

**ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T
ATRAVÉS DA TÉCNICA LDA EM CULTURAS
IRRADIADAS ENTRE ZERO E 500 cGy¹**

***T-CELLS FREQUENCY STUDY BY LDA TECHNIQUES IN
IRRADIATED CULTURES FROM ZERO TO 500 cGy***

**Renato José Martini Filho²
Evamberto Garcia de Góes³
Vania Elisabeth Barlette⁴
Dimas Tadeu Covas⁵
Maristela Delgado Orellana⁵**

RESUMO

A doença enxerto-versus-hospedeiro associada à transfusão (DEVH-AT) é uma reação transfusional fatal que é causada pela presença de células T viáveis no sangue do doador. A DEVH-AT não responde a nenhum tipo de terapia e a melhor metodologia de prevenção é a desativação das células T através da irradiação do sangue antes da transfusão. Ainda não é conhecido o número mínimo de células T necessário para desencadear a DEVH-AT. Assim, é importante conhecer a relação entre a dose de radiação que o sangue absorve e o número de células T que permanece viável após a irradiação. A técnica Análise por Limite de Diluição (LDA) tem sido utilizada para caracterizar frequências de células T residuais viáveis em cultura. Neste trabalho, realizaram-se experimentos e cálculos teóricos LDA com dose entre zero e 500 cG, utilizando o modelo de Poisson de uma única chance. O objetivo desses estudos foi estimar a frequência de proliferação de células T irradiadas para a dose investigada. Foram consideradas diluições seriadas de razão 4 e 2 para os estudos experimentais e teóricos, respectivamente. Resultados preliminares indicam que não ocorreram perdas de informação quando experimentos LDA foram realizados utilizando-se diluições seriadas de razão 4.

Palavras-chave: células T imunocompetentes, raios gama, DEVH-AT.

¹ PROBIC - UNIFRA.

² Cursos de Física Médica. UNIFRA.

³ Orientadore.

⁴ Co-orientador.

⁵ Colaborador.

ABSTRACT

Transfusion associated graft-versus-host disease (TA-GVHD) is a fatal reaction caused by viable T-Cells which is present in the blood transfused. Irradiation of whole blood and blood components before transfusion is currently the only accepted methodology to prevent TA-GVHD. The minimal number of the T-Cells necessary to cause TA-GVHD has not been determined. Therefore, the relationship between dose and the residual number of viable T-Cells is important to determine the appropriated dose for TA-GVHD preventing. Dose-response data from limiting dilution techniques (LDA) have been used to detect immunocompetent cells in microcultures. In this work, LDA frequency estimations were obtained using single-hit Poisson model for irradiated cells in a range of zero to 500 cGy. Calculated results from zero to 500 cGy using geometrical dilutions series of ratio 2 have indicated that there was not significant gain in additional information related to experimental data using geometrical series of ratio 4.

KEY WORDS: immunocompetent T-Cells, gamma rays, TA-GVHD.

INTRODUÇÃO

A Técnica Análise por Limite de Diluição (LDA) é utilizada para determinar a frequência de células imunocompetentes presentes em uma cultura celular. Na técnica LDA específica, com base no modelo de Poisson de uma única chance, uma única célula imunocompetente é suficiente para gerar uma resposta positiva. Nesse modelo, assume-se que: a) células imunocompetentes estão diluídas em doses (quantidade de células) limites; b) cada célula imunocompetente gera uma resposta detectável; e, c) todos os outros tipos de células e fatores de culturas estão diluídos em doses não limitantes. A técnica LDA é um bioexperimento capaz de detectar resposta imune positiva ou negativa, para cada cultura, dentro de conjuntos de réplicas de culturas que contenham diferentes doses de células testes. A análise dos dados referentes a dose-resposta é usada para determinar a frequência de células imunocompetentes em uma população de células teste. Uma das mais importantes aplicações da técnica LDA é a detecção de células T imunocompetentes, presentes em unidades de hemocomponentes a serem transfundidas para pacientes imunocomprometidos. Dependendo do grau de disparidade HLA (antígenos dos leucócitos humano) entre doador e receptor, do número de células T presentes no sangue a ser transfundido, e da susceptibilidade do receptor de não rejeitar o enxerto, este tipo de célula pode montar uma resposta imunológica severa contra o paciente. Esse tipo de reação transfusional, fatal em até 90 % dos casos, é conhecida como Doença Enxerto-Versus-Hospedeiro Associada à Transfusão (DEVH-AT).

A DEVH-AT pode ser prevenida através da remoção dos leucócitos do sangue a qual é realizada por uma variedade de técnicas, incluindo sedimentação, centrifugação, lavagem, congelamento, e filtros de leucoredução. Procedimentos de congelamento de hemácias reduzem a contaminação por leucócitos de um a $2 \log_{10}$ [dos leucócitos inicialmente presentes na amostra], mas não os eliminam totalmente, sendo que células remanescentes mostram-se mitoticamente ativas (CROWLEY et al., 1974). Nenhum caso da DEVH-AT foi registrado envolvendo transfusão de hemácias congeladas e deglicerolizadas, no entanto não se tem nenhuma estimativa do risco a que pacientes susceptíveis a DEVH-AT são submetidos quando transfundidos com hemácias que foram armazenadas desta maneira (PRZEPIORKA et al., 1996). O uso de filtros, de segunda e terceira gerações, não conseguem uma leucoredução maior que 3 a $4 \log_{10}$ [dos leucócitos inicialmente presentes na amostra], sendo que casos da DEVH-AT letal ocorreram após a transfusão de hemácias administradas através destes filtros (HAYASHI et al., 1993). Uma vez que não se consegue uma remoção física das células T em quantidade suficiente para a prevenção da DEVH-AT, é possível conseguir-se uma metodologia de prevenção através do desarmamento do potencial proliferativo destas células antes da transfusão. O uso das radiações ionizantes é capaz de produzir quebras cromossômicas e inibir atividades mitóticas e transformações blásticas das células T (SPRENT et al., 1974), impedindo-se que estas células ataquem receptores susceptíveis.

Assim, para o sucesso na prevenção da DEVH-AT através da irradiação dos hemocomponentes, antes da transfusão, é importante determinar-se a redução da frequência de proliferação das células T em função da dose de radiação (raios X ou gama). Com o objetivo de comparar a eficiência da técnica LDA em experimentos contendo células T irradiadas (em intervalos de dose entre zero e 500 cGy) e diluídas segundo uma série geométrica de razão 4, neste trabalho realizou-se uma série de cálculos teóricos de utilizando o modelo de Poisson de uma única chance. Esse modelo foi utilizado com a finalidade de estimar a frequência de proliferação de células T irradiadas com dose entre zero e 500 cGy. Os resultados preliminares obtidos, para o intervalo de dose entre zero e 500 cGy, indicam que não ocorreram perdas de informações quando experimentos LDA foram realizados utilizando-se diluições seriadas de razão 4.

MATERIAIS E MÉTODOS

PROCEDIMENTOS UTILIZADOS NA COLETA E IRRADIAÇÃO DO SANGUE

Unidade de concentrado de hemácia foi preparada, individualmente, a partir do sangue total coletado de doador voluntário, adulto e saudável, da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto-SP, e armazenada em bolsa plástica PL-146 contendo solução preservativa ADSOL (Fabricante: Baxter Healthcare).

A bolsa de sangue continha, aproximadamente, 250 ml de concentrado de hemácia de doador único. A bolsa foi protegida através de embalagem plástica e armazenada em caixa térmica (dimensões de 20 x 16 x 16 cm), contendo água à temperatura de 2°C. A caixa foi irradiada através de um sistema de irradiação de 2 campos, paralelos e opostos, utilizando-se um equipamento de telecobaltoterapia. A bolsa foi irradiada 10 horas após a sangria com dose de 500 cGy. A liberação da dose foi confirmada através do uso de dosímetro tipo termoluminescente. Antes da irradiação, uma amostra, aproximadamente 50 ml, foi removida da bolsa para ser utilizada como experimento controle.

EXPERIMENTOS LDA

Células mononucleadas foram isoladas das amostras, irradiada e controle, a partir do gradiente de densidade sobre ficoll-hypaque. Elas foram enxaguadas três vezes e resuspendidas em RPMI 1640 (Fabricante: Sigma) contendo 5 % de soro fetal bovino (FSC), penicilina-streptomina, e L-glutamina. As amostras foram plaqueadas de acordo com uma série geométrica de diluições de razão 4, utilizando-se placas de microculturas de 96 poços. Foram preparadas 8 séries de diluições com 12 poços por diluição, para o intervalo de concentração de células entre 6 e 10^5 células por poço. As diluições foram realizadas com base na contagem de células, marcadas com solução de turk, em câmara de Neubauer. A concentração inicial de células, para cada diluição, foi selecionada de maneira que algumas diluições (quantidade de células por poço) fossem informativas (isto é, que todos os poços não fossem 100 % positivos ou 100 % negativos). Cada volume de cultura (200 μ l por poço) foi suplementado com 2,5 mg/ml de fitohemaglutinina (PHA-M - Sigma), 100 unidades/ml de interleucina-2 recombinante humano (IL-2 - Sigma), e um aloestímulo de 10^5 células irradiadas (4.000 cGy) por poço, o qual foi obtido a partir de um associado de concentrado de hemácias de 5 doadores. As culturas foram incubadas à temperatura de 37°C e atmosfera de 5 % de CO₂, durante quatro semanas. Elas foram pulsadas, semanalmente, com uma solução RPMI, contendo 10 % de FCS, e 500 unidades/ml de IL-2. O crescimento de células T foi verificado, visualmente, durante as 4 semanas, através do uso de microscópio de fase invertida. Poços de cultura contendo grumos de células T, com pelo menos 10 células, foram considerados positivos. A frequência f de células T imunocompetentes presentes nas culturas foi estimada a partir do modelo de Poisson de uma única chance descrito a seguir.

DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA PELO MÉTODO DE MINIMIZAÇÃO χ^2

No modelo de Poisson de uma única chance, a probabilidade P_i de encontrar uma resposta (negativa ou positiva) é dada por

$$P_i = \exp(-\phi x_i), \quad (1)$$

em que ϕ é a frequência de células imunocompetentes, x_i é o número de células por cultura para a dose i (TASWEL, 1981). Foi utilizado o procedimento seguido por Taswell para o cálculo da estimativa da frequência ϕ pelo método de minimização χ^2 . A estimativa f é determinada como o valor de ϕ que minimiza

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \frac{[r_i - n_i \exp(-\phi x_i)]^2}{n_i \exp(-\phi x_i) [1 - \exp(-\phi x_i)]} \quad (2)$$

em que N é o número de séries de diluições com poços de culturas nem todos positivos ou nem todos negativos, r_i é o número de culturas com resposta negativa para a dose i , e n_i é o número de réplicas ou culturas para a dose i , de modo que,

$$\frac{r_i}{n_i} = p_i \cong P_i \quad (3)$$

em que p_i é a probabilidade da cultura responder negativamente, ou fração de culturas negativas, e representa uma estimativa da distribuição de Poisson P_i . Então, P_i é aproximado pelo valor experimentalmente observado $p_i = r_i/n_i$. A faixa de valores pesquisada para ϕ ficou entre 1 e 1×10^{-3} . Foram utilizadas 12 réplicas de microculturas ($n_i = 12$), e concentração inicial de 10^5 células por poço diluída de acordo com uma série geométrica de razão 2. No presente estudo, a frequência f foi calculada para o intervalo de dose de radiação entre zero e 500 cGy.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os dados experimentais LDA utilizados para a determinação da frequência f de proliferação das células T irradiadas no intervalo de dose entre zero e 500 cGy, utilizando-se uma série geométrica de diluições de razão 4.

Tabela 1- Dados experimentais LDA utilizados para determinação da frequência de proliferação das células T irradiadas. As diluições foram realizadas de acordo com uma série geométrica de razão 4. Não se aplicou (NA) o cálculo da fração de culturas negativas quando os poços foram todos positivos (TP) ou todos negativos (TN).

Células por cultura (x_i)	Culturas negativas(r_i)		Fração de culturas negativas (p_i)	
	Zero Gy	500 cGy	Zero Gy	500 cGy
6	9	11	0,750	0,916
24	2	10	0,166	0,833
98	TP	8	NA	0,666
390	TP	4	NA	0,333
1.562	TP	TP	NA	NA

A Tabela 2 apresenta os dados calculados para a determinação da frequência f de proliferação das células T irradiadas no intervalo entre zero e 500 cGy, utilizando-se uma série geométrica de diluições de razão 2. O propósito de escolher uma razão intermediária àquela experimental foi o de verificar se a razão experimental utilizada não acarreta em perda de informações sobre a redução da frequência de proliferação das células T devido à irradiação. A Tabela 3 apresenta os valores de f experimental e calculado.

Tabela 2- Dados calculados utilizados para determinação da frequência de proliferação das células T irradiadas.

Células por cultura (x_i)	Culturas negativas (p_i)		Fração de culturas negativas (p_i)	
	Zero cGy	500 cGy	Zero cGy	500 cGy
3	10	TN	0,830	NA
6	9	11	0,750	0,916
12	6	11	0,512	0,914
24	2	10	0,160	0,833
48	1	10	0,051	0,825
98	TP	8	NA	0,666
196	TP	6	NA	0,457
390	TP	4	NA	0,333
780	TP	1	NA	0,048
1.562	TP	TP	NA	NA

Tabela 3- Resultados de χ^2 e f determinados a partir dos dados experimentais e teóricos apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Dose de radiação (cGy)	Experimental		Simulado	
	$f(x10^{-3})$	$\chi^2(f)$	$f(x 10^{-3})$	$\chi^2(f)$
Zero	64,72	0,4384	58,45	0,6414
500	3,909	3,7470	3,730	4,5882

As diluições foram selecionadas de acordo com uma série geométrica de razão 2. Não se aplicou (NA) o cálculo da fração de culturas negativas quando os possos foram todos positivos (TP) ou todos negativos (TN).

De acordo com essa tabela, podem ser feitas as seguintes observações: a) para as culturas contendo células não irradiadas, os dados experimentais mostraram que para cada 15 células plaquedas uma prolifera, enquanto que os dados calculados mostraram que para cada 17 células plaquedas uma prolifera; b) para as culturas contendo células irradiadas com dose de 500 cGy, os dados experimentais mostraram que para cada 256 células plaquedas apenas uma prolifera, enquanto que os dados calculados

mostraram que para cada 268 células plaqueadas apenas uma prolifera. Considerando-se que o limiar de células T necessárias para desencadear a reação DEVH-AT é da ordem de 10^4 células por quilograma de massa do receptor, a diferença observada entre os valores da frequência calculada e experimental não é significativa. Entretanto, convém salientar que diferenças significativas poderão ocorrer quando diluições com número de células por poço mais elevado forem consideradas, quando por exemplo, em uma segunda etapa deste trabalho, forem consideradas simulações da frequência de proliferação de células irradiadas em doses superiores a 500 cGy. Para esses casos, a metodologia proposta neste trabalho utilizando experimentos LDA poderá auxiliar na redução de custos de experimentos LDA em laboratórios de cultura celular (um experimento LDA completo é estimado em US\$ 5.000,00) pois evita experimentos piloto tradicionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CROWLEY, J.P., SKRABUT, E.M., VALERI, C. R., 1974. Immunocompetent Lymphocytes in Previously Frozen Washed red Cells, **Vox Sanguinis**, v. 26, p.513-517.

HAYASHI, M. *et al.*, 1993. Transfusion Associated Graft-Versus-Host Disease Caused by Leukocyte filtered Stored Blood, **Anesthesiology**, v.79, p. 1419-1421.

PRZEPIORKA, D. *et al.*, 1996. Use of Irradiated Blood Components: Practice Parameter, **American Journal of Clinical Pathology**, v.106, p.6-11.

SPRENT, J., ANDERSON, R.E., MILLER, J.F., 1974. Radiosensitivity of T and B Lymphocytes: Effect of Irradiation on Response of T Cells to Alloantigens, **European Journal Immunology**, v.4, p. 202-210.

TASWELL, C. 1981. "Limiting dilution for the determination of immunocompetent cell frequencies", **The Journal of Immunology**, v.126 p. 1614.