS, P.J., Mason, D.W. & Hutchinson, I.V. (1983) The effect of cyclosporine A on lymphocytes in animal models of tissue transplantation. *Transplant. Proc.* 15, 2287.
- MOSS, D.J., Rickinson, A.B. & Pope, J.H. (1978) Long-term T-cell-mediated immunity to Epstein-Barr virus in man. I. Complete regression of virus-induced transformation in cultures of seropositive donor leukocytes. *Int. J. Cancer* 22, 662.
- MÖLLER, E. (1965) Contact-induced cytotoxicity by lymphoid cells containing foreign isoantigens. *Science* 147, 873.
- NIEDERHUBER, J.E., Frelinger, J.A. & Dine, M.S. (1976) Effects of anti-Ia sera on mitogenic responses. II. Differential expression of the Ia marker on phytohaemagglutinin and concanavalin A-reactive T cells. *J. Exp. Med.* 143, 372.
- NIEUWENHUIS, P. & Ford, W.L. (1976) Comparative migration of B and T lymphocytes in the rat spleen and lymph nodes. *Cell. Immunol.* 23, 254.
- NOSSAL, G.J.V. & Pike, B.L. (1975) Evidence for the clonal abortion theory of B-lymphocyte tolerance. *J. Exp. Med.* 141, 904.
- O'TOOLE, C.M., Carvalho, G.S., Cranage, M.P. & Large, S. (1984) Immune responses in cardiac transplantation. I. Detection of activated T_H1⁺ cells in the blood during herpes virus infections. *Clin. Exp. Immunol.* 57, 671.

- O'TOOLE, C.M., Maher, P., Spiegelhalter, D.J., Walker, J.R., Stovin, P., Wallwork, J. & English, T.A.H. (1985) Predictive value of T cell subset ratios, pre- and post-cardiac transplantation, for rejection or infection. *Transplantation* (submitted).
- OWEN, J.J.T., Cooper, M.D. & Raff, M.C. (1974) *In vitro* generation of B lymphocytes in mouse foetal liver, a mammalian "bursa equivalent". *Nature* 249, 361.
- PALACIOS, R. (1982a) Mechanisms of T cell activation. Role and functional relationship of HLA-DR antigen and interleukins. *Immunol. Rev.* 63, 73.
- PALACIOS, R. (1982b) Cyclosporin-A and the OKT3 monoclonal antibody exert their respective inhibitory and mitogenic activity on T cells by interacting with the same receptor. *J. Clin. Immunol.* 2 (supl. 3), 15s.
- PALACIOS, R. & Möller, G. (1981) Cyclosporin A blocks receptors for HLA-DR antigens on T cells. *Nature* 290, 792.
- PAPAMICHAEL, M., Holbrorow, E.Z., Keith, H.I. & Currey, H.L.F. (1972) Subpopulations of human peripheral blood lymphocytes distinguished by combined rosette formation and membrane immunofluorescence, *Lancet* ii, 64.
- PARASKEVAS, F., Lee, S-T., Orr, K.B. & Israels, L.G. (1972) A receptor for Fc on mouse B-lymphocytes. *J. Immunol.* 108, 1319.
- PARISH, C.R. & Hayward, J.A. (1974) The lymphocyte surface. I. Relations between Fc receptors, C'3 receptors and surface immunoglobulin. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 187, 47.
- PARSA, I., Butt, K.M.H., Elberg, A.J., Kountz, S.L., Satoh, P.S. & Sutton, A. (1979) Human T lymphocyte receptors for sheep erythrocyte, antithymocyte (ATG), and anti-human brain globulin (AHB) in renal allograft recipients. *Transplant. Proc.* 11, 1241.
- PEPYS, E.O., Tennent, G. & Pepys, M.B. (1981) Enumeration of T and B lymphocytes in whole peripheral blood: absence of a null cell population. *Clin. Exp. Immunol.* 46, 229.
- PEREIRA, R.S., Gear, A.J., Dore, C.J. & Webster, A.D.B. (1983) Effects of cyclosporin A on immunoglobulin production by EB virus stimulated lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 53, 115.

- PERNIS, B., Ferrarini, M., Forni, L. & Amante, L. (1971) In "Progress in Immunology" (Editores: Fougerau, M. & Dausset, J.), Amsterdam, Holanda.
- PIZZOLO, G., CHILOSI, M. & MARRADI, P.L. (1981) Diagnostic usefulness of detecting Ia-bearing T lymphocytes in mononuclear syndromes. *Acta haemat.* 66, 63.
- PREIKSAITIS, J.K., Rosno, S., Grumet, C. & Merigaw, T.C. (1983) Infections due to herpes viruses in cardiac transplant recipients: role of donor heart and immunosuppressive therapy. *J. Infect. Dis.* 147, 947.
- PRINCE, H.E., Ettenger, R.B., Dorey, F.J., Fine, R.N. & Fahey, J.L. (1984) Azathioprine suppression of natural killer activity and antibody-dependent cellular cytotoxicity in renal transplant recipients. *J. Clin. Immunol.* 4, 312.
- PROSS, H.F. & Jondal, M. (1975) Cytotoxic lymphocytes from normal donors. A functional marker of human non-T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 21, 226.
- PURI, J. & Lonai, P. (1980) Mechanisms of antigen binding by T cells. H-2 (I-A) restricted binding of antigen plus Ia by helper cells. *Eur. J. Immunol.* 10, 273.
- RAMASAMY, R. & Lawson, Y. (1975) Independent movement of surface immunoglobulin from Fc receptors on lymphocyte membranes. *Immunology* 28, 301.
- RAWSON, A.J. & Huang, T.C. (1975) The response of phytohaemagglutinin or to concanavalin A as a probe for subpopulations of human peripheral blood lymphocytes. *Cell Immunol.* 17, 310.
- REINHERZ, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G. & Schlossman, S.F. (1979a) A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T cells. *J. Immunol.* 123, 1312.
- REINHERZ, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G. & Schlossman, S.F. (1979b) Further characterization of the human inducer T cell subset defined by monoclonal antibody. *J. Immunol.* 123, 2894.

- REINHERZ, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G. & Schlossman, S.F. (1980a) A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic/suppressor T cell subset previously defined by a heteroantiserum termed TH2. *J. Immunol.* 124, 1301.
- REINHERZ, E.L., Meuer, S.C. & Schlossman, S.F. (1983) The delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. *Immunol. Today* 4, 5.
- REINHERZ, E.L., O'Brien, C., Rosenthal, P. & Schlossman, S.F. (1980b) The cellular basis for viral-induced immunodeficiency: analysis by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 125 1269.
- REINHERZ, E.L. & Schlossman, S.F. (1980) The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell* 19, 821.
- REINHERZ, E.L. & Schlossman, S.F. (1981) The characterization and function of human immunoregulatory T lymphocyte subset. *Immunol. Today* 2, 69.
- RICKINSON, A.B., Moss, D.J. & Pope, J.H. (1979) Long-term T-cell mediated immunity to Epstein-Barr virus in man, II. Components necessary for regression in virus-infected leukocyte cultures. *Int. J. Cancer* 23, 610.
- RINGDEN, O., Rynnell-Dagoo, B., Kunori, T., Freijd, A. & Möller, E. (1979) Antibody production and DNA synthesis of human lymphocyte subpopulations induced by PPD tuberculin. *Clin. Exp. Immunol.* 36, 528.
- RINGDEN, O., Rynnell-Dagoo, B., Waterfield, E.M., Möller, E. & Möller, G. (1977) Polyclonal antibody secretion in human lymphocytes induced by killed staphylococcal bacteria and polysaccharide. *Scand. J. Immunol.* 6, 1159.
- ROCKLIN, R.E., MacDermott, R.P., Chess, L., Schlossman, S.F. & David, J.R. (1974) Studies on mediator production by highly purified human T and B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 140, 1303.
- ROMAGNANI, S., Giudizi, M.G., Almerigogna, F., Nicoletti, P.L. & Ricci, M. (1980) Protein A of *Staphylococcus aureus* is mitogenic for IgG bearing but also for a subpopulation of IgM and/or IgD-bearing human lymphocytes. *Immunology* 39, 417.

- ROSENBERG, J.C. & Lysz, K. (1978) Suppression of human cytotoxic lymphocytes by methylprednisolone. An immunosuppressive mechanism of action of steroids. *Transplantation* 25, 115.
- ROSS, G.D. & Polley, M.J. (1976) Assay for the two different types of lymphocyte complement receptors. *Scand. J. Immunol.* 5 (Supl. 5), 99.
- ROSS, G.D., Polley, M.J., Rabellino, E.M. & Grey, H.M. (1973) Two different complement receptors on human lymphocytes, one specific for C3b and one specific for C3b inactivator-cleaved C3b. *J. Exp. Med.* 138, 798.
- ROUTHIER, G., Epstein, O., Janossy, G., Thomas, H.C., Scherlock, S., Kung, P.C. & Goldstein, G. (1980) Effects of cyclosporin A on suppressor and inducer T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *Lancet* *ii*, 1223.
- SAMARUT, C., Brochier, J. & Revillard, J.P. (1976) Distribution of cells binding erythrocyte-antibody (EA) complexes in human lymphoid populations. *Scand. J. Immunol.* 5, 221.
- SASAKI, M., Terasaki, P.I., Silberman, H. & Berne, T. (1979) Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity tests for immunosuppression monitoring of transplant patients. *Transplantation* 27, 246.
- SCHLOSSMAN, S.F., Chess, L., Humphreys, R.E. & Strominger, J.L. (1976) Distribution of Ia-like molecules on the surface of normal and leukemic human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1288.
- SCHROFF, R.W., Gale, R.P. & Fahey, J.L. (1982) Regeneration of T cell subpopulations after bone marrow transplantation: cytomegalovirus infection and lymphoid subset imbalance. *J. Immunol.* 129, 1926.
- SHUURMAN, R.K., Gelfand, E.W., Matheson, D., Zimmerman, B. & Dosch, H.M. (1980) Identification of Ia on a subpopulation of human T lymphocytes that stimulate in a mixed lymphocyte reaction. *J. Immunol.* 124, 1924.

- SEAMAN, G.V.F. & Uhlenbruck, G. (1963) The surface structure of erythrocytes from some animal sources. *Arch. Biochem. Biophys.* 100, 493.
- SHREFFLER, D.C. & Davis, C.S. (1975) In "Advances in Immunology" 20, 125 (Editores: Dixon & Kunkel). Academic Press, New York, E.U.A.
- SHIH, W.W.H., Ellison, G.W., Meyers, L.W., Durkos-Smith, D. & Fahey, J.L. (1982) Locus of selective depression of human natural killer cells by azathioprine. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 23, 672.
- SMITH, C.I.E., Hammarstrom, L., Bird, A.G., Kunori, T., Gustaffson & Holme, T. (1979) Lipopolysaccharide and lipid A induced human blood lymphocyte activation as detected by a protein A plaque assay. *Eur. J. Immunol.* 9, 619.
- SOKAL, R.R. & Rohlf, F.J. (1967) Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biology Research. W.H. Freeman & Company, San Francisco, E.U.A.
- SOLLIDAY, S. & Bach, F.H. (1970) Cytotoxicity: specificity after *in vitro* sensitization. *Science* 170, 1406.
- SONDEL, P.M., Chess, L., MacDermott, R.P. & Schlossman, S.F. (1975) Immunologic functions of isolated human lymphocyte subpopulations. III. Specific allogeneic lympholysis mediated by human T cells alone. *J. Immunol.* 114, 982.
- SPRINGER, T.A., Kaufman, J.F., Terhorst, C. & Strominger, J.L. (1977) Purification and structural characterization of human HLA-linked-B-cell antigens. *Nature* 268, 213.
- TATSUMI, E., Kimura, K., Takiuchi, Y., Fukuhara, S. & Shirakawa, S. (1980) T lymphocytes expressing human Ia-like antigens in infectious mononucleosis (IM). *Blood* 56, 383.
- TEN BERGE, R.J.M., Schellekers, P.T.A., Surachnos, S., The, T.H., Ten Veen, J.H. & Wilmink, J.M. (1981) The influence of therapy with azathioprine and prednisone on the immune system of kidney transplant recipients. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 21, 20.

- TEN BERGE, R.J.M., Schellekers, P.T.A., Surachnos, S., The, T.H., Ten Veen, J.H. & Wilmink, J.M. (1982) A longitudinal study on the effects of azathioprine and high doses of prednisone on the immune system of kidney transplant recipients. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 24, 33.
- THOMAS, F., Mendez-Picon, G., Thomas, J. & Lee, H.M. (1979) Individualized monitoring and modulation of immune reactivity using standardized antithymocyte globulin (ATG). *Transplant. Proc.* 11, 1429.
- UHR, J.W. (1965) Passive sensitization of lymphocytes and macrophages by antigen-antibody complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 1599.
- VERBI, W., Greaves, M.F., Schneider, C., Koubek, K., Janossy, G., Stein, H., Kung, P. & Goldstein, G. (1982) Monoclonal antibodies OKT11 and OKT11A have pan-T reactivity and block sheep erythrocyte "receptors". *Eur. J. Immunol.* 12, 81.
- VITETTA, E.S. & Uhr, J.W. (1975) Lymphocyte surface immunoglobulin revisited. *Science* 189, 964.
- WALLIS, V.J., Leuchars, E., Chwalinski, S. & Davies, A.J.S. (1975) On the sparse seeding of bone marrow and thymus in radiation chimeras. *Transplantation* 19, 1.
- WATSON, J.D. (1981) Lymphokines and the induction of immune responses. *Transplantation* 31, 313.
- WEBEL, M.L., Ritts, R.E., Howard, F.T., Donadio, J.V., Jr. & Woods, J. E. (1974) Cellular immunity after intravenous administration of methylprednisolone. *J. Lab. Clin. Med.* 83, 383.
- WECHTER, W.J., Nelson, J.W., Perper, R.J., Parcels, A.J., Riebe, K. W., Evans, J.S., Satoh, P.S. & Ko, H. (1979) Manufacture of antithymocyte globulin (ATGAM) for clinical trials. *Transplantation* 28, 303.
- WEINER, M.S., Bianco, C. & Nussenzweig, V. (1973) Enhanced binding of neuraminidase-treated sheep erythrocytes to human T lymphocytes. *Blood* 42, 939.

- WEST, W.H., Cannon, G.B., Kay, H.D., Bonnard, G.D. & Herberman, R.B. (1977) Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: characterization of effector cells. *J. Immunol.* 118, 355.
- WHITE, D.J.G., Plumb, A.M., Paweleg, G. & Brons, G. (1979) Cyclosporin A: an immunosuppressive agent preferentially active against proliferating T cells. *Transplantation* 27, 55.
- WIESINGER, D. & Borel, J.F. (1980) Studies on the mechanism of action of cyclosporin A. *Immunobiol.* 156, 454.
- WIGZELL, H. (1965) Quantitative titration of mouse H-2 antibodies using ^{51}Cr -labelled target cells. *Transplantation* 3, 423.
- WILSON, A.B., Haegert, D.G. & Coombs, R.R.A. (1975) Increased sensitivity of the rosette-forming reaction of human T lymphocytes with sheep erythrocytes afforded by papain treatment of the sheep cells. *Clin. Exp. Immunol.* 22, 177.
- WILSON, A.B., Kent, S.P., Miller, R.M., McConnel, I. & Coombs, R.R.A. (1973) Studies on actively allergized cells. IV. Light and electron microscopic studies on the morphology of rosette-forming cells with special reference to plasma cells. *Immunology* 24, 1059.
- WILSON, A.B., Woods, V. & Coombs, R.R.A. (1984) Discrimination between innate and cytophilic immunoglobulin on human peripheral blood lymphocytes: analysis by the direct antiglobulin rosette-forming reaction. *J. Immunol. Methods* 75, 275.
- WINCHESTER, R.J. & Fu, S.M. (1976) Lymphocyte surface membrane immunoglobulin. *Scand. J. Immunol.* 5 (Supl. 5), 77.
- WINCHESTER, R.J., Fu, S.M., Wernet, P., Kunkel, H.G., Dupont, B. & Jersild, C. (1975a) Recognition by pregnancy serums of non-HLA alloantigens selectively expressed on B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 141, 924.
- WINCHESTER, R.J., Hoffman, T., Fu, S.M. & Kunkel, H.G. (1975b) IgG on lymphocyte surfaces; technical problems and the significance of the thir cell population. *J. Immunol.* 114, 1210.

- WINCHESTER, R.J., Wang, C.Y., Halper, J. & Hoffman, T. (1976) Studies with B cell allo- and heteroantisera: parallel reactivity and special properties. *Scand. J. Immunol.* 5, 745.
- WOODRUFF, J. & Gesner, B.M. (1968) Lymphocytes: circulation altered by trypsin. *Science* 161, 176.
- WYBRAN, J. & Fudenberg, H.H. (1973) Thymus-derived rosette-forming cells in various human disease states: cancer, lymphoma, bacterial and viral infections, and other diseases. *J. Clin. Invest.* 52, 1026.
- YU, D.T.Y. (1975) Human lymphocyte subpopulation: early and late rosettes. *J. Immunol.* 115, 91.
- YU, D.T.Y., Clements, P.J. & Paulus, H.E. (1974) Human lymphocyte subpopulations. Effect of corticosteroids. *J. Clin. Invest.* 53, 565.
- YU, D.T.Y., Winchester, R.J., Fu, S.M., Gibofsky, A., Ko, H.S. & Kunkel, H.G. (1980) Peripheral blood Ia positive T cells increase in certain diseases and after immunization. *J. Exp. Med.* 151, 91.