

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:  
PEDIATRIA

**ESTIMULAÇÃO *EX VIVO* DE LINFÓCITOS T  
CITOTÓXICOS HUMANOS PARA IMUNOTERAPIA DE  
NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS EM CRIANÇAS:  
ANÁLISE DA SUBPOPULAÇÃO DE MEMÓRIA E  
PAPEL DAS CITOQUINAS DE CADEIA GAMA COMUM**

LIANE ESTEVES DAUDT

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre, Brasil 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:  
PEDIATRIA

**ESTIMULAÇÃO *EX VIVO* DE LINFÓCITOS T  
CITOTÓXICOS HUMANOS PARA IMUNOTERAPIA DE  
NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS EM CRIANÇAS:  
ANÁLISE DA SUBPOPULAÇÃO DE MEMÓRIA E  
PAPEL DAS CITOQUINAS DE CADEIA GAMA COMUM**

LIANE ESTEVES DAUDT

**Orientador Prof. Dr. Roberto Giugliani  
Supervisor Estrangeiro Prof. Dr. Franco Locatelli**

“A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor”

Porto Alegre, Brasil 2007

**D238e** Daudt, Liane Esteves

Estimulação ex vivo de linfócitos T citotóxicos humanos para imunoterapia de neoplasias hematológicas em crianças: análise da subpopulação de memória e papel das citocinas de cadeia gama comum / Liane Esteves Daudt ; orient. Roberto Giugliani ; supervisor estrangeiro Franco Locatelli. – 2007.

136 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria. Porto Alegre, BR-RS, 2007.

1. Neoplasias hematológicas 2. Imunoterapia 3. Transplante de medula óssea 4. Criança 5. Linfócitos T 6. Citocinas 7. Terapia tissular I. Giugliani, Roberto II. Locatelli, Franco III. Título.

NLM: WS 300

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

*Aos meus pais,  
Nestor e Maria Helena,  
por me ensinaram que a sabedoria vai além  
do conhecimento e que para alcançá-la é  
necessário transpor fronteiras....*

## AGRADECIMENTOS

Morar, estudar e trabalhar no exterior é uma experiência única, enriquecedora pessoal, cultural e profissionalmente, possível pelo apoio da família e de queridos amigos a quem agradeço e espero poder compartilhar e retribuir:

Ao curso de Pós-Graduação em Medicina: Pediatria, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, seus professores, meus colegas e funcionários, pela ajuda, oportunidade de convívio e aprimoramento que tornaram esse momento uma realidade;

Ao Prof. Dr. Roberto Giugliani, meu orientador, que mais uma vez confiou suficientemente em mim e na realização deste trabalho;

À Dra. Lúcia Mariano da Rocha Silla – Chefe do Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Óssea do HCPA – pelo seu apoio, por sua amizade e pelo seu estímulo à minha formação e carreira profissional;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – e Ministério da Saúde do Brasil pelo incentivo financeiro dado como Bolsa no Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior – PDEE;

Aos Dr. Franco Locatelli, Dra. Rita Maccario e a todos demais amigos e colegas da *Unità di Oncoematologia e Trapianto di Midollo Osseo e Laboratorio di Immunologia dei Trapianti, IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia*, Itália, pela receptividade e disponibilidade que viabilizaram a realização deste estudo e a minha permanência na Itália;

À Dra. Daniela Montagna, bióloga responsável pelo projeto de geração de Linfócitos T Citotóxicos Anti-Leucemia do Departamento de Pediatria da *Università degli Studi di Pavia*, Itália, por seu carinho, apoio incansável e competência imprescindíveis para a realização deste estudo;

À técnica de laboratório Enrica Montini e à bióloga Ilaria Turin, amigas, dedicadas e profissionais, a quem devo grande parte do aprendizado em laboratório;

À Dra. Alessandra Aparecida Paz, colega do Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Óssea do HCPA, que dobrou suas atividades para me substituir durante a minha ausência e o fez com grande competência e profissionalismo;

À Dra. Claudia Caceres Astigarraga, pelo estímulo e valiosos conselhos científicos, pessoais e astrais;

Ao Prof. Dr. Henrique Bittencourt, por sua amizade, estímulo e orientações que me fizeram chegar à Itália e completar este projeto;

Aos queridos amigos Filippo Frignocca, Ilaria Turin e ao pequeno Luca Frignocca que fizeram da sua família a minha família italiana.

À secretária Neusa Granja Laydner e aos colegas do Serviço de Hematologia Clínica do HCPA, pela espera e por acreditarem no meu trabalho;

À minha irmã Paula, a meu cunhado Rogério Sarmiento Leite pelo apoio e a minha afilhada Maria Antonia que nasceu no final deste projeto e a quem vou dedicar meu tempo livre;

À Joice Merzoni, que me ajudou a consolidar o recente conhecimento da prática de laboratório revisando termos e conceitos técnicos;

Aos colegas, paciente e amigos do HEMORGS – Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul – que entenderam a importância deste projeto e aguardaram o meu retorno;

Ao Dr. Tiago Roberto Sarmiento Leite e a sua esposa Eunice pelo carinho e orientações durante minha ausência e retorno;

À minha família, avó, tios e primos, que com afeto diminuíram a distância;

E a todos os amigos e colegas, brasileiros e italianos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

*HOMENAGEM ESPECIAL*

À memória da pequena Sofia Luce Rebuffat e a seus familiares, Enrico, Sabina e Eirene, que souberam transformar o sofrimento de sua perda em incentivo a pesquisa científica proporcionando novas oportunidades de cura a muitos pacientes, e que tanto me sensibilizou a continuar este projeto.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
3. METODOLOGIA.....	20
3.1. População.....	20
3.2. Delineamento do Estudo e Cálculo da Amostra.....	21
3.3. Variáveis do Estudo.....	21
3.4. Separação das Células Mononucleares.....	21
3.5. Contagem e Avaliação da Vitalidade Celular.....	22
3.6. Preparo das Células Dendríticas.....	22
3.7. Geração das Linhagens de LTC Anti-Leucemia.....	23
3.8. Expansão Rápida dos LTC Anti-Leucemia.....	24
3.9. Preparo das Células Estimuladoras e Células Alvos.....	25
3.10. Análise dos Marcadores de Superfície.....	26
3.11. Ensaio da Liberação de <sup>51</sup> Cromo.....	27
3.12. Separação Celular Magnética.....	28
3.13. Análise Estatística.....	29
3.14. Considerações Éticas.....	29
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31



5. ARTIGO DE REVISÃO.....	48
5.1. Resumo.....	48
5.1.1. <i>Abstract</i> .....	49
5.2. Palavras-Chave.....	49
5.2.1. <i>Key Words</i> .....	49
5.3. Introdução.....	50
5.4. Imunoterapia Adotiva para Restabelecer a Vigilância Imune contra Agentes Infecciosos Específicos após o alo-TCTH.....	51
5.4.1. Imunoterapia Adotiva contra o Citomegalovírus Humano.....	51
5.4.2. Imunoterapia Adotiva contra o Vírus Epstein-Barr.....	54
5.4.3. Imunoterapia Adotiva contra <i>Aspergillus sp</i> .....	59
5.5. Imunoterapia Adotiva para a Prevenção e Tratamento da Recorrência de Leucemia.....	60
6. ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS.....	70
<i>Interleucina-15 Promove a Expansão de Células CD8+ da Memória Central   em Culturas de Linfócitos T Citotóxicos Humanos Anti-Leucemia</i>	
6.1. Resumo.....	70
6.2. Palavras – Chave.....	71
6.3. Introdução.....	72
6.4. Pacientes e Métodos.....	74
6.4.1. Pacientes.....	74
6.4.2. Células Estimuladoras e Células Alvo.....	76
6.4.3. Células Dendríticas.....	76
6.4.4. Geração das Linhagens de LTC Anti-Leucemia.....	77
6.4.5. Expansão Rápida dos LTC Anti-Leucemia.....	79
6.4.6. Análise dos Marcadores de Superfície.....	79
6.4.7. Ensaio de Liberação de Cromo.....	79
6.4.8. Análise Estatística.....	80
6.5. Resultados.....	80
6.5.1. Geração e Expansão de LTC Anti-Leucemia Derivados do Doador.....	80
6.5.2. Ensaio de Citotoxicidade com Inibição a Frio.....	84

6.5.3. Caracterização das Culturas de LTC Anti-Leucemia.....	85
6.5.4. Subtipos de CD8 da Memória nas Culturas de LTC.....	87
6.6. Discussão.....	89
6.7. Agradecimentos.....	93
7. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS.....	94
<i>Interleukin-15 Promotes the Expansion of Central Memory CD8+ T Cells in ex-vivo Generated Anti-Leukemia Cytotoxic T lymphocyte Lines</i>	
7.1. Abstract.....	95
7.2. Introduction.....	96
7.3. Patients and Methods.....	98
7.3.1. Patients.....	98
7.3.2. Stimulator and Target Cells.....	99
7.3.3. DC Differentiation .....	99
7.3.4. Induction of Anti-Leukemia CTL Lines.....	100
7.3.5. Rapid Expansion of Anti-Leukemia CTL Lines.....	100
7.3.6. Surface Marker Analysis.....	101
7.3.7. <sup>51</sup> CR-Release Assay.....	101
7.3.8. Statistical Analysis.....	102
7.4. Results.....	102
7.4.1. Induction and Expansion of Donor-Derived Anti-Leukemia CTL Lines.....	102
7.4.2. Cold Target Inhibition of Cytotoxic Activity.....	105
7.4.3. Phenotype Characterization of Anti-Leukemia CTL Lines.....	106
7.4.4. CD8 Memory Subsets in Anti-Leukemia CTL Lines.....	107
7.5. Discussion.....	109
7.6. References.....	113
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	116

**LISTA DE ABREVEATURAS**

## ABREVEATURAS EM PORTUGUÊS

<b>AI</b>	Aspergilose Invasiva
<b>Alo-TCTH</b>	Transplante de Célula Tronco Hematopoiética Alogênico
<b>BL</b>	Blastos Leucêmicos
<b>CAA</b>	Células Apresentadoras de Antígenos
<b>CMNSP</b>	Células Mononucleares do Sangue Periférico
<b>CMV</b>	Citomegalovírus Humano
<b>DC</b>	Células Dendríticas
<b>DECH</b>	Doença Enxerto Contra o Hospedeiro
<b>DLI</b>	Infusão de Leucócitos do Doador
<b>DLP-EBV</b>	Doença Linfoproliferativa associada ao Vírus Epstein-Barr
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>EBV</b>	Vírus Epstein-Barr
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiaminotetracético
<b>EvL</b>	Enxerto <i>versus</i> Leucemia
<b>FITC</b>	Isotiocianato de Fluoresceína
<b>GM-CSF</b>	Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos e Macrófagos Recombinante Humano
<b>Gy</b>	Gray
<b>HLA</b>	Antígeno Leucocitário Humano
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INF-alfa</b>	Interferon Alfa
<b>INF-gama</b>	Interferon Gama

<b>LLA</b>	Leucemia Linfóide Aguda
<b>LMA</b>	Leucemia Mielóide Aguda
<b>LTC</b>	Linfócitos T Citotóxicos
<b>mAb</b>	Anticorpo Monoclonal
<b>mHAg</b>	Antígeno de Histocompatibilidade Menor
<b>PBS</b>	Solução Tampão Fosfato
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PerCP</b>	Proteína Clorofila Peridina
<b>pLTC</b>	Precursor do Linfócito T Citotóxico
<b>RECL</b>	Reação do Enxerto Contra a Leucemia
<b>rIL</b>	Interleucina Humana Recombinante
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SH</b>	Soro Humano
<b>SMD</b>	Síndrome Mielodisplásica
<b>TCTH</b>	Transplante de Célula Tronco Hematopoiética
<b>TCR</b>	Receptor da Célula T
<b>T<sub>H</sub>1</b>	Linfócito T auxiliar – <i>helper</i> – Resposta tipo 1
<b>T<sub>H</sub>2</b>	Linfócito T auxiliar – <i>helper</i> – Resposta tipo 2
<b>T<sub>MC</sub></b>	Linfócito T da Memória Central
<b>T<sub>ME</sub></b>	Linfócito T da Memória Efetor
<b>T<sub>ME/RA+</sub></b>	Linfócito T da Memória Efetor CD45RA positivo
<b>T-PHA</b>	Células T Estimuladas com Fitohemaglutinina

## ABREVEATURAS EM LINGUA ESTRANGEIRA

<b>Allo-HSCT</b>	<i>Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of Differentiation</i>
<b>CML</b>	<i>Chronic Myeloid Leukemia</i>
<b>CMV</b>	<i>Human Cytomegalovirus</i>
<b>CTL</b>	<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>
<b>DC</b>	<i>Dendritic Cells</i>
<b>DLI</b>	<i>Donor Lymphocyte Infusion</i>
<b>FAB</b>	<i>French – American – British</i>
<b>FCS</b>	<i>Fetal Calf Serum</i>
<b>FITC</b>	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
<b>GVHD</b>	<i>Graft versus Host Disease</i>
<b>GvL</b>	<i>Graft versus Leukemia Effect</i>
<b>HEV</b>	<i>High Endothelial Venules</i>
<b>HLA</b>	<i>Human Leukocyte Antigen Complex</i>
<b>HSCT</b>	<i>Hematopoietic Stem Cell Transplantation</i>
<b>IRCCS</b>	<i>Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico</i>
<b>LB</b>	<i>Leukemia Blast Cells</i>
<b>mAb</b>	<i>Monoclonal Antibody</i>
<b>mHAg</b>	<i>Minor Histocompatibility Antigen</i>
<b>NK</b>	<i>Natural Killers Cells</i>
<b>PBMC</b>	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
<b>PBMNC</b>	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
<b>PE</b>	<i>Phycoerythrin</i>

<b>PerCP</b>	<i>Peridinin Chlorophyll Protein</i>
<b>Rad</b>	<i>Radiation Absorbed Dose</i>
<b>RPMI-1640</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute series 1640</i>
<b>T<sub>CM</sub></b>	<i>Central Memory T cell</i>
<b>TCR</b>	Receptor da Célula T
<b>T<sub>EM</sub></b>	<i>Effector Memory T cell</i>
<b>T<sub>EM/RA+</sub></b>	<i>Effector Memory T cell CD45RA+</i>
<b>T-PHA</b>	<i>Phytohemagglutinin Stimulated T Cells</i>

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1	Sobrevida Livre de Doença após o Alo-TCTH de acordo com a presença de DECH.....	5
Figura 2	Frequência de precursores de LTC com citotoxicidade específica contra blasto leucêmico.....	8
Figura 3	Rotas de Migração da Célula T.....	12
Figura 4	Modelo de intensidade do sinal para a diferenciação da célula T e geração da célula T de memória.....	14
Figura 5	Ilustração esquemática indicando a relação inversa das funções efetoras <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da transferência adotiva dos subtipos de memória de células T proposto por Gattinoni et al.....	16
Figura 6	Diferenças na expressão das subunidades do receptor das citoquinas durante a resposta imune.....	17

### ARTIGO DE REVISÃO

Figura 1	Diagrama do método empregado para reativar LTC específicos anti-EBV.....	56
Figura 2	Efeito da Infusão de LTC anti-EBV na carga viral e a frequência de linfócitos circulantes específicos contra o vírus em receptores de TCTH com infecção ativa pelo EBV.....	58
Figura 3	Atividade citotóxica das linhagens de LTC derivadas das células mononucleares do sangue periférico de doadores de alo-TCTH.....	65
Figura 4	Padrão da expansão clonal das linhagens de LTC anti-leucemia.....	66
Figura 5	Geração e expansão de clones de células T com citotoxicidade específica contra leucemia.....	67

## ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

Figura 1	Diagrama esquemático da geração e expansão <i>ex vivo</i> de LTC anti-leucemia.....	78
Figura 2	Atividade Citotóxica dos LTC anti-leucemia após 2 estimulações contra os blastos leucêmicos.....	82
Figura 3	Atividade Citotóxica dos LTC anti-leucemia após a Expansão Antígeno-Independente.....	83
Figura 4	Recuperação celular após a expansão antígeno-independente.....	84
Figura 5	Atividade citotóxica com inibição a frio.....	85
Figura 6	Recuperação de células TMC das culturas de LTC após a expansão antígeno-independente.....	88

## ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

Figure 1	Schematic diagram of <i>ex vivo</i> generation and expansion of anti-leukemia CTL lines.....	101
Figure 2	Cytolytic activity of anti-leukemia CTLs measured after two rounds of leukemia-specific stimulations.....	103
Figure 3	Cytolytic activity of antileukemia CTLs measured after antigen-independent expansion.....	104
Figure 4	Cell recovery after antigen-independent expansion.....	105
Figure 5	Cold target inhibition of cytotoxic activity of anti-leukemia CTLs.....	106
Figure 6	TCM cell recovery of anti-leukemia CTL lines after antigen independent expansion.....	108



## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

Tabela 1	Frequência de pLTC contra Leucemia.....	7
----------	---	---

### ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

Tabela 1	Características dos pacientes das culturas de LTC anti-leucemia.....	75
Tabela 2	Fenótipo de superfície das culturas de LTC anti-leucemia.....	86
Tabela 3	Fenótipo de superfície dos LTC CD8+ após a expansão antígeno-independente.....	88

### ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

Table 1	Patients Characteristics.....	98
Table 2	Surface phenotype of anti-leukemia CTL lines.....	107
Table 3	Surface phenotype of gated CD8+ CTLs after antigen-independent expansion.....	108

## 1. INTRODUÇÃO

Durante os últimos 50 anos, o uso do sistema imunológico para destruir doenças neoplásicas hematológicas passou de uma hipótese para a terapia efetiva de muitos pacientes (BARON e STORB, 2006). A idéia da vigilância imunológica foi primeiramente proposta por Paul Ehrlich em 1909, que observou a ocorrência de células aberrantes durante o desenvolvimento fetal e pós-fetal, mas que eram eliminadas ou permaneciam latentes devido ao controle exercido pelo sistema imune (EHRlich, 1909). Passados 50 anos, Thomas e Burnet desenvolveram a “teoria da imunovigilância” propondo que, em circunstâncias normais, o sistema imunológico destrói células neoplásicas quando em estágios iniciais da formação do tumor, provavelmente porque estas células diferem antigenicamente das células normais (BURNET, 1959; BURNET, 1970; THOMAS, 1982). Esta teoria foi apoiada nas seguintes observações: (i) maior incidência tanto de neoplasias hematológicas como de tumores sólidos observados em ratos timectomizados, ou em pacientes com imunodeficiências primárias; (ii) maior incidência de neoplasias em pacientes que recebem tratamento imunossupressivo (por exemplo, após transplante de órgãos); e (iii) a demonstração de que ratos poderiam ser imunizados contra tumores singênicos induzidos por vírus ou drogas carcinogênicos (DUNN et al., 2002; BARON e STORB, 2006).

Posteriormente, estudos em ratos demonstraram que tanto o sistema imune inato (células NK – *Natural Killers*) como o adaptativo (células T) poderia estar implicado na imunovigilância, pois ratos deficientes de células NK, células T, células NK/T, Interferon-gama ou interleucina 12 (IL-12) têm maior susceptibilidade a tumores. Sendo assim, o sistema imune, além de proteger o hospedeiro do desenvolvimento de tumores, poderia facilitar o surgimento de tumores com imunogenicidade reduzida (DUNN et al., 2004).

Entretanto, foi no âmbito do transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas (alo-TCTH) que o conceito da atividade do sistema imune, no caso do enxerto, no controle da doença ficou mais evidente. O pioneiro em descrever o uso da terapia celular com células hematopoiéticas através do transplante de medula óssea foi Thomas et al, em 1957, que publicou seus resultados para o tratamento de leucemia linfocítica aguda utilizando como doadores os irmão dos pacientes (THOMAS et al., 1957; THOMAS et al., 1959). No mesmo período, sugeriram os primeiros estudos identificando o Complexo de Histocompatibilidade Maior (MCH – *Major Histocompatibility Complex*) humano, chamado de antígenos leucocitários humanos (HLA – *Human Leucocyte Antigen*) (DAUSSET e BRECZY, 1957) que tornou o alo-TCTH factível e progressivamente mais utilizado como opção terapêutica a muitos pacientes (THOMAS et al., 1977; RINGDÉN e BLANC, 2005). O complexo HLA está localizado no cromossomo 6, possui mais de 200 genes, sendo mais de 40 aqueles codificados pelos leucócitos, todos herdados por haplótipos. Os genes do HLA envolvidos na resposta imune estão divididos em duas classes: os genes da Classe I (regiões HLA-A, HLA-B e HLA-C) são expressos pela maioria das células somáticas; e os genes da classe II (região D, famílias M, O, P, Q ou R) normalmente são expressos pelas células imunes como os linfócitos B, linfócitos T ativados, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais do timo. A principal função destas moléculas é a de apresentar peptídeos derivados dos patógenos às células T e, assim, iniciar a resposta imune celular adaptativa. (KLEIN e SATO, 2000).

Também decorre da metade do século vinte a classificação genérica dos transplantes: singênico, quando a medula transplantada tem origem em um doador geneticamente idêntico (por exemplo, gêmeo monozigótico); autólogo, se a medula provém do próprio indivíduo; ou alogênico, quando é utilizado um doador geneticamente diferente do receptor, o que pode resultar em uma reação imunológica dos linfócitos do doador contra o receptor, causando inflamação de

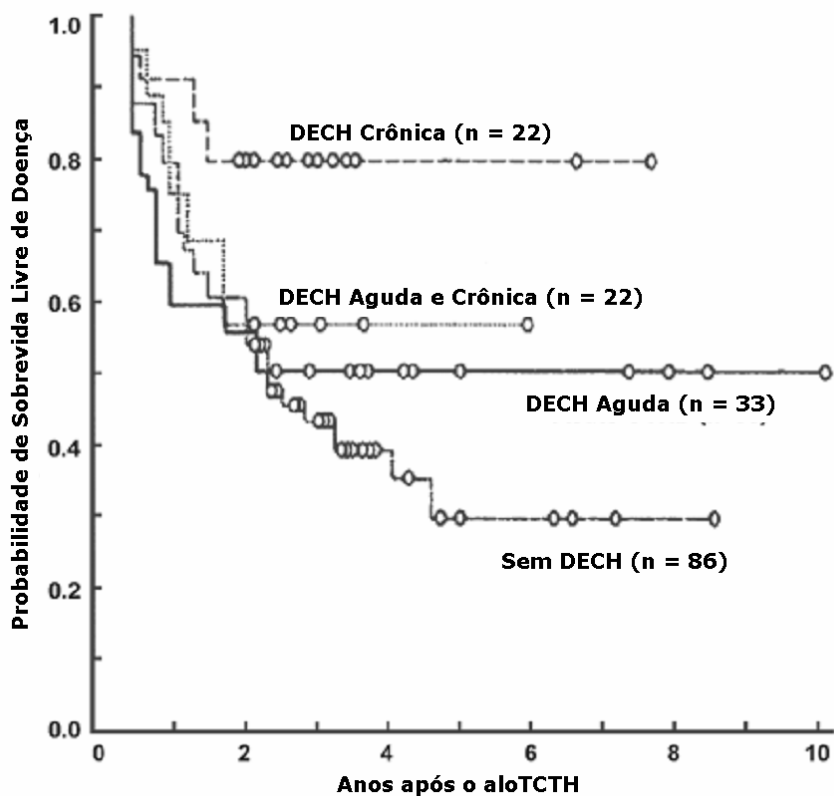
tecidos alvos, chamada doença enxerto contra hospedeiro (DECH) (COPELAN, 2006). A severidade da DECH depende do grau de disparidade genética entre o receptor e o doador, sendo muito mais intensa se esta disparidade ocorre no sistema HLA (FLOMENBERG et al., 2004; RINGDÉN ET al., 2004)

Entretanto, a reação imunológica desencadeada pela diferença genética entre o receptor e o doador pode trazer alguns efeitos benéficos, principalmente no controle da doença neoplásica. O termo reação enxerto contra leucemia (*graft-versus-leukemia effect*) foi proposto por Mathe, em 1965, baseado em estudos em roedores (MATHE et al., 1965). A primeira evidência em humanos do efeito enxerto contra o tumor veio de um estudo publicado em 1979, no qual o risco de recaída leucêmica foi 2.5 vezes menor em pacientes submetidos ao alo-TCTH, que apresentaram doença enxerto contra hospedeiro aguda do que naqueles sem evidencia de DECH (WEINDEN et al., 1979). Porém, este efeito não repercutiu em aumento da sobrevida, já que a presença DECH aumentou a mortalidade após o transplante não relacionada à recaída. Posteriormente, os mesmos autores observaram que a DECH crônica, com manifestações que se assemelham à doença autoimune e que se apresenta após os 100 dias do alo-TCTH, também estava associada à redução do risco de recaída da leucemia, sendo que este efeito repercutia, também, em aumento da sobrevida dos pacientes transplantados por doença avançada, principalmente naqueles sem manifestações de DECH aguda (Figura 1) (WEIDEN et al, 1981). O efeito anti-leucemia da DECH aguda e crônica foi confirmado em 1990 pelo IBMTR (*International Bone Marrow Transplant Registry*) através da publicação de um estudo com grande número de pacientes (HOROWITZ et al, 1990). Todavia, os pacientes que receberam enxerto singênico (com doador irmão gêmeo idêntico) apresentaram maior risco de recaída leucêmica se comparados ao pacientes que receberam enxerto alogênico e que não desenvolveram DECH clinicamente relevante, demonstrando, assim, que a reação do enxerto

contra a leucemia (RECL) poderia ser dissociada da DECH clinicamente aparente. A contribuição dos linfócitos T do doador na RECL foi elucidada a partir das observações de pacientes transplantados com enxerto alogênico com depleção de linfócitos que, apesar da redução da incidência de DECH, apresentavam maior incidência de recaídas e falhas na “pega” da medula (HOROWITZ et al., 1990; ANDOLINA et al., 2000). Entretanto, as tentativas de aumentar a RECL, em pacientes com alto risco de recaída, através da redução da imunossupressão após o transplante, ou pela infusão de concentrados de leucócitos (*buffy coat*) do doador imediatamente após o transplante não foram bem sucedidas, houve aumento da incidência de DECH e da mortalidade não relacionada à recaída leucêmica (SULLIVAN et al., 1989; VOURKA-KARUSSIS et al., 1999).

A partir do reconhecimento do papel dos linfócitos na RECL e da observação de que pacientes com recaída após o transplante, ocasionalmente, alcançavam remissão completa durante episódios de atividade da DECH, Kolb et al investigaram a eficácia da infusão de linfócitos do doador (DLI – *Donor Lymphocyte Infusions*) em pacientes com recaída leucêmica após o TCTH. Estes autores demonstraram ser possível obter a remissão hematológica completa e duradoura em pacientes com neoplasias hematológicas através da DLI confirmando que a RECL seria capaz de erradicar a doença mesmo sem a quimioterapia prévia (KOLB et al., 1995).

Os resultados da DLI foram posteriormente confirmados em 2 estudos multicêntricos que avaliaram cerca de 400 pacientes tratados para leucemia que recaíram após o alo-TCTH (COLLINS et al., 1997; KOLB et al., 2004). Nestes estudos, a DLI induziu e manteve a remissão completa em mais de 60% dos pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC) e em 10 a 40% dos pacientes com outras neoplasias hematológicas. Tanto a presença de DECH aguda, como de crônica, aumentou a probabilidade de resposta da doença, apesar de que alguns pacientes obtiveram a remissão completa sem evidência clínica de DECH (KOLB et al., 2004).



**Figura 1. Sobrevida Livre de Doença após o Alo-TCTH de acordo com a presença de DECH.** Pacientes com neoplasias hematológicas que receberam ciclofosfamida e irradiação corporal total (TBI), transplante de células progenitoras hematopoiéticas de doador familiar HLA compatível (HSCT) e metotrexato para a prevenção da doença enxerto contra hospedeiro (*GVHD – graft-versus-host-disease*). São apresentados os pacientes com e sem doença enxerto contra o hospedeiro aguda e crônica. (Weinden et al. NEJM 1981; 304:1529)

Os conceitos de imunovigilância e resposta a DLI abriram o caminho para técnicas de imunoterapia celular como forma de aumentar a imunidade específica após o alo-TCTH sem aumentar os riscos do desenvolvimento de alorreatividade. Apesar de muitos estudos realizados com sucesso em ratos, pouco, até o momento, se obteve em humanos.

O primeiro aspecto a ser explorado no desenvolvimento da imunoterapia celular é o antígeno tumoral que será usado como estimulador e alvo das células citotóxicas. A existência de

um antígeno tumoral específico é reconhecida desde os anos 50 em estudos realizados em ratos, que mostraram a possibilidade de imunização contra tumores singênicos induzidos por agentes químicos carcinogênicos ou oncovírus (BURNET, 1970; BARON e STORB, 2006). Enquanto as baixa incidência de recaída após o alo-TCTH comparado com o singênico (HOROWITZ et al., 1990) demonstraram a importância da resposta das células T aos antígenos de histocompatibilidade menores (mHA<sub>g</sub> – *minor histocompatibility antigens*) como alvos da RECL, outros tipos de proteínas, exclusivamente expressas pelas células tumorais, também poderiam desencadear a resposta citotóxica (NAGLER et al., 2000). Desta forma, alguns estudos especularam o papel desencadeado pelas proteínas tumorais como os idiotipos das imunoglobulinas no linfoma de células B ou mieloma múltiplo, da proteína *bcr/abl* na leucemia mielóide crônica (LMC), ou das proteínas associadas ao vírus Epstein-Barr (EBV), presentes nos linfomas de Burkitt ou na doença de Hodgkin. Em um dos mais elegantes estudos a este respeito, Molldrem et al observaram uma forte correlação entre a resposta da célula T diretamente contra a proteinase-3 (frequentemente super-expressa na LMC) e a resposta clínica dos pacientes tratados com alo-TCTH ou interferon-alfa (MOLLDREM et al., 2000).

Ao otimizar as condições das culturas, foi possível isolar de doadores saudáveis, ou de pacientes portadores de leucemias, células T pouco frequentes, mas com atividade citotóxica específica contra antígenos ou células tumorais *in vitro* ou em modelos animais (BLEAKLEY e RIDDELL, 2004; MORRIS et al., 2006). Ao extrapolar estes achados para humanos, Montagna et al estudaram a frequência de precursores de linfócitos T citotóxicos (pLTC) direcionados contra os blastos leucêmicos no sangue periférico de crianças submetidas ao alo-TCTH. Previamente ao transplante, a pesquisa de pLTC no sangue periférico dos doadores detectou a ausência de atividade citotóxica contra os blastos leucêmicos (Tabela 1). Após o alo-TCTH, a frequência destes pLTC aumentou e se manteve alta nos pacientes que permaneceram em

remissão, enquanto que nos pacientes que apresentaram recidiva da doença estes precursores caíam rapidamente, tornado-se indetectáveis nas semanas precedentes ao surgimento da doença (Figura 2) (MONTAGNA et al., 1998; MONTAGNA et al., 1999). Entretanto, foram nos estudos para a reconstituição imune após alo-TCTH contra infecções que a imunoterapia celular mostrou seus melhores resultados em humanos.

**Tabela 1. Frequência de pLTC contra Leucemia.**

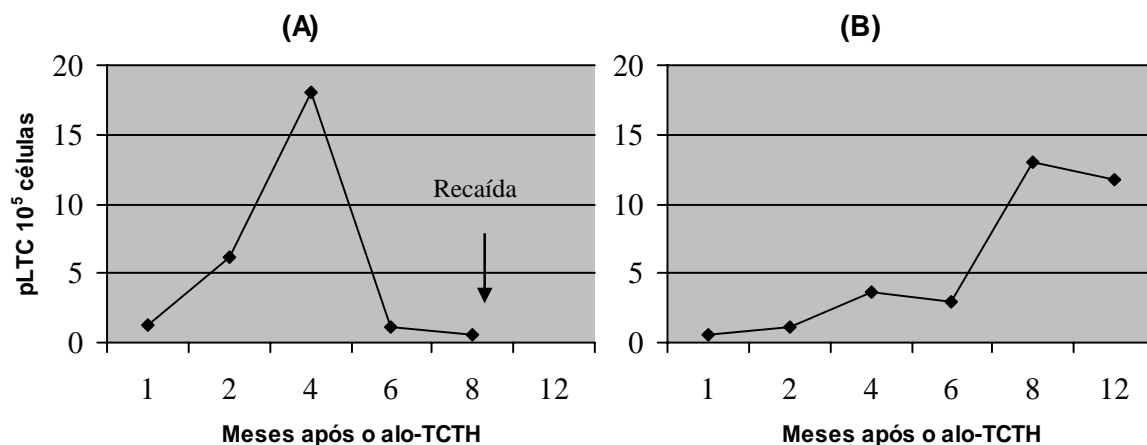
<i>Doador</i>	<i>Frequência de pLTC</i>	<i>Intervalo de Confiança 95%</i>
Paciente CT	1/31.484	1/24.829 – 1/43.013
Paciente NM	< 1/200.000	NC
Paciente MD	< 1/200.000	NC
Paciente PD	1/77.091	1/58.794 – 1/111.920
Paciente IS	< 1/200.000	NC
Paciente ER	< 1/200.000	NC

Tabela da frequência de precursores de Linfócitos T Citotóxicos (pLTC) contra células leucêmicas medidos por ensaio de diluição limitante no sangue periféricos de doadores de alo-TCTH. NC, não calculado. (Adaptado de Montagna et al., 1998)

Os primeiros estudos em humanos, para avaliar a eficácia da reconstituição da imunidade específica através da transferência de clones de células T, foram realizados em receptores de alo-TCTH com alto risco de desenvolver a infecção ou a doença provocada pelo vírus citomegalovírus humano (CMV) (RIDELELL et al., 1992; WALTER et al., 1995). Estes clones foram gerados *ex vivo* usando os epítomos pp65 e pp150 da estrutura protéica viral e mantiveram sua atividade citotóxica após transferência *in vivo* (KEEVER-TAYLOR et al., 2001). Todavia, a principal aplicabilidade clínica de linhagens celulares específicas veio da geração de LTC anti-aspergillus e anti-EBV. Ambas se mostraram eficientes em evitar a reativação da doença em pacientes submetidos ao alo-TCTH haploidêntico, situação em que o grau de imunodeficiência posterior ao procedimento é muito grande (LOCATELLI et al., 2004). Outro aprendizado



interessante, obtido com a geração de LTC anti-EBV, foi a possibilidade de gerar *ex vivo* linhagens policlonais usando como estimuladores células linfoblásticas B transformadas pelo EBV (COMOLI et al., 2002; ROSSI et al., 2003).



**Figura 2. Frequência de precursores de LTC com citotoxicidade específica contra blasto leucêmico.** São apresentados 2 pacientes portadores de Leucemia Mielóide Aguda submetidos ao alo-TCTH, sendo que a frequência de pLTC foi medida por ensaio de diluição limitante. Paciente (A) apresentou recaída da doença 8 meses após o aloTCTH, enquanto que o paciente (B) se manteve em remissão. Cortesia Dra Daniela Montagna (Montagna et al, BMT 1998; 22: 743.)

Entretanto, gerar *ex vivo* um número suficiente de células T específicas anti-tumorais com alta afinidade contra os antígenos tumorais associados de cada paciente e assegurar a sua persistência após a transferência *in vivo* ainda é um grande desafio (BORDIGNON et al., 1999; MORRIS et al., 2006). Atualmente, nas várias propostas de estratégias de terapia celular, dois grandes grupos de antígenos capazes de estimular os LTC são mais frequentemente usados. Além do polimorfismo dos antígenos de histocompatibilidade menor, presentes nas células leucêmicas e capazes de estimular as células T do doador, mas não expressos nos tecidos não hematopoiéticos alvos de DECH, estão os antígenos específicos de cada tumor. São muitos os antígenos candidatos a serem alvos das células T, mesmo em um contexto não relacionado ao TCTH, que, de forma genérica, podem ser classificados em: (i) mutacional, como bcr/abl que é

uma mutação específica da célula leucêmica; (ii) viral, como o papilomavírus humano presente no câncer de colo uterino, também é um antígeno específico do tumor; (iii) antígenos teciduais, como antígeno prostático específico para o tratamento do câncer prostático onde a destruição de todo o tecido, afetado pelo tumor ou não, é permitida; (iv) antígenos de células germinativas, associados ao melanoma e normalmente expresso em adulto somente nos testículos; e (v) proteínas com aumento anormal da sua expressão no tumor que podem ser reconhecidas por seu nível aumentado (APPELBAUM, 2001). Algumas estratégias recentes tentam desenvolver células T geneticamente modificadas como, por exemplo, a transferência de genes que codificam receptores da célula T específicos contra o tumor, ou que sinalizam domínios de proteínas co-estimulatórias (BROUWE et al 2000; BRENTJENS et al., 2003; ROSSIG e BRENNER, 2004; MORRIS et al., 2006). Porém, são técnicas extremamente trabalhosas e que requerem a identificação precisa do antígeno tumoral de cada indivíduo. Este aspecto é extremamente limitante nas leucemias agudas, em que a variabilidade das características genéticas é muito grande, principalmente no grupo pediátrico, onde estas doenças são bastante incidentes e apresentam grande variabilidade genética e fenotípica. (COSTELLO et al., 1998; MONTAGNA et al., 1998; BORDIGNON et al., 1999).

O transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas é um tratamento efetivo para muitas doenças hematológicas pediátricas (LOCATELLI, 1998; BARTH et al., 2000; DINI et al., 2000). Entretanto, a recorrência da doença neoplásica original é uma das principais causas de falha desta terapia, mesmo considerando a presença da reação enxerto contra leucemia mediado pelos linfócitos T citotóxicos do doador (HSIEH et al., 2000; WELNIAK et al., 2000). Apesar das muitas estratégias desenvolvidas para imunoterapia celular propostas na literatura para melhorar os resultados do TCTH, poucas são direcionadas ao grupo pediátrico (BORDIGNON et al., 1999; LOCATELLI et al., 2004; POTER e JUNE, 2005). Em 2001, Montagna et al

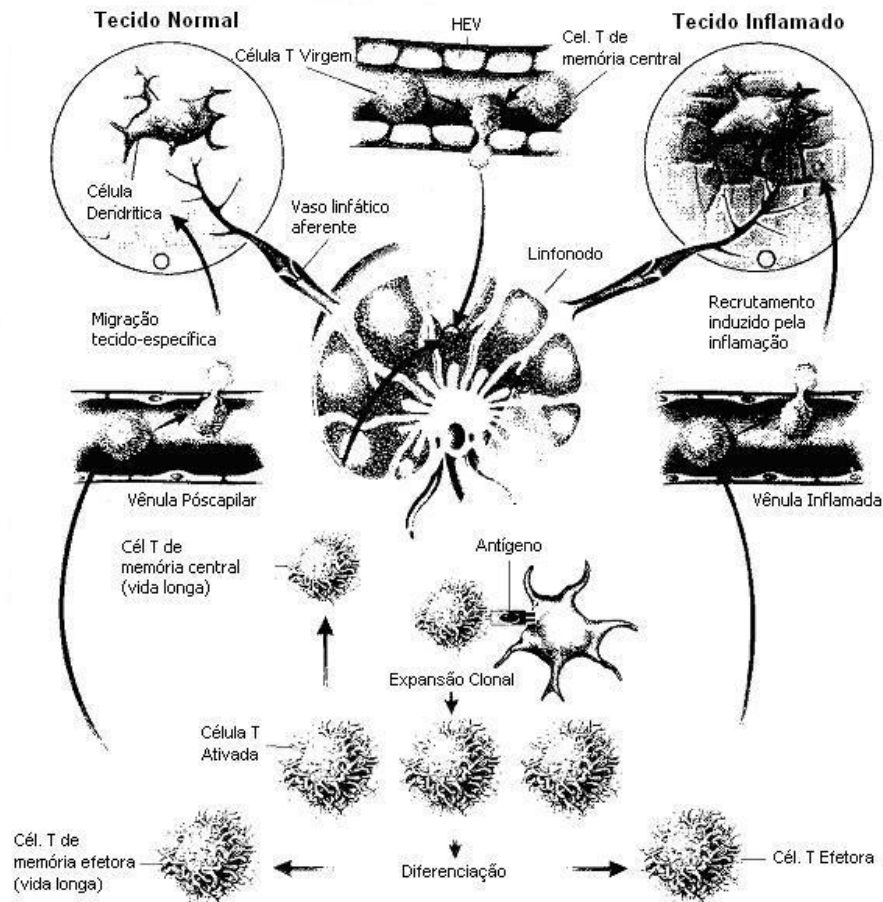
propuseram uma estratégia de geração *ex vivo* de LTC anti-leucemia usando como antígenos os blastos leucêmicos apoptóticos de crianças portadoras de leucemia mielóide aguda (LMA) submetidas ao alo-TCTH (MONTAGNA et al., 2001). A primeira aplicação clínica mostrando a facilidade e eficácia desta estratégia foi relatada por Falkenburg et al em 1999, que, através da infusão de LTC anti-leucemia derivados do doador, gerados *in vitro* pela estimulação com células apoptóticas, proporcionou a remissão hematológica e citogenética completa em um paciente portador LMC ao alo-TCTH e a DLI (FALKENBURG et al., 1999). Os resultados obtidos no contexto da LMA infantil foram posteriormente estendidos e demonstraram que os LTC capazes de reconhecer seletivamente os blastos leucêmicos, igualmente podem ser obtidos em pacientes portadores de leucemia linfocítica aguda (LLA) ou síndrome mielodisplásica (SMD), usando tanto doadores HLA compatíveis ou parcialmente compatíveis (MONTAGNA et al., 2003; MONTAGNA et al., 2006). O uso de células apoptóticas parece ter a vantagem, ao não limitar a estimulação a um único antígeno, de gerar culturas de LTC policlonais, o que hipoteticamente diminuiria a possibilidade de escape tumoral à resposta citotóxica adotiva (MONTAGNA et al, 2003; BECKNELL e CALIGIURI, 2003; MORRIS et al., 2006). Além disto, não restringe a terapia celular a um grupo exclusivo de neoplasias que apresentem antígenos tumorais específicos, bem como não limita à necessidade de disparidade de mHAg entre o doador e o receptor.

Apesar da viabilidade de gerar e expandir *ex vivo* linhagens de LTC com atividade citotóxica direcionada contra células leucêmicas já ter sido provada, a capacidade destas células manterem *in vivo*, após a sua transferência, o controle eficiente do crescimento das células leucêmicas residuais ainda não está claramente determinado. Provavelmente, o sucesso da transferência de células T adotivas expandidas *ex vivo* dependa, não apenas do número de células infundidas, mas igualmente, da capacidade de sobrevivência a longo prazo, de migrar aos sítios de

envolvimento tumoral, manter sua especificidade, e sobretudo, de estabelecer uma resposta imune constante e sustentada contra a doença (BECKNELL e CALIGIURI, 2003; BRENTJES et al., 2003)

Recentemente, vem sendo especulado que a cinética e comportamento dos subgrupos da célula T da memória imunológica é fundamental para a persistência por longo tempo da vigilância anti-tumoral (POTER e JUNE, 2005). Assim, se a célula T virgem (que não recebeu estímulo antigênico) se divide raramente no hospedeiro normal, as células T da memória apresentam alta capacidade de proliferação e de diferenciação para a atividade citotóxica específica (BERARD et al., 2003). Desta forma, a compreensão dos subtipos de células T de memória presentes nas linhagens de LTC anti-leucemia humanas podem fornecer importantes informações para aumentar a sobrevida a longo prazo destas células e, conseqüentemente, restabelecer a resposta imune adotiva.

Os linfócitos T respondem ao estímulo antigênico apresentando uma série de alterações na expressão das moléculas de superfície que representam alterações da sua capacidade de migração, proliferação e citotoxicidade (SALLUSTO et al., 2004). A célula T virgem, uma vez apresentada ao antígeno nos órgãos linfáticos secundários, prolifera vigorosamente e gera células diferenciadas com atividade citotóxica que migram para os tecidos inflamados (Figura 3) (MACKAY e ROSEN, 2000). Uma fração dos linfócitos T estimulados pelo antígeno persiste na circulação como células de memória que conferem proteção, permitindo uma resposta imune qualitativa e quantitativamente diferenciada após um segundo contato com o mesmo antígeno (SALLUSTO et al., 1999; LANZAVECCHIA e SALLUSTO, 2005). As células T CD8<sup>+</sup> efectoras têm uma vida curta, produzem mediadores com atividade citolítica e são capazes de destruir seus alvos *ex vivo*, porém são mais suscetíveis aos mecanismos de ativação de morte celular ou apoptose (WENINGER et al., 2001; RUFER et al., 2003).

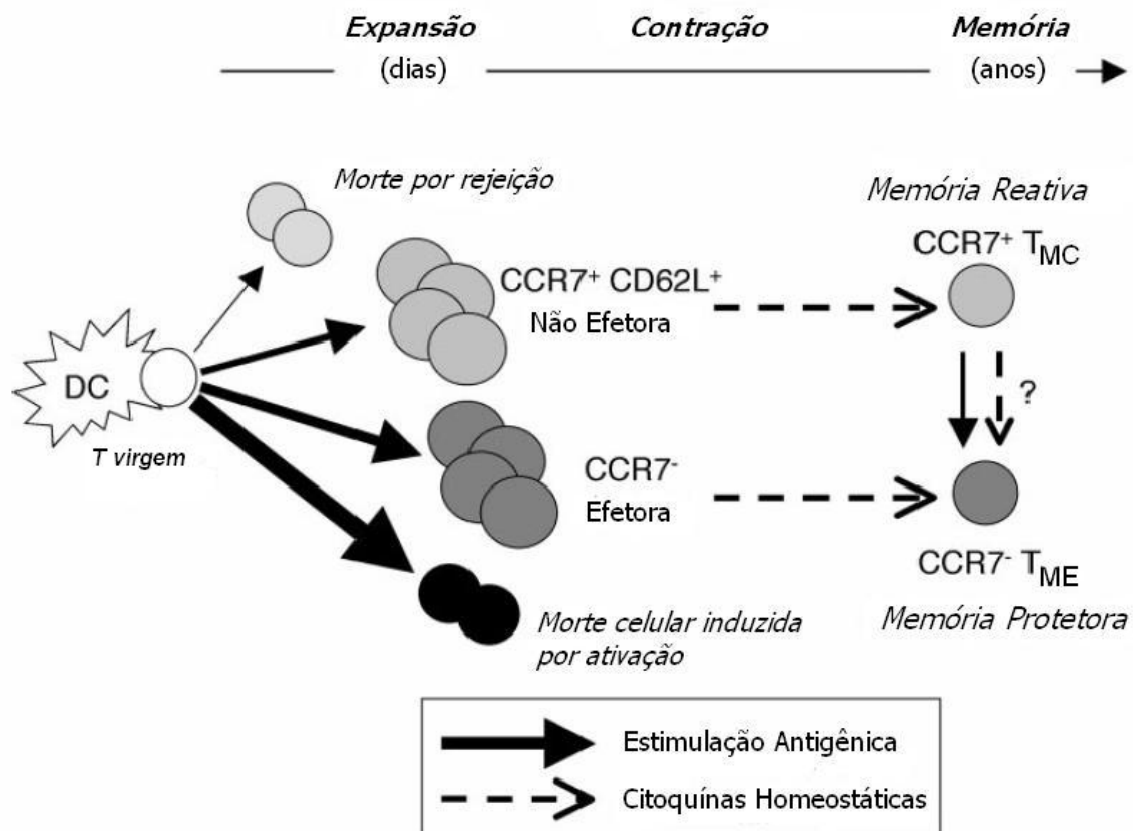


**Figura 3. Rotas de Migração da Célula T.** As células T virgens migram continuamente do sangue para os linfonodos e para outros tecidos linfáticos secundários. A migração para os linfonodos ocorre no sistema endotelial venoso (HEV), que expressa moléculas para o recrutamento dos linfócitos. A linfa percorre os linfonodos vinda dos tecidos periféricos, onde as células dendríticas (DC) recolhem o material antigênico. Nos tecidos inflamados, as DC são mobilizadas para transportar os antígenos até os linfonodos, aonde estimulam as células T antígeno-específico. Durante esta estimulação, as células T proliferam através da expansão clonal e diferenciam-se em células efetoras, passando a expressar receptores que as direcionam para os tecidos inflamados. Apesar da maioria das células efetoras apresentarem vida curta, algumas células antígeno-específico sobrevivem por longo tempo. Estas células da memória são subdivididas em duas populações de acordo com a sua capacidade de migração: as chamadas células de memória efetoras, que possuem a capacidade de migrar para os tecidos periféricos; e as células de memória central, que expressam uma gama de moléculas para a migração e tráfico semelhante às células T virgens, migrando preferencialmente para os órgãos linfáticos. Os sinais que orientam o tráfico das células T de memória são específicos para cada tecido (por exemplo, as moléculas que orientam migração para a pele são diferentes das moléculas do intestino). Também são moduladas por mediadores inflamatórios e diferem para cada subgrupo de célula T (por exemplo, as células CD4 do tipo 1 respondem a quimioatraentes diferentes das células do tipo 2). (Adaptado de Mackay. NEJM 2000 343:1020)

A memória é o fundamento do sistema imune adquirido ou adaptativo. É o resultado da expansão clonal e diferenciação de linfócitos específicos para cada antígeno que persistem durante toda a vida. Os linfócitos da memória conferem proteção imediata aos tecidos periféricos e montam a resposta definitiva contra os antígenos já conhecidos nos órgãos linfáticos secundários. No sistema imune humoral, composto pelos linfócitos B, estas funções são realizadas por dois tipos celulares bem caracterizadas nos humanos. A memória de proteção é feita pelas células plasmáticas que produzem e liberam anticorpos, enquanto que a memória reacional é mediada pelos linfócitos B de memória que se proliferam e se diferenciam em plasmócitos em resposta à estimulação antigênica secundária (SALLUSTO et al., 2004). Uma divisão semelhante também foi proposta para as células T, onde a memória protetora é mediada pelas células de memória T efetoras ( $T_{ME}$ ) que migram para os tecidos periféricos inflamados e apresentam funções citotóxicas imediatas. Enquanto a memória reacional é mediada pelas células da memória T central ( $T_{MC}$ ), que migram para os órgãos linfáticos secundários, têm pouca ou nenhuma capacidade citotóxica, mas rapidamente proliferam e se diferenciam em células efetoras como resposta ao estímulo antigênico conhecido (CHO et al., 1999; SALLUSTO et al., 1999; KAECH e AHMED, 2001).

Apesar da complexidade da expressão de moléculas que orientam o tráfico de migração para os tecidos e da caracterização das células efetoras (HAMANN et al., 1997; WENINGER et al., 2001), Lanzavecchia et al. propuseram uma classificação dos linfócitos  $CD8^+$  de memória semelhante aos  $CD4^+$  e baseada na expressão das moléculas de migração tecidual CCR7 e CD62L (Figura 4) (SALLUSTO et al., 1999; GEGINAT et al., 2003). Desta forma, as células T de memória CCR7<sup>-</sup> expressam receptores de migração para os tecidos inflamados e apresentam funções de efetores ou citotóxicas imediatas. Da outra parte, as células CCR7<sup>+</sup> expressam receptores que orientam o tráfico para os linfonodos e não possuem função citotóxica imediata,

mas eficientemente estimulam as células dendríticas e diferenciam-se em células efetoras CCR7- após segunda estimulação (CAMPBELL et al., 2001; MASOPUST e AHMED, 2004; LANZAVECCHIA E SALLUSTO, 2005).



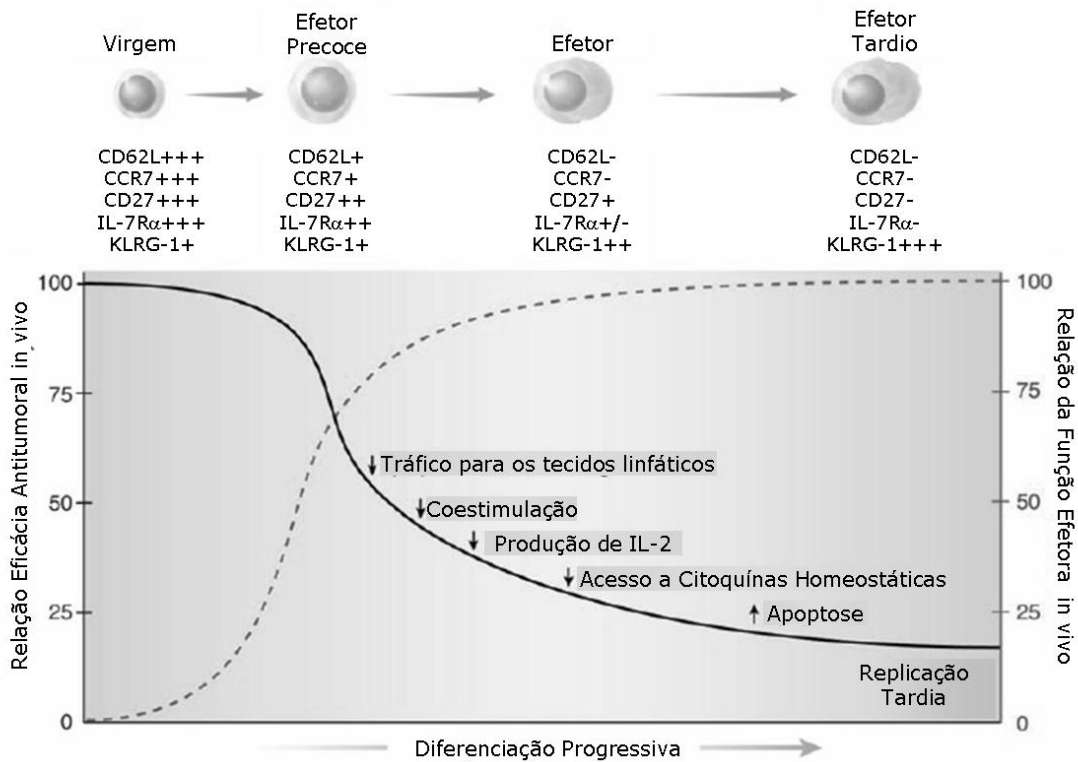
**Figura 4. Modelo de intensidade do sinal para a diferenciação da célula T e geração da célula T de memória.** A duração e intensidade da estimulação antigênica são indicadas pelo comprimento e espessura das setas sólidas. Os eventos independentes dos antígenos que levam à proliferação e diferenciação são indicados pelas linhas pontilhadas. DC, célula dendrítica. (Adaptado de Sallusto. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:745).

Recentemente, surgiram evidências de que a célula T<sub>MC</sub> teria uma maior capacidade que a célula T<sub>ME</sub> de persistir *in vivo* e, assim, seria mais efetiva em mediar a proteção devido ao seu alto potencial proliferativo, apesar de pouca atividade citotóxica inicial. Este efeito seria verdadeiro, principalmente, nos casos em que proteção depende de uma resposta secundária

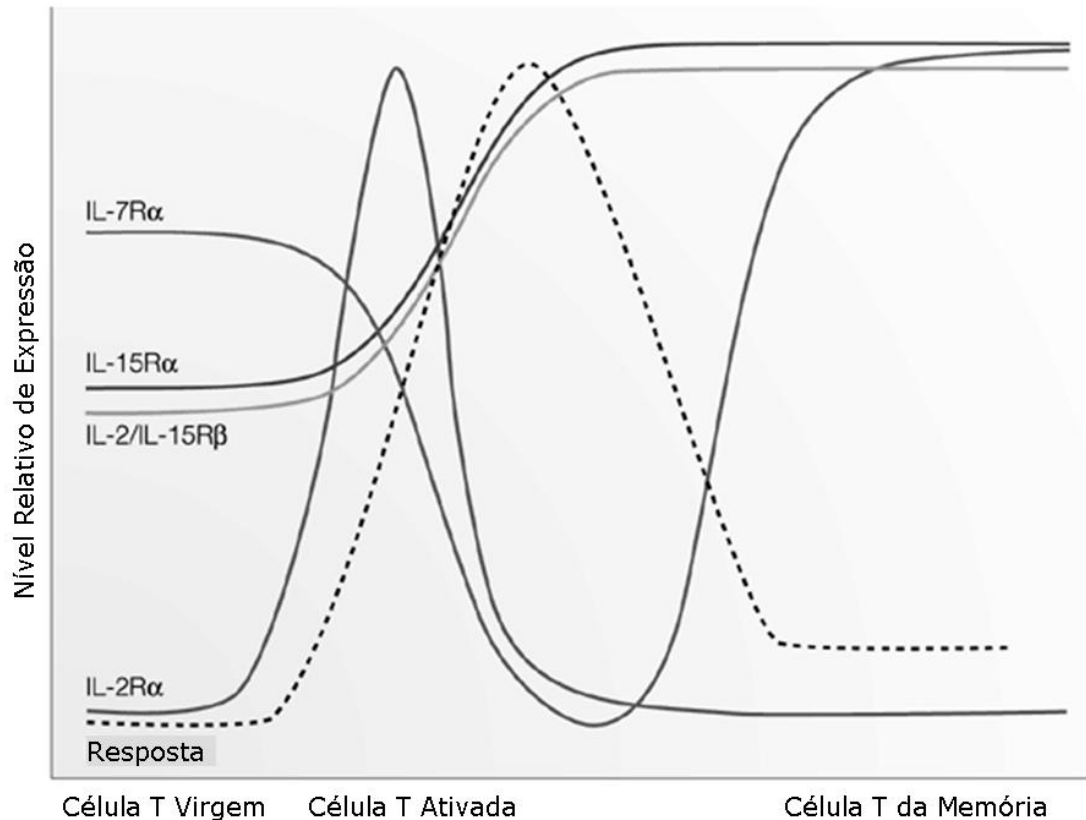
(LANZAVECCHIA e SALLUSTO, 2005). A este respeito, Gattinoni et al demonstraram em ratos que a infusão de LTC anti-tumoral com característica de memória central, que apresenta maiores propriedades de migração para os linfonodos e maior expressão de moléculas coestimulatórias, provêm imunidade superior se comparada à infusão de células com características de memória efetora (CCR7-/CD62L-/CD27-) (Figura 5)(GATTINONI et al., 2005).

Outro aspecto importante na resposta imune e na manutenção da memória é o papel das citoquinas homeostáticas na sobrevivência e diferenciação da célula T. Enquanto a interleucina-2 (IL-2) promove a expansão e ativação das LTC e é amplamente utilizada nos protocolos de geração *ex vivo* voltados para a imunoterapia celular (FALKEMBURG et al., 1999; MOLLIDREM et al., MONTAGNA et al., 2001; LOCATELLI et al., 2004; MONTAGNA et al., 2006), outras citoquinas desempenham papel importante na manutenção das células de memórias (Figura 6) (SCHLUMS e LEFRANÇOIS, 2003; CORNISH et al., 2006). A este respeito, especula-se que a IL-15, uma citoquina que também pertence à família das citoquinas com o receptor de cadeia gama comum como a IL-2, porém com a subunidade alfa diversa, aumenta a capacidade de proliferação dos subtipos de células T de memória e, também, apresenta um efeito anti-apoptótico que pode aumentar o efeito anti-tumoral *in vivo* (BRENTJENS et al., 2003; BIANCHI et al., 2006). Estas informações são apoiadas por resultados obtidos em modelos animais demonstrando que ratos deficientes em IL-15 ou, seu receptor, apresentam marcada redução no número de células T CD8+ nos linfonodos e da frequência de linfócitos T primários (CD44+/CD62L+/-) (LODOLCE et al., 1998; ALVES et al., 2003).





**Figura 5. Ilustração esquemática indicando a relação inversa das funções efetoras *in vitro* e *in vivo* da transferência adotiva dos subtipos de memória de células T proposto por Gattinoni et al.** Após a estimulação antigênica primária, a célula T CD8<sup>+</sup> prolifera e diferencia-se progressivamente na célula terminal efetora diferenciada. O processo de diferenciação é caracterizado por alterações funcionais e fenotípicas. A aquisição gradual das funções citotóxicas (linha tracejada) completa é associada com a incapacidade das células T de causar a regressão do tumor através da transferência adotiva (linha escura). Este mecanismo inicialmente envolve a diminuição da expressão das moléculas de migração linfática e coestimulatórias, o que resulta na ativação *in vivo* pobre das células T. Outros mecanismos ocorrem posteriormente e incluem a incapacidade de produzir IL-2 e outras citocinas homeostáticas, oscilação dos sinais pro-apoptóticos e anti-apoptóticos; e a aquisição de um estado de reativação tardia. +, expressão baixa; ++, expressão intermediária; +++ expressão alta. (Adaptado de Gattinoni. JCI 2005; 115:1616)



**Figura 6. Diferenças na expressão das subunidades do receptor das citocinas durante a resposta imune.** O receptor de cadeia alfa da interleucina 7 (IL-7R $\alpha$ ) e da interleucina 15 (IL-15R $\alpha$ ) são intensamente expressos na célula T virgem. Apesar da célula T virgem não expressar o receptor da interleucina 2 (IL-2R $\alpha$ ), a ativação da célula T aumenta rapidamente esta expressão até o pico proliferativo quando inicia a declinar. Os níveis de expressão do receptor da cadeia beta das IL-15 e IL-2 (IL-2/IL-15R $\beta$ ) e do IL-15R $\alpha$  aumentam após a ativação e se mantêm altos na fase de memória celular. A expressão do IL-7R $\alpha$  diminui com a ativação da célula T, o que pode promover a morte celular. Inversamente, a sua expressão aumenta se persiste a resposta imune, alcançando altos níveis nas células CD8<sup>+</sup> da memória. (Adaptado de Schluns e Lefrançois. Nat Rev Immunol 2003; 3:269).

A terapia celular adotiva oferece uma grande possibilidade de cura a muitos pacientes portadores de neoplasias, entretanto é uma modalidade terapêutica muito complexa. O seu aprimoramento depende de muitos fatores como estratégias de condicionamento antes da transferência, vacinação, tratamento de suporte após a infusão e das técnicas de geração e expansão *ex vivo* (SPEISER e ROMERO, 2005). Igualmente, o melhor conhecimento dos mecanismos de manutenção da memória imunológica e da atividade citotóxica específica anti-tumoral pode ser importante para obter resultados clínicos a longo prazo.

O transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico é um tratamento efetivo para muitas doenças hematológicas pediátricas (Barth et al, 2000). Entretanto, a recorrência da doença neoplásica original é uma das principais causas de falha desta terapia, mesmo considerando a presença do efeito enxerto versus leucemia (EvL) mediado pelos linfócitos T citotóxicos do doador (Hsieh et al, 2000; Welniak et al, 2000). A possibilidade de explorar uma função específica da célula, *ex vivo* ou *in vivo*, para obter efeito terapêutico, como a atividade citotóxica anti-tumoral, sem comprometer linhagens saudáveis é o princípio da imunoterapia e tem como objetivo melhorar os resultados deste procedimento. O presente estudo se justifica, pois se propõe a reproduzir a técnica de geração de LTC *ex vivo* sem utilizar um antígeno específico, favorecendo vários tipos de doenças hematológicas da infância, e a melhorar esta estratégia analisando a distribuição dos subtipos de células T da memória imunológica adaptativa utilizando duas citoquinas de cadeia gama comum como substrato das culturas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem o objetivo de analisar a distribuição dos subtipos de células T da memória imunológica adaptativa, em culturas de linfócitos T citotóxicos humanos, com atividade anti-leucemia, gerados e expandidos *ex vivo*.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Entre os objetivos específicos, a investigação realizada pretendeu:

- ✓ Analisar a distribuição de células T da memória em culturas de linfócitos T citotóxicos humanos em culturas mantidas com interleucina-2;
- ✓ Avaliar a possibilidade de gerar e expandir *ex vivo* linfócitos T citotóxicos humanos anti-leucemia em culturas mantidas com interleucina-15;
- ✓ Avaliar a capacidade de proliferação *in vitro* de linfócitos T citotóxicos humanos anti-leucemia em culturas mantidas com interleucina-15;
- ✓ Analisar a atividade citotóxica anti-leucemia de linfócitos T CD8+ gerados *ex vivo* em culturas mantidas com interleucina-15;
- ✓ Analisar a distribuição de células T da memória em culturas de linfócitos T citotóxicos humanos em culturas mantidas com interleucina-15;
- ✓ Comparar as culturas de linfócitos T citotóxicos humanos anti-leucemia mantidas com interleucina-2 e interleucina-15 quanto à atividade citotóxica, capacidade proliferativa e distribuição de linfócitos T citotóxicos da memória.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. POPULAÇÃO

A população estudada compreendeu pacientes pediátricos portadores de leucemia recaída, encaminhados à Unidade de Oncohematologia e Transplante de Medula Óssea do IRCCS Policlínico San Matteo, Pavia – Itália para a realização de alo-TCTH, dos quais se dispunha de células blásticas criopreservadas em grande quantidade e a disponibilidade de obter células de sangue periférico dos seu doadores por venopunção ou leucoaférese para a geração dos LTC anti-leucemia.

Os critérios para o diagnóstico de LMA foram baseados na morfologia das células leucêmicas de acordo com a classificação FAB e na imunofenotipagem conforme previamente estabelecido (BERNARD et al., 1996; HEAD, 1996; JENNINGS E FOON, 1997).

Desta forma, foram incluídos no estudo 5 pacientes: 4 portadores de leucemia mielóide aguda e 1 com leucemia linfóide aguda, submetidos ao alo-TCTH de doador familiar HLA compatível (1 paciente), ou de doador familiar parcialmente compatível (4 pacientes). As células leucêmicas (BL) foram obtidas do sangue periférico ou medula óssea destes pacientes no momento da recaída, enquanto que as células provenientes dos doadores foram obtidas do sangue periférico por venopunção de 1 doador; os demais foram submetidos à leucoaférese. A leucoaférese foi realizada na máquina Spectra Cobe (Lakewood Co, EUA.), utilizando o programa para coleta de células mononucleares (método semi-automático) e processando, no mínimo, um volume de sangue. As células mononucleares obtidas apresentaram uma pureza sempre superior a 90%, relativo ao total das células processadas, com um percentual de glóbulos vermelhos por unidade de 1% a 3%.

Todas as células foram criopreservadas após separação das células mononucleares em nitrogênio líquido (temperatura inferior a  $-120^{\circ}\text{C}$ ) e em meio contendo tampão fosfato (PBS-Gibco, Grand Island, EUA), dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% e albumina humana a 5%.

### 3.2. DELINEAMENTO DO ESTUDO E CÁLCULO DA AMOSTRA

Trata-se de um estudo experimental descritivo da frequência de células T CD8+ da memória imune adotiva de culturas de LTC anti-leucemia humanos gerados a partir de um protocolo previamente descrito (MONTAGNA et al., 2001) e comparativo pela introdução da rIL-15 às culturas.

Uma vez que não existem estudos semelhantes em humanos foram usados os resultados obtidos por BERARD et al., 2003 e GEGINAT et al., 2003, o tamanho da amostra foi estimado para um estudo descritivo calculando a amplitude em 10 % e o intervalo de confiança de 90%. Calculou-se um  $n$  amostral de 7 culturas.

### 3.3. VARIÁVEIS DO ESTUDO

As culturas foram analisada quanto à recuperação celular, característica fenotípica e atividade citotóxica anti-leucemia e contra células alvo não malignas.

### 3.4. SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES

A obtenção das células mononucleares das amostras de medula óssea ou sangue periférico necessárias para o estudo foi realizada por diferença de gradiente a partir da suspensão em Lymphoprep® - 1077 (Life Technologies, CA, EUA) na proporção de 4:6 (4 partes de Lymphoprep® para 6 partes de suspensão celular), centrifugadas a 1800 rpm durante 30 minutos

em temperatura ambiente, seguido de duas lavagens a 1200 rpm por 10 minutos. O meio utilizado para as diluições e suspensões foi solução tampão PBS (Gibco, Grand Island, EUA).

### 3.5. CONTAGEM CELULAR E AVALIAÇÃO DA VITALIDADE CELULAR

As células mononucleares foram contadas em câmara de Burker com microscópio óptico, observando quatro quadrantes e usando como reagente o Líquido de Türk (solução fisiológica a 2% de ácido acético, adicionada com violeta de genciana) na diluição 1:20 após a separação das células mononucleadas. O cálculo final da concentração celular representa a média dos quatro quadrantes multiplicada por  $10^4$  e pelo fator de diluição.

Para avaliar a recuperação celular e vitalidade das culturas e após o descongelamento, o reagente utilizado foi a solução de etídio bromuro (1 mg/ml) e laranja de acridina (2 mg/ml) em solução fisiológica, conservada no escuro a 4°C. Em geral, a contagem celular foi realizada na relação 2:1 com o corante, analisadas ao microscópio óptico com fluorescência onde as células vivas foram vistas com a coloração verde, enquanto que as mortas, laranja.

### 3.6. PREPARO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

As células dendríticas foram geradas usando células mononucleares do sangue periférico CD14+ dos doadores de medula óssea. As células CD14+ foram selecionadas magneticamente usando *Microbeads* marcadas com anti-CD14 (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Alemanha) de acordo com a especificação do fabricante e descrição a seguir (20µL de anti-CD14 para  $10 - 20 \times 10^7$  células, incubados a 4°C por 30 minutos seguidos de 2 lavagens a 1100 rpm em solução tampão PBS adicionada com albumina humana 0,1%). As células CD14+ obtidas (> 90%) foram semeadas em placas de cultura de 24 poços à concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL em

meio contendo RPMI-1640, 10% de soro fetal bovino (FCS, *fetal calf serum* - EuroClone, Celbio, Itália) suplementado com gentamicina 50µL/mL e glutamina 2mM e estimuladas com 500U/mL de IL-4 recombinante humana (R & D Systems Europe, Abingdon, RU) e 800 U/mL de fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos recombinante humano (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* - Schering-Plough/Sandoz, Basel, Suíça) (SALLUSTO et al., 1994; MONTAGNA et al., 2003). Após 7 dias de cultura em incubadora umidificada a 37<sup>0</sup>C em 5% de CO<sub>2</sub>, as células foram recuperadas, analisadas quanto ao seu fenótipo de superfície para CD14 (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) e CD1a (R & D Systems Inc, Minneapolis, MN, EUA) e usadas para a indução das linhagens de LTC se negativas para CD14 e positivas para CD1a (CD1a > 80%) (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998).

### 3.7. GERAÇÃO DAS LINHAGENS DE LTC ANTI-LEUCEMIA

O meio de cultura utilizado foi RPMI-1640 suplementado com 2mM de L-glutamina, 50µg/mL de gentamicina, 1% de aminoácidos não essenciais, 1mM de piruvato de sódio e 5% de soro humano (RPMI-SH5%). As células mononucleares obtidas do sangue periférico (CMNSP) dos doadores foram enriquecidas com CD8<sup>+</sup> através da seleção negativa após incubação com anti-CD4 marcado magneticamente, microbeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Alemanha) na concentração de 20µL de anti-CD4 para 10 - 20 x 10<sup>7</sup> células, incubados a 4°C por 30 minutos seguidos de 2 lavagens a 1100 rpm em solução tampão PBS, adicionada com albumina humana 0,1% seguindo a recomendação do fabricante. As células CD8<sup>+</sup> enriquecidas (0.5 a 1x10<sup>6</sup> células/mL) foram cultivadas em placas de 48 poços de fundo plano (volume final de 1mL) com as células dendríticas dos doadores (2 x 10<sup>5</sup> células/mL), blastos leucêmicos (BL) irradiados (200 Gy) (5 x 10<sup>5</sup> células/mL) e linfócitos CD4<sup>+</sup> dos doadores remanescente da



separação magnética irradiados (30 Gy) ( $3 \text{ a } 5 \times 10^5$  células/mL) (MONTAGNA et al., 2001; MONTAGNA et al., 2003). No dia 0 das culturas foram adicionados 10 ng/mL de rIL-7 (R & D Systems Inc, Minneapolis, MN, EUA) e 10 pg/mL de rIL-12 (R & D Systems Europa). Depois de 7 a 10 dias, as culturas foram contadas quanto à recuperação celular e vitalidade, analisadas quanto ao seu fenótipo por citometria de fluxo e reestimuladas com os BL dos pacientes da seguinte forma: as CMNSP dos doadores irradiadas a 30 Gy foram semeadas em RPMI-SH5% em placas de 48 poços à concentração de  $2-3 \times 10^6$ /mL; após 3 horas de incubação as células não aderentes foram recolhidas, deixando 0,3 mL da suspensão nas placas; as células efectoras recuperadas da cultura precedente foram suspensas ( $0,8 - 1 \times 10^6$ /por poço) com BL irradiados (200 Gy) ( $5 \times 10^5$  cells/mL) e semeadas em 0,7mL de meio de cultura nas placas contendo os CMNSP aderidas (VITIELLO et al., 1995). Após dois dias, foram adicionados as culturas 25U/mL de rIL-2 (rIL-2; Chiron CO, Emeryville, CA, EUA) ou 10ng/mL de IL-15 recombinante (R & D Systems Inc, Minneapolis, MN, EUA). O mesmo protocolo foi utilizado nas estimulações sucessivas. Sempre antes de cada estimulação, as células foram contadas quanto a sua vitalidade, analisadas quanto ao seu fenótipo de superfície e avaliadas quanto a sua capacidade citotóxica.

A dose de rIL-15 de 10ng/mL foi estabelecida com base nos estudos publicados na literatura internacional (DUNNE et al., 2001; WENG et al., 2002; ALVES et al., 2003; ANICHINI et al., 2003; BRENTJENS et al., 2003) que demonstraram efeito na proliferação e diferenciação celular T.

### 3.8. EXPANSÃO RÁPIDA DOS LTC ANTI-LEUCEMIA

As culturas de LTC antileucemia derivadas dos doadores e obtidas após três estimulações com os BL dos pacientes em meio contendo as duas citoquinas foram expandidas com um ciclo do protocolo de expansão rápida previamente descrito (MONTAGNA et al., 2003). De acordo

com este protocolo, são utilizadas CMNSP alogênicas irradiadas (30 Gy) como células de suporte ( $2 \times 10^6/\text{mL}$ ), anticorpo anti-CD3 (OKT3, Ortho, Raritan, NJ, USA; 30 ng/mL) e repetidas doses de rIL-2 (50 U/mL) ou rIL-15 (10 ng/mL) a cada 3 a 4 dias, dependendo da citocina usada na fase de estimulação. As suspensões celulares de LTC à concentração de 0,2 a  $0,3 \times 10^6$  foram semeadas em placas de cultura de 24 poços em 1,5 mL de RPMI-SH5% contendo as CMNSP alogênicas e o anti-CD3 e mantidas em incubadora umidificada a  $37^\circ\text{C}$  em 5% de  $\text{CO}_2$ . A cada 3 a 5 dias, as culturas eram contadas e divididas em outras placas ou poços para manter uma concentração celular não superior a  $2 \times 10^6/\text{mL}$ .

### 3.9. PREPARO DAS CÉLULAS ESTIMULADORAS E CÉLULAS ALVO

As células usadas como estimuladores nas culturas *ex vivo* para a geração dos LTC foram os BL dos pacientes preparados em amostras heparinizadas da medula óssea ou sangue periférico (> 90% de BL) obtidos no momento do diagnóstico ou da recaída e mantidos sob criopreservação como previamente descrito. Estas células foram descongeladas imediatamente antes do uso a uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , em meio contendo RPMI-1640 na proporção 1:10 e lavado a 1000 rpm por 10 minutos. Igualmente às células efectoras, tiveram sua viabilidade contada após a lavagem.

Nos ensaios de citotoxicidade foram utilizadas como células alvo, além dos BL, linhagens de células T estimuladas com mitógeno (fitohemaglutinina - Gibco, Grand Island, EUA - T-PHA) como controle não maligno. Estas células foram obtidas para todos os pacientes através da estimulação de CMNSP ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ), criopreservadas previamente ao transplante, com fitohemaglutinina  $4\mu\text{g}/\text{mL}$  em RPMI-1640 suplementados com 10% de FCS e 100 U/mL de IL-2 recombinante (rIL-2; Chiron CO, Emeryville, CA, EUA), foram semeadas em placas de 24 poços (1mL/poço) e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em 5% de  $\text{CO}_2$  em ambiente umidificado. A cada 3-4 dias

era trocado o meio de cultura ou as linhagens eram transferidas para outro poço, se a concentração celular fosse maior que  $3 \times 10^6/\text{mL}$  (MONTAGNA et al., 2001).

Também foram obtidos fibroblastos da biopsia de pele dos pacientes antes do transplante. Os fragmentos obtidos foram semeados em frascos de  $25\text{cm}^2$  com 2mL do meio RPMI1640 contendo 10% de FCS, 4mM de L-glutamina e  $50\mu\text{g}/\text{mL}$  de gentamicina e incubados durante 12 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Os restos celulares foram retirados com a primeira troca do meio de cultura, e as células aderidas mantidas até se tornarem confluentes, quando foram recolhidas usando solução de tripsina  $500\mu\text{L}$  a 1mL e criopreservadas para utilização posterior como células alvos de controle (MONTAGNA et al., 2003).

### 3.10. ANÁLISE DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE

A análise da população celular de cada cultura foi realizada por imunofluorescência direta com marcação de duas ou três cores e medidas com o citômetro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences, Milão, Itália). Foram utilizadas múltiplas combinações de anticorpos conjugados com ficoeritrina (Phycoerythrin - PE), isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate* - FITC) e proteína clorofila peridinina (*peridinin chlorophyll protein* - PerCP) para os seguintes marcadores: i) CD14 e CD1a, para análise das DC; ii) CD3, CD56, CD4, CD8, TCR- $\gamma\delta$ , CCR7, CD27, CD45RA, CD45RO, CD62L (mAb, BD Biosciences, Milão, Itália), para a análise da população de LTC das culturas. Todas as marcações foram controladas com o isótipo (imunoglobulina IgG de rato) adequado para cada marcador de acordo com a especificação do fabricante.

Assim, cerca de  $50$  a  $100 \times 10^4$  células obtidas de cada cultura foram suspendidas, lavadas e preparadas em  $50\mu\text{L}$  de RPMI-SH5% para ser adicionado  $10\mu\text{L}$  do anticorpo conjugado. Após

um período de 30 minutos de incubação a 4°C, as células foram novamente centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos, retirado o sobrenadante e adicionado 250 a 350 µL de solução fisiológica a 0,9% para proceder com a aquisição ao citômetro de fluxo de ao menos 10.000 eventos utilizando o programa *CellQuest* (Macintosh, EUA ) para a análise.

A classificação das células T CD8+ da memória foi baseada na descrição de Sallusto et al., 1999 e Genginat et al., 2003 onde: as células T virgens expressam CD8+/CCR7+/CD45RA+; as células T da memória central, CD8+/CCR7+/CD45RA-; e as células efetoras CD8+/CCR7-/CD45RA- ou CD8+/CCR7-/CD45RA+ (SALLUSTO et al., 1999; GENGINAT et al., 2003).

### 3.11. ENSAIO DA LIBERAÇÃO DE <sup>51</sup>CROMO

A atividade citotóxica das culturas de LTC antileucemia foi avaliada através do ensaio de liberação de <sup>51</sup>Cromo após 8 horas de incubação. As células alvo (BL, T-PHA e fibroblastos) foram marcadas com 50 µCi de <sup>51</sup>NaCrO<sub>4</sub> (1 mCi/mL) (PerkinElmer, Boston, EUA) em 500 µL de FCS por 18 horas a 37°C. Após três lavagens, as células alvo foram semeadas na concentração de 5 x 10<sup>3</sup> por poço em 100 µL de RPMI-SH5% em placas de 96 poços com fundo oval. Os efetores (LTC anti-leucemia) foram semeados em cada poço em diferentes concentrações a fim de obter uma proporção Efetor: Alvo (E:A) de 50:1 a 1:1 em um volume final de 200µL. A lise espontânea das células alvo foi medida após incubação com o meio de cultura, enquanto que a liberação total do isótopo radioativo incorporado às células marcadas foi medida após a lise mecânica do mesmo número de células alvo. As placas foram centrifugadas por 4 minutos a 200 rpm e incubadas à 37°C por 8 horas. Após o período de incubação, 30µL do sobrenadante foi coletado e contado no contador gama (Top Count, Packard, EUA). A lise específica foi calculada seguindo a seguinte fórmula: % da liberação específica = [(liberação encontrada – liberação

espontânea)] x 100. Todos os experimentos foram feitos em triplicata, sendo que ao fim da contagem foi calculada a média da liberação radioativa de cada cultura em diferentes proporções.

Para testar a contribuição da atividade citolítica não específica mediada pelas células NK foram adicionadas às culturas do ensaio citotóxico células eritroleucêmicas da linhagem K562 (experimento de inibição a frio) como descrito previamente (MONTAGNA et al., 2004). Estas células foram mantidas em cultura em meio contendo RPMI-1640 com 10% de FCS em frasco de 25cm<sup>2</sup>. No momento do uso foram recolhidas, contadas e lavadas para serem suspensas em RPMI-SH5% e adicionadas às placas contendo as células efectoras e alvo marcadas antes do início do período de incubação, a uma proporção de 20:1 com as células alvo.

### 3.12. SEPARAÇÃO CELULAR MAGNÉTICA

Para a seleção das células CD14 e para o enriquecimento das CMNSP dos doadores de CD8<sup>+</sup> foi utilizada a tecnologia *MACS – Myltenyi Biotec GmbH* (Alemanha) com as *MicroBeads* CD14 e CD4 de acordo com a determinação do fabricante seguindo o seguinte protocolo: a suspensão de CMNSP dos doadores, lavadas e diluídas em 80µL de solução tampão adicionada de 0,5% de albumina bovina e de 2mM de EDTA (pH 7,2) na concentração de 10 a 20 x 10<sup>7</sup> células, foi com marcada 20µL da *MicroBeads* determinada. Após 20 minutos de incubação a 4°C, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos, lavadas e suspendidas em 1mL da mesma solução tampão. Esta suspensão foi levada à coluna de separação (*MiniMacs - Myltenyi Biotec GmbH*, Alemanha) previamente colocada no suporte magnético e condicionada com 500µL da solução tampão. As células negativas passam através da coluna e foram recolhidas em uma proveta. Seguiram duas lavagens com 1mL da solução tampão através da coluna para retirar todas as células não aderidas ao campo magnético e ao monoclonal. Neste ponto, a coluna

foi retirada do suporte magnético, foi adicionado mais outro 1mL da solução e realizado uma pressão de esvaziamento da coluna com o êmbolo sobre uma proveta para obter a fração celular positiva (marcada com o anticorpo monoclonal). Ao término da separação, as frações negativas e positivas foram contadas em vitalidade e marcadas com anticorpo monoclonal de superfícies para análise ao citômetro de fluxo. Foi considerada efetiva a separação se a fração celular positiva tivesse mais de 90% das células marcadas, no caso CD14+ e CD4+.

### 3.13. ANALISE ESTATÍSTICA

Foram utilizadas estatísticas descritivas. Os dados são apresentados em valores da média  $\pm$  desvio padrão, a diferença estatística da expressão fenotípica e a atividade citotóxica entre as culturas com IL-2 ou IL-15 foram estimadas usando o teste ANOVA ou teste *t* com valor de significado estatístico do  $p < 0,05$ .

Os dados foram armazenados em planilha do programa Microsoft Excel 2003 para Windows XP e analisados no programa SPSS 9.0.

### 3.14. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Em se tratando de um ensaio laboratorial, que utilizou amostras usualmente coletadas nos procedimento de diagnóstico e alo-TCTH, foi aprovado pela Comissão de Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com base na “Resolução Normativa 02/97 para a Utilização de Material Biológico Descartado em Projetos de Pesquisa”.

O Comitê de Revisão e Ética do Departamento de Pediatria da Fundação IRCCS Policlínico San Matteo de Pavia, Itália aprovou o protocolo dentro do projeto “*The development*

*of immunotherapeutic Strategies to treat Hematological and Neoplastic Diseases on the Basis of Optimised Allogenic Stem Cell Transplantation*”, procedimento número 19419/2003. Todos os pacientes incluídos no estudo, ou seus responsáveis, assinaram um consentimento informado antes da coleta de CMNSP, ou biópsia de pele, assim, como seus doadores antes da realização do procedimento como norma da instituição.

#### 4. BIBLIOGRAFIA

1. ALPDOGAN O, ENG JM, MURIGLAN SJ, WILLIS LM, HUBBARD VM, TJOE KH, TERWEY TH, KOCHMAN A, VAN DEN BRINK RM. Interleukin-15 enhances immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation. **Blood** 2005; 105:865-873.
2. ALVES NL, HOOIBRINK B, AROSA FA, VAN LIER RAW. IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8+ T cells in vitro. **Blood** 2003; 102: 2541-2546.
3. ANDOLINA M, MAXIMOVA N, RABUSIN M, VUJIC D, BUNJEVACKI G, VIDALI C, BEORCHI A. Haploidentical bone marrow transplantation in leukemia and genetic diseases. **Haematologica** 2000; 85 (suppl 11):37-40.
4. ANICHINI A, SCARITO A, MOLLA A, PARMIGIANI G, MORTARINI R. Differentiation of CD8+ T cells from tumor-invaded and tumor-free lymph nodes of melanoma patients: role of common  $\gamma$ -chain cytokines. **J Immunol** 2003; 171:2134-2141.
5. APPELBAUM FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. **Nature** 2001; 411:385-389.
6. AVERSA F, TABILIO A, VELARDI A et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. **N Engl J Med** 1998; 339: 1186–1193.
7. BANCHEREAU J, STEINMAN RM. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature** 1998; 392:245-252.
8. BARON F & STORB S. The immune system as a foundation for immunologic therapy and hematologic malignancies: a historical perspective. **Best Pract Res Clin Haematol** 2006; 19:637- 653.



9. BARRETT AJ & MALKOVSKA V. Graft-versus-leukemia: understanding and using the alloimmune response to treat haematological malignancies. **Br J Haematol** 1996; 93: 754–761.
10. BARTH E, MALORGIO C, TAMARO P. Allogeneic bone marrow transplantation in hematologic disorders of childhood: new trends and controversies. **Haematologica** 2000; 85 (suppl 11): 2-8.
11. BECKNELL B & CALIGIURI MA. Cancer T cell therapy expands. **Nat Med** 2003; 9: 257-258.
12. BELLANTUONO I, GAO L, PARRY S et al. Two distinct HLA-A0201-presented epitopes of the Wilms tumor antigen 1 can function as targets for leukemia-reactive CTL. **Blood** 2002; 100: 3835–3837.
13. BERNARD DR, KALOUSEK DK, WIERSMA SR et al. Morphologic, immunologic, and cytogenetic classification of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in childhood: a report from the childrens cancer group. **Leukemia** 1996; 10:5-10.
14. BERARD M, BRANDT K, PAUS SB, TOUGH DF. IL-15 Promotes the survival of naïve and memory phenotype CD8+ T cells. **J Immunol** 2003; 170: 5018-5026.
15. BIANCHI T, GASSER S, TRUMPP A, MACDONALD R. c-Myc acts downstream of IL-15 in the regulation of memory CD8 T-cell homeostasis. **Blood** 2006; 107: 3992-3999.
16. BLEAKLEY M E RIDDELL SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. **Nature Reviews Cancer** 2004; 4(5): 371-380.
17. BORDIGNON C, CARLO-STELLA C, COLOMBO MP et al.. Cell therapy: Achievements and perspectives. **Haematologica** 1999; 84:1110-1149.
18. BRENTJENS RJ, LATOUCHE JB, SANTOS E et al. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. **Nat Med** 2003; 9: 279-286.

19. BROUWER RE, ZWINDERMAN KH, KLUIN-NELEMANS HC, van LUXEMBURG-HEIJS SAP, WILLEMZE R, FALKENBURG JHF. Expression and induction of costimulatory and adhesion molecules on acute myeloide leukemic cells: Implications for adoptive immunotherapy. **Exp Hematol** 2000; 28:161-168.
20. BURNET FM. The concept of immunological surveillance. **Progress in Experimental Tumor Research** 1970; 13: 1-27.
21. BURNET M. The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity. **London: Cambridge University Press**, 1959.
22. CAMPBELL JJ, MURPHY KE, KUNKEL E et al. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. **J Immunol** 2001; 166: 877-884.
23. CENCI E, MENCACCI A, FE D'OSTIANI C et al. Cytokine-and T helper-dependent lung mucosal immunity in mice with invasive pulmonary aspergillosis. **J Infect Dis** 1998; 178: 1750–1760.
24. CENCI E, PERITO S, ENSSLE K et al. Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis. **Infect Immun** 1997; 65: 564–570.
25. CHO BK, WANG C, SUGAWA S, EISEN HN, CHEN J. Functional differences between memory and naïve CD8 T cells. **Proc Nat Acad Sci** 1999; 96: 2976-2981.
26. CLARK RE, DODI IA, HILL SC et al. Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein. **Blood** 2001; 98: 2887–2893.
27. COLLINS RHJ, SHPILBERG O, DROBYSKI WR, et al. Donor leukocyte infusion in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. **J Clin Oncol** 1997; 15: 433-444.
28. COMOLI P, DE PALMA R, SIENA S et al. Adoptive transfer of allogeneic Epstein–Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T-cells with in vitro antitumor activity boosts LMP2-

- specific immune response in a patient with EBV-related nasopharyngeal carcinoma. **Ann Oncol** 2004; 15: 113–117.
29. COMOLI P, LABIRIO M, BASSO S et al. Infusion of autologous Epstein–Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for prevention of EBV-related lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients with evidence of active virus replication. **Blood** 2002; 99: 2592–2598.
  30. COOKSON S & REEN D. IL-15 drives neonatal T cells to acquire CD56 and become activated effector cells. **Blood** 2003; 102:2195-2197.
  31. COOPER LJN, TOPP MN, SERRANO LM, et al. T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect. **Blood** 2001; 101: 1637-1644.
  32. COPELAN EA. Medical progress: hematopoietic stem-cell transplantation. **N Eng J Med** 2006; 354:1813-1826.
  33. CORNISH GH, SINCLAIR LV, CANTRELL DA. Differential regulation of T-cell growth by IL-2 and IL-15. **Blood** 2006; 108: 600-608.
  34. COSTELLO RT, MALLET F, SAINTY D, MARANINCHI D, GASTAUT JA, OLIVE D. Regulation of CD80/B7-1 and CD86/B7-2 molecule expression in human primary acute myeloid leukemia and their role in allogeneic immune recognition. **Eur J Immunol** 1998; 28:90-103.
  35. DAUSSET J, BRECY H. Identical nature of the leucocyte antigens detectable in monozygotic twins by means of immuno iso-leuco-agglutinins. **Nature** 1957; 180:1430-9.
  36. DAVIS TA, CZERWINSKI DK & LEVY R. Therapy of B cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. **Clin Cancer Res** 1999; 5: 611–615.

37. DINI G, CANCEDDA R, LOCATELLI F, BOSI A, BANDINI G, ALESSANDRINO EP, PORTA F et al., for GITMO. Unrelated donor marrow transplantation: an update of the experience of the Italian Bone Marrow Transplant Group (GITMO). **Haematologica** 2000; 85(suppl11): 30-36.
38. DUDLEY ME, WUNDERLICH JR, YANG JC, et al. Adoptive transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. **J Clin Oncol** 2005; 23: 2346-2357.
39. DUNN GP, BRUCE AT, IKEDA H et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nature Immunol** 2002; 3: 991-998.
40. DUNN GP, OLD LJ & SCHREIBER RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. **Immunity** 2004; 21: 137-148.
41. DUNNE J, LYNCH S, O'FARRELLY C, TODRYK S, HEGARTY JE, FEIGHERY C, DOHERTY DG. Selective expansion and partial activation of human NK cells and NK receptor-positive T cells by IL-2 and IL-15. **J Immunol** 2001, 167: 3129-3138.
42. EHRLICH P. Ueber den jetzigen stand der Karzinomforschung. **Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde** 1909; 5: 273-290.
43. EINSELE H, ROOSNEK E, RUFER N et al. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. **Blood** 2002; 99: 3916-3922.
44. FALKENBURG JH & WILLEMZE R. Minor histocompatibility antigens as targets of cellular immunotherapy in leukemia. **Best Pract Clin Haematol** 2004; 17: 415-425.
45. FALKENBURG JH, SMIT WM, WILLEMZE R. Cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses against acute or chronic myeloid leukemia. **Immunol Rev** 1997; 157: 223-230.
46. FALKERBURG JH, WAFELMAN AR, JOOSTEN P, SMIT W, VAN BERGEN CAM, BONGAERTS R, LURVINK E et al. Complete remission of accelerated phase of chronic

- myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. **Blood** 1999; 94:1201-1208.
47. FARAG SS, FEHNIGER TA, RUGGERI L et al. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graftversus-leukemia effect. **Blood** 2002; 100: 1935–1947.
  48. FLOMENBERG N, BAXTER-LOWE LA, CONFER D et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. **Blood** 2004; 104:1923-30.
  49. GAMBACORTI-PASSERINI C, GRIGNANI F, ARIENTI F et al. Human CD4 lymphocytes specifically recognize a peptide representing the fusion region of the hybrid protein PML/RAR alpha present in acute promyelocytic leukemia cells. **Blood** 1993; 81: 1369–1375.
  50. GATTINONI L, KLEBANOFF CA, PALMER DC, WRZESINSKI C et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. **J Clin Invest** 2005; 115:1616-1626.
  51. GEGINAT J, LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. **Blood** 2003;102:4260-4266
  52. GERNA G, BALDANTI F, GROSSI P et al. Diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus infection in transplant recipients. **Rev Med Microbiol** 2001; 12: 155–175.
  53. GERNA G, LILLERI D, BALDANTI F et al. Human cytomegalovirus immediate early-mRNAemia vs pp65-antigenemia for guiding pre-emptive therapy in children and young adults given hematopoietic stem cell transplantation: a prospective, randomized, open-label trial. **Blood** 2003; 101: 5053–5060.

54. GIEBEL S, LOCATELLI F, LAMPARELLI T et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. **Blood** 2003; 102: 814–819.
55. GOLDIN JR. **Pesquisa em Saúde: Leis Normas e Diretrizes**. 3 ed. Porto Alegre, RS: HCPA; 1997.p.73.
56. GOTTSCHALK S, EDWARDS OL, SILI U et al. Generating CTLs against the subdominant Epstein–Barr virus LMP1 antigen for the adoptive immunotherapy of EBV-associated malignancies. **Blood** 2003; 101: 1905–1912.
57. GOULMY E. Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. **Immunol Rev** 1997; 157: 125–140.
58. GREENBERG PD & RIDDELL SR. Deficient cellular immunity-finding and fixing the defects. **Science** 1999; 285: 546–551.
59. GROW WB, MOREB JS, ROQUE D et al. Late onset of invasive aspergillus infection in bone marrow transplant patients at a university hospital. **J Clin Microbiol** 2002; 40: 1496–1499.
60. HAMANN D, BAARS PA, REP MHG, HOOIBRINK B, KERKHOF-GARDE SR, KLEIN MR, VAN LIER RAW. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+T cells. **J Exp Hematol** 1997; 9: 1407-1418.
61. HEAD DR. Revised classification of acute myeloid leukemia. **Leukemia** 1996; 10:1826-1831.
62. HESLOP EE & ROONEY CM. Adoptive cellular immunotherapy for EBV lymphoproliferative diseases. **Immunol Rev** 1997; 157: 217–222.
63. HESLOP HE, NG CYC, LI C et al. Long-term restoration of immunity against Epstein–Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. **Nat Med** 1996; 2: 551–555.

64. HOROWITZ MM, GALE RP, SONDEL PM, GOLDMAN JM, KERSEY JH, KOLB H-J, RIMM AA, RINGDÉN O, ROZMAN C, SPECK B, TRUITT RL, ZWANN FE, BORTIN MM. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. **Blood** 1990; 75: 555-562.
65. HSIEH M, PATTERSON AE, KORNGOLD R. T-Cell subsets mediate graft-versus-myeloid leukemia responses via different cytotoxic mechanisms. **Biol Blood Marrow Transpl** 2000; 6: 231-240.
66. IEZZI G, SCHEIDEGGER D, LANZAVECCHIA A. Migration and function of antigen-primed nonpolarized T lymphocytes in vivo. **J Exp Med** 2001; 193: 987-993.
67. JENNINGS CD & FOON KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematology malignancy. **Blood** 1997; 90: 2863-2892.
68. KAECH SM & AHMED R. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells. **Nat Immunol** 2001; 2: 415-422.
69. KEEVER-TAYLOR CA, MARGOLIS D, KONINGS S, SANDFORD GR, NICOLETTE CA, LAWENDOWSKI C, BURNS WH. Cytomegalovirus-specific cytolytic T-cell lines and clones generated against adenovirus-pp65-infected dendritic cells. **Biol Blood Marrow Transpl** 7:247-256, 2001.
70. KLEIN J & SATO A. Advances in immunology: the HLA system (first of two parts). **N Engl J Med** 2000; 343:702-9.
71. KOLB HJ, MITTERMULLER J, CLEMM C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. **Blood** 1990; 76: 2462-2465.
72. KOLB HJ, SCHATTENBERG A, GOLDMAN JM et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. **Blood** 1995; 86: 2041-2050.

73. KOLB HJ, SCHMIDT C, BARRETT AJ et al. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. **Blood** 2004; 103: 767-776.
74. KUEHNLE I, HULS MH, LIU Z et al. CD20 monoclonal antibody (rituximab) for therapy of Epstein–Barr virus lymphoma after hemopoietic stem-cell transplantation. **Blood** 2000; 95: 1502–1505.
75. LANZAVECCHIA A & SALLUSTO F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. **Curr Opin Immunol** 2005; 17:326-332.
76. LATGE JP. Aspergillus fumigatus and aspergillosis. **Clin Microbiol Rev** 1999; 12: 310–350.
77. LI CR, GREENBERG PD, GILBERT MJ et al. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV) specific T cell responses after allogeneic bone marrow transplantation: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. **Blood** 1994; 83: 1971–1979.
78. LJUNGMAN P, ENGELHARD D, LINK H et al. Treatment of interstitial pneumonitis due to cytomegalovirus with ganciclovir and intravenous immune globulin: experience of European Bone Marrow Transplant Group. **Clin Infect Dis** 1992; 14: 831–835.
79. LOCATELLI F & BURGIO GR. Transplant of haematopoietic stem cells in childhood: where we are and where we are going. **Haematologica** 1998; 83:550-563.
80. LOCATELLI F, COMOLI P, MONTAGNA D, ROSSI F, DAUDT L, MACCARIO R. Innovative approaches of adoptive immune cell therapy in paediatric recipients of haematopoietic stem cell transplantation. **Best Pract Res Clin Haematol** 2004; 17: 479–492.
81. LOCATELLI F, PERCIVALLE E, COMOLI P et al. Human cytomegalovirus infection in pediatric patients given allogeneic bone marrow transplantation: role of early treatment of antigenemia on patients' outcome. **Br J Haematol** 1994; 88: 64–71.



82. LOCATELLI F. The role of repeat transplantation of haematopoietic stem cells and adoptive immunotherapy in treatment of leukemia relapsing following allogeneic transplantation. **Br J Haematol** 1998; 102: 633-638.
83. LODOLCE JP, BOONE DL, CHAI S et al. IL-15 receptor maintains lymphonoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. **Immunity** 1998; 9: 669-676.
84. MACKAY IR & ROSEN FS. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. **N Eng J Med** 2000; 343(14):1020-1034.
85. MARIJT WA, HEEMSKERK MH, KLOOSTERBOER FM et al. Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100: 2742–2747.
86. MARR KA, CARTER RA, BOECKH M et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. **Blood** 2002; 100: 4358–4365.
87. MASOPUST D & AHMED R. Reflections on CD8 T-cell activation and memory. **Immunol Res** 2004; 29:151-160.
88. MASOPUST D, KAECH SM, WHERRY EJ, AHMED R. The role of programming in memory T-cell development. **Curr Opin immunol** 2004; 16:217-225.
89. MATHE G, AMIEL JL, SCHWARZENBERG L et al. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. **Cancer Research** 1965; 25: 1525-1531.
90. MOLLDREM J, KOMANDURI K, WIEDER E. Overexpressed differentiation antigens as target of graft-versusleukemia reactions. **Curr Opin Hematol** 2002; 9: 503–508.

91. MOLLDREM J, LEE PP, CHANGQING W et al. Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. **Nat Med** 2000; 6: 1018-1023.
92. MONTAGNA D, DAUDT LE, LOCATELLI F, MONTINI E, TURIN I, LISINI D, GIORGIANI G, BERNARDO ME, MACCARIO R. Single-Cell Cloning of Human, Donor-Derived Antileukemia T-Cell Lines for In vitro Separation of Graft-versus-Leukemia Effect from Graft-versus-Host Reaction. **Cancer Res** 2006; 66(14): 7310-6.
93. MONTAGNA D, LOCATELLI F, CALCATERRA V et al. Does the emergence and persistence of donor-derived leukemia reactive T lymphocytes protect patients given an allogeneic BMT from recurrence? Results of a preliminary study. **Bone Marrow Transplant** 1998; 22:743-750.
94. MONTAGNA D, MACCARIO R, LOCATELLI F, et al. Ex vivo priming for long term maintenance of anti-leukemia human cytotoxic T cells suggests a general procedure for adoptive immunotherapy. **Blood** 2001; 98: 3359–3366.
95. MONTAGNA D, MACCARIO R, MONTINI E et al. Generation and ex vivo expansion of cytotoxic T lymphocytes directed toward different types of leukemia or myelodysplastic cells using both HLA-matched and partially matched donors. **Exp Hematol** 2003; 31: 1031–1038.
96. MONTAGNA D, SCHIAVO R, GIBELLI N, et al. Ex vivo generation and expansion of anti-tumor cytotoxic T-cell lines derived from patients or their HLA-identical sibling. **Int J Cancer** 2004;110:76-86
97. MONTAGNA D, YVON E, CALCATERRA V, COMOLI P, LOCATELLI F, MACCARIO R, FISHER A, CAVAZZANA-CALVO M. Depletion of alloreactive T cells by a specific anti-interleukin-2 receptor p55 chain immunotoxin does not impair in vitro antileukemia and antiviral activity. **Blood** 1999; 93:3550-3557.
98. MORRIS E, HART D, GAO L et al. Generation of tumor-specific T-cell therapies. **Blood Reviews** 2006; 20:61-69.

99. MURPHY WJ e LONGO DL. The potential role of NK cells in the separation of graft-versus-tumor effects from graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. **Immunol Rev** 1997; 157:167–176.
100. NAGLER A, ACKERSTEIN A, OR R, NAPARSTEK E, SLAVIN S. Adoptive immunotherapy with haploidentical allogeneic peripheral blood lymphocytes following autologous bone marrow transplantation. **Exp Hematol** 2000; 28:1225-1231.
101. NALESNIK MA. Posttransplantation lymphoproliferative disorders (PTLD): current perspectives. **Semin Thorac Cardiovasc Surg** 1996; 8: 139–148.
102. O'REILLY R, SMALL TN, PAPADOPULOS E et al. Biology and adoptive cell therapy of Epstein–Barr-virus associated lymphoproliferative disorders in recipients of marrow allografts. **Immunol Rev** 1997; 157: 195–216.
103. OHKAWA T, SEKI H, DOBASHI H, KOIKE Y et al. Systmatic characterization of human CD8+ T cells with natural killer cell markers in comparison with natural killer cells and normal CD8+ T cells. **Immunol** 2001; 103: 281-290
104. OZDEMIR O, RAVINDRANATH Y, SAVASAN S. Mechanism of superior anti-tumor cytotoxic response of interleukin 15-induced lymphokine-activated killer cells. **J Immunother** 2005; 28: 44-52.
105. PAPADOPOULOS EB, LADANYI M, EMANUEL D et al. Infusions of donor leukocytes as treatment of Epstein–Barr virus associated lymphoproliferative disorders complicating allogeneic marrow transplantation. **N Engl J Med** 1994; 330: 1185–1191.
106. PARKMAN R & WEINBERG KI. Immunological reconstitution following bone marrow transplantation. **Immunol Rev** 1997; 157: 73–78.
107. PERRUCCIO K, TOSTI A, BURCHIELLI E et al. Transferring donor immunity to pathogens across HLA barriers. **Blood** 2003; 102: 40a.
108. POTER DL & JUNE CH. T-cell reconstitution and expansion after hematopoietic stem cell transplantation: 'T' it up! **BMT** 2005; 35: 935-942.

109. RAUSER G, EINSELE H, SINZGER C et al. Rapid generation of combined CMV-specific CD4C and CD8C T-cell lines for adoptive transfer into recipients of allogeneic stem cell transplants. **Blood** 2004; 103: 3565–3572.
110. REUSSER P, RIDDELL SR, MEYERS JD & GREENBERG PD. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. **Blood** 1991; 78: 1373–1380.
111. RICKINSON AB & MOSS DJ. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein–Barr virus infection. **Ann Rev Immunol** 1997; 15: 405–431.
112. RIDDELL SR, WATANABE KS, GOODRICH JM et al. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. **Science** 1992; 257: 238.
113. RINGDÉN O & LE BLANC K. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: state of the art and new perspectives. **APMIS** 2005; 113:813-30.
114. RINGDEN O, SCHAFFER M, LE BLANC K, PERSSON U et al. Which donor should be chosen for hematopoietic stem cell transplantation among unrelated HLA-A, -B and -DRb1 genomically identical volunteers? **Biol Blood Marrow Transplant** 2004; 10:128-34.
115. ROONEY CM, LOFTIN SK, HOLLADAY MS et al. Early identification of Epstein–Barr virus associated posttransplant lymphoproliferative disorders. **Br J Haematol** 1995; 89: 98–103.
116. ROONEY CM, SMITH CA, NG CY et al. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein–Barr-virus-related lymphoproliferation. **Lancet** 1995; 345: 9–12.
117. ROONEY CM, SMITH CA, NG CYC et al. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein–Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. **Blood** 1998; 92: 1549–1555.

118. ROSSI G, GIORGIANI G, COMOLI P et al. Successful T-cell-depleted, related haploidentical peripheral blood stem cell transplantation in a patient with Fanconi anaemia using a fludarabine-based preparative regimen without radiation. **Bone Marrow Transplant** 2003; 31: 437–440.
119. ROSSIG C & BRENNER MK. Genetic modification of T lymphocytes for adoptive immunotherapy. **Mol Therapy** 2004; 10(1):5-18.
120. RUFER N, ZIPPELIUS A, BATARD M, PITTET IK E et al. Ex vivo characterization of human CD8<sup>+</sup> T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. **Blood** 2003; 102:1779-1787.
121. RUGGERI L, CAPANNI M, URBANI E et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched haematopoietic transplants. **Science** 2002; 295: 2097–2100.
122. SABLE CA e DONOWITZ GR. Infections in bone marrow transplant recipients. **Clin Infect Dis** 1994; 18: 273–281.
123. SALLUSTO F, GEGINAT J, LANZAVECCHIA A. Central memory and effector memory T cell subsets: functions, generation, and maintenance. **Annu Rev Immunol** 2004; 22:745-63.
124. SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and down regulated by tumor necrosis factor alpha. **J Exp Med** 1994; 179:1109-1118.
125. SALLUSTO F, LENIG D, FÖRSTER R, LIPP M, LANZAVECCHIA A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature** 1999; 401:708-712.
126. SCHLUNS K, WILLIAMS K, MA A, ZHENG XX, LEFRANÇOIS L. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. **J Immunol** 2002; 168:4827-4831.

127. SCHULUNS KS & LEFRANCOIS L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. **Nat Rev Immunol** 2003; 3:269-279.
128. SOUBANI AO e QURESHI MA. Invasive pulmonary aspergillosis following bone marrow transplantation: risk factors and diagnostic aspect. **Cancer** 2003; 98: 292–299.
129. SPEISER DE & ROMERO P. Toward improved immunocompetence of adoptively transferred CD8+ T cells. **J Clin Invest** 2005; 115:1467-1469.
130. SULLIVAN KM, STORB R, BUCKNER CD et al. Graft-versus-host disease as adoptive immunotherapy in patients with advanced hematologic neoplasms. **N Engl J Med** 1989; 320: 828-834.
131. THOMAS ED, BUCKNER CD, BANAJI M et al. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and marrow transplantation. **Blood** 1977; 49: 551-33.
132. THOMAS ED, LOCHTE HL JR, CANNON JH, SAHLER OD, FERREBEE JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. **J Clin Invest** 1959; 38: 1709-16.
133. THOMAS ED, LOCHTE HL JR, LU WC, FERREBEE JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. **N Engl J Med** 1957; 257: 491-6.
134. THOMAS L. On immunosurveillance in human cancer. **Yale J Biol Med** 1982; 55: 329-333.
135. van ESSER JWJ, NIESTERS HGM, van DER HOLT B et al. Prevention of Epstein–Barr virus-lymphoproliferative disease by molecular monitoring and preemptive rituximab in high-risk patients after allogeneic stem cell transplantation. **Blood** 2002; 99: 4364–4369.

136. van RHEE F, LIN F, CULLIS O, et al. Relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantat: the case for giving donor leukocyte transfusion bifore the onset of hematological relapse. **Blood** 1994; 83: 3377-3383
137. VITIELLO A, ISHIOKA G, GREY HM ET AL. Development of a lipopeptide-based therapeutic vaccine to treat chronic HBV infection, I: Induction of primary cytotoxic t lymphocyte response in humans. **J Clin Invest** 1995; 95: 341-349.
138. VOURKA-KARUSSIS U, ACKERSTEIN A, PUGATSCH T, SLAVIN S. Allogeneic cell-mediated immunotherapy for eradication of minimal residual disease: Comparison of T-cell and Il-2 activated killer (LAK) cell-mediated adoptive immunotherapy in murine models. **Exp Hematol** 1999; 27: 461-469.
139. WALTER EA, GREENBERG PJ, GILBERT MJ et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. **N Engl J Med** 1995; 333: 1038–1044.
140. WEIDEN PL, FLOURNOY N, THOMAS ED et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. **N Eng J Med** 1979; 300: 1068-1073.
141. WEIDEN PL, SULLIVAN KM, FLOURNOY N et al. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease. Contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. **N Eng J Med** 1981; 304: 1529-1533.
142. WELNIAK LA, BLAZAR BR, ANVER MA, WILTROUT RH, MURPHY WJ. Opposing roles of interferon- $\gamma$  on CD4+ T cell-mediated graft-versus-host disease: effects of conditioning. **Biol Blood Marrow Transpl** 2000; 6: 604-612.
143. WENG NP, LIU K, CATALFAMO M, LI Y, HENKART PA. IL-15 is a growth factor and an activator of CD8 memory T cells. **Ann NY Acad Sci** 2002; 975: 46-56.
144. WENINGER W, CROWLEY MA, MANJUNATH N, VON ADRIAN UH. Migratory properties of naïve, effector, and memory CD8+ T cells. **J Exp Med** 2001; 194: 953-966.

145. WHERRY EJ, TEICHHGRABER V, BECKER TC, MASOPUST D, KAECH M, ANTIA R, VON ADRIAN UH, AHMED R. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. **Nat Immunol** 2003; 4: 225-234.
146. YEE C, THOMPSON JA, BYRD D et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells clones for the treatment of patients with metastatic melanoma in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 2002; 99: 16168-73.
147. ZECCA M e LOCATELLI F. Management of graft-versus-host disease in paediatric bone marrow transplant recipients. **Pediatr Drugs** 2000; 2: 29–55.
148. ZECCA M, PRETE A, RONDELLI R et al. Chronic graft-versus-host disease in children: incidence, risk factors, and impact on outcome. **Blood** 2002; 100: 1192–1200.



## 5. ARTIGO DE REVISÃO

### NOVAS ESTRATÉGIAS DE IMUNOTERAPIA CELULAR ADOTIVA EM PACIENTES PEDIÁTRICOS SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS.

*Innovative approaches of adoptive immune cell therapy in paediatric recipients of haematopoietic stem cell transplantation*

Liane Daudt, Patrizia Comoli, Daniela Montagna, Rita Maccario, Roberto Giugliani e Franco Locatelli

#### 5.1. RESUMO

A imunoterapia celular adotiva representa uma das mais promissoras áreas de investigação em transplante de células progenitoras hematopoiéticas (alo-TCTH). Estudos preliminares indicam que a imunoterapia celular pode restabelecer a imunocompetência de pacientes submetidos a alo-TCTH contra vários patógenos no período imediato após o transplante. Estas estratégias podem ser de fundamental importância nos pacientes submetidos ao alo-TCTH com depleção de linfócitos T, procedimento que vem sendo realizado com mais frequência nos últimos anos. Alguns estudos preliminares, recentemente, demonstraram que a prevenção e o tratamento da doença linfoproliferativa relacionada à infecção por Epstein-Baar, citomegalovirose e aspergilose invasiva podem ser obtidos através da infusão de linhagens ou de células T específicas contra estes patógenos. Muitos esforços também estão sendo direcionados para a determinação de estratégias capazes de selecionar e intensificar uma resposta específica do enxerto versus leucemia (EvL). A este respeito, estratégias de geração e expansão *ex vivo* de linhagens celulares ou clones, específicos ou dirigidos contra a leucemia, vêm sendo desenvolvidas e aperfeiçoadas nos últimos anos.

### 5.1.1 Abstract

Adoptive immune cell therapy represents one of the most promising fields of investigation in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT). Preliminary studies indicate that adoptive immune cell therapy can be used to restore the immunocompetence of alloHSCT recipients towards widespread pathogens in the early post-transplant period. These strategies can be of fundamental importance in patients given a T-cell-depleted allograft, a type of transplant that has been performed increasingly over the last few years. A few seminal studies have recently documented that prevention and treatment of Epstein–Barr-virus-related lymphoproliferative disorders, human cytomegalovirus disease and invasive aspergillosis can be obtained through infusion of pathogen-specific T-cell lines or clones. Several efforts are also being directed towards the identification of strategies capable of selecting and strengthening specific graft-vs-leukaemia responses. In this regard, strategies of ex-vivo generation and expansion of clones or cell lines, specifically or preferentially leukaemia reactive, have been developed and enhanced in the last years.

## 5.2. PALAVRAS-CHAVE

Terapia celular adaptativa; transplante de células progenitoras hematopoiéticas; doença linfoproliferativa EBV relacionada; citomegalovirose; aspergilose invasiva; leucemia recaída; infusão de linfócitos do doador; doença residual mínima.

### 5.2.1. Key words

Adoptive cell therapy; allogeneic haematopoietic stem cell transplantation; EBV-related lymphoproliferative disorders; HCMV infection; invasive aspergillosis; leukaemia relapse; DLI; minimal residual disease.

### 5.3. INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, o transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas (alo-TCTH) vem sendo cada vez mais utilizado para o tratamento de crianças portadoras de algumas doenças hematológicas e congênicas e é uma potente arma para a cura destes pacientes (LOCATELLI e BURGIO, 1998). Apesar de obter sucesso em muitos casos, o alo-TCTH ainda apresenta uma considerável possibilidade de falha, principalmente relacionada a complicações imunológicas (a citar a doença enxerto contra hospedeiro, DECH) (ZECCA et al., 2000; ZECCA et al., 2002), recaída da neoplasia (BARRETT e MALKOVSKA, 1996), ou ao profundo estado de imunodeficiência que caracteriza os pacientes transplantados e que favorece a ocorrência de infecções fatais (PARKMAN e WEINBERG, 1997; GREENBERG e RIDELL, 1999). Em particular, as infecções fatais, tanto virais como fúngicas, ocorrem com mais frequência em pacientes que recebem o transplante com depleção de células T, já que estes não se beneficiam da contribuição das células de memória T da imunidade adaptativa transferidas com o enxerto (AVERSA et al., 1998; SABLE e DONOWITZ, 1994). O uso da imunoterapia celular para prevenir e tratar complicações relacionadas ao herpes-virus é particularmente atrativa, pois o defeito primário que contribui para a progressão da doença parece ser a incapacidade de montar uma resposta adequada da célula T antiviral específica. Da mesma forma, a ausência da reação enxerto contra leucemia (RECL) mediada pela célula T rende aos receptores de transplantes T-depletados maior susceptibilidade à recaída leucêmica (HOROWITZ et al., 1990). Todavia, a RECL mediada pelas células *Natural Killer* (NK) pode, ao menos parcialmente, compensar a falta da aloreatividade específica quando for utilizado um doador familiar com aloreatividade das células NK decorrente de incompatibilidade do Sistema Antígeno Leucocitário Comum (*Human Leukocyte Antigen* – HLA) (RUGGERI et al., 2002; FARAG et al., 2002; GIEBEL et al., 2003; KOLB et al., 2004).

Existem vários procedimentos que podem ser considerados para prevenir a recaída de leucemias e para acelerar a reconstituição imune específicas contra determinados patógenos em pacientes submetidos ao alo-TCTH. A geração *in vitro* de células T dirigidas e com especificidade tanto contra células leucêmicas como contra alguns patógenos comuns, seguido da infusão *in vivo* destas linhagens celulares ou clones destas obtidos, representa um dos mais fascinantes procedimentos para melhorar os resultados do alo-TCTH.

Baseados nestas considerações, nós discutiremos, de forma genérica, como a terapia celular adotiva pode ser uma importante arma para restabelecer a imunocompetência antiviral e antifúngica, e como podemos explorar ou aumentar o ataque das células imunes do doador contra os alvos tumorais e, assim, eliminar células tumorais residuais que escapam à ação da quimio e radioterapia.

#### 5.4. IMUNOTERAPIA ADOTIVA PARA RESTABELEECER A VIGILÂNCIA IMUNE CONTRA AGENTES INFECCIOSOS ESPECÍFICOS APÓS O alo-TCTH.

##### 5.4.1. Imunoterapia Adotiva Contra Citomegalovírus Humano

Os primeiros estudos em humanos, para avaliar a eficácia da reconstituição da imunidade específica através da transferência de clones de células T, foram realizados em receptores de alo-TCTH com alto risco de desenvolver a infecção ou a doença provocada pelo vírus citomegalovírus humano (CMV) (RIDELL et al., 1992; WALTER et al., 1995). Em pacientes imunossuprimidos, a reativação do CMV latente é freqüente e, apesar da disponibilidade de testes para o diagnóstico precoce (GERNA et al., 2001) e da terapia farmacológica preventiva (GERNA et al., 2003; LOCATELLI et al., 1994), é uma doença grave e potencialmente letal quando evolui para pneumonia intersticial (LJUNGMAN et al., 1992). A imunidade do hospedeiro é responsável por limitar a infecção primária e controlar o estado de portador do vírus no indivíduo

normal, de tal modo que a capacidade de recuperação da infecção grave pelo CMV, nos pacientes submetidos ao alo-TCTH, é diretamente correlacionada com a habilidade do receptor em gerar células citotóxicas CD8+ específicas contra o vírus restritas aos antígenos HLA de classe I (REUSSER et al., 1991; LI et al., 1994). Desta forma, estes pacientes oferecem ótima oportunidade para provar a eficácia da infusão de células T antivirais específicas em restabelecer a resposta imune protetora.

No início dos anos 90, o grupo de Seattle documentou a possibilidade da geração de clones *ex vivo* de células T CD8+ específicas anti-CMV originárias do doador para ser infundidas em receptores de alo-TCTH (RIDELL et al., 1992; WALTER et al., 1995). Estas células, geradas através de uma estratégia de expansão altamente complexa e sofisticada, baseada no uso de fibroblastos obtidos da pele dos doadores, irradiados e infectados com uma cepa do CMV, provaram ser eficientes na profilaxia da reativação viral. Além do mais, a estratégia de clonagem permite a seleção de células T com redução da capacidade alorreativa, e assim evita o surgimento subsequente de DECH. Estes clones, direcionados contra epítomos da estrutura protéica viral como a pp65 ou pp150, restabeleceram a citotoxicidade específica anti-CMV e este efeito permaneceu por várias semanas. Entretanto, depois deste período, só permaneceram em alto nível na circulação sanguínea dos pacientes que apresentaram recuperação endógena de células CD4+ específicas antiviral (WALTER et al., 1995). Nos pacientes que não apresentaram a recuperação espontânea de linfócitos CD4+ específicos anti-CMV, as células T citotóxicas CD8+ transferidas declinaram progressivamente com o tempo e, em alguns pacientes, desapareceram. Esta observação documentou o papel fundamental exercido pelos linfócitos CD4+ em promover e sustentar a recuperação imunológica antígeno-específico, e gerou a hipótese de que o uso de linhagens celulares policlonais, contendo tanto células CD4+ como CD8+, quando possível, devem ser preferidas à infusão de clones unicamente CD8+.

A estratégia para a geração *ex vivo* de linhagens celulares T específicas contra o CMV foi desenvolvida por Einsele et al que explorou a aplicação terapêutica destas linhagens antivirais em pacientes que não apresentavam resposta celular T anti-CMV específica e sofriam da infecção viral persistente ou recorrente apesar da terapia quimioterápica antiviral (EINSELE et al., 1994). Estas células T foram preparadas a partir de repetidas estimulações com o antígeno do CMV de forma a aumentar a porcentagem de células T específicas e eliminar a aloreatividade, mesmo em pacientes transplantados com doadores com disparidade em um a três antígenos HLA. Resultados encorajadores foram relatados após a transferência de  $10^7$  células T/m<sup>2</sup> em oito pacientes com uma média de 120 dias (79-479 dias) após o transplante (EINSELE et al., 1994).

Posteriormente, o mesmo grupo descreveu uma nova estratégia para a geração de células T CMV-específicas visando reduzir a complexidade da técnica, bem como dos custos e do tempo necessário para a produção no laboratório. Esta nova estratégia foi desenvolvida usando componentes celulares e séricos autólogos derivados de uma única retirada de 500 mL de sangue, estimulados simultaneamente com peptídeos específicos do CMV restritos ao complexo HLA de classe I e antígenos do CMV (RAUSER et al., 2004). As células T ativadas foram isoladas com ensaios da secreção de interferon-gama (INF-g) e expandidas por 10 dias. Assim, comparativamente, houve uma redução da aloreatividade mediada pelas células T CD4+ e CD8+ na população de células T específicas anti-CMV geradas em relação à população inicial (RAUSER et al., 2004).

Apesar da imunoterapia adotiva, usando clones específicos anti-CMV ou LTC (Linfócitos T Citotóxicos), provou ser factível e segura como estratégia para restabelecer a imunidade celular T deficiente em pacientes após TCTH, até o momento, é a terapia preventiva da infecção por CMV, baseada no monitoramento da antigenemia, determinação quantitativa do DNA ou do RNA mensageiro do CMV, que significativamente reduziu o número de pacientes que

desenvolveram a doença por CMV (GERNA et al., 2001; GERNA et al., 2003; LOCATELLI et al., 1994). Desta forma, o papel da imunoterapia adotiva para esta infecção vem sendo menos considerado, apesar de que algumas categorias selecionadas de pacientes, por exemplo, aqueles que receberam enxertos com depleção de células T de doadores parcialmente HLA compatíveis e que apresentam imunodeficiência celular profunda, talvez se beneficiem deste procedimento. Além disso, devido ao longo tempo de tratamento, alguns pacientes podem desenvolver resistência aos agentes antivirais. A este respeito, o grupo de Perugia descreveu recentemente a possibilidade de gerar clones de células CD4+ específicas anti-CMV de doadores que apresentam disparidade HLA com o receptor (PERRUCCIO et al., 2003). Neste estudo clínico de fase I-II foram selecionados clones não alorreativos contra alvos do receptor, gerados *in vitro* a partir de doadores familiares parcialmente compatíveis com privação de interleucina-2 (IL-2). No total, 21 pacientes receberam  $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$  clones de células T, que prontamente restabeleceram a imunidade específica contra o patógeno prevenindo a ocorrência de mortalidade relacionada ao CMV (PERRUCCIO et al., 2003). Se confirmados em uma grande coorte de pacientes, estes resultados podem estabelecer uma nova, segura e efetiva forma de remontar a imunidade contra patógenos além da barreira do HLA.

#### 5.4.2. Imunoterapia Adotiva Contra o Vírus Epstein-Baar

A doença linfoproliferativa associada ao vírus Epstein-Baar (DLP-EBV) é uma complicação grave tanto do alo-TCTH, quanto dos transplantes de órgão sólidos (NALESNIK, 1996; O'REILLY et al., 1997). Nos pacientes submetidos ao alo-TCTH os principais fatores de risco para o surgimento de DLP-EBV são a depleção T, que elimina os linfócitos B, assim como o uso de doadores familiares parcialmente compatíveis e doadores não relacionados (HESLOP e ROONEY, 1997; O'REILLY et al., 1997). Esta doença usualmente se apresenta nos primeiros 4-

6 meses após o transplante como linfoma difuso de grandes células B de alto grau, oligoclonal ou monoclonal que expressa os antígenos EBV originários do doador. Tanto altos níveis de EBV-DNA na corrente sanguínea, como o crescimento espontâneo *in vitro* de linhagens celulares linfoblastóides do EBV são preditivos do desenvolvimento da DLP (ROONEY et al., 1995).

A infecção pelo EBV induz a resposta primária e de memória dos LTC CD8+, e indivíduos normais EBV-soropositivos têm alta frequência de precursores de LTC vírus específicos circulantes que controlam a proliferação das células B infectadas pelo EBV (RICKINSON e MOSS, 1997).

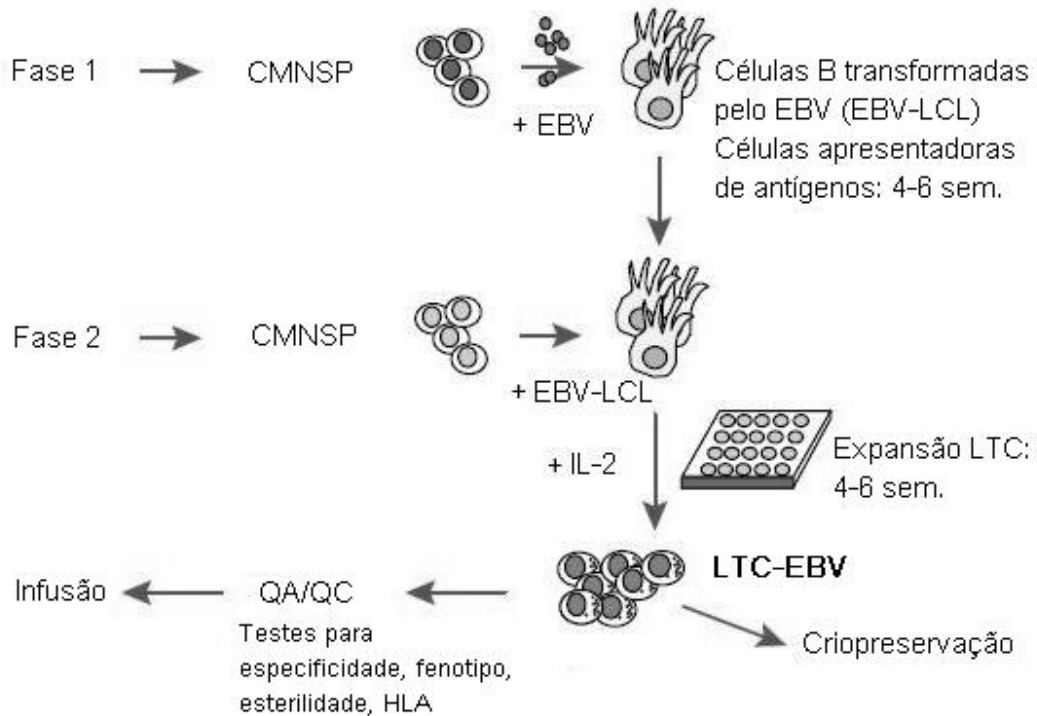
Uma vez que a DLP-EBV se origina da deficiência de LTC específicos contra o vírus dos pacientes imunodeficientes, é razoável imaginar que a imunoterapia adotiva com linfócitos T derivados do doador pode prevenir a linfoproliferação, ou eliminar a doença já estabelecida, após alo-TCTH.

A primeira tentativa de imunoterapia adotiva contra o EBV em humanos foi realizada através da infusão de leucócitos do doador não selecionados (PAPADOPOULOS et al., 1994). Apesar de obter a remissão da DLP-EBV, em alguns casos, este tratamento expôs os pacientes a grande risco de desenvolver DECH clinicamente relevante, assim, se tornando impeditivo para receptores de alo-TCTH de doadores parcialmente compatíveis.

Uma estratégia mais sofisticada e segura para o tratamento da DLP-EBV envolve a geração *in vitro* e a infusão de linhagens de LTC específicos anti-EBV que contenham tanto linfócitos T CD8+, quanto CD4+ capazes de restabelecer a memória imunológica específica antiviral a longo prazo, e assim, prevenir a ocorrência da DLP em pacientes considerados de alto risco (receptores de alo-TCTH com depleção T de doadores parcialmente compatíveis) (ROONEY et al., 1995; HESLOP et al., 1996; ROONEY et al., 1998). Estes LTC policlonais EBV específicos são preparados através de repetidas estimulações *ex vivo* dos linfócitos T com



linhagem linfoblastóides de células B transformadas pelo EBV. Este processo dura em média 7 a 10 semanas até obter uma quantidade adequada de LTC específicos anti-EBV. (Figura 1)



**Figura 1. Diagrama do método empregado para reativar LTC específicos anti-EBV.** Primeiro, é gerado *in vitro* a linhagem linfoblastóide de células B transformadas pelo EBV (EBV-LCL) a partir das células mononucleares do sangue periférico (CMNSP) infectadas pelo vírus no sobrenadante do meio de cultura. Segundo, os LTC-EBV são reativados através de repetidas estimulações dos linfócitos T circulantes com as linhagens EBV-LCL na presença de IL-2 exógena. Após realizar testes de qualidade (QA/QC), os LTC são congelados para posterior uso. (Comoli et al. Blood 2002; 99:437)

Estudos realizados com marcadores genéticos mostram a persistência destas células T específicas anti-EBV originárias do doador no sangue periférico dos pacientes anos após a infusão e a sua reexpansão durante episódios de reativação viral; este achado enfatiza a importância da célula T auxiliar para manter a atividade das células CD8+ transferidas.

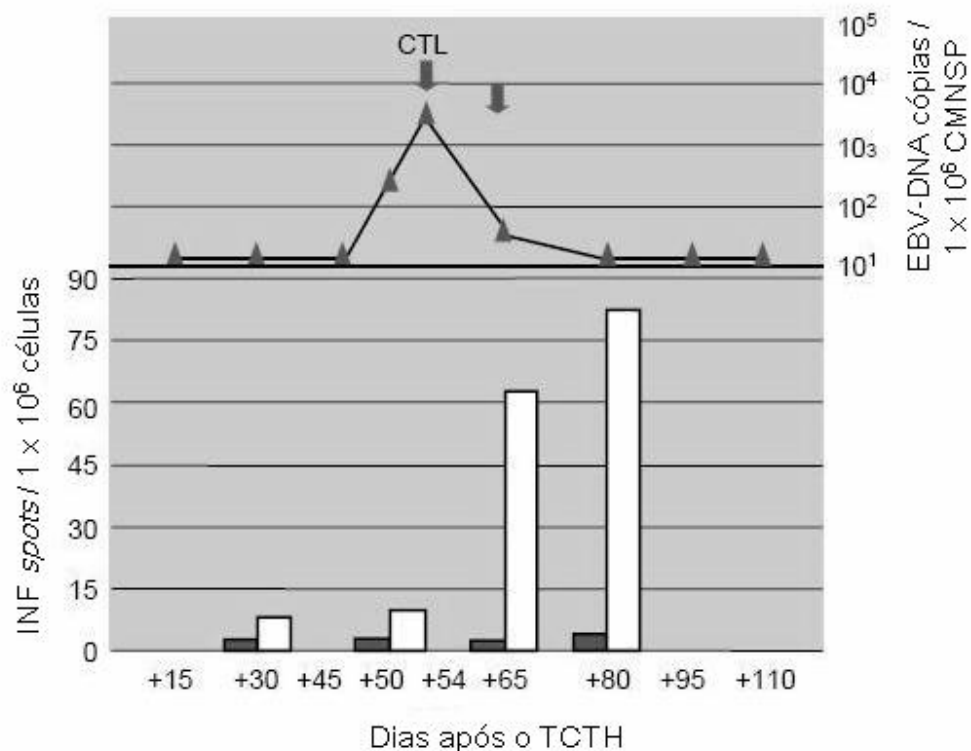
A infusão destas células T policlonais mostrou ser segura e efetiva em prevenir a DLP-EBV, como documentado em um estudo mais recente onde nenhum dos 39 pacientes que

receberam alo-TCTH T-depletado e LTC anti-EBV desenvolveram doença linfoproliferativa comparados com 7 de 61 transplantados que não receberam este tratamento preventivo (ROONEY et al., 1998). Além disto, a imunoterapia adotiva tem demonstrado exercer um papel fundamental no tratamento da doença estabelecida (ROONEY et al., 1995), entretanto deve ser mencionado que o uso dos LTC anti-EBV para o tratamento do linfoma monoclonal é menos efetivo que o seu uso como profilaxia.

O grupo de Pavia também documentou a possibilidade, segurança e eficácia da geração *in vitro* (figura 2) de LTC anti-EBV no contexto do TCTH alogênico, mesmo quando existe disparidade HLA entre o doador e o receptor (ROSSI et al., 2003), e desenvolveu um programa para a expansão *ex vivo* e infusão de linhagens celulares citotóxicas específicas anti-EBV autólogas, originárias do sangue periférico de receptores de transplante de órgãos sólidos (em tratamento imunossupressivo para a prevenção da rejeição do enxerto) que apresentavam aumento dos níveis de DNA-EBV após o transplante (COMOLI et al., 2002). Estes LTC autólogos expandidos *ex vivo* partindo dos mononucleares periféricos obtidos no momento da reativação viral, são capazes de aumentar a resposta imune específica contra o vírus mantendo a capacidade citotóxica *in vivo* (demonstrado pelo imediato desaparecimento da carga viral e regressão da DLP) sem aumentar a probabilidade de rejeição ao enxerto (COMOLI et al., 2002). Esta estratégia indica, conseqüentemente, ser segura e eficiente podendo ser empregada como profilaxia da DLP relacionada à infecção pelo EBV em receptores de órgãos sólidos, seguidos da estratégia de terapia preventiva guiada pelos níveis de DNA-EBV.

Recentemente, foi proposto para a prevenção e tratamento da DLP-EBV dos pacientes transplantados o uso do anticorpo monoclonal antiCD20 (KUEHMLE et al., 2000; VAN ESSER et al., 2002). Apesar de este anticorpo monoclonal ser seguro e efetivo, o uso repetitivo pode selecionar uma população de células B transformadas pelo EBV CD20 negativas, rendendo o seu

uso ineficaz (DAVIS et al., 1999). Entretanto, está ainda incerto se a ausência de células B infectadas pelo EBV poderia retardar a recuperação específica antiviral e, desta forma, favorecer o surgimento do linfoma no período após o transplante tardio. Em vista destas considerações, é razoável imaginar que tanto o anticorpo monoclonal antiCD20 quanto os LTC anti-EBV podem ser necessários para obter os melhores resultados.



**Figura 2. Efeito da Infusão de LTC anti-EBV na carga viral e a freqüência de linfócitos circulantes específicos contra o vírus em receptores de TCTH com infecção ativa pelo EBV.** Após a infusão dos LTC anti-EBV (CTL) a carga viral, mensurada como o numero de copias do genoma/ $10^5$  nos mononucleares do sangue periférico (CMNSP), diminui como consequência do aumento do número de células secretoras de INF-alfa específicas anti-EBV, medidas pela técnica de ELISPOT. (Comoli et al. Blood 2002; 99:437)

Avanços futuros no entendimento nos mecanismos relacionados à ativação, alvo e função das populações envolvidas na resposta imunológica contra o EBV, e na aquisição de excelência na manipulação celular podem melhorar os resultados da imunoterapia celular adotiva antiviral.

Em particular, o uso de células apresentadoras de antígenos (CAA) periféricas pulsadas com peptídeos do EBV com relevante atividade imunogênica poderá reduzir o tempo necessário para preparar os LTC antivirais e permitir sua aplicação no tratamento de outras neoplasias associadas ao EBV, como sugerido em estudos recentes no tratamento da Doença de Hodgkin e do carcinoma nasofaríngeo (GOTTSCHALK et al., 2003; COMOLI et al., 2004).

#### 5.4.3. Imunoterapia Adotiva contra *Aspergillus sp*

A aspergilose invasiva (AI) segue como a principal causa de mortalidade e morbidez nos receptores de TCTH (LATGE, 1999; GROW et al., 2002). Apesar da disponibilidade de novos agentes antifúngicos com utilização imediata e agressiva, casos comprovados de AI são difíceis de tratar, tendo a taxa de mortalidade na ordem de 80 a 90% (SOUBANI e QURESHI, 2003). A incidência anual desta infecção vem mudando, muito devido ao tipo de transplante realizado. Um estudo recentemente publicado estabeleceu a incidência de 7,3% em pacientes que receberam enxerto de doador HLA compatível e de 10,5% em transplantes realizados, tanto com doador familiar parcialmente compatível, como com doadores voluntários não familiares (MARR et al., 2002). A maioria dos casos de AI é diagnosticada entre os 40 a 180 dias após o TCTH, 30% das infecções são diagnosticadas precocemente (ou seja, dentro dos primeiros 40 dias após o transplante), e apenas 17% são diagnosticadas no período tardio, após 6 meses do procedimento (MARR et al., 2002). O risco de desenvolver AI também é influenciado por muitos outros fatores de risco como DECH, corticoterapia, infecção por CMV ou vírus respiratórios após o transplante, idade e neutropenia prolongada (MARR et al., 2002).

Nos receptores de alo-TCTH de doadores parcialmente compatíveis e com depleção de células T a probabilidade de desenvolver AI é maior se a imunidade específica com células T anti-aspergillus não é completa até os 9-12 meses após o transplante. Nestes pacientes, a

transferência de clones de células T CD4+ anti-aspergillus derivadas do doador podem conferir proteção contra o desenvolvimento de complicações fatais. A este respeito, o grupo de Perugia recentemente relatou os resultados preliminares para a prevenção de AI em pacientes que receberam enxerto com depleção de células T de doadores familiares com disparidades HLA usando a infusão de clones específicos CD4+ (PERRUCCIO et al., 2003). A produção destes clones CD4+ específicos contra o Aspergillus foi feita usando células apresentadoras de antígenos provenientes do sangue periférico do doador estimuladas com antígenos fúngicos em meio não contendo IL-2. Os clones de células T do doador com aloreatividade foram descartados, apenas os clones não aloreativos foram infundidos nos pacientes. Um número limitado de clones específicos anti-aspergillus foram infundidos ( $1 \times 10^5$  -  $10^6$  células/kg) em 10 pacientes nas primeiras 4 semanas do transplante para evitar o risco de DECH. Apesar deste número relativamente baixo de células infundidas, houve redução da mortalidade por AI. É importantes notar que os clones de células T CD4+ expressam, predominantemente, um fenótipo tipo Th1 com diminuição da secreção de IL-10 e aumento da secreção de INF-gama. Estes achados são de particular importância, já que alguns estudos em modelos animais demonstraram maior imunidade associada às citocinas da resposta tipo Th1 como o INF-gama, enquanto que citocinas relacionadas à resposta Th2 como a IL-4 e IL-10 estariam associadas à progressão da doença (CENCI et al., 1997; CENCI et al., 1998).

#### 5.5. IMUNOTERAPIA ADOTIVA PARA A PREVENÇÃO E TRATAMENTO DA RECORRÊNCIA DE LEUCEMIA

Existem muitas evidências que indicam que as células T e NK do doador apresentam atividade imunológica antileucemia e que este efeito contribui para a erradicação definitiva das células malignas após o alo-TCTH (HOROWITZ et al., 1990; BARRETT e MALKOVSKA,

1996; RUGGERI et al., 2002; FARAG et al., 2002; GIEBEL et al., 2003; KOLB et al., 2004). De fato, pacientes que receberam o alo-TCTH de irmão gêmeo idêntico, assim como aqueles que receberam enxerto com redução de células T, apresentam um risco maior de recaída da leucemia se comparados com pacientes transplantados sem manipulação do enxerto, e, principalmente, se comparados com aqueles que desenvolveram DECH aguda ou crônica (HOROWITZ et al., 1990; BARRETT e MALKOVSKA, 1996; KOLB et al., 2004). Contudo, a melhor evidência da reação do enxerto contra a leucemia (RECL) é demonstrada pela eficácia da infusão de linfócitos do doador (*donor lymphocytes infusion* - DLI) em tratar a recaída após o TCTH, especialmente em pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC) (KOLB et al., 1995; KOLB et al., 2004). Entretanto, a DLI está associada a complicações muitas vezes graves, como piora da imunossupressão e DECH. Por fim, Montagna et al, demonstraram que precursores de linfócitos T citotóxicos (pLTC) anti-leucemia emergem e persistem no sangue periférico de receptores de alo-TCTH que se mantêm em remissão hematológica (MONTAGNA et al., 1998; MONTAGNA et al., 1999). Em contraste, nos pacientes que apresentam recaída da leucemia após o alo-TCTH, a frequência de pLTC anti-leucemia declina rapidamente a níveis indetectáveis (MONTAGNA et al., 1998; MONTAGNA et al., 1999). Corroboram com estes resultados a forte correlação demonstrada entre o surgimento de LTC anti-leucemia em pacientes com LMC submetidos ao alo-TCTH e a manutenção da resposta citogenética com desaparecimento das células leucêmicas (MOLLIDREM et al., 2000).

Considera-se que a RECL após o alo-TCTH e a DLI seja mediada pelas células NK ou linfócitos T que reconhecem as células leucêmicas pela disparidade nos alelos do HLA (KOLB et al., 1995; MURPHY e LONGO, 1997; FARAG et al., 2002; KOLB et al., 2004). Em particular, quando o paciente e o doador são HLA idênticos, se acredita que os antígenos de histocompatibilidade menores (mHAg – *minor histocompatibility antigen*) são reconhecidos

pelos LTC do doador. Comumente distribuídos, os mHAgs são responsáveis pela RECL associada a DECH, enquanto antígenos específicos contra as células leucêmicas e não direcionados a outros tecidos podem eleger uma resposta RECL mais direcionada (MURPHY e LONGO, 1997; FALKENBURG et al., 1997; KOLB et al., 2004), estando já demonstrado que tanto células CD4+, como LTC CD8+ reconhecem mHAgs na forma clássica HLA restrita, e podem ser gerados *in vitro* (MURPHY e LONGO, 1997; FALKENBURG et al., 1997).

Na medida em que a DECH severa está associada a altas taxas de mortalidade relacionada ao transplante, muitos esforços têm sido direcionados para a identificação de estratégias capazes de selecionar e promover uma resposta anti-leucemia específica, não associada ao desenvolvimento concomitante de DECH. A este respeito, uma das propostas mais intrigantes é a de gerar e expandir clones, ou linhagens celulares, que sejam específicas ou, preferencialmente, reativas a células leucêmicas. Possíveis alvos ideais para o desenvolvimento destas linhagens celulares ou de clones são representados por: (i) mHAgs expressos exclusivamente nas células hematopoiéticas, e, desta forma, nos blastos leucêmicos; (ii) super-expressão de antígenos de diferenciação não-polimórficos, como peptídeos derivados da proteinase 3 nas células mielóides; (iii) peptídeos derivados de genes de fusão na transcrição específicos das células leucêmicas, como o *BCR/ABL* ou *PML/RAR $\alpha$*  (GAMBACORTI-PASSERINI et al., 1993; GOULMY, 1997; CLARK et al., 2001; MOLLDREM et al., 2002; BELLANTUONO et al., 2002; MARIJT et al., 2003).

Como alternativa, uma estratégia muito interessante é usar blastos leucêmicos apoptóticos como fonte para obtenção de antígenos tumorais para gerar e expandir linhagem de células T ou clones anti-leucemia *ex vivo* (FALKENBURG et al., 1999; MONTAGNA et al., 2001; MONTAGNA et al., 2003). A primeira aplicação clínica mostrando a facilidade e eficácia nesta

sofisticada estratégia, foi relatada em 1999 por Falkenburg et al (FALKENBURG et al., 1999), que, através da infusão de LTC anti-leucemia derivados do doador e gerados *in vitro*, proporcionou a remissão hematológica e citogenética completa em um paciente com LMC que havia recaído após a alo-TCTH de seu irmão HLA compatível, e que foi refratário a DLI.

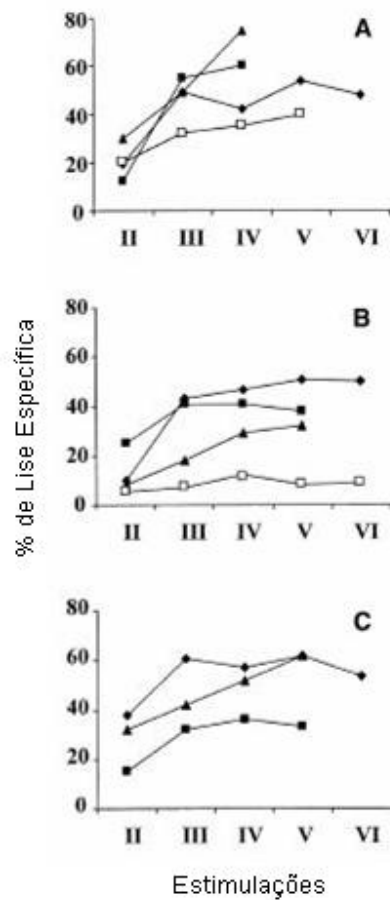
Posteriormente, Montagna et al, demonstraram a viabilidade da geração *ex vivo* a longo termo de linhagens de LTC anti-leucemia derivadas de doadores compatíveis ou parcialmente HLA compatíveis, familiares ou não aparentados, de pacientes portadores de leucemia mielóide aguda (LMA) (MONTAGNA et al., 2001). Estes LTC não mostraram atividade citotóxica contra as células não leucêmicas dos pacientes, assim como não afetaram adversamente o potencial clonogênico das células progenitoras hematopoiéticas do doador. Estas foram obtidas e expandidas usando células dendríticas (*dendritic cells* - DC) como CAA, blastos leucêmicos dos pacientes levados à apoptose como fonte de antígenos tumorais, e linfócitos T CD8+ do doador como efetores. Também foram usadas, para otimizar a fase primária, células CD4+ irradiadas, na função de células de suporte (*feeders cells*), e as interleucinas IL-7 e IL-12, enquanto que a IL-2 fez-se necessária nas fases de expansão das culturas celulares (MONTAGNA et al., 2001).

Os resultados obtidos no contexto da LMA foram posteriormente estendidos e demonstraram que os LTC capazes de reconhecer seletivamente os blastos leucêmicos, igualmente podem ser obtidos em pacientes portadores de leucemia linfocítica aguda (LLA) ou síndrome mielodisplásica (SMD), usando tanto doadores HLA compatíveis ou parcialmente compatíveis (Figura 3) (MONTAGNA et al., 2003). A magnitude da expansão na cultura *in vitro* dos LTC pode ser melhorada consideravelmente por protocolos de restimulação antígeno-independente (YEE et al., 2002), incluindo o uso de células alogênicas como suporte, anticorpo monoclonal antiCD3 e baixas doses de IL-2. Alguns LTC obtidos de doadores HLA parcialmente compatíveis apresentaram atividade citotóxica contra células não malignas do receptor, porém



sempre inferior à atividade de lise observada contra os blastos. Análise através da técnica de espectroscopia das subfamílias V-beta do receptor TCR (*TCR – T cell receptor*) dos linfócitos revela uma expansão preferencialmente oligoclonal da população celular que persiste nas culturas de LTC depois de repetidas estimulações (Figura 4) (MONTAGNA et al., 2003). Estes achados confirmam a hipótese dos LTC anti-leucemia serem direcionados contra vários epítomos antigênicos, assim, clones direcionados a cada família V-beta dos receptores TCR persistem e podem ser expandidos depois de várias estimulações.

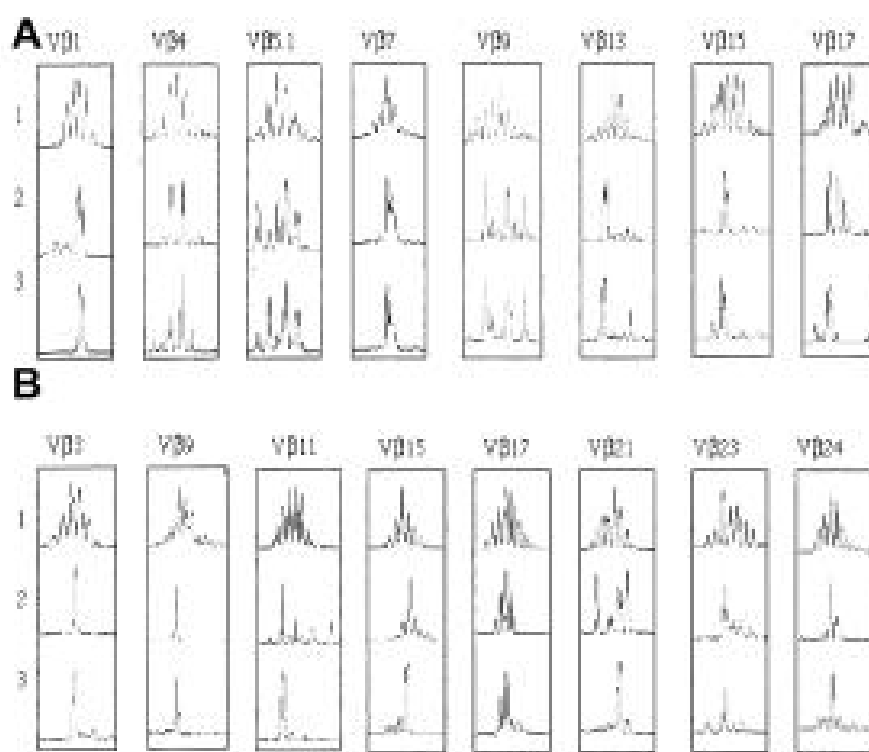
As linhagens de LTC estimuladas com blastos leucêmicos apoptóticos como antígenos tumorais são capazes de reconhecer mais de um único alvo. Apesar dos antígenos reconhecidos por estes LTC não serem definidos, a possibilidade de gerar LTC com múltiplas especificidades pode diminuir o risco de selecionar variantes com potencial de escape, muitas vezes induzido pela baixa imunogenicidade das células leucêmicas *in vivo*. Contudo, a maioria das estratégias de geração *ex vivo* de LTC se baseia no uso de mHAg o que limita a sua aplicação a uma associação bem definida entre o HLA do doador e do receptor, enquanto que a estimulação baseada nos blastos apoptóticos não requer esta especificidade entre doador e receptor. A demonstração da possibilidade de gerar LTC anti-leucemia de doadores com HLA díspares pode contribuir para erradicar a doença residual mínima dos pacientes após o alo-TCTH com depleção de células T. É fato bem demonstrado que pacientes com leucemia submetidos a alo-TCTH com depleção de células T de doadores parcialmente HLA compatíveis, apresentam maior risco de apresentar recaída leucêmica após o transplante, principalmente se não for possível explorar a aloreatividade das células NK (RUGGERI et al., 2002; FARAG et al., 2002).



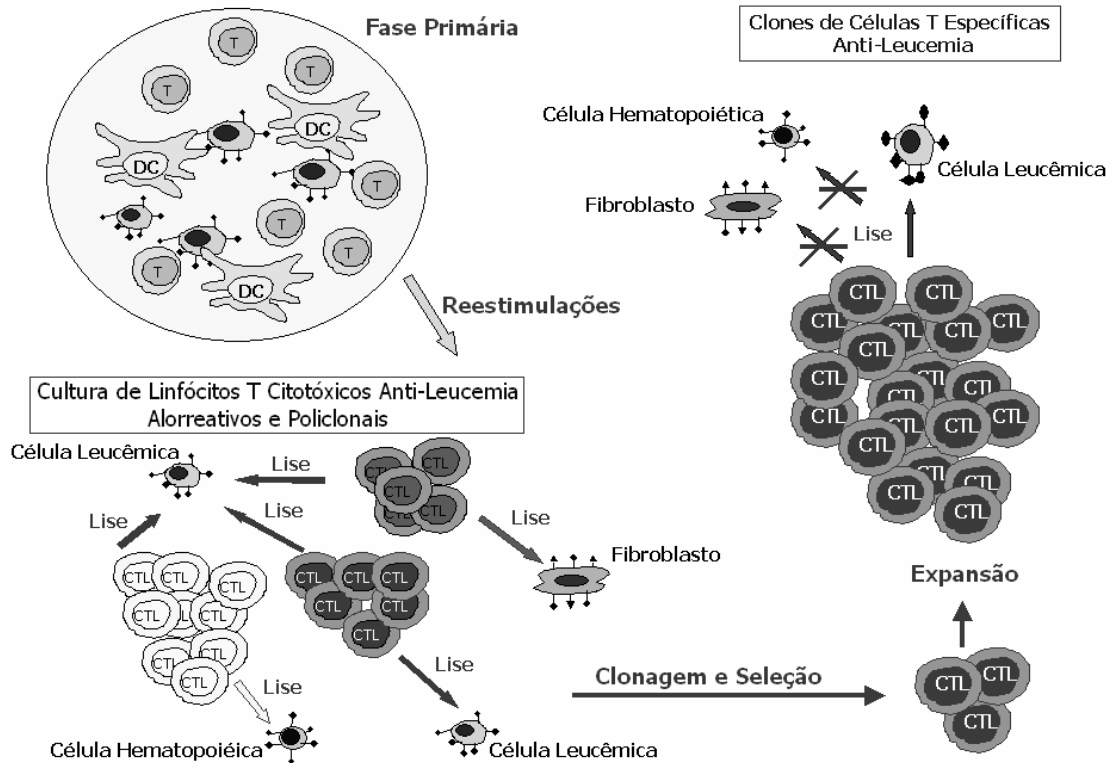
**Figura 3. Atividade citotóxica das linhagens de LTC derivadas das células mononucleares do sangue periférico de doadores de alo-TCTH.** As culturas foram testadas 7 a 10 dias após cada subsequente estimulação contra os blastos leucêmicos dos pacientes. São apresentados os resultados obtidos na relação efetor:alvo de 10:1. Os números de cada estimulação são representados por II, III, IV, V e VI. Os resultados das linhagens de LTC direcionadas contra células alvo da LLA, LMA e SMD são apresentados nos painéis **A**, **B** e **C** respectivamente. (Montagna et al. *Ex Hemaol* 2003; 31:1031)

O principal risco das estratégias de imunoterapia baseadas na transferência após o transplante de LTC anti-leucemia policlonais derivados do doador é de induzir a DECH. Este risco pode ser particularmente relevante quando o doador e o receptor apresentam disparidade no HLA e as linhagens de LTC apresentam níveis detectáveis de atividade citotóxica contra as células não malignas do receptor. Com o objetivo de ultrapassar este problema, deve ser considerada a infusão controlada, com aumento progressivo do número da quantidade de células

infundidas, especialmente nos pacientes com pouca carga tumoral. Alternativamente, está sendo estudada uma estratégia baseada na clonagem das linhagens de LTC. Os resultados destes estudos indicam que clones com especificidade contra os blastos leucêmicos podem ser obtidos, selecionados a partir das culturas de LTC e, expandidos para infusão posterior (Figura 5) (MONTAGNA et al., 2006).



**Figura 4. Padrão da expansão clonal das linhagens de LTC anti-leucemia.** A figura mostra oito padrões representativos de 24 subfamílias do gene TCR-Vbeta das culturas de LTC #8 (A) e #9 (B). O padrão obtido dos mononucleares do sangue periférico dos doadores é apresentado na linha 1. Os padrões referentes as linhagens de LTC anti-leucemia após 3 e 5 estimulações são apresentados nas linhas 2 e 3. (Montagna et al. Ex Hemaol 2003; 31:1031)



**Figura 5. Geração e expansão de clones de células T com citotoxicidade específica contra leucemia.** T, linfócito T; DC, célula dendrítica; CTL, linfócito T citotóxico. (Montagna et al. Cancer Res 2006, 66:7310)

As estratégias de terapia celular que usam células T adotivas para o controle da DLP-EBV demonstram que a eficácia deste procedimento, realizado através da infusão de pequena quantidade de células, depende da capacidade dos linfócitos transferidos de se expandirem *in vivo* em resposta ao estímulo antigênico das células infectadas pelos vírus e, conseqüentemente, de desenvolver uma resposta de memória imunológica (HESLOP et al., 1996; ROONEY et al., 1998). Em contraste às células infectadas por vírus, que notoriamente apresentam vários antígenos imunodominantes, capazes de estimular uma resposta imune forte, os antígenos tumorais podem ser fracos estimulantes para os linfócitos T adotivos usados para a transferência

na imunoterapia celular. Em vista destas considerações, é plausível imaginar que a terapia com células adotivas T anti-leucemia necessita da transferência de uma grande quantidade de células para ser efetiva. A possibilidade de eficientemente produzir uma grande quantidade de LTC anti-leucemia *ex vivo*, enquanto cuidadosamente se seleciona células com reatividade direta contra os blastos leucêmicos através estimulações independente dos antígenos, devem ser valorizadas nas estratégias clínicas da imunoterapia adotiva anti-leucemia.

Apesar das muitas vantagens teóricas da terapia celular baseada na transferência de células imune adotivas, uma série de eventos deve ocorrer para permitir a destruição e controle do crescimento tumoral. As células T transferidas devem manter a ativação ou serem reativadas *in vivo* pelo antígeno tumoral específico; devem proliferar e expandir-se vigorosamente a níveis capazes de causar a destruição tumoral; e, finalmente, as células T antitumorais devem sobreviver o tempo necessário para erradicar definitivamente o tumor (GATTINONI et al., 2005). O refinamento da técnica laboratorial passa pela adequada seleção do antígeno capaz de estimular a atividade citotóxica sem aumentar a aloreatividade, e pela possibilidade de expandir rapidamente estas células mantendo a sua vitalidade. Ao serem transferidas para os pacientes, estas células deveram sobreviver a longo prazo, serem capazes de migrarem para os sítios com envolvimento tumoral e, sobretudo, estabelecer e manter a atividade antitumoral específica a longo prazo (BECKNELL e CALIGIURI, 2003). Entretanto, pouco se conhece sobre a homeostasia destas células *in vivo* e qual seria o melhor momento da diferenciação celular adequado para promover a atividade citotóxica antitumoral específica a longo prazo. Estudos realizados em ratos demonstraram que o uso de LTC estimulados com antígenos tumorais, mas com características fenotípicas menos diferenciadas, parecem ser mais eficientes em controlar a doença ao adquirirem *in vivo* a diferenciação, com conseqüente maior capacidade citotóxica específica (GATTINONI et al., 2005). Assim, o melhor entendimento das qualidades funcionais e

fenotípicas dos linfócitos T in vivo, bem como das células geradas em laboratório, são tópicos importantes a serem explorados no desenvolvimento das técnicas de terapia celular.

## 6. ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

### INTERLEUCINA-15 PROMOVE A EXPANSÃO DE CÉLULAS CD8+ DA MEMÓRIA CENTRAL EM CULTURAS DE LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS HUMANOS ANTI-LEUCEMIA GERADOS *EX VIVO*

#### 6.1. RESUMO

Objetivos: Nos estudos anteriores demonstramos a possibilidade de gerar linhagens de linfócitos T citotóxicos (LTC) derivadas do doador com atividade direta anti-leucemia contra vários tipos de blastos leucêmicos usando tanto doadores HLA compatíveis como parcialmente compatíveis, como fonte de células efectoras. O objetivo do presente estudo foi o de analisar a distribuição dos subtipos de células T de memória em culturas de LTC expandidas na presença de interleucina-2 (rIL-2) e o efeito da rIL-15, usada em substituição a rIL-2, na população de memória, na capacidade das culturas de expandir-se *in vitro* e de manter atividade citotóxica anti-leucemia.

Métodos: Os LTC foram gerados usando as células dendríticas dos doadores como apresentadoras e os blastos apoptóticos dos pacientes como estimuladores em meio contendo rIL-12 e rIL-7 durante a fase primária das culturas, após foram expandidos com duas estimulações com os blastos leucêmicos seguido da expansão independente do antígeno, cultivados em meio com IL-2 ou IL-15.

Resultados: Ambas as culturas, cultivadas com rIL-2 ou rIL-15, apresentaram predominantemente células T CD45RA-/CCR7- com característica de memória efetora ( $T_{ME}$ ). Valores significativamente maiores de células CD8+ da memória central ( $T_{MC}$ ) (CD45RA-/CCR7+) foram observados nas linhagens cultivadas com rIL-15 se comparadas às culturas com

rIL-2 ( $p < 0.05$ ). As linhagens cultivadas com rIL-15 também mostraram maior taxa de proliferação quando comparadas com a rIL-2; a capacidade citotóxica direta contra leucemia foi mantida nas duas culturas.

Conclusões: O uso da rIL-15, em substituição a rIL-2, nas fases de expansão de LTC anti-leucemia aumenta o número de células CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> que, potencialmente, pode apresentar sobrevida a longo prazo e maior capacidade de proliferação e diferenciação *in vivo* na presença de quantidade limitada do antígeno. Além do mais, a rIL-15 aumenta a taxa proliferativa dos LTC sem perda da sua especificidade anti-tumoral.

## 6.2 PALAVRAS-CHAVE

Terapia Celular Anti-Leucemia; Linfócitos T Citotóxicos Anti-Leucemia; Linfócitos T da Memória Celular; Interleucina-15.



### 6.3. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, o transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas (alo-TCTH) vem sendo usado com sucesso como tratamento de muitas doenças hematológicas pediátricas. Apesar das altas taxas de sobrevida livre de doença alcançadas com este procedimento, uma parte dos pacientes pediátricos com leucemia aguda pode apresentar recaída da doença após o alo-TCTH (LOCATELLI & BURGIO, 1998). A prevenção ou tratamento da recaída leucêmica após o alo-TCTH através da manipulação da resposta imune do receptor vem sendo uma estratégia efetiva em alguns casos. Particularmente, o sucesso da imunoterapia adotiva com a infusão de linfócitos do doador (DLI – *donor lymphocyte infusion*) nos pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC) recaída após o transplante é uma das melhores demonstrações da reação enxerto contra leucemia na cura dos pacientes (KOLB et al., 1990; KOLB et al., 1995). Entretanto a DLI frequentemente está associada ao surgimento de doença enxerto contra o hospedeiro (DECH) grave e é menos efetiva na cura de pacientes com leucemias agudas do que nos portadores de LMC (van RHEE et al., 1994; COLLINS et al., 1997). A geração e expansão *ex vivo* de linfócitos CD8+ citotóxicos com atividade direcionada contra as células leucêmicas vem sendo estudada como uma estratégia alternativa para a imunoterapia celular (FALKENBURG et al., 1999; BRENTJENS et al., 2003; COOPER et al., 2001; LOCATELLI et al., 2004; FALKENBURG et al., 2004).

Em estudos anteriores (MONTAGNA et al., 2001; MONTAGNA et al., 2003; MONTAGNA et al., 2006) demonstramos a possibilidade de gerar e expandir *in vitro* um grande número de linhagens de LTC com atividade direta contra células de leucemia agudas e contra células mielodisplásicas usando, tanto doadores HLA (Human Leukocyte Antigen Complex) compatíveis, como doadores familiares parcialmente compatíveis como fonte de células efectoras. Os LTC anti-leucemia foram gerados usando células dendríticas (DC – *Dendritic cells*) do doador

estimuladas com blastos leucêmicos (BL) apoptóticos dos pacientes em culturas com IL-7 e IL-12 durante a fase primária. As culturas foram expandidas através de, pelo menos, duas estimulações específicas contra os LB (leucemia-específica) seguidas da expansão antígeno independente na presença de baixas doses de IL-2. Apesar da viabilidade *ex vivo* a longo prazo destas células e da sua capacidade citotóxica ter sido confirmada mesmo após criopreservação, a capacidade dos LTC de controlar eficientemente o crescimento de células leucêmicas residuais (doença residual mínima) permanece dúbia *in vivo*. Evidências obtidas no âmbito do TCTH, tanto alogênico como autólogo, claramente sugerem que o sucesso da transferência de células da imunidade adaptativa com atividade antitumoral expandidas *ex vivo* depende, não apenas da quantidade de células infundidas (FALKENBURG et al., 1999), mas também da sua capacidade de sobrevida longa, de migrar para os locais de envolvimento tumoral e de manter a resposta imune de memória antitumoral constante (YEE et al., 2002; BECKNELL & CALIGIURI, 2003; DUDLEY et al., 2005).

Recentemente foi descrito que o comportamento cinético dos subtipos de células T da memória é fundamental para a persistência longa da vigilância anti-leucemia, enquanto as células T virgens dividem-se raramente no hospedeiro saudável, as células T da memória apresentam maiores taxas de proliferação e especificidade citotóxica (SALLUSTO et al., 2004). Paralelamente, foi documentado que a IL-15, uma citoquina de 14- a 15-kDa pertencente à família das citoquinas com ligação ao receptor gama comum, aumenta a capacidade de proliferação de células T de memória e produz um efeito anti-apoptótico prolongando a atividade antitumoral (BRENTJENS et al., 2003).

Estes dados estão apoiados nos resultados obtidos em modelos animais que demonstram redução marcada do número de células T CD8+ nos linfonodos e da frequência de células T

antígeno específico (CD44<sup>alto</sup>/CD62L<sup>baixo</sup>) em ratos deficientes de IL-15 ou do receptor alfa da IL-15 (LODOLCE et al., 1998; ALVES et al., 2003).

Com base nestas informações, este estudo analisou a distribuição dos subtipos de células T da memória em culturas de LTC humanos anti-leucemia gerados com o protocolo estabelecido previamente, onde as fases de expansão são realizadas na presença de rIL-2. Em adição, foi analisado o efeito da rIL-15, usada em substituição a rIL-2, na diferenciação e manutenção das células T de memória, na capacidade de proliferação *ex vivo* das linhagens de LTC e na atividade citotóxica anti-leucemia apresentada.

## 6.4. PACIENTES E MÉTODOS

### 6.4.1 Pacientes

Foram incluídos neste estudo 5 pacientes portadores de leucemia mielóide aguda, ou leucemia linfóide aguda, submetidos ao aloTCTH de doador familiar HLA compatível (1 paciente), ou de doador familiar parcialmente compatível (4 pacientes). As células leucêmicas foram obtidas do sangue periférico ou medula óssea destes pacientes no momento do diagnóstico ou da recaída da leucemia, enquanto que as células provenientes dos doadores foram obtidas do sangue periférico. O Comitê de Revisão e Ética do Departamento de Pediatria da Fundação IRCCS Policlinico San Matteo de Pavia, Itália aprovou o protocolo. Os pacientes e doadores foram incluídos no estudo após assinarem o consentimento informado seguindo as normas da instituição. As características clínicas dos pacientes estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1. Características dos pacientes das culturas de LTC anti-leucemia**

LTC	Doença	Cariótipo no Diagnóstico	Idade (anos)	Sexo (Paciente/Doador)	Tipo do Doador Utilizado	Tipagem HLA do Doador/Receptor
#1	LMA – M2	46, XX t(9;22)	8	F/F	DFPC	D= A 02,24; B 35,35; C 03,03; DRB1 04,04 R= A 24,24; B 35,40; C 03,03; BRB1 03,04
#2	LMA – M1	46, XY t(8;21)	15	M/F	Irmão HLA Compatível	D= A 03,32; B 35,18; C 04,12; DRB1 04,15 R= A 03,32; B 35,18; C 04,12; BRB1 04,15
#3	LMA – M4	46, XX	7	F/M	DFPC	D= A 03,32; B 34,40; C 04,17; DRB1 03,11 R= A 02,32; B 35,40; C 03,04; BRB1 08,11
#4	LMA – M2	46, XX	4	F/M	DFPC	D= A 23,02; B 51,50; C 16,06; DRB1 01,11 R= A 23,33; B 51,58; C 16,03; BRB1 01,03
#5	LLA – CD10+	46, XY	6	M/M	DFPC	D= A 02,68; B 44,51; C 03,04; DRB1 14,16 R= A 02,24; B 44,62; C 02,03; BRB1 14,13

LMA leucemia mielóide aguda – classificação FAB; LLA, leucemia linfóide aguda; DFPC, doador familiar parcialmente compatível; F, feminino; M, masculino; D, doador; R, receptor.

#### 6.4.2. Células Estimuladoras e Células Alvo

As células usadas como estimuladores nas culturas *ex vivo* para a geração dos LTC foram os BL dos pacientes preparados em amostras heparinizadas da medula óssea ou sangue periférico (>90% de BL) obtidos no momento do diagnóstico ou da recaída. Nos ensaios de citotoxicidade foram utilizados como células alvos, além dos BL, linhagens de células T estimuladas com mitógeno (fitohemaglutinina, T-PHA) como controle não maligno. Estas células foram obtidas e cultivadas para cada paciente através da estimulação de células mononucleares do sangue periférico (CMNSP), coletadas previamente ao transplante e mantidas sob criopreservação, com fitohemaglutinina e várias passagens em soro fetal bovino a 10% (SFB) e RMPI-1640 suplementados com 100 U/mL de IL-2 recombinante (rIL-2; Chiron CO, Emeryville, CA, EUA) (MONTAGNA et al., 2001). Também foram obtidos fibroblastos da biópsia de pele dos pacientes antes do transplante, cultivados conforme método previamente descrito (MONTAGNA et al., 2003), para utilização como células alvos de controle.

#### 6.4.3. Diferenciação das Células Dendríticas

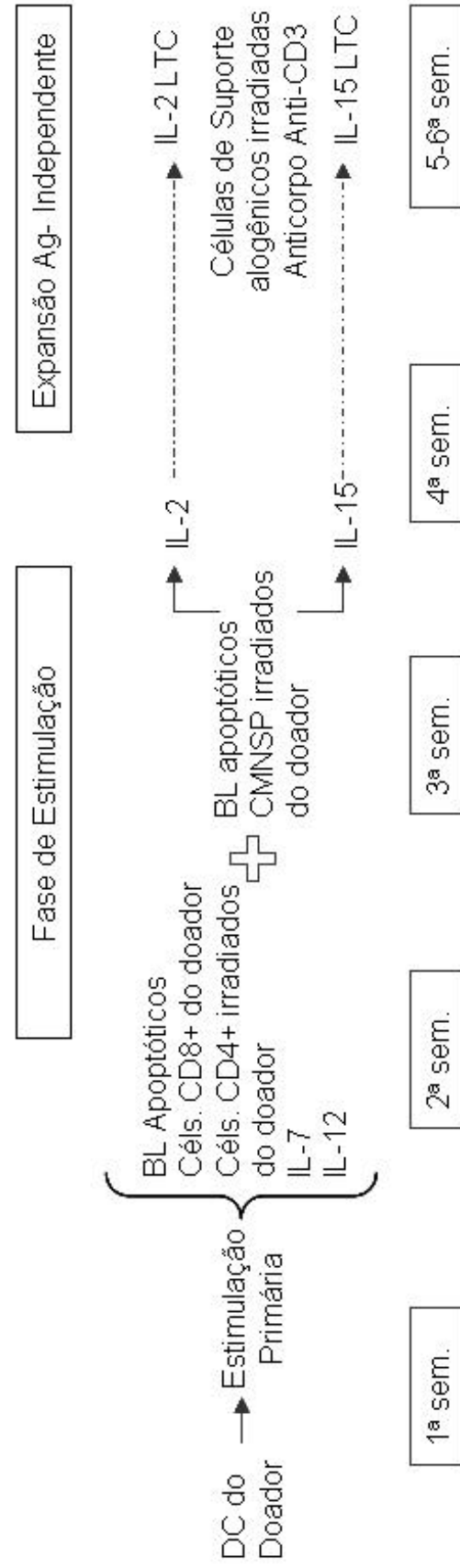
As células dendríticas foram geradas usando CMNSP CD14+ dos doadores de medula óssea. As células CD14+ foram selecionadas magneticamente usando *Microbeads* marcadas com CD14 (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Alemanha) de acordo com a especificação do fabricante. As células CD14+ obtidas (> 90%) foram estimuladas com 500U/mL de IL-4 recombinante humana (R & D Systems Europe, Abingdon, RU) e 800U/mL de fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos recombinante humano (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* - Schering-Plough/Sandoz, Basel, Suíça) (SALLUSTO et al., 1994). Após 7 dias de cultura, as células foram recuperadas, analisadas quanto ao seu fenótipo de superfície para CD14 (BD Bioscience, San Jose, CA,

EUA) e CD1a (R & D Systems Inc, Minneapolis, MN, EUA); as DC foram usadas para a indução das linhagens de LTC como células apresentadoras de antígenos se negativas para CD14 e positivas para CD1a (CD1a > 80%).

#### 6.4.4. Geração das Linhagens de LTC anti-Leucemia

O meio de cultura utilizado foi RPMI-1640 suplementado com 2mM de L-glutamina, 50µg/mL de gentamicina, 1% de aminoácidos não essenciais, 1mM de piruvato de sódio e 5% de soro humano (RPMI-SH5%). As células CMNSP dos doadores foram enriquecidas com CD8+ através da seleção negativa após incubação com anti-CD4 marcado magneticamente, *microbeads* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Alemanha). As células CD8+ enriquecidas ( $0.5$  to  $1 \times 10^6$  células/mL) foram cultivadas em placas de 48 poços (volume final de 1mL) com as células dendríticas dos doadores ( $2 \times 10^5$  células/mL), BL irradiados (200 Gy) ( $5 \times 10^5$  células/mL) e linfócitos CD4+ irradiados (30 Gy) dos doadores ( $3$  a  $5 \times 10^5$  células/mL) (MONTAGNA et al., 2001; MONTAGNA et al., 2003). No dia 0 das culturas foram adicionados 10ng/mL rIL-7 (R & D Systems Inc, Minneapolis, MN, EUA) e 10pg/mL rIL-12 (R & D Systems Europa). Depois de 7 a 10 dias, as culturas foram reestimuladas com os BL dos pacientes irradiados (200 Gy) ( $5 \times 10^5$  células/mL) e CMNSP dos doadores irradiadas (30 Gy) que permaneceram aderidas por 3 horas para dar suporte às culturas. Após dois dias foram adicionados às culturas 25U/mL de IL-2 (rIL-2; Chiron CO, Emeryville, CA, EUA) ou 10ng/ml de IL-15 recombinante (R & D Systems Inc, Minneapolis, MN, EUA). O mesmo protocolo foi utilizado nas estimulações sucessivas e é mostrado esquematicamente na Figura 1.

Figura 1. Diagrama Esquemático da Geração e Expansão ex vivo de LTC Anti-Leucemia



DC, células dendríticas; Ag- Independente, antígeno independente; BL, blastos leucêmicos; CMNSP, Células Mononucleares do Sangue Periférico; IL-, interleucinas; LTC, Linfócitos T Citotóxicos

#### 6.4.5. Expansão Rápida dos LTC Anti-Leucemia

As culturas de LTC anti-leucemia derivadas dos doadores e obtidas após três estimulações com os BL dos pacientes em meio contendo rIL-2 ou rIL-15 foram expandidas com um ciclo do protocolo de expansão rápida previamente descrito (MONTAGNA et al., 2003). De acordo com este protocolo foram utilizados CMNSP alogênicas irradiados (30 Gy) como células de suporte ( $2 \times 10^6$ /mL), anticorpo anti-CD3 (OKT3, Ortho, Raritan, NJ, USA; 30ng/mL) e repetidas doses de rIL-2 (50U/mL) ou rIL-15 (10ng/mL) a cada 3 a 4 dias, dependendo da citoquina usada na fase de estimulação (Figura 1).

#### 6.4.6. Análise dos Marcadores de Superfície

A análise da população celular de cada cultura foi realizada por imunofluorescência direta com marcação de duas ou três cores e medidas com o citômetro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences, Milão, Itália). Foram utilizadas múltiplas combinações de anticorpos conjugados com ficoeritrina (Phycoerythrin - PE), isotiocianato de fluoresceína (fluorescein isothiocyanate - FITC) e proteína clorofila peridínina (*peridinin chlorophyll protein* – PerCP) para os seguintes marcadores: i) CD14 e CD1a, para análise das DC; ii) CD3, CD56, CD4, CD8, TCR- $\gamma\delta$ , CCR7, CD27, CD45RA, CD45RO, CD62L (mAb, BD Biosciences, Milão, Itália), para a análise da população de LTC das culturas conforme descrito previamente (MONTAGNA et al., 2001).

#### 6.4.7. Ensaio de Liberação de $^{51}\text{Cr}$

A atividade citotóxica das culturas de LTC anti-leucemia foi avaliada através do ensaio de liberação de  $^{51}\text{Cr}$  após 8 horas de incubação. As células alvo foram marcadas com  $50\mu\text{Ci}$  de  $^{51}\text{Cr}$  (PerkinElmer, Boston, EUA) em  $500\mu\text{L}$  de SFB por 18 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Após três lavagens, as células alvos foram semeadas em placas de 96 poços com fundo oval



na relação efetor: alvo (E:A) variando de 50:1 a 1:1. Para testar a contribuição da atividade citolítica não específica mediada pelas células *Natural Killer* (NK) foram adicionadas às culturas do ensaio citotóxico células K562 na relação de 20:1 com as células alvo (experimento de inibição a frio) como descrito previamente (MONTAGNA et al., 2004). Após o período de incubação, o sobrenadante foi coletado e contado no contador gama. A lise específica foi calculada seguindo a seguinte fórmula: % da liberação específica = [(liberação encontrada – liberação espontânea)] x 100.

#### 6.4.8. Análise Estatística

Os dados são apresentados em valores da média  $\pm$  desvio padrão, a diferença estatística da expressão fenotípica e atividade citotóxica entre as culturas com rIL-2 ou rIL-15 foram estimadas usando o teste ANOVA ou teste *t* com valor de significado estatístico do  $p < 0,05$ .

### 6.5. RESULTADOS

#### 6.5.1. Geração e Expansão de LTC anti-Leucemia Derivados do Doador

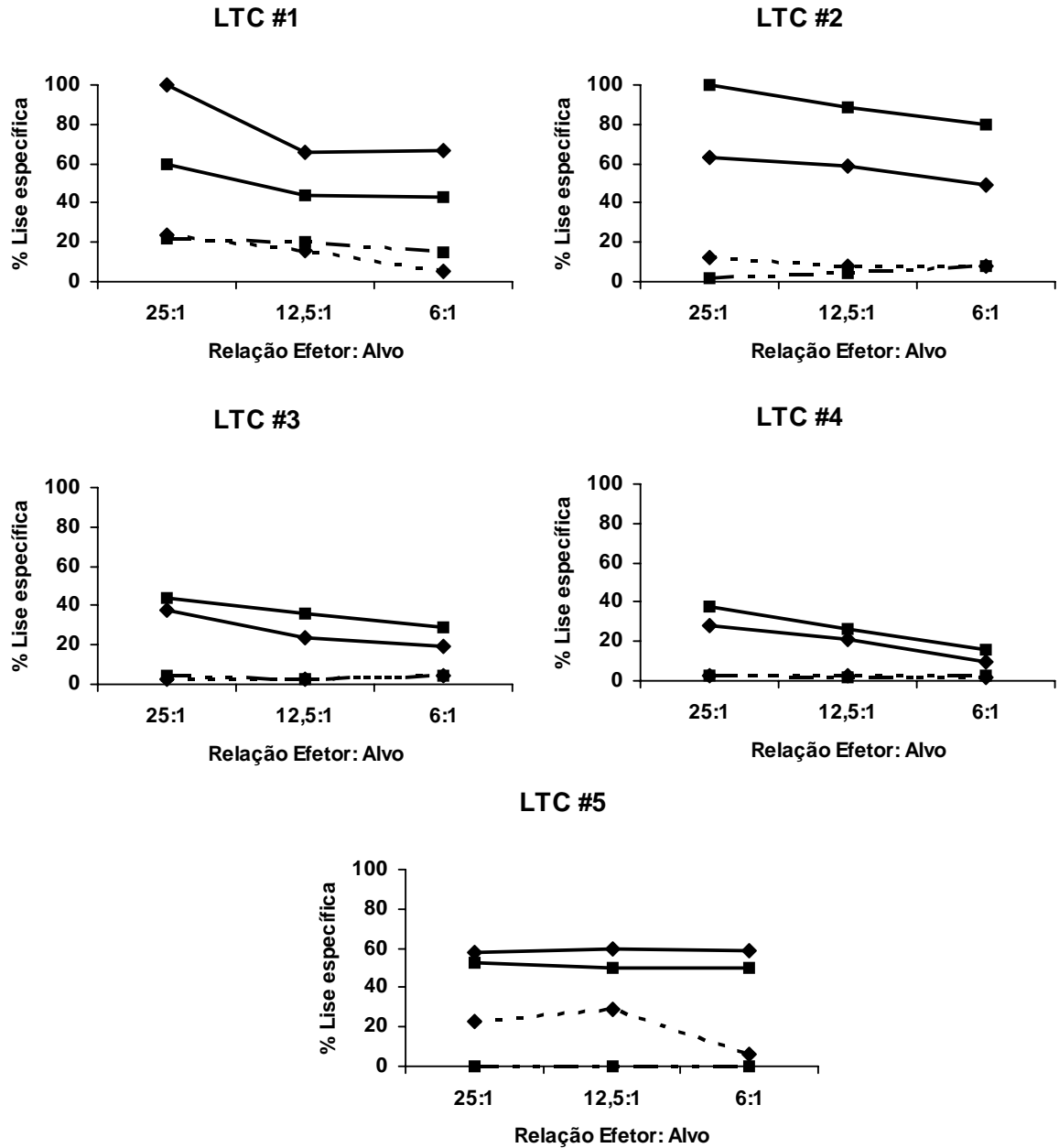
Foram realizadas 5 culturas de LTC anti-leucemia originárias dos doadores do alo-TCTH usando o método previamente descrito (MONTAGNA et al., 2001; MONTAGNA et al., 2003) na fase primária da cultura, enquanto que as estimulações posteriores foram mantidas com a adição de rIL-2 ou rIL-15 (figura 1). A identificação numérica (#) se refere a cada paciente investigado (ver também Tabela 1). Usando esta estratégia experimental, foram obtidas 10 linhagens de LTC anti-leucemia, 2 para cada par doador/paciente (IL-2-LTC e IL-15-LTC, seguido do número de identificação).

A análise da atividade citolítica contra os BL dos pacientes, medida após 2 estimulações específicas contra a leucemia não demonstrou diferença significativa entre as

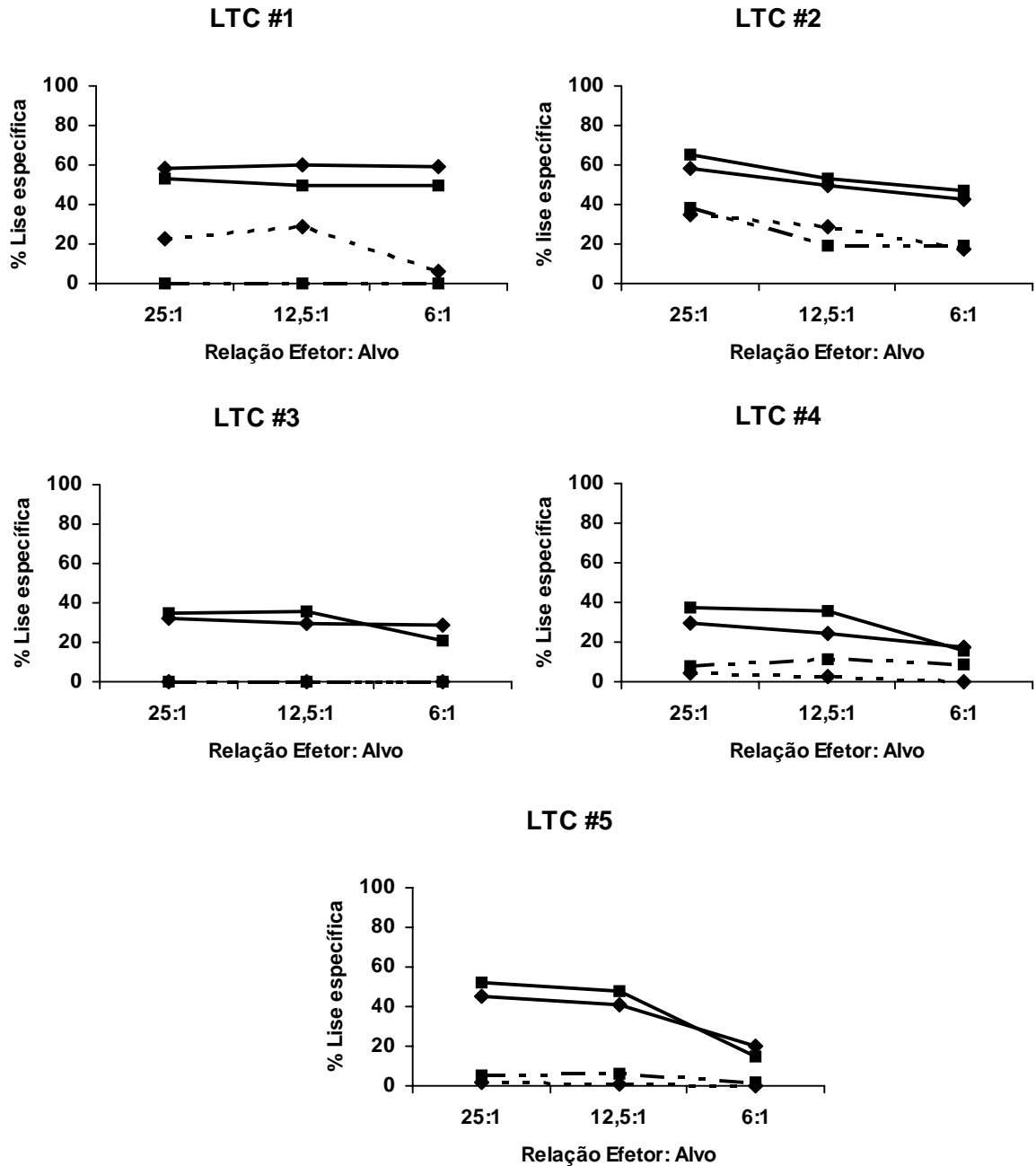
culturas de LTC mantidas com rIL-2 ou rIL-15 (Figura 2). Os LTC anti-leucemia também foram testados quanto a sua atividade citotóxica contra as células não leucêmicas obtidas dos pacientes antes do alo-TCTH para controle *in vitro* da reação enxerto contra leucemia. Ambas as linhagens, IL-2-LTC e IL-15-LTC, mostraram baixos níveis de reatividade (<20% de lise) contra as células não leucêmicas dos pacientes, no caso células T-PHA e fibroblastos, na relação efector: alvo mais alta e atividade indetectável na relação efector: alvo mais baixa (ou seja, 1:1), onde permaneceu atividade citotóxica contra os BL (Figura 2).

As culturas de LTC anti-leucemia mantidas com rIL-2 ou rIL-15 durante a fase de estimulação específica contra os BL foram posteriormente expandidas com o protocolo de expansão antígeno-independente, sempre mantidas com a adição de IL-2 ou IL-15 respectivamente (Figura 1). Estes LTC foram recolhidos aproximadamente após 14-15 dias da expansão e avaliados quanto a sua atividade citotóxica contra os BL e contra as células não malignas (Figura 3). As culturas IL-2-LTC ou IL-15-LTC demonstraram altos níveis de citotoxicidade contra os BL, enquanto que, igualmente ao observado após as estimulações específicas, a reatividade contra as células não malignas foi muito menor a uma relação E:A de 15:1 e, virtualmente, ausente na E:A de 1:1 (ver Figura 3 para maiores detalhes).

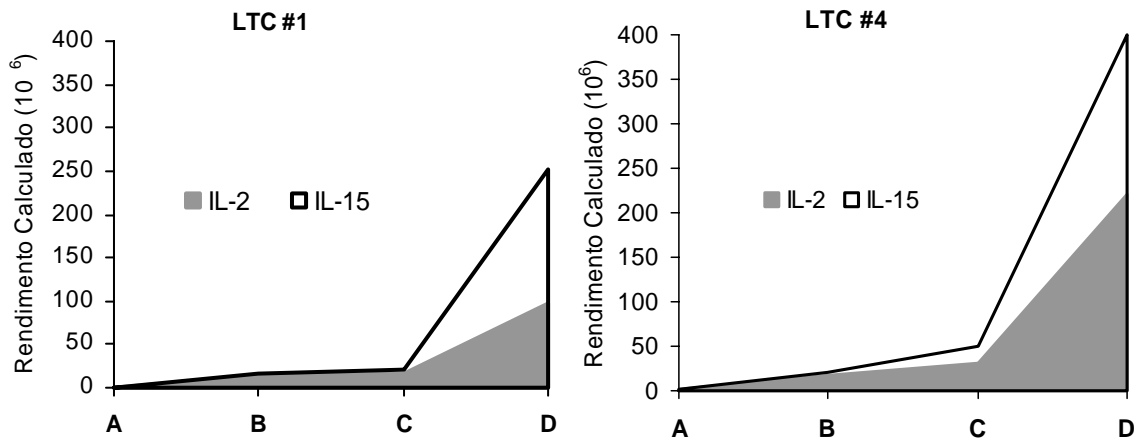
Após as duas estimulações específicas contra a leucemia e uma expansão antígeno-independente, as culturas de LTC apresentaram grande aumento do número absoluto de células (Figura 4). Entretanto, a taxa de expansão da cultura IL-15-LTC foi (média 298, variação de 250 a 400 vezes) significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que a IL-2-LTC (média 120, variação de 70 a 220 vezes).



**Figura 2. Atividade Citotóxica dos LTC anti-leucemia após 2 estimulações contra os blastos leucêmicos.** As culturas foram testadas simultaneamente contra os BL (linha sólida) e contras os fibroblastos dos pacientes (linhas pontilhadas). As culturas foram testadas 6 a 7 dias após a estimulação com relação efetor: alvo variada; estão relatados 3 valores de E:A  
 ◆IL2-LTC; ■ IL-15-LTC.



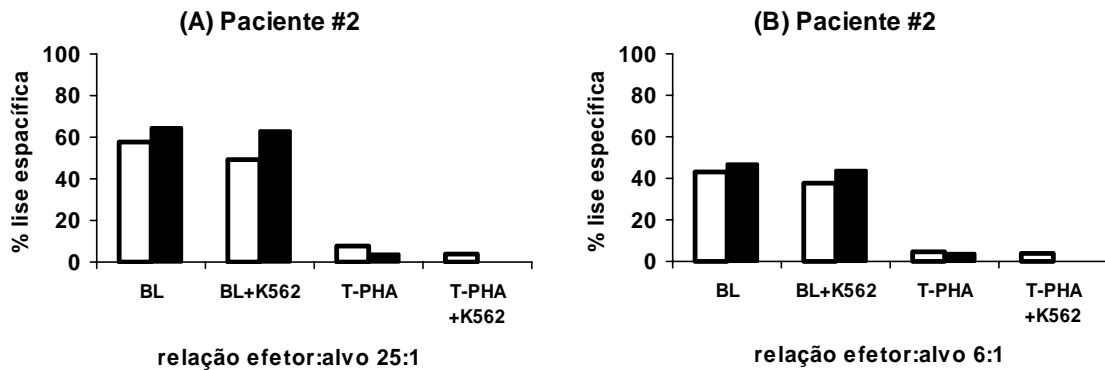
**Figura 3. Atividade Citotóxica dos LTC anti-leucemia após a Expansão Antígeno-Independente.** As culturas foram simultaneamente testadas contras os BL dos pacientes (linhas sólidas) e contra os fibroblastos (linhas pontilhadas). As culturas foram testadas 13 a 15 dias após a expansão com relação efetor: alvo variada; estão relatados os resultados obtidos em três valores de E:A. ◆IL2-LTC; ■ IL-15-LTC.



**Figura 4. Recuperação celular após a expansão antígeno-independente.** Os resultados da expansão celular de duas culturas representativas, com a maior e a menor recuperação, são apresentados; as informações representam um cálculo teórico baseado nas taxas de expansão das linhagens de LTC. Os resultados se referem à semeadura na fase primária de  $10^6$  células CD8+ enriquecidas. A, fase primária; B, segunda estimulação com BL; C, terceira estimulação com BL; e D, expansão antígeno-independente. □ IL-15-LTC; ■ IL-2-LTC.

#### 6.5.2. Ensaio de Citotoxicidade com Inibição a Frio

Os ensaios de inibição a frio, realizados após a estimulação específica contra leucemia e após a expansão independente do antígeno, demonstraram que a adição de células da linhagem K562 nos ensaios de citotoxicidade reduziu discretamente a atividade citotóxica contra os BL das culturas mediadas por ambas citoquinas. Na Figura 5 são apresentados resultados representativos da atividade citotóxica com inibição a frio das culturas IL-2-LTC#2 e IL-15-LTC#2 onde a expressão de CD56 foi maior.



**Figura 5. Atividade citotóxica com inibição a frio.** Os resultados apresentados se refere as cultura de LTC anti-leucemia #2 contra blastos leucêmicos (BL) e contra linhagem de células T mitógenas (T-PHA). As culturas IL-2-LTC#2 (coluna branca) ou IL-15-LTC#2 (coluna preta) foram testadas após duas estimulações leucemias-específicas e apresentadas na relação efetor:alvo 25:1 (A) e 6:1 (B). Os LTC foram testados contra os BL sozinhos ou com a adição de células K562 e simultaneamente contra T-PHA e T-PHA mais células K562.

### 6.5.3 Caracterização Fenotípica das Culturas de LTC anti-Leucemia

A análise fenotípica foi realizada no momento de cada ensaio citotóxico, ou seja, antes de cada estimulação específica contra a leucemia e entre os dias 10 e 14 após a expansão independente do antígeno. Após as duas estimulações leucemia-específicas a proporção de linfócitos CD3+/CD8+ presentes nas culturas IL-2-LTC foi comparável à encontrada nas culturas IL-15-LTC, enquanto que a porcentagem de células CD3+/CD4+ foi sempre inferior a 10% (Tabela 2). Nas culturas IL-15-LTC observou-se uma expressão maior da molécula CD56 após as estimulações leucemia-específica comparada às culturas IL-2-LTC, entretanto esta diferença não apresentou significância estatística. Após a expansão antígeno-independente, a grande maioria das células efetoras expressou CD3+/CD8+ em ambas as culturas IL-2-LTC e IL-15-LTC. Na cultura IL-2-LTC#3, 35% das células CD8+ co-expressaram CD4. A porcentagem de células CD3+/CD56+ permaneceu elevada nas culturas IL-15-LTC se comparadas as IL-2-LTC (diferença não significativa,  $p > 0.4$ ), porém a porcentagem de CD16 foi  $\leq 3\%$  (Tabela 2).

**Tabela 2. Fenótipo de superfície das culturas de LTC anti-leucemia.**

	LTC após 2 <sup>a</sup> estimulação BL- específica				LTC após a expansão Ag- independente			
	IL-2-LTC		IL-15-LTC		IL-2-LTC		IL-15-LTC	
	Média %	%	Média %	%	Média %	%	Média %	%
CD3+CD8+	84	65-99	84	67-96	97	93-100	97	90-100
CD3+CD4+	8	3-9	7	1-10	13	5-35	7	1-10
CD56+	21	3-40	52	31-66	10	2-20	41	18-63
CD3+CD56+	16	3-38	41	27-47	10	2-18	41	18-64
TCR- $\gamma\delta$	7	0-12	8	0-19	22	2-43	24	2-45
CD16+	2	1-3	2	1-3	0,5	0,3-0,8	0,4	0,2-0,8

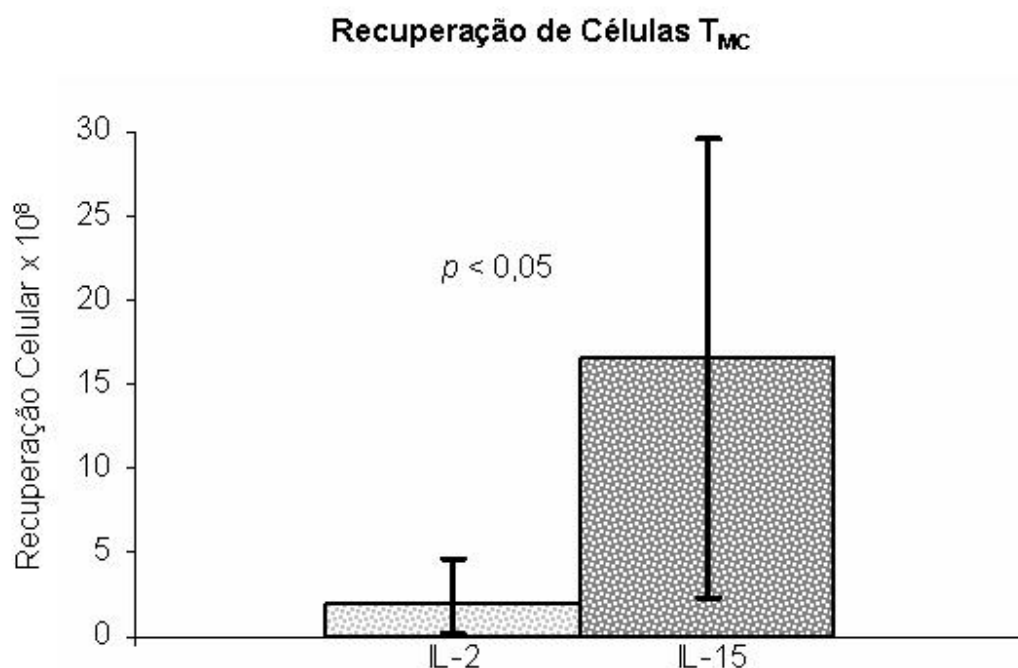
#### 6.5.4. Subtipos de CD8 da Memória nas Culturas de LTC

Baseada na classificação das células T de memória proposta por Geginat et al, 2003, foi avaliado o compartimento de células T da memória das culturas de LTC anti-leucemia geradas *ex vivo*. A distribuição das células T de memória foi avaliada nas culturas de LTC após a expansão antígeno-independente, que representa o produto final a ser infundido nos pacientes (Tabela 3). Apesar das células CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> serem maior de 90% em todas as culturas de LTC, os subtipos da memória foram analisados no citômetro de fluxo na população CD8<sup>+</sup>. Independente da citoquina empregada na cultura foi documentado um número predominante de células da memória T efetoras (T<sub>ME</sub>) CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>-</sup> em ambas as culturas (IL-2 35,1%±0,9 vs. IL-15 22,3%±1,4%) e CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup> (T<sub>ME/RA+</sub>) (IL-2 52,5%±2,1% vs. IL-15 56,8%±1%). Ambas as culturas apresentaram, também, um número considerável de células da memória T central (T<sub>MC</sub>) CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>+</sup>, que foi maior nos IL-15-LTC do que nos IL-2-LTC (6,3%±1,4% vs 1,86%±0,9% p<0.05). Esta observação é particularmente relevante considerando que, como previamente descrito, a recuperação celular das culturas IL-15-LTC foi significativamente maior que as culturas IL-2-LTC. Os resultados da recuperação celular de T<sub>MC</sub> das culturas IL-2-LTC e IL-15-LTC após a expansão antígeno-independente são apresentados na figura 6. A recuperação das células T<sub>MC</sub> foi estimada com base na porcentagem de T<sub>MC</sub> presentes nas culturas e na recuperação celular total de cada linhagem. Estes achados confirmam que, em comparação à rIL-2, a rIL-15 permite uma maior expansão de células CD8<sup>+</sup> T<sub>MC</sub> (p<0.05) (Figura 6). A expressão de CD27 e CD62L não foi significativamente diferente entre as culturas IL-15-LTC e IL-2-LTC (ver também a Tabela 2).



**Tabela 3. Fenótipo de superfície dos LTC CD8+ após a expansão antígeno-independente**

		IL-2-LTC	IL-15- LTC	Valor de <i>p</i>
		% Média ± Desvio Padrão	% Média ± Desvio Padrão	
CD45RA+/CCR7+	Virgem	10 ±2	15 ±1	NS
CD45RA-/CCR7+	T <sub>MC</sub>	2 ±2	6 ±1	<i>p</i> < 0,05
CD45RA-/CCR7-	T <sub>ME</sub>	35 ±2	22 ±1	NS
CD45RA+/CCR7-	T <sub>ME/RA+</sub>	53 ±2	57 ±1	NS
CD62L+		74 ±12	54 ±5	NS
CD27+		34 ±13	41 ±9	NS



**Figura 6. Recuperação de células T<sub>MC</sub> das culturas de LTC após a expansão antígeno-independente.** O número de células T<sub>MC</sub> das culturas IL-2-LTC e IL-15-LTC foi estimado a partir das porcentagens de T<sub>MC</sub> documentadas após a expansão antígeno-independente e da recuperação celular de cada linhagem. Os resultados da recuperação de células T<sub>MC</sub> se referem à semeadura na fase primária de 10<sup>6</sup> células CD8+ enriquecidas.

## 6.6. DISCUSSÃO

O sucesso da terapia celular T adotiva para o tratamento e prevenção de recaída após o alo-TCTH depende muito da capacidade das células do doador, no caso LTC anti-leucemia gerados *ex vivo*, de exercer funções citotóxicas e efetoras *in vivo*. Além da geração de LTC anti-leucemia com capacidade efetora imediata, a manutenção da capacidade de renovação celular por longo tempo, após exposição aos antígenos associados à leucemia, deve ser preservada. Neste estudo foi analisada a expressão de antígenos de superfície que classificam as células T da memória, efetoras e central, nas culturas de LTC anti-leucemia geradas *ex vivo* utilizando o protocolo previamente descrito. Também foi avaliado o papel da IL-15 em influenciar a proporção de linfócitos T da memória nas culturas, bem como em manter a atividade citotóxica específica e a magnitude da resposta celular T anti-leucemia.

Neste estudo foi demonstrado que as culturas de LTC anti-leucemia mantidas com rIL-2 ou rIL-15 na fase de expansão são heterogêneas quanto aos subtipos de células T da memória, apresentando tanto células com características de memória central como efetora. Independente da citoquina utilizada as culturas, apesar do predomínio de células  $T_{ME}$  e  $T_{ME/RA+}$ , apresentaram uma quantidade substancial de células CCR7+. Em particular, os resultados demonstraram que nas culturas IL-15-LTC a porcentagem de células CD8+ expressando fenótipo de memória central foi significativamente maior se comparada à porcentagem observada nas culturas IL-2-LTC. Apesar do comportamento das células CD8+ da memória nos humanos não estar completamente elucidado, é conhecido que a molécula CCR7, um receptor de quimiocinas que controla a migração para os órgãos linfáticos secundários, divide as células T da memória em dois subtipos funcionais distintos. As células da memória T CCR7- expressam receptores para a migração aos tecidos inflamados e apresentam funções efetoras terminais. Em contraste, as células da memória CCR7+ expressam receptores que orientam o tráfico para os linfonodos e não apresentam

funções citotóxicas, porém estimulam eficientemente as DC e se diferenciam em efetores CCR7- quando estimulados pelos antígenos já conhecidos (IEZZI et al., 2001; GEGINAT et al., 2003). Desta forma, os resultados indicam que, apesar do sucesso prévio em gerar e expandir LTC anti-leucemia *ex vivo*, o uso da rIL-15 em substituição a rIL-2 durante as fases de estimulação e expansão pode melhorar a qualidade das linhagens, em particular, aumentar o compartimento de células T da memória central com maior capacidade de auto-renovação.

Alguns autores relataram que a transferência de células T<sub>MC</sub> CD8<sup>+</sup> T adotivas que possuem maior capacidade de migração provê maior imunidade se comparada com a transferência de uma população de células T da memória com características de efector CCR7- (WHERRY et al., 2003; GATTINONI et al., 2005). Além do mais, a expressão de moléculas co-estimulatórias como CD27 e L-seletina (CD62L) resultam em maior expansão, sobrevida e diferenciação das células de memória T CD8<sup>+</sup> ativadas (MASOPUST et al., 2004). De forma geral, todos estes resultados sugerem que um repertório variado de LTC da memória e efetores pode ser importante em sustentar a atividade anti-leucemia imediata, além de gerar e manter a memória imunológica capaz de aumentar a eficácia da imunoterapia celular adotiva. Os resultados deste estudo demonstram que, junto com porcentagens mensuráveis de células T com características fenotípicas da memória central, os LTC CD8<sup>+</sup> anti-leucemia expressam valores consideráveis das moléculas CD27 e CD62L, sugerindo um possível papel de mediar eficientemente a função efetora citotóxica terminal e de manter a atividade anti-leucemia durante um longo período *in vivo*.

Algumas evidências obtidas em ratos e em experimentos com células humanas indicaram que o uso endógeno da IL-15 prolonga a sobrevida e a proliferação das células CD8<sup>+</sup> e poderia aumentar a sua eficácia anti-tumoral (SCHLUNS et al., 2002; ALVES et al., 2003; ANICHINI et al., 2003; BRENTJENS et al., 2003; SCHLUNS E LEFRANÇOIS, 2003; ALPDOGAN et al.,

2005; GATTINONI et al., 2005). Uma importante vantagem da IL-15 em sustentar a proliferação das células T CD8+ é a contribuição desta citoquina em manter as células da memória central. Na realidade, foi demonstrado que a IL-15 estimula a proliferação das células T CD8+ com fenótipo de memória central, apesar de ser menos clara a sua contribuição na persistência das células que mantiveram contato com os antígenos nos órgãos linfáticos secundários (WENG et al., 2002; BERARD et al., 2003; GATTINONI et al., 2005). De acordo com estas informações foi demonstrado neste estudo, em um modelo humano *ex vivo*, que culturas mantidas com rIL-15 podem expandir maior quantidade de células T CD8+ com fenótipo de memória central mantendo a atividade citotóxica contra os blastos leucêmicos sem perder sua especificidade, quando comparado à culturas mantidas com rIL-2. Outra diferença observada foi a maior recuperação celular obtida nas culturas IL-15-LTC em comparação às IL-2-LTC. A IL-15 induz a expressão de proteínas anti-apoptóticas da família *Bcl-2* nas células CD8+ em repouso, com efeito sobreposto, mas distinto entre as células de memória e virgens (BERARD et al., 2003). Este mecanismo é importante para manter a renovação das células T de memória específicas para determinado antígeno e poderia explicar a maior recuperação celular obtida *in vitro*.

Neste estudo foi observada uma alta co-expressão de CD56 nas células T das culturas mantidas com IL-15, porém não associado com maior aumento da aloreatividade citotóxica contra as células não malignas dos pacientes. O CD56 representa a molécula-1 de adesão neural presente nas células NK (*natural killer*) produtoras de interferon-gama (INF- $\gamma$ ) e com potente efeito anti-tumoral (OHKAWA et al., 2001). Sabidamente a IL-15 expande as células NK e, também, células T CD3+CD8+ com co-expressão de CD56+. Além disto, já foi descrito que a aquisição de CD56 pelos linfócitos T está associada com maior habilidade proliferativa em

resposta a IL-15 e com maior ativação das células efectoras (COOKSON E REEN, 2003; OZDEMIR et al., 2005).

Em conjunto, os resultados deste estudo confirmam a possibilidade de gerar linhagens de LTC com atividade anti-leucemia duradoura de doadores de medula óssea, totalmente ou parcialmente compatíveis no sistema HLA, de pacientes pediátricos portadores de leucemia aguda através de uma fase de estimulação primária seguida de duas estimulações específicas contra a leucemia e uma expansão independente do antígeno sustentada por rIL-2 ou rIL-15 durante todas as fases de expansão das culturas. Em adição, foi demonstrado que estas linhagens são heterogêneas quanto aos subtipos de células T da memória imune adotiva, e, apesar da alta atividade citotóxica com perfil fenotípico efector, foi possível obter um considerável número de células com características menos diferenciadas da memória T. Este parece ser o primeiro estudo documentando a possibilidade de gerar e expandir *ex vivo* LTC humanos anti-leucemia exibindo tanto células efectoras, quanto considerável número de células  $T_{MC}$  CD8+. Em comparação à adição de rIL-2, a rIL-15 parece ser superior em gerar mais células  $T_{MC}$  e em aumentar a recuperação celular dos LTC em cultura. Assim, se os linfócitos  $T_{ME}$  representam o verdadeiro grupo de células experimentadas com os antígenos capazes de percorrer os tecidos periféricos com potente função citotóxica, as células  $T_{MC}$  representam a população de células experimentadas passíveis de expansão clonal após um segundo contato com o antígeno, permitindo, assim, a geração de uma nova onda de células citotóxicas efetivas.

A maior compreensão do comportamento dos subtipos de células T de memória adotiva das linhagens de LTC anti-leucemia pode ser o ensejo para melhorar a sobrevivência destas células e, conseqüentemente, da resposta imune anti-tumoral. Desta forma, a possibilidade de manipular a geração e a distribuição de células T da memória e de efetores nas culturas de LTC pode ser uma estratégia eficaz para aprimorar os resultados da imunoterapia celular adotiva.

## 6.7. AGRADECIMENTOS

Este estudo foi parcialmente financiado por: AIRC (Associazione Italiana Ricerca sul Cancro), CNR (Consiglio Nazionale delle Ricerche), MURST (Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica), União Européia (FP6 programas ALLOSTEM e ITHANET) e Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo para Franco Locatelli; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – Ministério da Educação, Governo do Brasil e doação privada em homenagem a Sofia Luce Rebuffat para Liane Daudt.

## 7. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

### INTERLEUKIN-15 PROMOTES THE EXPANSION OF CENTRAL MEMORY CD8+ T CELLS IN *EX-VIVO* GENERATED ANTI-LEUKEMIA CYTOTOXIC T LYMPHOCYTE LINES

Liane Daudt, Rita Maccario, Franco Locatelli, Ilaria Turin, Lucia Silla, Enrica Montini, Elena Percivalle, Roberto Giugliani, Maria Antonietta Avanzini, Daniela Montagna

Laboratorio d'Immunologia dei Trapianti, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Dipartimento di Scienze Pediatriche, Università di Pavia, Pavia, Italy, Oncoematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Università di Pavia, Department of Clinical Hematology and Bone Marrow Transplantation, Hospital de Clinicas de Porto Alegre and Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; Department of Genetics, Hospital de Clinicas de Porto Alegre and Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Present address: Department of Clinical Hematology and Bone Marrow Transplantation Hospital de Clinicas de Porto Alegre, 90035-003 Porto Alegre – RS – Brazil

#### Corresponding Authors

Liane E Daudt, MD  
Department of Clinical Hematology and Bone Marrow Transplantation  
Hospital de Clinicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcellos, 2350/2235  
90035-003 Porto Alegre – RS – Brazil  
Phone/Fax: ++55.51.21018317  
ldaudt@hcpa.ufrgs.br

Daniela Montagna, Ph.D  
Laboratorio di Immunologia dei Trapianti e Oncoematologia Pediatrica  
Dipartimento di Scienze Pediatriche  
Università di Pavia, IRCCS Policlinico San Matteo  
P.le Golgi, 2  
27100 Pavia, Italy

#### Immunobiology

This work has been partly supported by grants from AIRC (Associazione Italiana Ricerca sul Cancro), CNR (Consiglio Nazionale delle Ricerche), MURST (Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica), European Union (FP6 programs ALLOSTEM and ITHANET) and Fondazione IRCCS (Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico) Policlinico San Matteo to Franco Locatelli; and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – Ministério da Educação, Brazilian Government and by a private Italian Grant in memory of Sofia Luce Rebuffat to Liane Daudt

## 7.1. ABSTRACT

Objectives. We previously demonstrated that donor-derived, anti-leukemia cytotoxic T lymphocyte (CTL) lines directed against different types of leukemia blasts (LBs) can be generated from either HLA-compatible or HLA-mismatched donors. The aim of this study was to analyze the distribution of memory T-cell subsets in CTL lines expanded in the presence of interleukin-2 (IL-2) and to evaluate the effect of IL-15, used in place of IL-2, on propagation and differentiation of different memory T-cell subset, as well as on the capacity of CTL lines to display leukemia-directed cytotoxic activity.

Methods. Anti-leukemia CTL lines were generated using donor-derived dendritic cells (DCs), pulsed with patients' apoptotic LBs, IL-12 and IL-7 during the primary culture and expanded by means of two rounds of leukemia-specific stimulation and one round of antigen-independent expansion, each supplemented with either IL-2 or IL-15.

Results. Both IL-2-supplemented (IL-2-CTL) and IL-15-supplemented (IL-15-CTL) cell lines contained predominant numbers of CD45RA-/CCR7- effector memory ( $T_{EM}$ ) T-cells. Significantly higher ( $p < 0.05$ ) numbers of CD8-positive central memory T-cells ( $T_{CM}$ ), as well as a higher proliferative capacity and a comparable cytotoxic activity, were observed in IL-15-CTLs compared to IL-2-CTLs.

Conclusion. The use of IL-15, in place of IL-2, for anti-leukemia CTL-line expansion, increases the number of  $T_{CM}$  CD8-positive cells, which are known to display long-term survival and the capacity to proliferate and differentiate *in vivo* in the presence of a limited amount of antigen. Moreover, IL-15 enhances the proliferative rate of CTLs, without loss of their specificity.



## 7.2. INTRODUCTION

Over the past few decades, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) has been increasingly used to treat patients affected by many hematological malignancies. Although a high proportion of these patients have been cured by allo-HSCT, recurrence of the original malignant disorder still remains the most important cause of treatment failure (1). Prevention or treatment of post-transplantation relapse, through the manipulation of the donor-origin anti-tumor immune response, has proven to be feasible and successful in some cases. In particular, adoptive immunotherapy with donor lymphocyte infusion (DLI) has provided one of the most effective demonstrations of the importance of the graft-versus-leukemia (GVL) effect in the cure of patients with hematological malignancies given allo-HSCT (2,3). However, while DLI has been demonstrated to rescue a high proportion of patients with Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia (CML) experiencing molecular/cytogenetics relapse or chronic phase recurrence, it is much less effective for treating patients with acute leukemia and can be associated with the occurrence of life-threatening complications, such as severe graft-versus-host disease (GVHD) and myelosuppression (4,5). The *ex vivo* generation and expansion of CD8+ cytotoxic T lymphocytes (CTLs), which are preferentially or selectively endowed with anti-leukemia reactivity, have been investigated as a potentially safer and more effective approach of adoptive cell therapy (6-10).

In previously published studies (11-13), we demonstrated the possibility of generating and expanding *in vitro* a large number of CTL lines directed against different types of either acute leukemia blasts (LBs) or myelodysplastic cells, using both HLA-matched and partially matched donors as a source of effector cells. These anti-leukemia CTL lines were generated using donor-derived dendritic cells (DCs) pulsed with patients' apoptotic LBs, together with interleukin-12 (rIL-12) and rIL-7 during primary culture. CTLs were expanded by means of at least two rounds

of leukemia-specific stimulation and one round of antigen-independent expansion, supported by low doses of rIL-2. Although the long-term viability and cytotoxic activity, tested both before and after cryopreservation, of these leukemia-reactive CTLs generated *in vitro* have been documented, their capacity to efficiently control the growth of residual leukemia cells *in vivo* still remains to be proven. Available evidence from both allogeneic and autologous settings suggests that the success of adoptive transfer of *in vitro* expanded anti-tumor T-cell lines mainly depends on the number of cells infused (8), as well as on their capacity for long-term survival, homing to tumor-involved sites and development of sustained anti-tumor memory immune response. (14-16).

It has been recently described that the kinetic behavior of T-cell subsets is fundamental for long-term persistence of immune surveillance; in fact, while *naïve* T cells divide only rarely in healthy hosts, memory T cells undergo substantially higher turnover rates and have higher effector specificity (17). Moreover, it has been documented that IL-15, a 14- to 15-kDa cytokine belonging to the common alpha-family cytokine family, enhances the proliferation capacity of memory T-cell subsets and also has an anti-apoptotic effect that could prolong *in vivo* anti-tumor activity (6). These data in favor of a positive effect of IL-15 on memory T cells are further supported by results obtained in animal models demonstrating that mice deficient in either IL-15 or the IL-15 alpha-chain receptor show a marked reduction in CD8<sup>+</sup> T cell numbers in lymph nodes and in frequency of primed T cells (CD44<sup>bright</sup>/CD62L<sup>low</sup>) (18,19).

In view of these findings, we analyzed the distribution of memory T-cell subsets in human anti-leukemia CTL lines generated with our original protocol (11), in which expansion phases were supported through the use of rIL-2. Then, we compared the effect of rIL-15, used in place of rIL-2, on differentiation and propagation of memory T-cell subsets, as well as on the capacity of CTL lines to proliferate *in vitro* and to display leukemia-directed cytotoxic activity.

### 7.3. PATIENTS AND METHODS

#### 7.3.1. Patients

Five patients with either acute lymphoblastic or myeloid leukemia, given an allograft from either an HLA-matched (1 child) or a partially-matched relative (4 children), and their allo-HSCT donors were included in the study. Leukemia cells were obtained from bone marrow of patients at time of diagnosis or leukemia relapse, while non-leukemia peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected at time of remission. The institutional review board of the Department of Pediatric Hematology/Oncology, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, approved the study.

Tissue samples from patients were collected after obtaining a written informed consent from patients' parents. Likewise, donors or their parents gave a written informed consent for collection of PBMCs. Clinical characteristics of the patients included in the study are reported in Table 1.

**Table 1.** Patients Characteristics

CTL line number	Disease	Karyotype at diagnosis on LB	Age (years) at diagnosis	Gender (patient/donor)	Type of donor employed	HLA typing of the donor/recipient pair
#1	AML, FAB M2	46, XY t(9;22)	8	F/F	PMFD	D= A 02,24; B 35,35; C 03,03; DRB1 04,04 R= A 24,24; B 35,40; C 03,03; BRB1 03,04
#2	AML, FAB M1	46, XY t(8;21)	15	M/F	HLA-identical Sibling	D= A 03,32; B 35,18; C 04,12; DRB1 04,15 R= A 03,32; B 35,18; C 04,12; BRB1 04,15
#3	AML, FAB M4	46, XY	7	F/M	PMFD	D= A 03,32; B 34,40; C 04,17; DRB1 03,11 R= A 02,32; B 35,40; C 03,04; BRB1 08,11
#4	AML, FAB M2	46, XY	4	F/M	PMFD	D= A 23,02; B 51,50; C 16,06; DRB1 01,11 R= A 23,33; B 51,58; C 16,03; BRB1 01,03
#5	ALL, CD10+	46, XY	6	M/M	PMFD	D= A 02,68; B 44,51; C 03,04; DRB1 14,16 R= A 02,24; B 44,62; C 02,03; BRB1 14,13

AML: acute myeloid leukemia; ALL: acute lymphoblastic leukemia; FAB, French American British Leukemia Classification; F, female; M, male; PMFD: partial-matched familiar donor.

### 7.3.2. Stimulator and target cells

LBs used as stimulators for the *in vitro* cell-cultures and as targets for the CTL assay were prepared from patient heparinized bone marrow aspirates, containing more than 90% leukemia cells and cryopreserved for later use (12). Mitogen-stimulated T cell lines (T-PHA), used as non-malignant control targets in the CTL assay, were grown from each patient by stimulation of cryopreserved pre-transplant PBMCs with PHA through serial passages in RPMI-FCS 10% supplemented medium in the presence of 100 U/mL recombinant IL-2 (rIL-2; Chiron CO, Emeryville, CA), according to a previously described method (11). Patient fibroblasts (FBs), obtained from a skin punch biopsy and cultured as previously described (12), were also used as non-malignant control targets.

### 7.3.3. DC differentiation

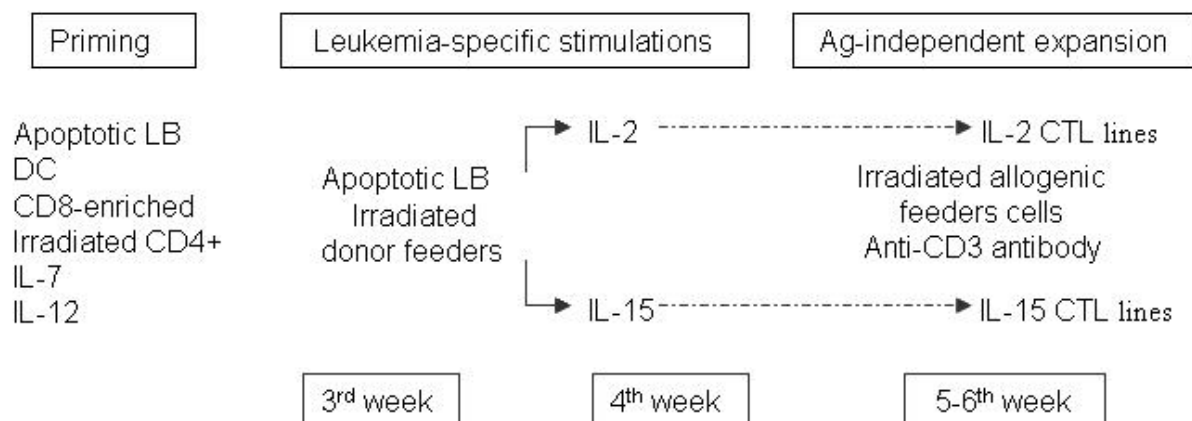
DCs were differentiated from purified CD14<sup>+</sup> PBMCs derived from allo-HSCT-donors, according to a previously described method (12). Briefly, CD14<sup>+</sup> cells were magnetically selected using CD14 labeled microbeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Germany) according to manufacturer's instructions. CD14<sup>+</sup> cells were then stimulated with 500 U/mL human rIL-4 (R&D Systems Europe, Abingdon, UK) and 800 U/mL recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rGM-CSF, Schering-Plough/Sandoz, Basel, Switzerland) (20). After 7-day culture, cells were recovered, analyzed for surface phenotype employing anti-CD14 (BD Bioscience, San Jose, CA) and anti-CD1a (R & D Systems Inc, Minneapolis, MN) monoclonal antibodies (mAbs); DCs were used as antigen presenting cells for induction of anti-leukemia CTL lines if CD14-negative and CD1a-positive (>80%) .

#### 7.3.4. Induction of anti-leukemia CTL lines

Cells were cultured in RPMI 1640 medium, supplemented with 2mM L-glutamine, 50µg/mL gentamycin, 1% non essential amino acids, 1mM sodium pyruvate, and 5% pooled human serum (RPMI-HS). PBMCs were obtained from allo-HSCT donors. Donor-derived CD8-enriched cells were obtained after negative depletion using anti-CD4 magnetically labeled microbeads (Miltenyi Biotec GmbH). CD8-enriched cells ( $0.5$  to  $1 \times 10^6$  cells/mL) were cultured in 48-well plates (final volume 1mL) with donor-derived DCs ( $2 \times 10^5$  cells/mL), irradiated (20,000 rads) recipient LBs ( $5 \times 10^5$  cells/mL), and irradiated (3000 rads) donor-derived CD4+ lymphocytes ( $3$  to  $5 \times 10^5$  cells/mL) (11,12). In addition, 10ng/mL rIL-7 (R & D Systems Inc.) and 10pg/mL rIL-12 (R & D Systems Europe) were added on day 0 of culture. After 7 to 10 days, cultures were re-stimulated with irradiated (20,000 rads) recipient LBs ( $5 \times 10^5$  cells/mL) and irradiated (3,000 rads) adherent donor PBMCs as feeder cells. Two days later, either 25U/mL rIL-2 or 10 ng/ml rIL-15 (R & D Systems Inc) were added to the cultures. The same protocol was used for the successive round of leukemia-specific stimulation (Figure 1).

#### 7.3.5. Rapid expansion of anti-leukemia CTL lines

The donor-derived LB-directed CTL lines obtained after leukemia-specific stimulations using the two different cytokines (IL-2-CTLs and IL-15-CTLs, respectively) were further expanded using a cycle of rapid expansion with irradiated allogeneic feeder cells ( $2 \times 10^6$ /mL), anti-CD3 antibody (OKT3, Ortho, Raritan, NJ; 30ng/mL) and repeated doses (every 3–4 days) of either rIL-2 (50U/mL) or rIL-15 (10ng/mL), respectively (Figure 1).



**Figure 1. Schematic diagram of *ex vivo* generation and expansion of anti-leukemia CTL lines.** Anti-leukemia CTL lines were generated using donor-derived DCs pulsed with apoptotic patients' LBs, rIL-12 and rIL-7 during the primary culture. Cultures were expanded by means of two-rounds of leukemia-specific stimulation and one-round of antigen-independent expansion, supplemented with either rIL-2 (IL-2-CTLs) or rIL-15 (IL-15-CTLs) (see also material and methods section for details).

#### 7.3.6. Surface marker analysis

A two or three-color cytofluorimetric analysis of cell populations was performed by direct immunofluorescence and measured with a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences, Milan, Italy) using a combination of phycoerythrin (PE), fluorescein isothiocyanate (FITC) and peridinin chlorophyll protein (PerCP) -conjugated mAbs specific for: i) CD14 and CD1a, for DC evaluation; and for ii) CD3, CD56, CD4, CD8, TCR- $\gamma\delta$ , CCR7, CD27, CD45RA, CD45RO, CD62L (BD Biosciences, Milan, Italy), for evaluation of effector cells recovered after *in vitro* culture, according to a previously described method (11).

#### 7.3.7. $^{51}\text{Cr}$ -release assay

The cytotoxic activity of anti-leukemia CTL lines was measured in an 8-hour  $^{51}\text{Cr}$  release assay. Targets cells were labeled with  $50\mu\text{Ci}$  of  $^{51}\text{Cr}$  (PerkinElmer, Boston, MA) in  $500\mu\text{L}$  FCS overnight at  $37^{\circ}\text{C}$ . After 3 washes, targets cells were plated in 96-well round-bottom plates at

effector:target (E:T) ratios ranging between 50:1 and 1:1. To test the contribution of antigen nonspecific cytolytic activity, due to the presence of natural killer (NK) cells, NK sensitive K562 cells were added at the cytotoxicity assay in 20-fold excess of labeled targets (cold inhibition experiments) as previously described (21). After the incubation period, supernatants were harvested and counted in a gamma counter. Specific lysis was calculated according to the following formula: % specific release = [(experimental release – spontaneous release)/(maximum release – spontaneous release)] x 100.

#### 7.3.8. Statistical analysis

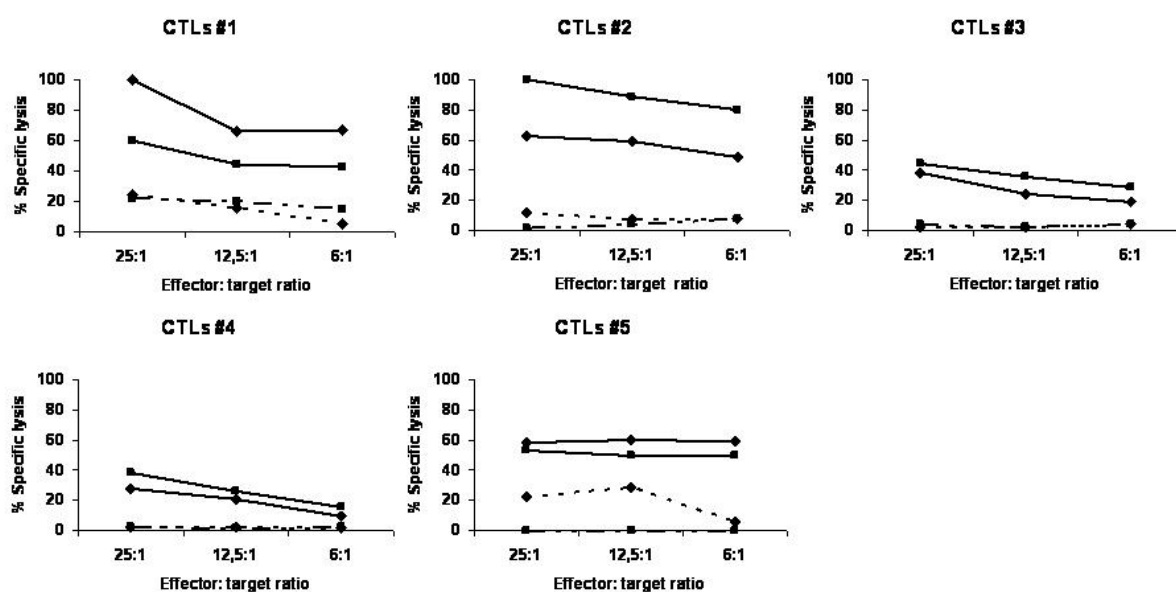
Data are presented as mean values  $\pm$  SD and the significance of differences for phenotypic expression between IL-2- and IL-15-supported cultures was estimated using the one-way ANOVA and student *T* test. A *p* value <0.05 was considered to be statistically significant.

### 7.4. RESULTS

#### 7.4.1. Induction and expansion of donor-derived anti-leukemia CTL lines

Five donor-derived anti-leukemia CTL lines were generated using the previously described culture method of primary culture (11,12), while further rounds of stimulations were supported with the addition of either IL-2 or IL-15 (Figure 1). The identification number (#) refers to each patient investigated (see also Table 1). Using this experimental approach, 10 anti-leukemia CTL lines were obtained, 2 for each donor/recipient pair (IL-2-CTLs and IL-15-CTLs, followed by the identification number). Evaluation of cytolytic activity against patient's LBs was measured after two rounds of leukemia-specific stimulation and we did not find any statistically significant differences in the lytic capacity displayed by IL-2-CTLs or IL-15-CTLs (see Figure

2). Anti-leukemia CTL lines were also tested for cytotoxic activity towards non-leukemia targets obtained from patients before transplantation. Both IL-2-CTLs and IL-15-CTLs showed low levels of reactivity (<20% lysis) at the highest E:T ratio against patient non-malignant cells, namely T-PHA and/or FBs, while the cytotoxicity became undetectable at the lowest E:T ratio (i.e., 1:1), when the cytotoxicity against LBs was still present (see also Figure 2).

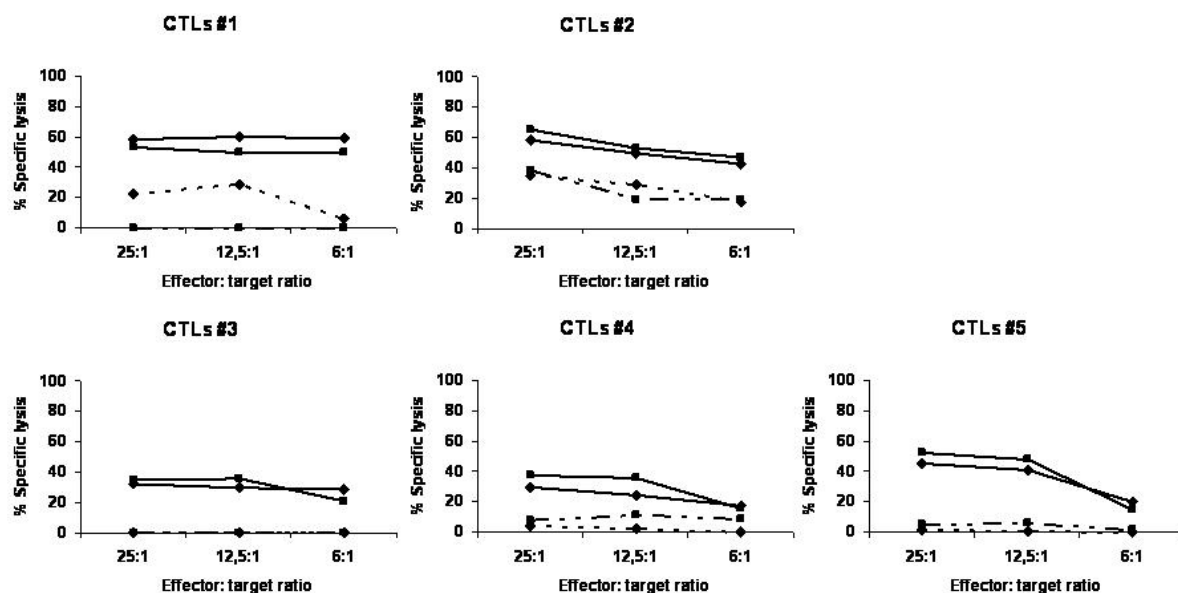


**Figure 2. Cytolytic activity of anti-leukemia CTLs measured after two rounds of leukemia-specific stimulations.** Anti-leukemia CTLs were simultaneously tested against patients LBs (solid line) and against patients FBs (dotted line). Cultures were tested 6-7 days after stimulation, at various effector:target (E:T) ratio; results obtained at three different E:T ratio are reported. ◆ Refers to IL-2-CTLs; ■ refers to IL-15-CTLs.

Anti-leukemia IL-2-CTLs and IL-15-CTLs were then further expanded with the rapid antigen-independent protocol, with the supplementation of either rIL-2 or rIL-15, respectively (Figure 1). CTLs were recovered approximately after 14-15 days of stimulation and their cytotoxic activity was evaluated against LBs and non-malignant cells (Figure 3). IL-2-CTLs and IL-15-CTLs displayed comparable high levels of cytotoxicity against patient LBs, while

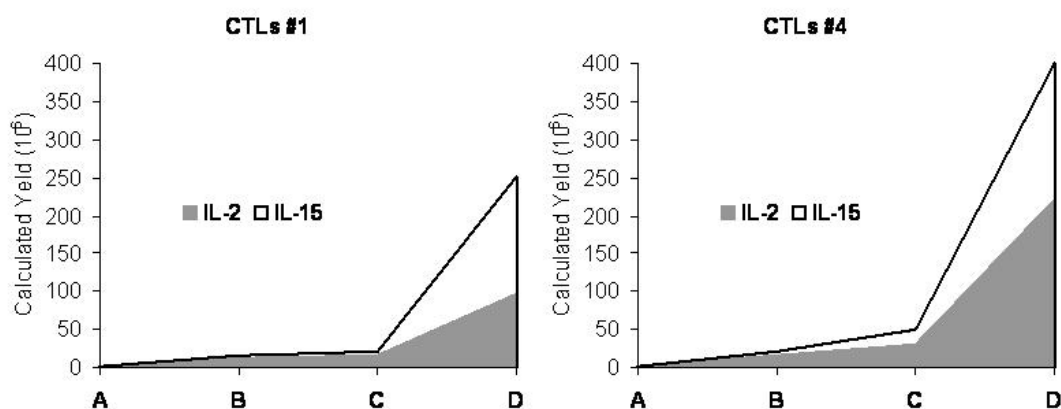


reactivity against recipient non-malignant cells was still much lower at an E:T ratio of 15:1 and virtually absent at an E:T ratio of 1:1. (see Figure 3 for further details).



**Figure 3. Cytolytic activity of antileukemia CTLs measured after antigen-independent expansion.** Anti-leukemia CTLs were simultaneously tested against patients LBs (solid line) and against patients FBs (dotted line). Cultures were tested 13-15 days after stimulation, at various effector:target (E:T) ratio; results obtained at three different E:T ratio are reported. ◆ Refers to IL-2-CTLs; ■ refers to IL-15-CTLs.

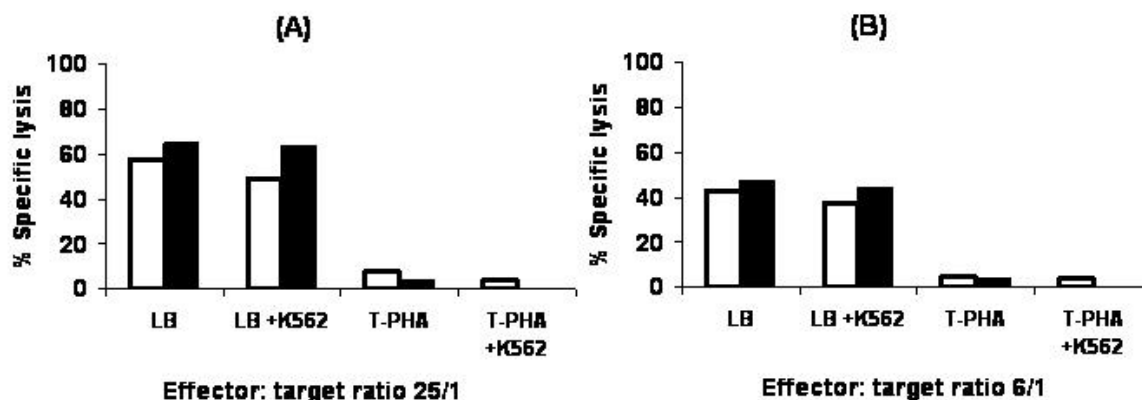
After leukemia-specific stimulations and antigen-independent expansion, both types of CTL lines showed a large expansion in the absolute number of cultured cells (Figure 4). However, the IL-15-CTLs expansion rate (mean 298, range 250-400 fold) was significantly greater ( $p < 0.05$ ) than that of IL-2-CTLs (mean 120, range 70-220 fold).



**Figure 4. Cell recovery after antigen-independent expansion.** Results of IL-2-CTLs and IL-15-CTLs cell expansion are reported; data represent a theoretical calculation based on the expansion rates of the CTL lines. Results referring to  $10^6$  CD8-enriched cells seeded in primary culture are reported. A, Priming phase; B, second LB-stimulation; C, third LB-stimulation; and D, antigen-independent expansion.

#### 7.4.2. Cold target inhibition of cytotoxic activity

Cold inhibition experiments, performed after leukemia-specific and antigen-independent expansion, demonstrated that the addition of K562 cells in the cytotoxicity assay results in a slight inhibition of cytotoxicity against LBs in both IL-2-CTLs and IL-15-CTLs. Moreover, results demonstrated that, when present, cytotoxic activity of anti-leukemia CTL lines against patient non-malignant cells was almost completely abrogated by the addition of cold K562 during the cytotoxicity assay. Representative results of the cytotoxic activity displayed by IL-2-CTLs and IL-15-CTLs #2 are shown in Figure 5.



**Figure 5. Cold target inhibition of cytotoxic activity of anti-leukemia CTLs.** Results of a representative experiment of cytotoxic activity displayed by IL-2-CTLs #2 (white column), and IL-15-CTLs #2 (solid column) are reported. Anti-leukemia CTL lines were tested after antigen independent expansion at various effector-target (E/T) ratio; results obtained at E:T ratio of 25:1 (A) and 5:1 (B) are reported. CTL lines were simultaneously tested against LBs alone or LBs plus cold K562 cells and against patient T-PHA alone or T-PHA plus cold K562 cells.

#### 7.4.3. Phenotype characterization of anti-leukemia CTL lines

After two rounds of leukemia-specific stimulation, the proportion of CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> lymphocytes present in IL-2-CTLs was comparable to that observed in IL-15-CTLs, while the percentage of CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> was  $\leq 10\%$  in all CTL lines (Table 2). Moreover, IL-15-CTLs displayed a higher expression of the CD56 molecule (CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> cells) as compared to IL-2-CTLs, even though the difference was not statistically significant. After the antigen-independent expansion, the great majority of effector cells were CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> in both IL-2-CTLs and IL-15-CTLs. In IL-2-CTL #3 line, 35% of CD8<sup>+</sup> cells co-expressed CD4. The percentage of CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> positive cells was still higher in IL-15-CTLs as compared to IL-2-CTLs (although not statistically significant), while the percentage of CD16 was  $\leq 3\%$  (Table 2).

**Table 2.** Surface phenotype of anti-leukemia CTL lines

	CTLs after 2 <sup>nd</sup> leukemia-specific stimulation				CTLs after Ag-independent expansion			
	IL-2-CTLs		IL-15-CTLs		IL-2-CTLs		IL-15-CTLs	
	Mean %	Range %	Mean %	Range %	Mean %	Range %	Mean %	Range %
CD3+CD8+	84	65-99	84	67-96	97	93-100	97	90-100
CD3+CD4+	8	3-9	7	1-10	13	5-35	7	1-10
CD56+	21	3-40	52	31-66	10	2-20	41	18-63
CD3+CD56+	16	3-38	41	27-47	10	2-18	41	18-64
TCR- $\gamma\delta$	7	0-12	8	0-19	22	2-43	24	2-45
CD16+	2	1-3	2	1-3	0.5	0,3-0,8	0,4	0,2-0,8

#### 7.4.4. CD8 memory subsets in anti-leukemia CTL lines

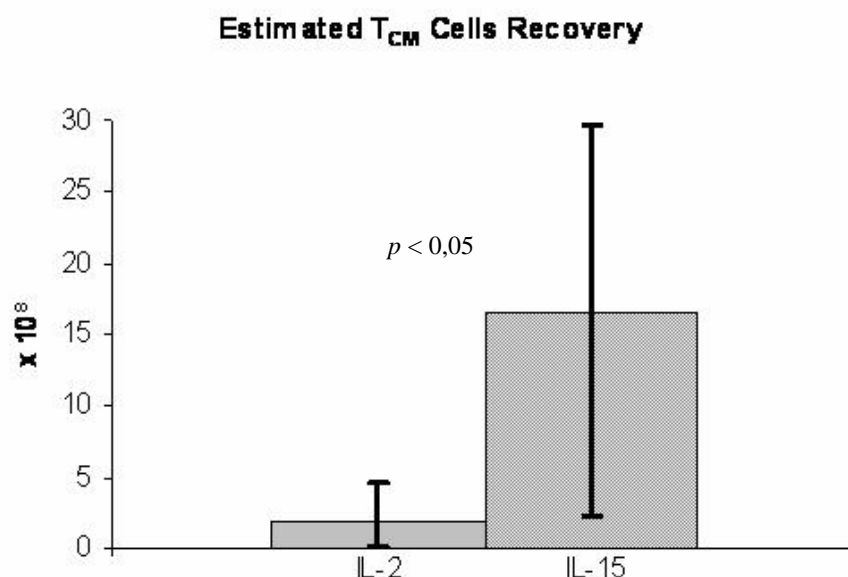
Based on the classification of memory T cells proposed by Geginat et al (22), we evaluated the T-cell memory compartment of *ex vivo* generated anti-leukemia CTL lines. The distribution of memory T cells was evaluated in anti-leukemia CTL lines obtained after one round of antigen-independent expansion (Table 3). As CD3+/CD8+ cells were more than 90% in all CTL lines, memory subsets were evaluated on gated CD8+ cells. Irrespectively of the type of cytokine employed in culture, we documented a predominance of T-effector memory (T<sub>EM</sub>) CD45RA-/CCR7-, (IL-2 35,1%±0,9 vs. IL-15 22,3%±1,4%) and CD45RA+/CCR7- (T<sub>EMRA+</sub>) T cells (IL-2 52,5%±2,1% vs. IL-15 56,8%±1%). Both types of CTL lines also included a measurable number of central memory T cells (T<sub>CM</sub>) CD45RA-/CCR7+, which was higher in IL-15-CTLs as compared to IL-2-CTLs (6,3%±1,4% vs. 1,86%±0,9% p<0.05).

This observation has particular relevance considering that, as already described, cell recovery in IL-15-CTLs was significantly higher than that in IL-2-CTLs. The results of T<sub>CM</sub> recovery are reported in figure 6, in both IL-2-CTLs and IL-15-CTLs after antigen-independent expansion. T<sub>CM</sub> recovery was estimated on the basis of the percentage of T<sub>CM</sub> cells present in the cultures and of cell recovery displayed by the same CTL line. These data confirm that, as

compared to IL-2, IL-15 better promotes the expansion of TCM CD8+ cells ( $p < 0.05$ ) (Figure 6). CD27 and CD62L expression was not significantly different in IL-15-CTLs as compared to IL-2-CTLs (see also Table 3).

**Table 3.** Surface phenotype of gated CD8+ CTLs after antigen-independent expansion

		IL-2 CTL lines	IL-15 CTL lines	
		% Mean $\pm$ SD	% Mean $\pm$ SD	<i>p</i> value
CD45RA+/CCR7+	<b>Naive</b>	10 $\pm$ 2	15 $\pm$ 1	NS
CD45RA-/CCR7+	<b>T<sub>CM</sub></b>	2 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	< 0,05
CD45RA-/CCR7-	<b>T<sub>EM</sub></b>	35 $\pm$ 2	22 $\pm$ 1	NS
CD45RA+/CCR7-	<b>T<sub>EMRA+</sub></b>	53 $\pm$ 2	57 $\pm$ 1	NS
CD62L+		74 $\pm$ 12	54 $\pm$ 5	NS
CD27+		34 $\pm$ 13	41 $\pm$ 9	NS



**Figure 6.** T<sub>CM</sub> cell recovery of anti-leukemia CTL lines after antigen independent expansion. The number of T<sub>CM</sub> present in IL-2-CTLs or in IL-15-CTLs is estimated based on percentages of T<sub>CM</sub> documented after antigen independent expansion and cell recovery of each CTL line. Results of T<sub>CM</sub> recovery refer to 10<sup>6</sup> CD8-enriched cells seeded in primary culture. Columns represent the mean cell recovery value, while bars the standard deviation (SD).

## 7.5. DISCUSSION

The success of adoptive T-cell therapy for the treatment and/or prevention of leukemia relapse after allogeneic HSCT lies on the capacity of donor-derived, *ex vivo* generated, anti-leukemia CTL lines both to display *in vivo* effector functions and to maintain long term self-renewing capacity after encountering leukemia-associated antigens. In this study, we analyzed, in terms of memory and effector T cells, the composition of anti-leukemia CTL lines generated with our previously described method. Moreover, we investigated the role played by IL-15 in influencing the proportion of different subsets of memory T cells in CTL lines, as well as the effect of this cytokine on the specificity and the magnitude of an anti-leukemia T-cell response.

We first demonstrated that anti-leukemia CTL lines, cultured with the addition of either rIL-2 or rIL-15 during the expansion phases, included heterogeneous T-cell subsets, as both memory and effector T cell populations were present. In fact, although in anti-leukemia CTL lines T<sub>EM</sub> and T<sub>EMRA</sub> cells predominate, irrespectively of the type of cytokines used during the culture, a sizeable proportion of CCR7<sup>+</sup> cells is present. In particular, our results clearly show that in IL-15-CTLs, the percentage of CD8<sup>+</sup> cells displaying a central memory phenotype is significantly increased as compared to that observed in IL-2-CTLs. It is known that CCR7, a chemokine receptor that can control homing to secondary lymphoid organs, divides human memory T cells into two functionally distinct subsets. CCR7-negative effector memory cells migrate to inflamed tissues and display immediate effector function. In contrast, CCR7<sup>+</sup> memory cells express lymph-node homing receptors and lack immediate effector functions, but efficiently stimulate DCs and differentiate into CCR7<sup>-</sup> effector cells upon secondary stimulation (22, 23). Results of our study indicate that, even though our previous approach was effective in inducing anti-leukemia CTL lines, the use of IL-15 instead of IL-2 during the expansion phases of the

cultures can improve the quality of anti-leukemia CTL lines, in particular enriching the central memory T cell compartment, which is endowed with self-renewing capacity.

Some studies have documented that the adoptive transfer of T<sub>CM</sub> CD8<sup>+</sup> cells possessing enhanced lymphoid-homing properties provides superior immunity as compared with the transfer of the CCR7-negative T<sub>EM</sub> cell population (24-25). Furthermore, the expression of the costimulatory molecules CD27 and L-selectin (CD62L) results in prolonged expansion, survival and memory differentiation of activated CD8<sup>+</sup> T cells (26). Altogether, these findings suggest that a vast repertoire of memory and effector CTLs may be important for sustaining immediate anti-leukemia activity and also for generating and maintaining immunological memory, able to improve the efficacy of adoptive immune therapy. Results of our study demonstrate that, together with a measurable percentage of T cells displaying a central memory phenotype, anti-leukemia CD8<sup>+</sup> CTLs also express sizeable numbers of both CD62L and CD27 molecules, suggesting their potential role in efficiently mediating not only immediate effector function, but also a long term anti-leukemia effect *in vivo*.

Evidence obtained in mouse and human models indicates that the use of endogenous IL-15 prolongs the survival and proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells and can enhance their antitumor efficacy (6,19, 24, 27-30). An important advantage of IL-15 in sustaining the proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells is the contribution of this cytokine to the maintenance of memory T cells. In fact, it has been shown that IL-15 stimulates the proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells with a memory phenotype, although it is less clear whether it contributes to the persistence of antigen-primed cells in secondary lymphoid organs in murine and human models (24, 31-32). In agreement with these data, we demonstrated, in a human *in vitro* model that IL-15-CTLs contain significantly greater numbers of CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> and display a level of cytotoxic activity against LBs comparable to that of IL-2-CTLs, without loss of leukemia specificity. In addition, another clear difference we observed was the higher cell recovery obtained in IL-15-CTLs as

compared with IL-2-CTLs. It has been described that IL-15 induces the expression of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins in resting CD8<sup>+</sup> cells, with overlapping but distinct effects on *naïve* and memory cells (31). This mechanism is important for the turnover of antigen-specific memory T cells and may explain the higher proliferative rate obtained *in vitro*.

CD56 is a neural cell adhesion molecule-1 present in NK cells, associated with interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) production and with a potent antitumor effect (33). IL-15 is known to expand NK cells and also CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cells co-expressing CD56. Moreover, it has been described that expression of CD56 on T cells is associated with an increased ability to proliferate in response to IL-15 and to become highly activated effectors (34). We observed a high co-expression of CD56 on CD8<sup>+</sup> T cell lines cultured with IL-15, which was not associated with an increased alloreactive cytotoxic activity against patient non-malignant cells.

Altogether, our results confirm the possibility of generating long-term anti-leukemia CTL lines from HLA-matched or disparate bone marrow donors by means of a priming phase, followed by two rounds of leukemia-specific stimulation and one round of antigen-independent expansion, supplemented with either rIL-2 or rIL-15 during all phases of expansion. In addition, we demonstrated that these lines are heterogeneous regarding memory T cell subsets, and even though they possess high cytotoxicity activity with an effector phenotypic profile, we were able to obtain a sizeable number of less differentiated cells with characteristics of memory T cells. In particular, and to the best of our knowledge, this is the first study documenting the possibility of generating and expanding human anti-leukemia CTLs *ex vivo*, which include, together with effector cells, also a sizeable number of T<sub>CM</sub> CD8<sup>+</sup> cells. As compared to rIL-2, rIL-15 seems to be superior not only in generating T<sub>CM</sub> cells, but also in enhancing cytotoxicity and cell recovery of CTLs. While T<sub>EM</sub> cells represent a readily available pool of antigen-primed cells, which can enter peripheral tissues with high



cytotoxic function, T<sub>CM</sub> cells represent a clonally expanded antigen-primed population, which travels to secondary lymphoid organs and, upon secondary challenge, can efficiently generate a new wave of effector cells.

A better understanding of T-cell memory subtypes in anti-leukemia CTL lines may provide useful information for the enhancement of the long-term survival of these cells and, consequently, the immune-mediated response. Moreover, the possibility of influencing the distribution of memory and effector T-cell subtypes may allow the optimization of adoptive immunotherapy results.

## 7.6. REFERENCES

1. Locatelli F, Burgio GR. Transplant of haematopoietic stem cells in childhood: where we are and where we are going. *Haematologica* 1998; 83:550-563.
2. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990; 76:2462-2465.
3. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusion in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow transplantation Working Party Chronic Leukemia. *Blood* 1995; 86:2041-2050
4. Collins RHJ, Shpilberg O, Drobyski WR et al. Donor leukocyte infusion in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1997; 15:433-444.
5. van Rhee F, Lin F, Cullis O, et al. Relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplant: the case for giving donor leukocyte transfusion before the onset of hematological relapse. *Blood* 1994; 83:3377-3383.
6. Brentjens RJ, Latouche JB, Santos E, Marti F et al. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med* 2003; 9:279-286.
7. Cooper LNJ, Topp MN, Serrano LM et al. T-cell clones can be rendered specific for CD19:toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect. *Blood* 2001; 101:1637-1644.
8. Falkenburg JH, Wafelman AR, Joosten P et al. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 1999; 94: 1201-1208.
9. Locatelli F, Comoli P, Montagna D, Rossi F, Daudt L, Maccario R. Innovative approaches of adoptive immune cell therapy in paediatric recipients of haematopoietic stem cell transplantation. *Best Prac R Clin Hematol* 2004; 17: 479-492.
10. FalkenburgJH, Willemze R. Minor histocompatibility antigens as targets of cellular immunotherapy in leukemia. *Best Pract Clin Haematol* 2004; 17:415-25.
11. Montagna D, Maccario R, Locatelli F et al. Ex vivo priming for long term maintenance of anti-leukemia human cytotoxic T cells suggests a general procedure for adoptive immunotherapy. *Blood* 2001; 98:3359–3366.

12. Montagna D, Maccario R, Montini E, et al. Generation and ex vivo expansion of cytotoxic T lymphocytes directed toward different types of leukemia or myelodysplastic cells using both HLA-matched and partially matched donors. *Exp Hematol* 2003; 31:1031-1038.
13. Montagna D, Daudt LE, Locatelli F, Montini E, Turin I, Lisini D, Giorgiani G, Bernardo ME, Maccario R. Single-Cell Cloning of Human, Donor-Derived Antileukemia T-Cell Lines for In vitro Separation of Graft-versus-Leukemia Effect from Graft-versus-Host Reaction. *Cancer Res* 2006; 66:7310-6.
14. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC et al. Adoptive transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2005; 23:2346-2357.
15. Yee C, Thompson JA, Byrd D et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Nat Acad Sci* 2002; 99:16168-73
16. Becknell B, Caligiuri M. Cancer T cell expand. *Nat Med.* 2003; 9:257-258.
17. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: functions, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:745-63.
18. Lodolce JP, Boone DL, Chai S et al. IL-15 receptor maintains lymphonoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 1998; 9: 669-676.
19. Alves NL, Hooibrink B, Arosa FA, van Lier RAW. IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8<sup>+</sup> T cells in vitro. *Blood* 2003; 102: 2541-2546.
20. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic is maintained by granulocyte/macrophage colony stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor - alpha. *J Exp Med* 1992; 176:1693-1702.
21. Montagna D, Schiavo R, Gibelli N, et al. Ex vivo generation and expansion of anti-tumor cytotoxic T-cell lines derived from patients or their HLA-identical sibling. *Int J Cancer* 2004; 110:76-86.
22. Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8<sup>+</sup> memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* 2003; 102:4260-4266.

23. Iezzi G, Scheidegger D, Lanzavecchia A. Migration and function of antigen-primed nonpolarized T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 2001; 193:987-993.
24. Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC, Wrzesinski C et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8<sup>+</sup> T cells. *J Clin Invest* 2005; 115:1616-1626.
25. Wherry EJ, Teichgraber V, Becker TC, Masopust D, Kaech M, Antia R, von Adrian UH, Ahmed R. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* 2003; 4:225-234.
26. Masopust D, Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. The role of programming in memory T-cell development. *Curr Opin Immunol* 2004; 16:217-225.
27. Schluns K, Lefrançois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:269-279.
28. Schluns K, Williams K, Ma A, Zheng XX, Lefrançois L. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol* 2002; 168:4827-4831.
29. Anichini A, Scarito A, Molla A, Parmigiani G, Mortarini R. Differentiation of CD8<sup>+</sup> T cells from tumor-invaded and tumor-free lymph nodes of melanoma patients: role of common  $\gamma$ -chain cytokines. *J Immunol* 2003; 171:2134-2141.
30. Alpdogan O, Eng JM, Muriglan SJ, Willis LM, Hubbard VM, Tjoe KH, Terwey TH, Kochman A, van den Brink RM. Interleukin-15 enhances immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2005; 105:865-873.
31. Berard M, Brandt K, Paus SB, Tough DF. IL-15 Promotes the survival of naïve and memory phenotype CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2003; 170: 5018-5026.
32. Weng NP, Liu K, Catalfamo M, Li Y, Henkart PA. IL-15 is a growth factor and an activator of CD8 memory T cells. *Ann NY Acad Sci* 2002; 975:46-56.
33. Ohkawa T, Seki H, Dobashi H, Koike Y et al. Systematic characterization of human CD8<sup>+</sup> T cells with natural killer cell markers in comparison with natural killer cells and normal CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunol* 2001; 103: 281-290.
34. Cookson S, Reen D. IL-15 drives neonatal T cells to acquire CD56 and become activated effector cells. *Blood* 2003; 102:2195-2197.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo principal a análise da distribuição dos subtipos de células T da memória imunológica adaptativa em culturas de linfócitos T citotóxicos humanos com atividade anti-leucemia gerados e expandidos *ex vivo*. Segundo nosso conhecimento, este parece ser o primeiro estudo que avalia esta população de linfócitos humanos em culturas geradas *ex vivo* através de um protocolo já estabelecido para ser utilizado como estratégia de imunoterapia celular adotiva. Segue o conceito atual proposto para estas estratégias que visa, além da citotoxicidade imediata obtida com a transferência de grande quantidade de células efetoras específicas, a manutenção deste efeito a longo prazo. Paralelamente a avaliação das populações T, o presente estudo também propôs uma modificação do protocolo inicial pela adição da interleucina-15 em substituição à interleucina-2, usualmente utilizada para a geração e expansão de linfócitos T citotóxicos.

Tratou-se de um ensaio laboratorial experimental com um número limitado de pacientes devido às características da população e disponibilidade técnica. Entretanto, apesar do *n* limitado, trouxe algumas observações pertinentes e com significado estatístico. A principal observação diz respeito à característica dos subtipos de linfócitos T da memória encontrado nas culturas. A presença de um número estimado de células apresentadas aos antígenos, porém menos diferenciadas e que expressam marcadores de superfície direcionados ao tráfico celular para os tecidos linfáticos secundários pode significar a manutenção da resposta imune por um período longo. Este efeito já foi observado em modelos animais, nos quais a diferenciação *in vivo* parece ser mais efetiva em controlar o crescimento tumoral imediato e manter este controle por mais tempo, mas ainda não foi claramente estabelecido em humanos. Novas pesquisas em modelos animais e, principalmente em humanos, serão

necessárias para avaliar melhor o papel das subpopulações de linfócitos e o restabelecimento da resposta imune e da vigilância anti-tumoral.

Outro resultado mostrado por este estudo foi a manutenção da atividade citotóxica para tipos variados de células leucêmicas como demonstrado previamente. O protocolo utilizado permitiu a geração de LTC de 4 pacientes pediátricos portadores de LMA e 1 de LLA, demonstrando que a utilização de células leucêmicas apoptóticas pode ser vantajosa ao favorecer maior número de pacientes. O uso dos blastos leucêmicos como células estimuladoras para a geração de LTC anti-leucemia, independente da identificação de um único antígeno neoplásico, também pode ser vantajoso por desenvolver uma resposta policlonal e não específica para um determinado antígeno. Talvez este possa ser um importante mecanismo para evitar o escape da célula tumoral à vigilância imunológica e, desta forma, reduzir a probabilidade de recaída leucêmica ao estabelecer uma resposta anti-leucêmica mais ampla.

A adição de outra citoquina, no caso a IL-15 em substituição a IL-2, manteve a atividade citotóxica das culturas sem aumentar a citotoxicidade contra as células não leucêmicas. Uma vez que IL-15 também está associada à expansão e a ativação das células NK, o seu uso nos protocolos de geração de LTC poderia aumentar a resposta alorreativa não específica. Entretanto, este estudo não observou este fenômeno, provavelmente porque a dose de IL-15 usada foi baixa. Mesmo sem aumentar a citotoxicidade contra as células não-leucêmicas, houve aumento da expressão da molécula CD56 que está associada ao fenótipo NK. Estudos comparativos com diferentes doses das interleucinas usadas para a estimulação celular podem vir a esclarecer as diferenças da resposta celular.

Nas culturas mantidas com IL-15 a recuperação celular foi significamente maior que nas mantidas com IL-2. Este efeito também repercutiu na maior quantidade de células com padrão de linfócitos T da memória central. Assim, tanto o percentual de expressão fenotípica

de células T da memória central quanto a recuperação total destas células nas culturas foi maior no grupo suplementado com IL-15. Estes dados estão de acordo com outros estudos em modelos animais e humanos, nos quais foi demonstrado que a suplementação de IL-15 ao meio de cultura na geração de LTC potencializa a expressão de moléculas relacionadas ao tráfico celular para os tecidos periféricos linfáticos. Este achado caracteriza células menos diferenciadas, capazes de manter a memória imunológica, pois possuem menor potencial proliferativo, porém respondem prontamente a um segundo estímulo antigênico.

O melhor aproveitamento da resposta imune celular e das subpopulações de linfócitos é de grande auxílio para a melhora da imunoterapia celular adotiva. Assim, estratégias futuras que incluam a melhor individualização desta população celular, como a clonagem e seleção dos clones com o fenótipo específico ou através separação *ex vivo* dos linfócitos com menor diferenciação, para posterior transferência *in vivo* possam trazer resultados interessantes nesta área. Uma vez melhor individualizada esta população, seria possível, na aplicação clínica, usar doses ou quantidades de células com características mais efetoras terminais ou com maior capacidade de memória de acordo com a necessidade de cada paciente. A infusão de grande quantidade de células efetoras reduziria drasticamente o volume tumoral num primeiro momento, enquanto a utilização de células menos diferenciadas impediria o ressurgimento da doença através da imunovigilância e controle da doença residual mínima por anos e poderia ser utilizada para a manutenção deste efeito.

Outro aspecto a ser explorado seria o papel das diversas citoquinas na regulação, geração, expansão e manutenção dos LTC anti-leucemia. Apesar de compartilhar parte do mesmo receptor, existem diferenças na resposta celular entre a IL-2 e a IL-15. Enquanto altas doses de IL-2, usualmente utilizadas para geração de LTC, permitem a obtenção de grande quantidade de células T reativas ao tumor com características diferenciadas, o uso da IL-15 separa a diferenciação da proliferação, permitindo a geração *in vivo* de células menos

diferenciadas, porém mais efetivas. As vantagens observadas nas culturas suplementadas com IL-15 devem ser confirmadas na utilização *in vivo*, bem como a melhor dose a ser utilizada. Igualmente, o papel de outras interleucinas poderá ser explorado, a citar a IL-7 que parece, também, desempenhar um efeito anti-apoptótico e favorecer a população de linfócitos T da memória central.

Além de fornecer informações importantes a respeito do funcionamento do sistema imune e da resposta antigênica, o aperfeiçoamento das estratégias de imunoterapia celular adotiva anti-leucemia com técnicas mais eficientes e simplificadas poderá beneficiar um número sempre maior de pacientes com doenças de risco e refratárias às terapias convencionais, melhorando significativamente os resultados do alo-TCTH e aumentando a sobrevida destes pacientes.