

Trabalho de Projeto
Mestrado Integrado em Medicina

**RECETORES KILLER NOS LINFÓCITOS T E NAS CÉLULAS
NATURAL KILLER EM DOENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Maria Amélia da Silva Aleixo

Orientador: Ana Martins da Silva

Coorientadores: Prof. Doutora Berta Martins e Dra. Andreia Bettencourt

Porto 2012

Agradecimentos

Agradeço a Deus, à Família, aos Amigos e a toda a Equipa de investigação.

ÍNDICE

TÍTULO	1
INTERVENIENTES NO PROJETO	1
Instituições, Departamentos e Serviços	1
Unidades e Grupos de Investigação	1
Equipa de investigação	1
Constituição.....	1
Funções e responsabilidades	2
PLANO CIENTÍFICO.....	4
Resumo	4
Introdução.....	6
Fisiopatologia e etiopatogenia da EM.....	6
Epidemiologia e fatores de risco de EM.....	6
Apresentação clínica da EM.....	7
Características clínicas e diagnóstico da doença	8
Medidas de incapacidade e de progressão / severidade da doença	8
Tratamento.....	9
Prognóstico	9
Imunologia da EM.....	10
Enquadramento e justificação	15
Problemas.....	16
Questões	16
Hipóteses de trabalho	17
Objetivos.....	17
Objetivo geral	17
Objetivo específicos	17
Desenho	18
Tipo de estudo.....	18
Universo, população e amostra	18
Seleção dos participantes e critérios de elegibilidade.....	18

PLANO DE TRABALHO	19
Tarefas associadas ao projeto	19
Material e métodos	26
Equipamento, material e reagentes	26
Reagentes e material consumível.....	26
Procedimentos técnicos	27
Calendarização.....	29
Duração.....	29
Datas de início e conclusão	29
Cronograma de execução	29
Indicadores de produção.....	29
Comunicações orais e posters.....	29
Referências bibliográficas	30
PLANO FINANCEIRO.....	36
Orçamento.....	36
Financiamento	36
GLOSSÁRIO.....	37
Abreviaturas e acrónimos	37
ANEXOS	39
EDSS Expanded Disability Status Score.....	40
MSSS Multiple Sclerosis Severity Score	41
Termo de consentimento informado.....	42
Folheto informativo para os participantes.....	43
Formulário de registo dos dados.....	44

TÍTULO

RECETORES KILLER NOS LINFÓCITOS T E CÉLULAS NATURAL KILLER EM DOENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA

INTERVENIENTES NO PROJETO

Instituições, Departamentos e Serviços

Centro Hospitalar do Porto (CHP), Hospital de Santo António (HSA) (HSA/CHP)

- Departamento de Medicina (DM)
 - Unidade de Imunologia Clínica (UIC)
 - Serviço de Hematologia Clínica (SHC)
 - Laboratório de Citometria (LC)
- Departamento de Doenças do Sistema Nervoso e Órgãos dos Sentidos (DDSNOS)
 - Serviço de Neurologia (SN)
 - Consulta de Neuroimunologia (NI)

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS/UP)

- Departamento de Patologia e Imunologia Molecular (DPIM)
 - Laboratório de Imunogenética (LI)

Unidades e Grupos de Investigação

Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB), com sede no ICBAS/UP (UMIB/ICBAS/UP)

- Grupos de investigação da UMIB:
 - “Imunogenética, inflamação e autoimunidade” (IGIA)
 - “Sangue e distúrbios linfopoiéticos e hematopoiéticos” (BLHD)

Centro Hospitalar do Porto (CHP), Hospital de Santo António (HSA) (HSA/CHP)

- Equipas de investigação do CHP:
 - “Imunologia Clínica”

Equipa de investigação

Constituição

Aluna

- M^a Amélia Aleixo: Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC), Curso de Mestrado Integrado em Medicina (MIM), ICBAS/UP e HSA/CHP.

Orientadora

- Dra. Ana Martins da Silva: Médica; Especialista em Neurologia; Assistente Hospitalar; Responsável pela Consulta de NI do SN do DDSNOS do HSA/CHP; Neurologista da Unidade de Imunologia Clínica; Investigadora da UMIB/ ICBAS/UP.

Coorientadores

- Prof. Doutora Berta Martins: Professora do ICBAS/UP; Responsável pelo Laboratório de Imunogenética do DPIM do ICBAS/UP; Investigadora responsável pelo grupo IGIA do UMIB/ ICBAS/UP.
- Dra. Andreia Bettencourt: Bolseira de Investigação do ICBAS/UP; Investigadora da UMIB/ ICBAS/UP (grupo IGIA).

Supervisora

- Prof. Doutora Margarida Lima: Médica; Professora Convidada do ICBAS/UP, responsável pela DIIC do MIM.

Coinvestigadores

- Prof. Doutora Margarida Lima: Médica, Especialista em Imunohemoterapia; Assistente Hospitalar Graduada; Responsável pelo LC do SHC do DM do HSA/CHP; Investigadora responsável pelo grupo BLHD da UMIB/ ICBAS/UP; Professora Convidada do ICBAS/UP.
- Téc. Marlene Santos: Técnica de Diagnóstico e Terapêutica, Análises Clínicas; LC do SHC do HSA/CHP; Investigadora da UMIB/ ICBAS/UP (grupo BLHD).
- Dra. Ernestina Santos: Médica; Especialista em Neurologia; Assistente Hospitalar; Responsável pela Consulta de NI do SN do DDSNOS do HSA/CHP; Investigadora da UMIB/ ICBAS/UP.
- Dra. Andreia Bettencourt: Bolseira de Investigação do ICBAS/UP; Investigadora da UMIB/ ICBAS/UP (grupo IGIA).

Funções e responsabilidades

- M^a Amélia Aleixo: Responsável pela conceção orientada do trabalho, recolha dos dados e elaboração do respetivo relatório.
- Dra. Ana Martins da Silva: Responsável pela orientação do trabalho e, enquanto neurologista responsável pela consulta de NI e investigadora, responsável pela informação dos doentes, obtenção do consentimento informado e supervisão da recolha de dados clínicos.

- Prof. Doutora Berta Martins: Responsável pela coorientação do trabalho, relativamente à vertente laboratorial e pelo fornecimento dos dados imunogenéticos dos doentes com EM.
- Dra. Andreia Bettencourt: Responsável pela coorientação do trabalho no que respeita aos estudos imunogenéticos e, enquanto investigadora, pelo apoio técnico a nível do LI do DPIM do ICBAS/UP.
- Prof. Doutora Margarida Lima: Responsável pela supervisão global do trabalho e pelo seu enquadramento na DIIC, enquanto regente da disciplina; responsável pelo planeamento, supervisão e interpretação das análises efetuadas no LC do SHC do HSA/CHP, enquanto investigadora.
- Dra. Ernestina Santos: Responsável pela informação dos doentes, obtenção do consentimento informado e supervisão da recolha de dados clínicos, enquanto neurologista da Consulta de NI e investigadora.
- Téc. Marlene Santos: Responsável por efetuar as análises no LC do SHC do HSA/CHP e colaborar na análise dos respetivos resultados.

PLANO CIENTÍFICO

Resumo

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença que atinge adultos jovens a partir da interação entre uma predisposição genética e um conjunto de fatores não genéticos, de natureza ambiental. É considerada uma doença autoimune em que, numa fase inicial, é preponderante a ativação de linfócitos T (LT) CD4⁺ autorreativos e a sua diferenciação num fenótipo Th1. Contudo, propõe-se que o dano observado no tecido alvo, o sistema nervoso central, seja mediado por outros componentes do sistema imune, como anticorpos, complemento, LT CD8⁺ e células da imunidade inata, como as células *natural killer* (NK) (CNK). Tem sido sugerido que os LT citotóxicos e as CNK estão implicados na etiopatogenia da EM através da modulação da ativação e sobrevivência dos LT autorreativos, das células da microglia e dos astrócitos. Este efeito pode ser decorrente de uma citotoxicidade direta mediada pelas subpopulações de CNK CD56⁺fraco e de LT citotóxicos CD56⁺, quer indiretamente, através da produção de citocinas, fundamentalmente da responsabilidade das CNK CD56⁺forte, dos LT Th1 e dos LT citotóxicos CD56⁺. Os recetores *killer* das CNK e dos LT citotóxicos condicionam a função destas células através do equilíbrio entre os seus sinais inibidores e ativadores. A maioria destes recetores tem como ligandos moléculas da classe I do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC, *Major Histocompatibility Complex*; nos humanos, HLA, *Human Leucocyte Antigens*) ou moléculas relacionadas. Dos poucos estudos existentes acerca do envolvimento destes recetores na patogénese da EM, verifica-se uma diminuição da frequência do ligando HLA Bw4, uma diminuição da frequência do recetor inibidor KIR2DL1 (*killer Immunoglobulin-like receptors*, recetores *killer* tipo Ig) com o ligando HLA C2, e uma frequência mais elevada do recetor ativador KIR2DS4. O haplótipo DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 do HLA é o único fator genético de suscetibilidade confirmado em todas as populações de doentes com EM estudadas. Na população que se pretende estudar foi observada uma maior frequência do alelo DRB1*15, seguido do DRB1*03 e uma associação negativa com o DRB1*09 assim como com o alelo HLA-A*02.

Este trabalho tem como objetivo a caracterização da expressão e da distribuição de recetores *killer* dos LT, em particular nas subpopulações CD56⁻ e CD56⁺, e das CNK, nomeadamente nas subpopulações CD56⁺fraco e CD56⁺forte, em doentes com EM em comparação com a observada num grupo controlo. Os dados obtidos serão correlacionados com variáveis demográficas, clínicas e imunogenéticas.

Este estudo vai ser realizado na Consulta de Neuroimunologia do Serviço de Neurologia do Hospital de Santo António, (HSA/CHP), com a colaboração do Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica HSA/CHP e do Laboratório de Imunogenética do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS/UP).

Introdução

A **esclerose múltipla (EM)** é uma doença de natureza autoimune e degenerativa do Sistema Nervoso Central (SNC). O início dos sintomas surge mais frequentemente nos adultos jovens, sobretudo entre os 20 e os 40 anos (Sospedra *et al.*, 2005). A sua etiologia continua desconhecida, propondo-se a interação entre componentes genéticos e ambientais (Fusco, 2010).

Fisiopatologia e etiopatogenia da EM

Os **mecanismos fisiopatológicos** subjacentes à EM são a inflamação, a desmielinização e a degeneração axonal (Compston, 2008). A teoria mais aceite refere que esta patologia se inicia através de uma alteração inflamatória autoimune mediada por linfócitos autorreativos (Weiner, 2004; Roach, 2004), levando à ativação das células da microglia e à degeneração neuroglial crónica (Compston, 2008). Existem teorias alternativas que propõem uma etiologia imune devido a uma possível infeção viral crónica (Roach, 2004), ou a um processo degenerativo neuroglial determinado geneticamente (Chaudhuri *et al.*, 2004).

Devido ao facto da patogénese da EM envolver o sistema imune, tem sido colocada a hipótese do envolvimento de um estímulo imunológico, como a vacinação. Contudo, vários estudos apontam para a inexistência desta associação (Ascherio *et al.*, 2001; Confavreux *et al.*, 2001, Hernan *et al.*, 2006). Apesar de ter sido investigada a implicação de diversos vírus, apenas se verifica uma associação significativa com o vírus de Epstein Barr (Thacker *et al.*, 2006; Levin L. *et al.*, 2005), ainda que os dados observados sejam contraditórios quanto à presença de infeção no tecido cerebral. Em alguns estudos também se verifica uma ligação ao Vírus da Varicela-Zoster, em particular nas exacerbações, requerendo uma investigação mais aprofundada para a sua confirmação (Sotelo *et al.*, 2008). Outra hipótese (“da higiene”) propõe que as infeções nos primeiros anos de vida podem modular a suscetibilidade para as doenças autoimunes como a EM (Bach *et al.*, 2002).

Epidemiologia e fatores de risco de EM

Relativamente aos **fatores de risco**, a EM é mais prevalente no género feminino. Segundo um estudo de revisão (Alonso *et al.*, 2008), a taxa de incidência de EM nas mulheres *versus* homens aumentou de 1.4 para 2.5 entre 1955 e 2000, sugerindo-se a influência de fatores hormonais.

Quanto a fatores geográficos, verifica-se uma variação tanto na incidência como na prevalência (Ebers, 2008). As áreas de alta frequência são a Europa, o sul do Canadá, Estados Unidos da América, Nova Zelândia e sudeste da Austrália. Constata-se também que existe

uma associação entre a latitude e o desenvolvimento de EM, aumentando de sul para norte (Alonso e Hernan, 2008). As pessoas que migram após os 15-16 anos de idade de áreas de alta para áreas de baixa prevalência mantêm o risco, enquanto aqueles que migram ao longo da infância parecem adquirir um risco associado à área para a qual migraram. Contudo, segundo uma revisão recente (Koch-Henriksen *et al.*, 2010) não se verificou o gradiente de latitude no hemisfério norte, apenas sendo observado na Austrália e Nova Zelândia. Uma explicação possível para as variações geográficas na EM relaciona-se com a exposição solar e com o efeito da luz ultravioleta no metabolismo da vitamina D e na sua influência nas células imunorreguladoras (Ascherio *et al.*, 2007). A distribuição geográfica também reflete o nível socioeconómico, tendo ocorrido um aumento das taxas de prevalência nos países mais desenvolvidos. Observa-se também uma associação com os hábitos tabágicos, tanto no desenvolvimento (Franklin *et al.*, 2003) como na progressão da doença (Healy *et al.*, 2009).

Quanto à **suscetibilidade genética**, verifica-se uma concordância nos gémeos monozigóticos de 20 a 39% (Sadovnick *et al.*, 1993), o que indica que fatores não genéticos como o ambiente, agentes infecciosos e comportamentos ou estilos de vida condicionam o seu desenvolvimento. O risco de suscetibilidade de desenvolvimento de EM está primariamente associado aos alelos do Complexo Maior de Histocompatibilidade II (MHC, *Major Histocompatibility Complex*; nos humanos, HLA, *Human Leucocyte Antigens*) que estão localizados no cromossoma 6p21, em particular ao locus HLA-DRB1 (Compston, 1999; Lincoln *et al.*, 2005), podendo também contribuir para esse risco alguns polimorfismos do gene que codifica para o recetor da IL7 (IL-7R) (Hafler *et al.*, 2007; Gregory *et al.*, 2007).

Apresentação clínica da EM

O doente típico é jovem adulto e apresenta dois ou mais episódios clinicamente distintos de disfunção no SNC com resolução parcial (Fauci *et al.*, 2008). O início pode ser agudo ou insidioso. Os **sintomas** são diversos e dependem da localização e da severidade das lesões no SNC, podendo ser do tipo sensitivo, motor, de coordenação e cognitivos.

As alterações da visão que podem ocorrer estão relacionadas com nevrite ótica, hemianópsia bitemporal e oftalmoplegia internuclear. Relativamente a sintomas sensitivos, podem existir parestesias, alterações na sensibilidade vibratória e postural, diminuição da sensibilidade à dor e ao toque leve, podendo verificar-se nevralgia do trigémio e o sinal de Lhermitte (sensação do tipo choque elétrico). Relativamente ao sistema cerebelo-vestibular, pode ocorrer vertigem e nistagmo. Quanto a sintomas motores, podem estar presentes paraparesia e paraplegia, espasticidade, diminuição dos reflexos profundos, amiotrofia e alterações na coordenação. A nível do sistema nervoso autónomo pode ocorrer disfunção dos

esfíncteres, disfunção sexual e aumento da sensibilidade ao calor. Também podem estar presentes na sintomatologia a fadiga, a depressão, a euforia e a disfunção cognitiva.

Características clínicas e diagnóstico da doença

O **diagnóstico** é realizado através da história clínica, com a avaliação das características e evolução dos sintomas, em conjunto com os resultados dos exames auxiliares de diagnóstico (ressonância magnética nuclear, punção lombar e estudo de potenciais evocados) (Fauci *et al.*, 2008). Atualmente existem critérios de diagnóstico, utilizados em ensaios clínicos e na prática clínica, conhecidos como *McDonald revised criteria* (Polman *et al.*, 2005).

Trata-se de uma patologia com grande heterogeneidade clínica, estando definidas 4 formas clínicas de doença, de acordo com o seu curso ao longo do tempo (Lublin e Reingold, 1996):

Exacerbação-remissão (ER): incluem-se neste tipo 85-90% dos casos na apresentação inicial. Caracteriza-se por surtos (episódios de aparecimento agudo de disfunção clínica, que atingem o seu pico ao fim de alguns dias até várias semanas, seguidos de remissão, ocorrendo a resolução dos sinais e sintomas em grau variável; a duração mínima de um surto tem sido estabelecida arbitrariamente em 24 horas), com recuperação completa ou parcial com sequelas e défice residual. Durante os períodos entre os surtos não ocorre progressão da doença. Contudo, a maioria destes doentes evolui para uma fase secundariamente progressiva.

Primariamente Progressiva (PP): representa aproximadamente 10% dos casos na apresentação inicial. Caracteriza-se pela progressão da doença desde o início, com *plateaus* ocasionais e alívio temporário. Ocorre um declínio funcional desde o surgimento, nunca existindo episódios agudos. Estes doentes têm uma distribuição por género diferente, isto é, sem predominância de sexo feminino, têm uma idade de início mais tardia e podem ter um pior prognóstico devido à incapacidade cumulativa.

Secundariamente Progressiva (SP): caracteriza-se por um início ER seguido de progressão, com ou sem surtos ocasionais, remissões minor e *plateaus*. Alguns estudos sugerem que consiste numa fase da tardia da evolução das formas ER, levando a um maior grau de incapacidade neurológica.

Progressiva com surtos (PS): caracteriza-se por progressão contínua desde o início, com um número reduzido surtos identificados clinicamente, com ou sem recuperação.

Medidas de incapacidade e de progressão / severidade da doença

O *score* de incapacidade de Kurtzke (DSS, *Disability Status Score*) e a versão expandida (EDSS, *Expanded Disability Status Score*) (Kurtzke, 1983) (Anexo 1) permitem

quantificar a disfunção dos doentes com EM em 8 sistemas funcionais: piramidal, cerebelar, tronco cerebral, sensorial, intestino e bexiga, visual, cerebral e “outros”. Scores EDSS de 1.0 a 4.5 indicam que o doente mantém a capacidade de deambular, enquanto scores de 5.0 a 9.5 indicam que esta função está comprometida. O EDSS é usado geralmente em ensaios clínicos, mas tem limitações, pois são comuns variações inter e intra resultados. Por exemplo, neste sistema a capacidade para deambular é valorizada em detrimento de outros problemas como o desenvolvimento de demência, perda visual ou fraqueza a nível das mãos. Portanto, há quem recorra a outras medidas de progressão que têm em conta alterações *minor*. O *Multiple Sclerosis Severity Score* (MSSS) (Anexo 2) é um algoritmo que permite relacionar índices de EDSS com a distribuição da incapacidade em doentes com duração de doença comparável (Roxburgh, 2005).

Tratamento

Não existe tratamento curativo da doença. A terapêutica do doente com EM inclui as ações que atrasam a progressão da doença e melhoram a qualidade de vida do doente com o alívio dos sintomas. O tratamento da doença engloba: a) tratamento dos surtos; b) sintomático; c) tratamento modificador da doença. Os medicamentos utilizados e aprovados como modificadores da doença incluem: imunomoduladores, o interferão-beta (IFN- β) e acetato de glatiramero; imunossuppressores (mitoxantrona e fingolimod) e anticorpo monoclonal (natalizumab) (Graber *et al.*, 2010). Estes tratamentos são essencialmente eficazes nas formas ER.

Prognóstico

A forma ER está geralmente associada a um melhor prognóstico do que a forma progressiva (Tremlett *et al.*, 2006). Nos doentes em que a EM se apresenta de forma progressiva desde o início, verifica-se um desenvolvimento mais rápido de incapacidade irreversível (Confavreux *et al.*, 2000). Contudo, após o estabelecimento da irreversibilidade, o tempo de desenvolvimento de incapacidade progressiva não apresenta diferenças entre as 2 formas. Na fase inicial, o grau de incapacidade está mais associado à idade do doente do que ao padrão remitente ou progressivo (Confavreux *et al.*, 2006). Na forma ER, verifica-se que os sintomas iniciais a nível dos esfíncteres se associam a um pior prognóstico. Os fatores que mais condicionam a incapacidade a longo prazo são a recuperação incompleta do primeiro surto, um intervalo de tempo curto entre os primeiros surtos e uma acumulação precoce de incapacidade (Langer-Gould *et al.*, 2006).

Imunologia da EM

Como referido acima, a EM é considerada uma doença autoimune. O conhecimento acerca do envolvimento do sistema imune na EM tem aumentado recentemente, tendo o sistema imune adaptativo um estudo de relevo. Tem sido proposto que linfócitos T (LT) autorreativos específicos para a mielina, principalmente linfócitos Th1 secretores de interferão-gama (IFN- γ) (Baker *et al.*, 1991; Bettelli *et al.*, 2004) e/ou linfócitos Th17 produtores de Interleucina 17 (IL-17) são ativados na periferia por fatores ainda não identificados. Esses linfócitos migram para o SNC, conduzem à desmielinização, perda axonal e disfunção neurológica subsequente (Sospedra e Martin, 2005). Estudos recentes sugerem que o sistema imune inato também está implicado no desenvolvimento e progressão da EM, influenciando a função efectora das células B e T (Weiner, 2008).

As células do sistema imune inato podem atuar quer de forma benéfica ou prejudicial na EM. Por um lado, previnem a autoimunidade através da diferenciação das células T reguladoras e pela secreção de fatores neurotróficos de crescimento. Por outro lado, o sistema imune inato pode ter um papel imunopatogénico através da promoção da diferenciação dos linfócitos Th1 e Th17 que conduzem a eventos inflamatórios agudos associados aos surtos de EM (Gandi, 2010).

Células NK

As células *natural killer* (NK) (CNK), baseando-se na sua linhagem de origem, repertório de recetores e funções efectoras, parecem ser um tipo celular transicional, constituindo uma ponte entre o sistema imune inato e o adaptativo (Lanier, 2005). Estas células são componentes fundamentais na defesa contra células tumorais, células infetadas por vírus e células sob “stress” (Moretta *et al.*, 2002).

As CNK contribuem para as funções efectoras e reguladoras do sistema imune inato através da sua atividade citotóxica, principalmente contra vírus, e devido à sua capacidade de produção de citocinas (Moretta *et al.*, 2008). Existem 2 populações principais de CNK no sangue periférico: as CNK CD56^{fraco} (cerca de 90%) que têm uma função primariamente citotóxica e as CNK CD56^{forte} (<10%) que secretam grandes quantidades de citocinas anti-inflamatórias e têm fundamentalmente uma função “reguladora”.

As CNK também têm um papel preponderante na proteção e reparação do SNC, pois têm a capacidade de produzir fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) e Neurotrofina-3. Nos surtos de EM tem sido descrita uma diminuição da atividade citotóxica das CNK circulantes (Kastrutoff *et al.*,

2003). Nos doentes em surto foi observado um aumento de uma subpopulação de CNK, designada NK2, comparando com as remissões (Takahashi *et al.*, 2001). A mesma subpopulação parece regular negativamente a ativação de LT autorreativos (Takahashi *et al.*, 2004). Mais recentemente, foi observado que outra subpopulação de CNK caracterizada como CD3⁻ CD56⁺ CD4⁻ CD8⁺fraco, estava reduzida nos indivíduos não tratados, assim como no síndrome clínico isolado (De Jager *et al.*, 2008).

Vários estudos sugerem que o efeito benéfico observado com terapêuticas imunomoduladoras e imunossupressoras, como o daclizumab (Bielekova *et al.*, 2006), o interferão beta (IFN- β) (Saraste *et al.*, 2007) e a ciclofosfamida (Rinaldi *et al.*, 2007) pode ser decorrente de um aumento da subpopulação de CNK CD56⁺forte. O envolvimento das CNK na modulação da resposta imune pode estar associado ao padrão de secreção de citocinas (Cooper *et al.*, 2001), mas também pode ser mediado pelas suas propriedades citotóxicas. Tem sido ainda demonstrado que as CNK CD56⁺forte podem estar envolvidas na diminuição da frequência de surtos durante a gravidez, dado que nas mulheres grávidas se observa um aumento deste subtipo e uma diminuição das CD56⁺fraco (Airas *et al.*, 2008).

Recetores killer

A ativação, proliferação e funções efectoras das CNK são reguladas por um repertório de recetores de superfície celular (Spits *et al.* 1998). Estes recetores também são expressos nos LT citotóxicos que têm muitas características semelhantes às CNK, apesar do reconhecimento de antigénios ocorrer de forma diferente, através do recetor da célula T (TCR, *T cell receptor*). Propõe-se que a ação das CNK seja o resultado do balanço entre os inúmeros sinais provenientes de vários recetores. A sua ativação é controlada por recetores inibidores que evitam a estimulação inadvertida e o dano das células normais. O reconhecimento de células alvo por CNK envolve a ligação e a interação entre recetores ativadores e inibidores presentes na sua membrana celular com moléculas de ligação presentes na superfície da célula alvo. No caso de ativação, as CNK respondem reorganizando e libertando grânulos citotóxicos, além da transcrição e secreção de citocinas. Como nos grânulos das CNK ocorre o armazenamento constitutivo de granzimas e perforinas, a sua resposta citotóxica pode ser ativada rapidamente, sem requerer transcrição, tradução ou proliferação celular (Lanier, 2005).

Quanto ao reconhecimento de células alvo, inicialmente, as CNK foram descritas como não restritas às moléculas do MHC, devido à sua capacidade de lisar células que não expressam moléculas MHC ou que expressam moléculas alogénicas. De acordo com a hipótese “*missing-self*” (Ljunggren e Karre, 1990), as CNK efetuam uma imunovigilância das células que apresentam uma diminuição da expressão de moléculas MHC de classe I. Até recentemente, aceitava-se que as CNK lisavam quaisquer células que não expressassem

ligandos MHC de classe I para os seus recetores inibidores (Lanier, 2005). Uma reformulação recente da hipótese “*missing-self*”, postula que CNK vigiam as células anormais, que não expressam ou têm uma expressão reduzida de moléculas MHC de classe I ou uma expressão aumentada de ligandos para recetores ativadores das CNK, tendo-se verificado que a quantidade de proteínas MHC I na superfície da célula-alvo é proporcional ao grau de inibição. No entanto, para desencadear uma resposta citotóxica, é necessária a intervenção de recetores ativadores. As CNK possuem ainda recetores de citotoxicidade natural (NCR, *Natural Cytotoxic Receptors*) que podem desencadear uma resposta ou funcionar apenas como recetores de “coestimulação”, aumentando a sinalização de outros recetores.

Assim, os recetores *killer* podem ser classificados quanto à estrutura, ao tipo de ligando e à função, em quatro grandes grupos:

- Recetores de citotoxicidade natural (NCR, *Natural Cytotoxicity Receptors*)
- Recetores *killer* tipo lectina (KLR, *Killer Cell Lectin-type Receptors*)
- Recetores *killer* semelhantes às Ig (KIR, *Killer Immunoglobulin-like Receptors*)
- Recetores leucocitários semelhantes às Ig (LILR, *Leucocyte Ig-like Receptors*)

Os ligandos podem ser moléculas do MHC da classe I, clássicas ou não clássicas ou moléculas não MHC. Quanto à sua função, as propriedades inibidoras dependem da presença de motivos ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*) no domínio citoplasmático dos recetores; os recetores *killer* com funções ativadoras exercem as suas propriedades através da associação com outras proteínas como a DAP12 (*DNAX activation protein of 12KD*), o FcεRI (recetor para o fragmento Fc da IgE) e a CD3ζ (cadeia zeta do CD3), que contêm domínios ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activatory Motif*), capazes de transmitir sinais ativadores para o interior das CNK.

Genes que codificam para os recetores *killer*

Os genes que codificam para os recetores *killer* fazem parte do Complexo dos Recetores Leucocitários (LCR, *Leucocyte Receptor Complex*) – KIR e LILR – e no Complexo *Natural Killer* (NKC, *Natural Killer Complex*) – KLR e NCR.

Atualmente, a função das CNK e dos seus recetores na autoimunidade do SNC ainda não se encontra completamente esclarecida (Morandi *et al.*, 2008). As CNK *in vitro* demonstram atividade citotóxica contra oligodendrócitos e outras células gliais, como os astrócitos e as células microgliais, durante a inflamação. Esta interação é mediada pelo recetor ativador NKG2D, expresso pelas CNK, e os seus ligandos, como as moléculas relacionadas com as moléculas MHC da classe I, designadas por MICA e MICB (MICA/B, *MHC class I Chain Related Molecules*) e as proteínas de ligação à UL-16 (ULBP, *UL-16 binding proteins*) 1, 2 e 3

expressas pelos oligodendrócitos e astrócitos fetais (Saikali *et al.*, 2007) e também outras moléculas, como os recetores de antígenos associados a função dos linfócitos (LFA-1, *Lymphocyte Function-Associated Antigen 1 Recetor*) e CD45 nos astrócitos (Darlington *et al.*, 2008). As CNK podem promover a morte das células microgliais pela libertação de perforinas através de interações envolvendo os recetores NKG2D e Nkp46 (Lunemann *et al.*, 2008).

Os recetores das CNK inibidores específicos para moléculas do MHC I (p.e. KIR, LILRB1, CD94/NKG2A) controlam a autorreatividade contra células normais, enquanto outros recetores ativadores desencadeiam a secreção de citocinas (p.e. IFN- γ e TNF- α) e a atividade citotóxica através da união aos seus ligandos específicos em condições patológicas como stress celular, infeções virais ou tumores. Alguns recetores são expressos pela maioria das CNK (p.e., NKG2D, NKp30, NKp46) enquanto outros (KIR, NKG2A, NKG2C, LILRB1, etc.) são expressos seletivamente por subpopulações de CNK. A maioria destes recetores também é expressa por algumas sub-populações de LT, principalmente TCR $\alpha\beta^+CD8^+$ e TCR $\gamma\delta^+$, modulando a ativação celular dependente de TCR. Esta distribuição adquire uma enorme variedade uma vez que, em cada indivíduo, existem diferentes subpopulações de CNK com diversas combinações de recetores ativadores e inibidores.

Relativamente à patogénese da EM, o primeiro estudo acerca do papel dos recetores das CNK, mais especificamente os KIR, é recente. Nesse estudo é descrita uma diminuição da frequência do ligando HLA Bw4, independentemente de associações conhecidas com o HLA DRB1*15. Propõe-se então que presença do Bw4 confere proteção relativamente à EM na população norueguesa estudada. O HLA Bw4 é o ligando para o recetor inibidor KIR3DL1. Um défice de HLA Bw4 pode diminuir a funcionalidade das CNK, resultando numa diminuição da resposta às infeções e num aumento da suscetibilidade para a EM. Também se verificou uma tendência para a diminuição do recetor inibidor KIR2DL1 com o ligando HLA C2 e uma frequência mais elevada do recetor ativador KIR2DS4 nos doentes com EM. Os genes ativadores KIR2DS2 e inibidores KIR2DL2 têm tendência a ser encontrados em doentes com maior severidade, apesar de a falta do ligando C1 não estar associada à patologia (Lorentzen *et al.*, 2009).

Num estudo posterior, realizado numa população italiana, foi descrito um possível papel protetor do gene ativador KIR2DS1, sendo essa associação ainda mais forte na presença do seu ligando HLA-C2 (Fusco, 2010).

Noutro estudo (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2010), constatou-se que na forma progressiva, comparando com a ER, há um maior número de LT $CD8^+$ e CNK $LILRB1^+$. A expressão de LILRB1 nas CNK está diretamente associada com a idade e duração da doença e inversamente relacionada com a atividade clínica da EM. A terapêutica com IFN- β associa-se a uma expressão diminuída de LILRB1, KIR e CD56 pelas CNK.

Atualmente, o único fator genético de suscetibilidade para o desenvolvimento da EM é o haplótipo DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 do HLA II (Gödde *et al.*, 2005). Estudos recentes indicam um efeito protetor de alguns alelos do HLA I como o HLA-A*02 e o Cw*05, independentemente do alelo HLADRB1*1501 (Bergamaschi *et al.*, 2010; Brynedal *et al.*, 2007; Yeo e *The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium*, 2007). Quanto aos genes associados aos recetores *killer*, estão identificados 17 loci distintos no cromossoma 19q13.4. O cluster de genes KIR é altamente polimórfico, com genes individuais que apresentam variabilidade alélica, podendo ser observados diferentes combinações entre os tipos ativador e inibidor dos haplótipos herdados. O polimorfismo dos loci dos KIR é análogo ao do MHC, facilitando a adaptação do sistema imune a um ambiente dinâmico (Bashirova *et al.*, 2006). Os genes do HLA I encontram-se no cromossoma 6, sem ligação com os genes KIR que se encontram no cromossoma 19. Portanto, a hereditariedade e a expressão dos genes codificadores dos recetores e respetivos ligandos são fisicamente independentes, sendo então possível que um determinado recetor, o seu ligando, ou ambos possam estar ausentes num dado indivíduo, resultando numa situação funcional nula (Kulkarni *et al.*, 2008). A diversidade haplotípica dos KIR e as interações entre os recetores e ligandos na célula alvo resultam na constituição de um sinal ativador ou inibidor que regula as funções das subpopulações de CNK e de LT CD8⁺ (Middleton *et al.*, 2005), com uma consequente suscetibilidade diferencial para a patologia.

Na população portuguesa, mais especificamente na população de doentes com EM do Hospital de Santo António (Silva *et al.*, 2007), verificou-se que o alelo mais frequente é o alelo DRB1*15, seguido do alelo DRB1*03. Observou-se uma associação negativa com o DRB1*09, assim como com o HLA-A*02 (Silva *et al.*, 2009). Relativamente à frequência dos genes KIR, observou-se uma diminuição da frequência do gene KIR2DS1 (dados não publicados).

Enquadramento e justificação

Este trabalho surge enquadrado nas atividades de investigação clínica da Consulta de NI do SN do HSA/CHP, do Laboratório de Citometria do SHC do HSA/CHP e do Laboratório de Imunogenética ICBAS/UP.

a) A Consulta de NI do SN do HSA/CHP, da responsabilidade da Dra. Ana Martins da Silva tem como principal função o diagnóstico, seguimento e tratamento de doentes com as seguintes patologias: EM, *miastenia gravis*, polineuropatia inflamatória desmielinizante crónica e doentes com doenças autoimunes sistémicas com envolvimento do SNC (ex: Lupus, Behçet, e síndrome antifosfolípido). Relativamente à EM, são assistidos nesta consulta cerca de 450 doentes. A abordagem desta patologia implica uma equipa multidisciplinar que engloba neurologistas (Dra. Ana Martins da Silva e Dra. Ernestina Santos), enfermeira com formação específica, fisiatra, psiquiatra, urologista e neurorradiologista. Para além da atividade assistencial, tem funções formativas (formação de alunos do curso de Medicina do ICBAS, internos de Neurologia ou outras especialidades como Neurorradiologia, Neurocirurgia, Psiquiatria e Fisiatria) e de Investigação, incluindo os projetos de doutoramento das neurologistas da consulta, ensaios clínicos internacionais e colaboração com centros de investigação do exterior.

b) O LC do SHC do HSA/CHP, chefiado pela Prof. Doutora Margarida Lima, é um laboratório vocacionado para o estudo de doenças hematológicas, competindo-lhe a caracterização fenotípica das células hematológicas, por citometria de fluxo. Nos últimos anos diferenciou a sua atividade no estudo dos LT e das CNK, sendo considerado um laboratório de referência nesta área. No LC do SHC do HSA/CHP, foi efetuada a caracterização fenotípica das CNK em diversas situações normais (CNK CD56⁺fraco e CNK CD56⁺forte) (Lima et al., 2001) e patológicas - CNK ativadas em resposta a infeções agudas, infeções crónicas e tumores (Lima et al., 2002; Lima et al., 2004a) e CNK neoplásicas (Lima et al., 2004b). Uma das técnicas do LC, a Técn. Marlene Santos, coinvestigadora deste estudo, está a fazer um trabalho académico de investigação com vista à obtenção de grau de Mestre, com o título: “ESTUDO DO REPERTÓRIO DE RECETORES *KILLER* NAS CÉLULAS NATURAL KILLER DO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS ADULTOS NORMAIS”. Este trabalho já foi aprovado no CHP e o estudo laboratorial está em fase de execução.

c) O LI do DPIM do ICBAS/UP, chefiado pela Prof. Doutora Berta Martins, é um laboratório que pertence ao grupo de investigação “Imunogenética, Inflamação e Autoimunidade” (IGIA) da UMIB/ICBAS/UP. Tem como propósito a ligação entre a investigação básica e a investigação clínica, em colaboração com o HSA. Está vocacionado para o estudo imunogenético de doenças complexas e tem como objetivo identificar novos biomarcadores

para a suscetibilidade à doença, progressão e resposta ao tratamento. Uma das doenças estudadas é a EM, tendo, nos últimos anos, sido publicados vários trabalhos na área da suscetibilidade imunogenética para o desenvolvimento desta patologia (Silva et al., 2007 e Silva et al., 2009). A nível de formação, intervém nos projetos de Doutoramento da Dra. Ana Martins da Silva, orientadora deste estudo, e da Dra. Ernestina Santos, coinvestigadora deste estudo.

Problemas

A etiologia da EM ainda não está completamente esclarecida, pelo que o estudo de possíveis alterações a nível do sistema imune pode traduzir-se num aumento da compreensão desta temática. Apesar do aumento do conhecimento ao longo dos últimos anos, ainda se desconhece o papel concreto das CNK, dos seus recetores e do HLA na EM. É então necessária uma análise detalhada dos recetores altamente polimórficos e da sua relação com os respectivos ligandos na suscetibilidade à EM, salientando a compreensão da resposta imune para o desenvolvimento da doença. A integração das recentes descobertas nesta área pode conduzir à identificação de novos biomarcadores e alvos terapêuticos.

Questões

São várias as questões a investigar:

- Há diferenças entre os doentes com EM e os controlos, no que respeita a:
 - Percentagem e nº absoluto de LT?
 - Percentagem e nº absoluto de LT CD56⁻ e CD56⁺?
 - Percentagem e nº absoluto de CNK?
 - Percentagem e nº absoluto de CNK CD56⁺fraco e de CNK CD56⁺forte?
 - Expressão de recetores *killer* nos LT (CD56⁻ e CD56⁺)?
 - Expressão de recetores *killer* nas CNK (CD56⁺fraco e CD56⁺forte)?
- Há alguma relação entre os parâmetros imunológicos acima mencionados e fatores demográficos?
 - Idade e sexo;
- Há alguma relação entre os parâmetros imunológicos acima mencionados e fatores clínicos?
 - Idade de início, duração da doença, forma da doença, EDSS e MSSS e tipo de tratamento;
- Existe associação entre a suscetibilidade genética e a distribuição de recetores *killer*?

Hipóteses de trabalho

As hipóteses de trabalho são as seguintes:

- a) Há diferenças entre doentes e controlos no que respeita aos parâmetros imunológicos avaliados;
- b) Há relação entre os parâmetros imunológicos avaliados e as características da doença;
- c) Há relação entre os parâmetros imunológicos avaliados e os resultados do estudo imunogenético previamente efetuado.

Objetivos

Objetivo geral

Neste trabalho pretende-se caracterizar as células citotóxicas (Linfócitos T citotóxicos e células *natural killer*) em doentes com EM.

Objetivos específicos

Os principais objetivos específicos são os seguintes:

- Identificar e quantificar os LT e as CNK totais em doentes com EM e comparar com um grupo de controlo;
- Identificar e quantificar as populações de LT (56^- e 56^+) e de CNK (56^+ e 56^{++}) em doentes com EM e comparar com um grupo de controlo;
- Identificar a expressão e distribuição de recetores *killer* nos LT (56^- e 56^+) e nas CNK (56^+ e 56^{++}) de doentes com EM e comparar com um grupo de controlo;
- Relacionar os parâmetros acima descritos com fatores individuais (idade, sexo) e com as características da doença: idade de início, duração, forma (ER, SP, PP), severidade (EDSS, MSSS) e tipo de tratamento;
- Relacionar as características imunogenéticas investigadas em estudos anteriores com a expressão de recetores *killer*.

Com a execução deste projeto, a aluna pretende também, a título pessoal, desenvolver competências relacionadas com a prática da investigação clínica, assim como o enriquecimento de capacidades profissionais e humanas. É também um objetivo pessoal a utilização do projeto na disciplina “Dissertação / Projeto / Relatório de Estágio” do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/UP.

Desenho

Tipo de estudo

Estudo nacional, institucional, de caráter observacional, transversal e analítico, de natureza clínica e laboratorial, feito em seres humanos.

Universo, população e amostra

Universo: Doentes com EM.

População: Doentes com EM da Consulta de Neuroimunologia do HSA/CHP (n=450).

Amostra: 40 doentes com EM. (*)

(*) Para proporcionar uma caracterização segundo diferentes padrões de doença pretende-se que a amostra tenha a seguinte distribuição aproximada: 20 doentes ER, 10 doentes SP e 10 doentes PP.

Controlos: Os controlos serão 30 indivíduos (15 do sexo masculino e 15 do sexo feminino) adultos saudáveis, dadores benévolos de sangue do SHC do HSA/CHP. O estudo dos controlos está a ser efetuado no âmbito do trabalho académico de investigação (dissertação de mestrado) da Técn. Marlene Santos.

Seleção dos participantes e critérios de elegibilidade

Seleção:

A seleção será não probabilística, de conveniência.

Serão incluídos os doentes com EM que frequentem a consulta de NI do HSA/CHP entre 1 de setembro de 2011 e 29 de fevereiro de 2012, desde que cumpram os seguintes critérios, até atingir o número pretendido para a amostra:

Crítérios de inclusão:

- Ser seguido na Consulta de NI do SN do HSA/CHP;
- Ter o diagnóstico de EM, de acordo com *McDonald revised criteria*;
- Ter idade igual ou superior a 18 anos;
- Ter consulta agendada durante o período de recrutamento;
- Ter capacidade para entender a informação subjacente ao pedido de participação;
- Concordar em participar no estudo, assinando o termo de consentimento informado.

Critérios de exclusão:

- Não ter processo clínico acessível ou ter dados insuficientes no processo clínico;
- Doente em surto ou com surto nos últimos 30 dias;
- Corticoterapia atual ou nos últimos 30 dias.

PLANO DE TRABALHO

Apresentam-se, de seguida as principais tarefas associadas ao projeto e o material e métodos usados no estudo laboratorial:

Tarefas associadas ao projeto

Durante a execução do projeto estão previstas as seguintes tarefas:

- TAREFA 1 – Consentimento informado.
- TAREFA 2 – Recolha de dados clínicos e analíticos.
- TAREFA 3 – Colheita de sangue.
- TAREFA 4 – Estudo laboratorial.
- TAREFA 5 – Análise e interpretação dos resultados.
- TAREFA 6 – Análise e interpretação dos resultados.

TAREFA 1 – Consentimento informado

- Duração prevista:
6 meses.
- Datas previstas para o início e conclusão:
01-09-2011 a 29-02-2012.
- Instituições, Departamentos e Serviços:
HSA/CHP – DDSNOS – SN – Consulta de NI.
- Investigadores (Neurologistas)
Dra. Ana Martins da Silva (Orientadora e médica responsável pela consulta) e
Dra. Ernestina Santos (Coinvestigadora e médica da consulta).
- Objetivos:
Informar os doentes.
Solicitar a participação no estudo.
Solicitar a assinatura do termo de consentimento informado.
- Descrição:
Durante a vinda à consulta programada, os doentes com EM serão informados pela médica responsável pela consulta sobre o estudo de investigação (em que consiste, quais os benefícios e riscos potenciais – anexo 3).
Será solicitado o seu consentimento para participação no estudo, mediante assinatura do termo de consentimento informado (anexo 4).
- Distribuição de tarefas, funções e responsabilidades:

Investigadores	Tarefas/Funções/Responsabilidades
Dra. Ana Martins da Silva	Informação aos doentes Solicitação de consentimento Assinatura do termo de consentimento informado
Dra. Ernestina Santos	Informação aos doentes Solicitação de consentimento Assinatura do termo de consentimento informado

TAREFA 2 – Recolha de dados clínicos e analíticos

- Duração prevista:
6 meses.
- Datas previstas para o início e conclusão:
01-09-2011 a 29-02-2012.
- Instituições, Departamentos e Serviços:
HSA/CHP – DDSNOS – SN – Consulta de NI.
- Investigadores:
Dra. Ana Martins da Silva (Orientadora e médica responsável pela consulta);
Dra. Ernestina Santos (Coinvestigadora); Amélia Aleixo (Aluna).
- Objetivos:
Fazer uma revisão sistematizada da informação clínica e analítica dos doentes com EM seguidos na consulta que concordarem em participar no estudo, usando o formulário de recolha de dados (Anexo 5).
- Descrição:
 - i. A recolha dos dados dos processos clínicos será feita no SN ou na Consulta Externa do HSA/CHP, no gabinete disponibilizado para esse efeito;
 - ii. A Orientadora e a Coinvestigadora procederão à recolha dos dados segundo o formulário, assumindo a responsabilidade;
 - iii. Os formulários com os dados ficarão à guarda da Orientadora;
 - iv. A aluna receberá das médicas assistentes dos doentes os dados anonimizados para posterior tratamento.
 - v. A aluna procederá ao registo dos dados em ficheiro de Excel anonimizado, que será usado para o seu trabalho académico (a cada doente será atribuído um código numérico e a correspondência entre o código e a identificação do doente ficará na posse da Orientadora).
 - vi. Será salvaguardada a confidencialidade da informação recolhida.
- Distribuição de tarefas, funções e responsabilidades:

Investigador	Tarefas/Funções/Responsabilidades
Dra. Ana Martins da Silva	Assumir a responsabilidade e a recolha dos dados.
Dra. Ernestina Santos	Assumir a responsabilidade e a recolha dos dados.
Amélia Aleixo, Aluna	Sistematização dos dados recolhidos em ficheiro Excel.

TAREFA 3 – Colheita de sangue

- Duração prevista:
6 meses.
- Datas previstas para o início e conclusão:
01-09-2011 a 29-02-2012.
- Instituições, Departamentos e Serviços:
HSA/CHP – Core Lab.
- Investigadores:
Dra. Ana Martins da Silva e Dra Ernestina Santos (Neurologistas); Técn. Marlene Santos (Técnica do LC e Investigadora).
- Colaboradores:
Técnica Responsável pelo Core Lab (Colaboradora); Técnicos do Core-Lab (Colaboradores)
- Objetivos:
Efetuar as colheitas de sangue.
- Descrição:
Durante a consulta, sempre que os doentes concordarem em participar no estudo, a Dra. Ana Martins da Silva ou a Dra. Ernestina Santos contactam por telefone interno a Técnica Responsável pelo CoreLab, informarão do facto e combinarão a colheita.
No final da consulta os doentes serão enviados ao CoreLab, com a requisição de colheita de análises.
Os Técnicos do CoreLab procederão à colheita de sangue (2 amostras de sangue, cerca de 4. 5 ml cada em tubo com anticoagulante (EDTA-K3).
A Técnica Responsável pelo CoreLab contactará por telefone interno a Técn. Marlene Santos, que se deslocará ao CoreLab para ir buscar as amostras que transportará para o LC.
- Distribuição de tarefas, funções e responsabilidades:

Investigador / Colaborador	Tarefas/Funções/Responsabilidades
Dra. Ana Martins da Silva Dra. Ernestina Santos	Contactar por telefone interno a Técnica Responsável pelo CoreLab para programar as colheitas de sangue.
Técnica Responsável pelo Core Lab	Programar as colheitas de sangue. Contactar por telefone interno (ext. 4210) a Técn. Marlene Santos para informar que as colheitas foram feitas.
Técnicos do CoreLab	Efetuar as colheitas de sangue.
Técn. Marlene Santos	Deslocar-se ao CoreLab para ir buscar as amostras e levá-las para o LC.

TAREFA 4 – Estudo laboratorial

- Duração prevista:
6 meses.
- Datas previstas para o início e conclusão:
01-09-2011 a 29-02-2012.
- Instituições, Departamentos e Serviços:
HSA/CHP – SHC – LC.
- Investigadores:
Prof. Doutora Margarida Lima (Médica Responsável pelo LC); Técn. Marlene Santos (Técnica do LC); Amélia Aleixo (Aluna).
- Objetivos:
Quantificar os LT e as CNK.
Caracterizar a expressão de recetores *killer* nos LT (CD56⁻ e CD56⁺) e nas CNK (CD56⁺fraco e CD56⁺forte).
- Descrição:
A descrição dos procedimentos técnicos encontra-se descrita na secção “Material e Métodos”.
Proceder-se-á à marcação dos linfócitos do sangue periférico por técnica de imunofluorescência direta, usando combinações quádruplas de anticorpos monoclonais com diferentes especificidades conjugadas com diferentes fluorocromos.
As amostras serão lidas no citómetro de fluxo.
Serão quantificados os LT e as CNK e as subpopulações de LT (CD56⁻ e CD56⁺) e de CNK (CD56⁺fraco e CD56⁺forte).
Será analisada a expressão de recetores *killer* nos LT (CD56⁻ e CD56⁺) e nas CNK (CD56⁺fraco e CD56⁺forte).
- Distribuição de tarefas, funções e responsabilidades:

Investigador	Tarefas/Funções/Responsabilidades
Prof. Doutora Margarida Lima	Supervisão do estudo Análise e interpretação dos resultados
Técn. Marlene Santos	Execução técnica Análise e interpretação dos resultados
Amélia Aleixo	Colaboração na execução técnica e na análise e interpretação dos resultados.

TAREFA 5 – Análise e interpretação dos resultados

- Duração prevista:

2 meses.

- Datas previstas para o início e conclusão:

01-03-2012 a 30-04-2012.

- Instituições, Departamentos e Serviços:

HSA/CHP – DDSNOS – SN – Consulta de NI

HSA/CHP – SHC – LC

ICBAS/UP – DPIM – LI

- Investigadores:

Todos os investigadores.

- Objetivos:

Analisar e interpretar os resultados.

Fazer o tratamento estatístico dos dados.

- Descrição:

Os dados clínicos e laboratoriais recolhidos dos processos clínicos, os resultados do estudo imunogenético já existentes no LI do ICBAS/UP e os resultados do estudo dos LT e das CNK efetuado no LC do SHC do HSA/CHP serão introduzidos em ficheiro Excel único, anonimizado.

Será efetuada uma análise estatística descritiva e inferencial, utilizando o *software* estatístico SPSS (*Statistical Program for the Social Sciences*), versão 17.0.

- Distribuição de tarefas, funções e responsabilidades:

Investigador	Tarefas/Funções/Responsabilidades
Amélia Aleixo e restantes investigadores	Análise e interpretação dos resultados.

TAREFA 5 – Redação de relatório / artigo / dissertação de MIM e apresentação nas JIIC

- Duração prevista:

3 meses.

- Datas previstas para o início e conclusão:

01-05-2012 a 30-07-2012.

- Instituições, Departamentos e Serviços:

HSA/CHP – DDSNOS – SN – Consulta de NI

HSA/CHP – SHC – LC

ICBAS/UP – DPIM – LI

- Investigadores:

Amélia Aleixo (Aluna); Dra. Ana Martins da Silva (Orientadora); Prof. Doutora Berta Martins e Dra. Andreia Bettencourt (Co-Orientadoras); Dra. Ernestina Santos (Coinvestigadora); Técn. Marlene Santos (Co-Investigadora); Prof. Doutora Margarida Lima (Supervisora, DIIC).

- Objetivos:

Redigir o relatório do estudo e/ ou artigo científico que serão usados para as provas de dissertação do MIM.

Apresentar os resultados nas JIIC 2012.

- Descrição:

A aluna redigirá o relatório do trabalho / artigo científico / dissertação do MIM e apresentará os resultados nas JIIC 2012.

- Distribuição de tarefas, funções e responsabilidades:

Investigador	Tarefas/Funções/Responsabilidades
Amélia Aleixo	Elaboração de relatório do trabalho / artigo científico / dissertação do MIM. Elaboração de apresentação para as JIIC 2012.
Dra. Ana Martins da Silva, Prof. Doutora Berta Martins, Dra. Andreia Bettencourt, Dra. Ernestina Santos e Técnica Marlene Santos	Orientação e / ou colaboração
Margarida Lima	Supervisão.

Material e métodos

Equipamento, material e reagentes

Equipamento

Será usado o equipamento disponível nos LC do SHC do HSA/CHP mencionado na Tabela 1.

Tabela 1: Equipamento

Grande equipamento	
Citômetros de fluxo (FACScanto, BD)	Centrífugas refrigeradas
Contador hematológico automático (LH780, BC)	Frigoríficos
	Micropipetas automáticas

Reagentes e material consumível

Serão usados os anticorpos monoclonais (AcMo) e os restantes reagentes e materiais consumíveis mencionados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Anticorpos monoclonais

AcMo	Fornecedor (Fabricante) (1)	Fluorocromo (2)	Clone	Referência
CD3	IZASA (IOT)	FITC	UCHT1	082A07746
CD56	IZASA (BC)	PC5	N901 (NKH-1)	082A07789
CD85j (ILT2)	ABO (ABO)	PE	GHI/75	ABIN312911
CD94	ABO (ABO)	APC	DX22	ABIN158197
CD158a/h (KIR2DL1/S1)	ABO (ABO)	PE	HP-MA4	ABIN312806
CD158b1/b2,j	IZASA (BC)	APC	GL183	082A22333
CD158e1/e2	IZASA (IOT)	PE	Z27.3.7	082IM3292
CD158i (P50.3)	IZASA (IOT)	PE	FES172	082IM3337
CD158f (KIR2DL5)	eBIO (eBIO)	APC	UP-R1	17-1588-41
CD159a	IZASA (IOT)	PE	Z199	082IM3291U
CD160	ABO (ABO)	AF-647	BY55	ABIN311820
CD161	ABO (ABO)	PE	HP-3G10	ABIN312810
CD226 / DNAM1	ABO (ABO)	PE	DX11	ABIN320107
CD244 (2B4)	ABO (ABO)	APC	C1.7	ABIN312046
CD314 (NKG2D)	ABO (ABO)	APC	1D11	ABIN159191
CD336 (NKp44)	ABO (ABO)	PE	P44-8	ABIN159506
CD335 (NKp46)	ABO (ABO)	AF-647	9E2	ABIN311852
CD337 (NKp30)	ABO (ABO)	APC	P30-15	ABIN159520

(1) ABO, Antibodies On-line; IOT, Immunotech, Marseille, France; BC, Beckman Coulter, Hialeah, Florida, USA; BD, Becton Dickinson, California, USA; e-BIO, e-Bioscience. (2) AF-647, Alexa Fluor 647; APC, allophycocyanin (alofiocianina); FITC, fluorescein isothiocyanate (isotiocianato de fluoresceína); PC5, Phycoerythrin Cyanin 5 (ficoeritrina cianina 5); PE, phycoerythrin (ficoeritrina).

Tabela 3: Outros reagentes e material consumível

Finalidade	Descrição	Fornecedor (Fabricante)
Lavagem e suspensão células	Tampão fosfato-salino (PBS)	Sigma
Lise e fixação células	FACSlising	ENZIFARMA (BD)
Material consumível	Tubos com EDTA-K3, 4. 5 ml (1)	-
	Tubos de 5 ml (2)	-
	Pontas para pipetas estéreis (3)	-
	Pipetas Pasteur estéreis (4)	-

- (1) Tubos de vácuo com anticoagulante - sal tripotássico de ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA-K3), para colheita de 4,5mL de sangue;
- (2) Tubos tipo FALCON (12x75 mm), para imunomarcção das células e leitura em citómetro de fluxo;
- (3) Pontas para pipetas automáticas de 5µL, de 50µL, de 100µL e de 1000µL;
- (4) Pipetas Pasteur de 1 e 2 mL;
- (5) Microtubos tipo "ependorf".

Procedimentos técnicos

Colheita de sangue

O SP será colhido em tubo de vidro com vácuo que já contém anticoagulante (EDTA-K3).

Imunofenotipagem

A imunofenotipagem das CNK será efetuada por imunomarcção direta, usando combinações de AcMo (Tabela 4) com diferentes especificidades (anti-CD3, anti-CD56, antirreceptores *killer*) conjugados com diferentes fluorocromos (FITC, *Fluorescein isothiocyanate*; PE, *Phycoerythrin*; PC5, *Peridin chlorophyll protein-Cyanine 5*; APC, *Allophycocyanin* ou AF-647, Alexa Fluor 647) (Tabela 5).

A marcação será efetuada em sangue total. Para a lise dos eritrócitos e fixação dos leucócitos será usado o reagente *FACSlising*® (Becton Dickinson, BD), de acordo com as instruções do fornecedor.

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

Para a análise dos resultados será usada a aplicação informática *Infinicyt* (Cytognos). Serão analisadas as seguintes variáveis: % linfócitos (nos leucócitos); % de CNK e %LT (nos linfócitos); % de CNK CD56^{fraco} e % de CNK CD56^{forte} (nas CNK); % de LT CD56⁺ (nos LT); % de células positivas, média e CV da IMF para cada um dos marcadores testados (na população de células em análise). Para cada uma das variáveis serão calculados a média, o desvio padrão (DP) e a mediana.

Com recurso à contagem de células efetuada no contador hematológico serão também calculados os nº absolutos de linfócitos, de CNK e de LT (x106/L).

Tabela 4. Combinações de AcMo a usar para caracterização da expressão de recetores *killer* nos LT e nas CNK.

Fluorocromo	FITC	PE	PC5	APC ou AF-647
Especificidade	CD3	Recetor <i>killer</i>	CD56	Recetor <i>killer</i>

Tabela 5. Recetores *killer* a analisar nos LT e nas CNK.

Família	Recetores
Recetores de citotoxicidade natural (NCR)	CD335 (NKp44) CD336 (NKp46) CD337 (NKp30)
Recetores <i>killer</i> tipo lectina (KLR)	CD94 CD161 (NKR-P1) CD314 (NKG2-D) CD159a (NKG2A/B)
Recetores <i>killer</i> tipo Ig (KIR)	CD158a/h CD158b1b2/j CD158e1e2 CD158f CD158i CD160
Recetores leucocitários semelhantes às Ig (LILR)	CD85j (ILT2, <i>Immunoglobulin Like Transcript-2</i>)
Outros recetores <i>killer</i> sem especificidade para moléculas do MHC	CD244 CD226

Calendarização

Duração

Global: 22 meses

Execução: 8 meses

Datas de início e conclusão

Global: outubro de 2010 a julho de 2012

Execução: setembro de 2011 a abril de 2012

Cronograma de execução

ANO	2010			2011												2012						
	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07
Escolha do tema e do assunto	X																					
Identificação dos problemas/questões		X	X																			
Revisão bibliográfica/conceção do estudo	X	X	X	X																		
Elaboração da proposta de projeto			X	X	X	X	X	X														
Submissão à aprovação									X													
Apresentação da proposta										X												
Preparação para o início do projeto											X											
Execução do projeto (estudo clínico e laboratorial)												X	X	X	X	X	X					
Execução do projeto (análise e interpretação dos resultados)																	X	X				
Redação de relatório / apresentação dos resultados																			X	X	X	
Provas de dissertação do MIM																						X

Indicadores de produção

Comunicações orais e posters

- Apresentação oral da proposta nas 3ª JIIC (1 de julho de 2011);
- Apresentação oral da proposta em reunião da UIC do HSA/CHP (data a combinar);
- Apresentação oral dos resultados nas 4ª JIIC (junho / julho 2012);
- Apresentação dos resultados em poster em reuniões das especialidades envolvidas (Neurologia, Imunologia, Hematologia, etc.) (2012).

Trabalhos escritos

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

Referências bibliográficas

1. Airas, L, Saraste, M, Rinta, S, Elovaara, I, Huang, YH, Wiendl, H. Immunoregulatory factors in multiple sclerosis patients during and after pregnancy: relevance of natural killer cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2008; 151, 235–243.
2. Alonso, A, Hernan, MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology.* 2008; 71:129.
3. Ascherio, A, Munger, KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol.* 2007; 61:504.
4. Ascherio, A, Zhang, SM, Hernan, MA, et al. Hepatitis B vaccination and the risk of multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2001; 344:327.
5. Bach, JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med.* 2002; 347:911.
6. Baker, D, O'Neill, JK, Turk, JL. Cytokines in the central nervous system of mice during chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *Cell Immunol.* 1991; 134, 505–510.
7. Bashirova, AA, Martin, MP, McVicar, DW, Carrington, M. The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2006; 7, 277–300.
8. Bejaoui, K, Rolak, LA. What is the risk of permanent disability from a multiple sclerosis relapse?. *Neurology.* 2010; 74:900.
9. Bergamaschi, L, Leone, MA, Fasano, ME, Guerini, FR, Ferrante, D, Bolognesi, E, Barizzone, N, Corrado, L, Naldi, P, Agliardi, C, Dametto, E, Salvetti, M, Visconti, A, Galimberti, D, Scarpini, E, Vercellino, M, Bergamaschi, R, Monaco, F, Caputo, D, Momigliano-Richiardi, P, D'Alfonso, S. HLA-class I markers and multiple sclerosis susceptibility in the Italian population. *Genes Immun.* 2010; 11 (2), 173–180.
10. Bettelli, E, Sullivan, B, Szabo, SJ, Sobel, RA, Glimcher, LH, Kuchroo, VK. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 2004; 200, 79–87.
11. Bielekova, B, Catafamo, M, Reichert-Scriver, S, Packer, A, Cerna, M, Waldmann, TA, McFarland, H, Henkart, PA, Martin, R. Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006; 103, 5941–5946.
12. Brynedal, B, Duvefelt, K, Jonasdottir, G, Roos, IM, Akesson, E, Palmgren, J, Hillert, J, 2007. HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis. *PLoS ONE.* 2007; 2, e664.

13. Chaudhuri, A, Behan, PO. Multiple sclerosis is not an autoimmune disease. *Arch Neurol.* 2004; 61:1610.
14. Compston, A, Coles, A. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2008; 372:1502.
15. Compston, A. The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1999; 354:1623.
16. Confavreux, C, Suissa, S, Saddier, P, et al. Vaccinations and the risk of relapse in multiple sclerosis. Vaccines in Multiple Sclerosis Study Group. *N Engl J Med.* 2001; 344:319.
17. Confavreux, C, Vukusic, S. Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain.* 2006; 129:595.
18. Confavreux, C, Vukusic, S, Moreau, T, Adeleine, P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2000; 343:1430.
19. Cooper, MA, Fehniger, TA, Turner, SC, Chen, KS, Ghaheri, BA, Ghayur, T, Carson, WE, Caligiuri, MA. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood.* 2001; 97, 3146–3151.
20. Darlington, PJ, Podjaski, C, Horn, KE, Costantino, S, Blain, M, Saikali, P, Chen, Z, Baker, KA, Newcombe, J, Freedman, M, Wiseman, PW, Bar-Or, A, Kennedy, TE, Antel, JP. Innate immune-mediated neuronal injury consequent to loss of astrocytes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2008; 67, 590–599.
21. De Jager, PL, Rossin, E, Pyne, S, Tamayo, P, Ottoboni, L, Vigiotta, V, Weiner, M, Soler, D, Izmailova, E, Faron-Yowe, L, O'Brien, C, Freeman, S, Granados, S, Parker, A, Roubenoff, R, Mesirov, JP, Khoury, SJ, Hafler, DA, Weiner, HL. Cytometric profiling in multiple sclerosis uncovers patient population structure and a reduction of CD8low cells. *Brain.* 2008; 131, 1701–1711.
22. Ebers, GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2008; 7:268.
23. Fauci, AS, Braunwald, E, Kasper, D, Hauser, L, Longo, D, Jameson, L, Loscalzo, J, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th Edition, 2008, McGraw-Hill.
24. Franklin, GM, Nelson, L. Environmental risk factors in multiple sclerosis: Causes, triggers, and patient autonomy. *Neurology.* 2003; 61:1032.
25. Fusco C, Guerini FR, Nocera G, Ventrella G, Caputo D, Valentino MA, Agliardi C, Gallotti J, Morra VB, Florio C, Clerici M, Lombardi ML. KIRs and their HLA ligands in Remitting-Relapsing Multiple Sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2010 Sep 6. Em publicação.
26. Gandhi, R, Laroni, A, Weiner, H. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology,* 2010; 221: 7-14
27. Gödde, R, Rohde, K, Becker, C, Tollat, MR, Entz, P, Suk, A, Müller, N, Sindern, E, Haupts, M, Schimrigk, S, Nürnberg, P, Epplen, JT. Association of the HLA region with

- multiple sclerosis as confirmed by a genome screen using N10, 000 SNPs on DNA chips. *J. Mol. Med.* 2005; 83, 486–494.
28. Graber, JJ, McGraw, CA, Kimbrough, D, Dhib-Jalbut, S. Overlapping and distinct mechanisms of action on multiple sclerosis therapies. *Clin. Neurology and Neurosurgery.* 2010; 112: 583-591.
 29. Gregory, SG, Schmidt, S, Seth, P, et al. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2007; 39:1083.
 30. Hafler, DA, Compston, A, Sawcer, S, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007; 357:851.
 31. Healy, BC, Ali, EN, Guttman, CR, et al. Smoking and disease progression in multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2009; 66:858.
 32. Hernan, MA, Alonso, A, Hernandez-Diaz, S. Tetanus vaccination and risk of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology.* 2006; 67:212.
 33. Kastrukoff, LF, Lau, A, Wee, R, Zecchini, D, White, R, Petkau, AJ, Satoh, J, Paty, DW. Clinical relapses of multiple sclerosis are associated with 'novel' valleys in natural killer cell functional activity. *J. Neuroimmunol.* 2003; 145, 103–114.
 34. Koch-Henriksen, N, Sorensen, PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol.* 2010; 9:520.
 35. Kulkarni, S, Martin, MP, Carrington, M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin. Immunol.* 2008; 20, 343–352.
 36. Kurtzke, JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* 1983; 33:1444.
 37. Langer-Gould, A, Popat, RA, Huang, SM, et al. Clinical and Demographic Predictors of Long-term Disability in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *Arch Neurol.* 2006; 63:1686.
 38. Lanier, LL. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23: 225-274.
 39. Levin, LI, Munger, KL, Rubertone, MV, et al. Temporal relationship between elevation of Epstein barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA.* 2005; 293:2496.
 40. Lima M, Almeida J, dos Anjos Teixeira M, Queirós ML, Justiça B, Orfão A. The "ex vivo" patterns of CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO, and CD11a/HLA-DR expression identify acute/early and chronic/late NK-cell activation states. *Blood Cells Mol Dis.* 2002; 28:181-90.
 41. Lima M, Almeida J, Montero AG, Teixeira Mdos A, Queirós ML, Santos AH, Balanzategui A, Estevinho A, Algueró Mdel C, Barcena P, Fonseca S, Amorim ML, Cabeda JM, Pinho L, Gonzalez M, San Miguel J, Justiça B, Orfão A. *Clinicobiological,*

- immunophenotypic, and molecular characteristics of monoclonal CD56-/±dim chronic natural killer cell large granular lymphocytosis. *Am J Pathol.* 2004; 165:1117-27.
42. Lima M, Almeida J, Teixeira MA, Santos AH, Queirós ML, Fonseca S, Moura J, Gonçalves M, Orfão A, Pinto Ribeiro AC. Reactive phenotypes after acute and chronic NK-cell activation. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2004;18:331-4.
 43. Lima M, Teixeira MA, Queirós ML, Leite M, Santos AH, Justiça B, Orfao A. Immunophenotypic characterization of normal blood CD56+lo versus CD56+hi NK-cell subsets and its impact on the understanding of their tissue distribution and functional properties. *Blood Cells Mol Dis.* 2001; 27:731-43.
 44. Lincoln, MR, Montpetit, A, Cader, MZ, et al. A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat Genet* 2005; 37:1108.
 45. Ljunggren, HG, Karre, K. In search of the “missing self” hypothesis. MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today.* 1990; 11:237 – 44.
 46. Lorentzen, AR, Karlsen, TH, Olsson, M, Smestad, C, Mero, IL, Woldseth, B, Sun, JY, Senitzer, D, Celius, EG, Thorsby, E, Spurkland, A, Lie, BA, Harbo, HF. Killer immunoglobulin-like receptor ligand HLA-Bw4 protects against multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 2009; 65, 658–666.
 47. Lublin, FD, Reingold, SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology.* 1996; 46:907.
 48. Lunemann, A, Lunemann, JD, Roberts, S, Messmer, B, Barreira da Silva, R, Raine, CS, Munz, C. Human NK cells kill resting but not activated microglia via NKG2D and NKP46-mediated recognition. *J. Immunol.* 2008; 181, 6170–6177.
 49. Martinez-Rodriguez, JE, Saez-Borderias, A, Munteis, E, Romo, N, Roquer, J, Lopez-Botet, M, Natural killer receptors distribution in multiple sclerosis: relation to clinical course and interferon-beta therapy. *Clin Immunol.* 2010; 10.1016.
 50. Middleton, D, Williams, F, Halfpenny, IA. KIR genes. *Transpl. Immunol.* 2005; 14, 135–142.
 51. Morandi, B, Bramanti, P, Bonaccorsi, I, Montalto, E, Oliveri, D, Pezzino, G, Navarra, M, Ferlazzo, G. Role of natural killer cells in the pathogenesis and progression of multiple sclerosis. *Pharmacol. Res.* 2008; 57, 1–5.
 52. Moretta, A, Marcenaro, E, Parolini, S, Ferlazzo, G, Moretta, L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ.* 2008; 15, 226–233.

53. Moretta, L, Ferlazzo, G, Bottino, C, Vitale, M, Pende, D, Mingari, MC, Moretta, A. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol. Rev.* 2006; 214, 219–228.
54. Pittock, SJ, McClelland, RL, Mayr, WT, et al. Clinical implications of benign multiple sclerosis: a 20-year population-based follow-up study. *Ann Neurol.* 2004; 56:303.
55. Polman Ch, Reingold S, Edan G et al. Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2005 Revisions to the “Mc Donald Criteria”. *Ann Neurol* 2005; 58: 840-846
56. Rinaldi, L, Laroni, A, Ranzato, F, Calabrese, M, Perini, P, Sanzari, M, Plebani, M-Battistin, L, Gallo, P. Regulatory CD56bright natural killer cells expanded during cyclophosphamide therapy in multiple sclerosis. *Mult Scler.* Sept 2007; Supplement 2, S35.
57. Roach, ES. Is multiple sclerosis an autoimmune disorder?. *Arch Neurol* 2004; 61:1615.
58. Roxburgh R, Seaman SR, Masterman T et al. Multiple Sclerosis Severity Score. Using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 2005; 64: 1144-1151
59. Sadovnick, AD, Armstrong, H, Rice, GP, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins: Update. *Ann Neurol* 1993; 33:281.
60. Saikali, P, Antel, JP, Newcombe, J., Chen, Z., Freedman, M., Blain, M., Cayrol, R., Prat, A., Hall, J.A., Arbour, N. NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis. *J. Neurosci.* 2007; 27, 1220–1228.
61. Saraste, M, Irijala, H, Airas, L. Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurol. Sci.* 2007; 28, 121-126.
62. Silva, AM, Bettencourt, A, Pereira, C, Santos, E, Carvalho, C, Mendonça, D, Costa, PP, Monteiro, L, Martins, B. Protective role of the HLA-A*2 in Portuguese patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis.* 2009; 15: 771-774.
63. Silva, AM, Pereira, C, Bettencourt, A, Carvalho, C, Couto, AR, Leite, MI, Marta, M, Freijo, M. Costa, PP, Mendonça, D, Monteiro, L, Armas, J, Martins, B. The role of HLA-DRB1 alleles on susceptibility and outcome of a Portuguese Multiple Sclerosis population. *J. Neurol. Sci.* 2007; 258: 69-74.
64. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:683-747.
65. Sotelo, J. Martinez-Palomo, A, Ordonez, G, Pineda, B. Varicella-zoster virus in cerebrospinal fluid at relapses of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2008; 63:303.

66. Spits, H, Blom, B, Jaleco, AC, Weijer, K, Verschuren, MC. Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. *Immunol. Rev.* 1998; 165:75–86.
67. Takahashi K, Aranami T, Endoh M, Miyake S, Yamamura T. The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain.* 2004 Sep; 127(Pt 9): 1917-27.
68. Takahashi, K, Miyake, S, Kondo, T, Terao, K, Hatakenaka, M, Hashimoto, S, Yamamura, T. Natural killer type 2 bias in remission of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 2001; 107, R23–29.
69. Thacker, EL, Mirzaei, F, Ascherio, A. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol* 2006; 59:499.
70. Tremlett, H, Paty, D, Devonshire, V. Disability progression in multiple sclerosis is slower than previously reported. *Neurology* 2006; 66:172.
71. Weiner, HL. A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. *J. Neurol.* 2008; 255 (Suppl 1), 3–11.
72. Weiner, HL. Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease. *Arch Neurol* 2004; 61:1613.
73. Yeo, TW. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 2007; 61, 228–236.

PLANO FINANCEIRO

Orçamento

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

Todos os procedimentos laboratoriais efetuados no LC do SHC do HSA/CHP são de investigação (não codificados pela tabela de preços do Sistema Nacional de Saúde), pelo que serão efetuados com reagentes comprados especificamente para investigação.

	Custo estimado (€)
Reagentes e material consumível de laboratório	5. 600,00
Impressão de poster para apresentação de resultados	50,00
Inscrição aluno em congresso médico	200,00
Organização das Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica	50,00
TOTAL	5. 900,00

Financiamento

O estudo terá duas fontes de financiamento:

Fontes de financiamento	Valor
Bolsa atribuída pelo ICBAS/UP à DIIC	1. 900,00 €
UMIB/ICBAS/UP (*)	4.000,00 €

(*) Não haverá financiamento direto. Serão usados reagentes no valor de 4.000,00 €, excedentários de projeto de investigação em curso aprovado no Hospital (dissertação de Mestrado de uma das investigadoras, Técn. Marlene Santos), financiado pela UMIB/ICBAS/UP.

GLOSSÁRIO

Abreviaturas e acrónimos

ABO, Antibodies On-Line

AF-647, Alexa Fluor 647

APC, *Allophycocyanin*, Aloficocianina

BC, Beckman Coulter

BD, Becton Dickinson

CHP, Centro Hospitalar do Porto

CNK, Células *natural killer*

DBP, Departamento de Biologia das Populações do ICBAS/UP

DDSNOS, Departamento de Doenças do Sistema Nervoso e Órgãos dos Sentidos do HSA/CHP

DIIC, Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica

DM, Departamento de Medicina do HSA/CHP

DPIM, Departamento de Patologia e Imunologia Molecular do ICBAS/UP

DSS, *Disability Status Score*

e-BIO, e-Biosciences

EDSS, *Expanded Disability Status Score*

EM, Esclerose Múltipla

ER, Exarcebação-remissão

FITC, *Fluorescein isothiocyanate*, Isotiocinato de fluoresceína

HLA, *Human Leukocyte Antigens*, Antígenos Leucocitários Humanos

HSA, Hospital de Santo António

ICBAS/UP, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

IFN- β , Interferão-beta

IFN- γ , Interferão gama

IL-7, Interleucina 7

IOT, Immunotech

JIIC, Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica

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

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

LB, Linfócitos B

LC, Laboratório de Citometria

LI, Laboratório de Imunogenética
LT, Linfócitos T
MHC, *Major Histocompatibility Complex*, Complexo Maior de Histocompatibilidade
MIM, Mestrado Integrado em Medicina
MSSS, Multiple Sclerosis Severity Score
NCAM, *Neuronal Cell Adhesion Molecule*, Molécula de Adesão das Células Neurais
NCR, *Natural Cytotoxicity Receptors*, Recetores de Citotóxicidade Natural
NI, Neuroimunologia
NK, *Natural Killer*, Assassinas Naturais
PBS, *Phosphate Buffered Saline*, Tampão Fosfato Salino
PC5, *Phycoerythrin-Cyanine 5*, Ficoeritrina-Cianina 5
PE, *Phycoerythrin*, Ficoeritrina
PP, Primariamente Progressiva
SHC, Serviço de Hematologia Clínica do HSA/CHP
SN, Serviço de Neurologia
SNC, Sistema Nervoso Central
SP, Sangue periférico
SP, Secundariamente Progressiva
TCR, *T Cell Receptor*, Recetor da Célula T
TNF- β , *Tumor Necrosis Factor beta*, Fator de necrose tumoral beta
UIC, Unidade de Imunologia Clínica
UP, Universidade do Porto

ANEXOS

1. EDSS (Expanded Disability Status Scale)
2. MSSS (Multiple Sclerosis Severity Score)
3. Termo de consentimento informado
4. Folheto informativo para os participantes
5. Formulário para recolha dos dados clínicos

EDSS Expanded Disability Status Score

Kurtzke, 1983

Kurtzke Expanded Disability Status Scale (*)	
0.0	Normal neurological examination
1.0	No disability, minimal signs in one FS
1.5	No disability, minimal signs in more than one FS
2.0	Minimal disability in one FS
2.5	Mild disability in one FS or minimal disability in two FS
3.0	Moderate disability in one FS, or mild disability in three or four FS. Fully ambulatory
3.5	Fully ambulatory but with moderate disability in one FS and more than minimal disability in several others
4.0	Fully ambulatory without aid, self-sufficient, up and about some 12 hours a day despite relatively severe disability; able to walk without aid or rest some 500 meters
4.5	Fully ambulatory without aid, up and about much of the day, able to work a full day, may otherwise have some limitation of full activity or require minimal assistance; characterized by relatively severe disability; able to walk without aid or rest some 300 meters.
5.0	Ambulatory without aid or rest for about 200 meters; disability severe enough to impair full daily activities (work a full day without special provisions)
5.5	Ambulatory without aid or rest for about 100 meters; disability severe enough to preclude full daily activities
6.0	Intermittent or unilateral constant assistance (cane, crutch, brace) required to walk about 100 meters with or without resting
6.5	Constant bilateral assistance (canes, crutches, braces) required to walk about 20 meters without resting
7.0	Unable to walk beyond approximately five meters even with aid, essentially restricted to wheelchair; wheels self in standard wheelchair and transfers alone; up and about in wheelchair some 12 hours a day
7.5	Unable to take more than a few steps; restricted to wheelchair; may need aid in transfer; wheels self but cannot carry on in standard wheelchair a full day; May require motorized wheelchair
8.0	Essentially restricted to bed or chair or perambulated in wheelchair, but may be out of bed itself much of the day; retains many self-care functions; generally has effective use of arms
8.5	Essentially restricted to bed much of day; has some effective use of arms retains some self care functions
9.0	Confined to bed; can still communicate and eat.
9.5	Totally helpless bed patient; unable to communicate effectively or eat/swallow
10.0	Death due to MS

(*) The Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS) is a method of quantifying disability in multiple sclerosis. The EDSS replaced the previous Disability Status Scales which used to bunch people with MS in the lower brackets. The EDSS quantifies disability in eight Functional Systems (FS) and allows neurologists to assign a Functional System Score (FSS) in each of these. The Functional Systems are: pyramidal; cerebellar; brainstem; sensory; bowel and bladder; visual; cerebral; other.

EDSS steps 1.0 to 4.5 refer to people with MS who are fully ambulatory.

EDSS steps 5.0 to 9.5 are defined by the impairment to ambulation.

MSSS Multiple Sclerosis Severity Score

Roxburgh, 2005

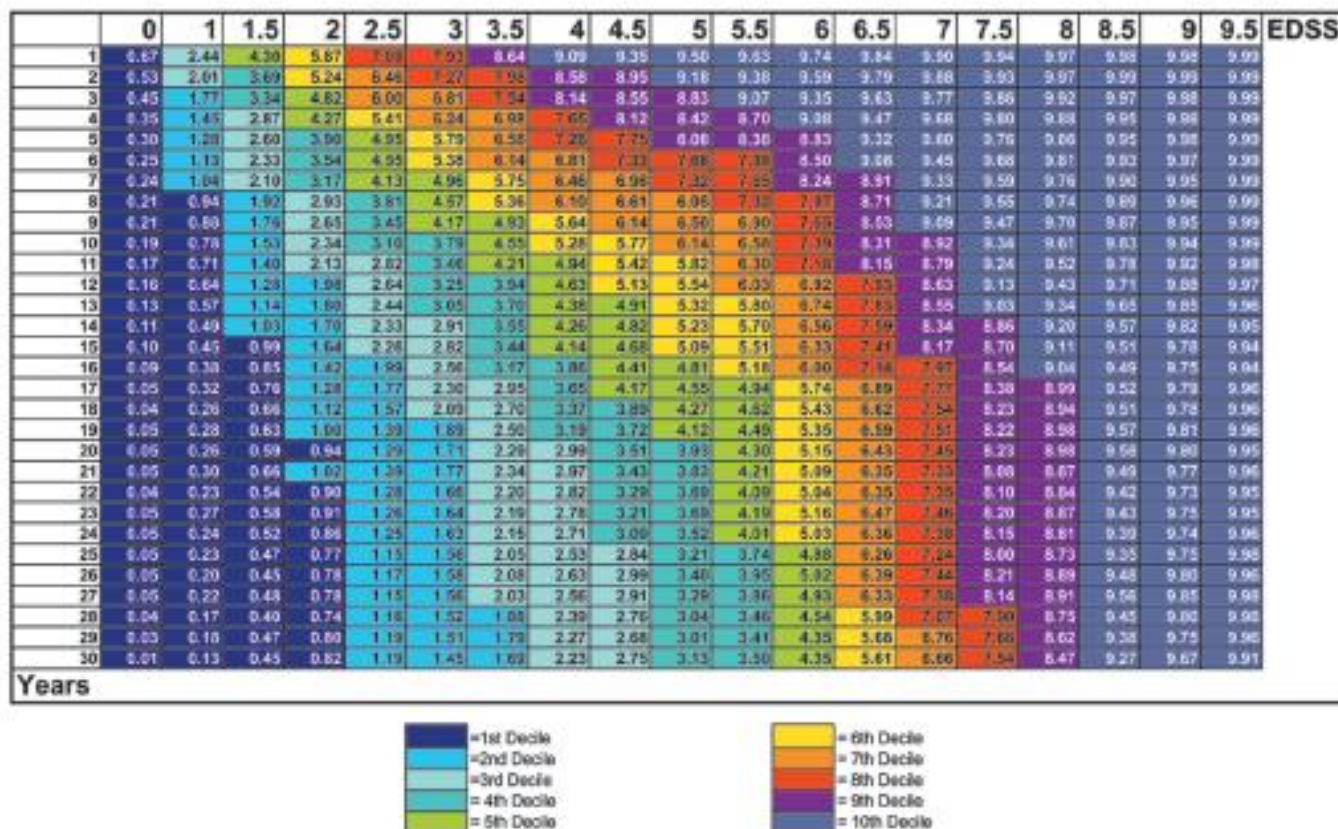


Figure 3. Global Multiple Sclerosis Severity Scores (MSSS) generated from 9,892 European patients. The MSSS for an individual patient is ascertained by finding the column corresponding to the patient's Expanded Disability Status Scale and the row corresponding to the number of years since the onset of multiple sclerosis. Deciles are color coded to show the pattern of disease progression at different disease durations.

Termo de consentimento informado

ESTUDO DE INVESTIGAÇÃO: RECETORES KILLER NOS LINFÓCITOS T E NAS CÉLULAS NATURAL KILLER EM DOENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA

Trabalho Académico da aluna Amélia Aleixo do MIM do ICBAS, integrado na Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica, regente Prof. Doutora Margarida Lima.

Coinvestigadoras e médicas da Consulta responsáveis: Dra. Ana Martins da Silva e Dra. Ernestina Santos.

Eu, abaixo-assinado _____:

Fui informado de que o Estudo de Investigação acima mencionado se destina a estudar os linfócitos T e as células NK do sangue na Esclerose Múltipla, para tentar compreender melhor a doença.

Os linfócitos T e as células NK são células do sistema imune capazes de destruir as células tumorais e as células infetadas por vírus e pensa-se que também possam estar envolvidas em algumas doenças autoimunes, como é o caso da Esclerose Múltipla.

Sei que neste estudo está prevista a revisão dos dados do meu processo clínico e ainda a realização de análises e que, para isso, é necessária a colheita de sangue (2 tubos, no total cerca de 9 ml).

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos Participantes neste estudo são confidenciais.

Sei que posso recusar-me a participar, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

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

Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado.

Concordo que seja efetuada a colheita de sangue para realizar as análises que fazem parte do estudo.

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

Nome do Participante no estudo: _____

Data: ___/___/_____ Assinatura _____

Nome do Médico Responsável: _____

Data: ___/___/_____ Assinatura _____

Folheto informativo para os participantes

ESTUDO DE INVESTIGAÇÃO: RECETORES KILLER NOS LINFÓCITOS T E NAS CÉLULAS NATURAL KILLER EM DOENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA

Trabalho Académico da aluna Amélia Aleixo do MIM do ICBAS, integrado na Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica, regente Prof. Doutora Margarida Lima.

Coinvestigadoras e médicas da Consulta responsáveis: Dra. Ana Martins da Silva e Dra. Ernestina Santos.

A esclerose múltipla é uma doença neurológica crónica, em que existe uma destruição das bainhas de mielina que recobrem e isolam as fibras nervosas (estruturas do cérebro), o que pode causar algumas manifestações como fraqueza muscular e descoordenação dos movimentos.

A causa da Esclerose Múltipla ainda é desconhecida.

Os linfócitos T e as células NK são células do sistema imune capazes de destruir células tumorais e células infetadas por vírus e pensa-se que também possam estar envolvidas em algumas doenças autoimunes, como é o caso da Esclerose Múltipla.

Neste trabalho vamos estudar os linfócitos T e as células NK do sangue, para tentar compreender melhor a doença.

Está prevista a revisão dos dados do seu processo clínico e a realização de análises, para o que é necessário colher uma amostra de sangue (2 tubos, no total cerca de 9 ml).

A participação no estudo não acarreta riscos para si. Também não haverá benefícios imediatos, mas os resultados deste estudo podem ajudar a compreender melhor a sua doença.

Antes de decidir se quer participar, não hesite em fazer as perguntas que achar necessário para esclarecer as suas dúvidas.

Muito obrigado pela sua participação!

Atenciosamente,

Amélia Aleixo
Aluna do Mestrado Integrado em Medicina – ICBAS/UP

Formulário de registo dos dados

ESTUDO DE INVESTIGAÇÃO: RECETORES KILLER NOS LINFÓCITOS T E NAS CÉLULAS NATURAL KILLER EM DOENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA

CÓDIGO: _____

Sexo: M F

Data de nascimento: ____/____ (mês / ano)

Data de avaliação: ____/____ (mês / ano)

Data de diagnóstico: ____/____ (mês / ano)

Duração da doença: _____ meses

Forma de doença

Exacerbação - remissão (ER) Primariamente Progressiva (PP)

Secundariamente Progressiva (SP) Progressiva com Surto (PS)

EDSS

Sistemas funcionais atingidos

Piramidal Cerebelar Tronco cerebral Sensorial Intestino e bexiga

Visual Cerebral "Outros" _____

Score EDSS

0.	0.	1.	1.	2.	2.	3.	3.	4.	4.	5.	5.	6.	6.	7.	7.	8.	8.	9.	9.	10.
0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0

MSSS

Score MSSS

Tratamento

Tratamento efetuado no passado:	
Tratamento em curso:	

RESULTADOS DO ESTUDO IMUNOGENÉTICO (ICBAS):