

INFUSÃO DE LEUCÓCITOS DE DADOR APÓS A TRANSPLANTAÇÃO ALOGÉNICA DE CÉLULAS ESTAMINAIS

JOÃO FORJAZ DE LACERDA

Unidades de Hematologia e de Transplante de Medula Óssea. Hospital de Santa Maria. Lisboa.
Faculdade de Medicina de Lisboa. Lisboa.

RESUMO

A imunoterapia do receptor de transplante alogénico de células estaminais com células mononucleadas colhidas do sangue periférico do respectivo dador conheceu um impulso significativo nos últimos anos, principalmente no tratamento da recaída da doença hematológica primária e na prevenção e terapêutica de algumas complicações virais pós-transplante. Os doentes em que esta técnica foi utilizada tinham recaída de leucemia mielóide crónica, tendo sido re-induzida remissão completa na maioria dos casos. As principais complicações desta terapêutica são o desenvolvimento de doença do enxerto contra o hospedeiro e a aplasia medular. Para limitar o aparecimento da primeira foram, até à data, desenvolvidas três estratégias: a infusão de doses crescentes de leucócitos de dador, a depleção de células CD8⁺ e a infusão de células portadoras do gene de cinase da timidina, que as torna sensíveis ao ganciclovir. As duas principais complicações infecciosas pós-transplante tratadas com leucócitos de dador são as doenças linfoproliferativas induzidas pelo vírus de Epstein-Barr e a infecção pelo citomegalovírus. Na primeira, que surge com maior frequência em receptores de transplantes não familiares e/ou não compatíveis com depleção de células T, foram utilizadas com sucesso tanto leucócitos não separados do sangue periférico como linfócitos T específicos para o vírus de Epstein-Barr. Na prevenção da infecção a citomegalovírus, a infusão de clones de linfócitos T específicos para o vírus restaurou a imunidade específica para o vírus e impediu a sua reacção no período pós-transplante.

SUMMARY

Infusion of Donor Leukocytes after Allogenic Stem Cell Transplantation

Adoptive cellular immunotherapy with donor leukocytes of patients submitted to allogenic stem cell transplantation has had significant success in the past few years, especially in the treatment of primary disease relapse and in the prevention and treatment of some post-transplant infectious complications. Most patients treated with donor leukocytes had a relapse of chronic myelogenous leukemia, which was successfully re-induced into remission. The most significant toxicities of this treatment are the development of graft versus host disease and marrow aplasia. Three strategies were developed to limit the former: the infusion of graded doses of donor leukocytes, the depletion of CD8⁺ cells and the transfer of donor leukocytes transvected with a thymidine kinase gene, which renders these cells sensitive to ganciclovir. The post-transplant infectious complications treated successfully with donor leukocytes were Epstein-Barr virus-induced lymphoproliferative disorders and cytomegalovirus infection. The former, arising most frequently in recipients of unrelated and/or mismatched T cell depleted grafts, were treated with donor unseparated leukocytes or Epstein-Barr virus-specific T cells. Cytomegalovirus infection in the early post-transplant period was largely prevented by the infusion of virus-specific T cell clones, which restored donor-specific immunity to cytomegalovirus in the recipient.

O transplante alogénico de medula óssea (TMO) é a terapêutica de escolha em síndromes de imunodeficiência de transmissão hereditária, na aplasia medular e em algumas doenças hemato-oncológicas, em que se incluem a leucemia mielóide crónica (LMC) e vários subtipos de leucemia mieloblástica aguda (LMA). O sucesso final desta técnica terapêutica é determinado por vários factores. Depende, em primeiro lugar, da morbidade e mortalidade associadas ao procedimento e, em segundo, da taxa de recaída pós-transplante. Enquanto que a toxicidade e complicações decorrentes da TMO alogénica estão em parte associadas ao desenvolvimento de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), a taxa de recaída pós-transplante depende de vários factores, em que se incluem a terapêutica inicial da doença oncológica, o regime de condicionamento utilizado e, talvez com maior relevância do que os precedentes, o estabelecimento de uma reacção imunológica eficaz dirigida contra as células oncológicas, denominada de reacção do enxerto contra a doença¹.

É bem conhecido que os receptores de TMO com depleção de células T têm não só uma incidência baixa de DECH, como também um aumento da taxa de recaída pós-transplante, o que sugere que as células T são mediadoras de ambos os fenómenos.² Por outro lado, sabe-se que os doentes que recebem transplantes com depleção de células T não totalmente compatíveis e/ou de dador não familiar apresentam uma reconstituição imunológica mais tardia e, por vezes, incompleta, em comparação com os receptores de transplantes convencionais de células estaminais hematopoiéticas³. Assim, não surpreende que alguns destes indivíduos venham a desenvolver complicações infecciosas pós-transplante raramente observadas em receptores de TMO alogénico convencional, tal como o desenvolvimento de doenças linfoproliferativas associadas ao vírus de Epstein-Barr (EBV)⁴.

Recentemente, a imunoterapia celular do receptor de TMO com células mononucleadas do sangue periférico do respectivo dador de medula óssea conheceu grande impulso, fundamentalmente em dois campos bem definidos: o tratamento de recaída pós-transplante da doença hematológica primária e a profilaxia ou terapêutica de fenómenos associados a infecções virais que emergem no período pós-transplante, tais como a doença a citomegalovírus (CMV) e as doenças linfoproliferativas associadas ao EBV⁵⁻⁸.

UTILIZAÇÃO DE LEUCÓCITOS DE DADOR NA RECAÍDA DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÓNICA

Resposta clínica

Em 1990, Kolb et al descreveram a indução de remissão completa hematológica e citogenética em três

doentes com LMC em recaída após um transplante convencional de medula óssea com a administração de leucócitos colhidos do sangue periférico do respectivo dador de medula óssea⁶. Estes doentes foram tratados também com interferão alfa, tendo-se verificado, durante o processo de transição da hematopoiese de receptor para a de dador, pancitopénia transitória nos três doentes e DECH em dois casos⁶.

Estes resultados foram posteriormente confirmados por outros investigadores⁹⁻¹⁴. Globalmente, estes estudos iniciais avaliaram cerca de meia centena de doentes, a maioria dos quais em fase crónica da doença, que receberam uma dose celular entre 0.34 e 12.3 x 10⁸ células por quilograma de peso, com indução de remissão completa em cerca de 75% dos casos. Estes resultados viriam a ser corroborados por duas grandes séries, uma europeia e a outra americana^{15,16}. O número mononucleadas de células infundidas tem variado de estudo para estudo. Na maioria dos centros em que se trataram doentes com LMC em recaída pós-transplante administrou-se o total das células colhidas por leucaferese, tendo os doentes recebido uma dose celular considerável⁷, a que não será alheia a elevada taxa de DECH associada. Numa tentativa separar o efeito enxerto versus leucemia da DECH, Mackinnon et al infundiram doses crescentes de leucócitos a doentes com LMC em recaída após transplante alogénico de medula óssea com depleção de células T, tendo identificado a dose de 1 x 10⁷ células T por quilograma de peso do receptor como a dose celular mínima capaz de induzir remissão completa na ausência de DECH^{17,18}.

A taxa de respostas à infusão de leucócitos depende da agressividade da recaída, sendo máxima em doentes com recaída molecular ou citogenética da doença, em que se aproxima dos 90%, intermédia nos doentes com recaída em fase crónica (70-80%), e menor nos doentes com recaídas blásticas de LMC, em que unicamente 20 a 25% dos casos respondem à terapêutica¹⁵. Todos estes estudos sugerem que as respostas obtidas são duráveis, sendo, no estudo europeu, a probabilidade de sobrevida aos cinco anos de 55% para os doentes em recaída hematológica e de 79% para aqueles com recaída citogenética de LMC¹⁵. Muitas das segundas recaídas em fase crónica têm respondido a re-infusões de leucócitos de dador (H. Kolb, comunicação pessoal).

O tempo mediano descrito para a indução de resposta citogenética completa após a infusão de leucócitos de dador é de cerca de 13 semanas (4-34 semanas)^{7,9-14}. Com a utilização de doses celulares menores, o tempo mediano de resposta foi de 14 semanas (4-19 semana), o

que sugere não existir uma correlação entre a dose celular administrada e o tempo de resposta à terapêutica¹⁷. Já o tempo para a remissão molecular de doença pode ser mais longo e chegar mesmo a um ano, aliás à semelhança do que se verifica com o status molecular após a transplantação convencional de medula óssea¹⁹.

Toxicidade da infusão de linfócitos

Na maioria dos estudos em que foram administradas doses celulares elevadas de células mononucleadas do sangue periférico de dador verificou-se uma toxicidade considerável, que se manifestou essencialmente por dois tipos de complicações, a DECH e a aplasia medular. Estas manifestações clínicas ocorreram em 50 a 90% dos casos e contribuíram de forma significativa para a elevada mortalidade associada a este procedimento, atingindo nalgumas séries os 20%^{6,9-16}.

A DECH observada nestes doentes parece ser mediada pelo elevado número de células T alo-reativas no produto de leucaferese infundido. Os doentes podem apresentar manifestações clínicas de DECH aguda ou crónica. Na série europeia, 16% dos doentes desenvolveram DECH aguda de grau I, 25% de grau II e 14% de grau III ou IV. Uma das manifestações clínicas mais frequentes da DECH crónica neste contexto é o envolvimento da mucosa da cavidade oral (observação pessoal).

Após a imunoterapia celular com leucócitos de dador, mais de 50 a 60% dos doentes podem desenvolver um quadro clínico de pancitopénia secundário a um período de aplasia medular, provavelmente devido à baixa reserva de células do dador no doente com recaída hematológica da sua doença primária^{7,15,16}. Por vezes, estes doentes necessitam de receber novo enxerto de células estaminais para reverter este fenómeno^{7,15,16}.

Prevenção da DECH após a infusão de leucócitos

Até agora, foram utilizados três métodos para limitar a emergência de DECH na sequência das infusões de leucócitos de dador após a transplantação alogénica de células estaminais. A primeira destas estratégias correspondeu à infusão de doses crescentes de leucócitos, numa tentativa de identificar o menor número de leucócitos capaz de induzir remissão de doença na ausência de DECH¹⁷. Neste estudo, os doentes receberam inicialmente células mononucleadas do sangue periférico de dador contendo 1×10^5 células T por kilograma de peso, sendo infundidas doses celulares crescentes em meio \log_{10} de células T por kilograma todas as 4 a 8 semanas na ausência de resposta, até à dose máxima de 5×10^8 células T por kilograma. Nesta série, 19 dos 22 doentes

tratados obtiveram remissão completa, após a infusão das seguintes doses de células T por kilograma de peso: 1×10^7 (n=8), 5×10^7 (n=4), 1×10^8 (n=3) e 5×10^8 (n=4). Dos 17 doentes avaliáveis, 15 entraram em remissão molecular ao testarem negativo para a proteína de fusão *bcr-abl* por RT-PCR. Dos 8 doentes que responderam à dose celular de 1×10^7 células T por kilograma de peso, unicamente um deles desenvolveu DECH (hepática). Documentou-se DECH em 8 dos 11 doentes tratados com doses de células T superiores a 5×10^7 por kilograma. A manifestação clínica mais frequente de DECH crónica foi o envolvimento limitado da cavidade oral sob a forma de *liquen planus*, o que aconteceu em 6 de 9 doentes. Neste contexto imunológico e de tolerância pós-transplante, i.e. em transplantes alogénicos com depleção de células T, doses celulares contendo 5×10^7 ou mais células T por kilograma de peso do receptor induziram DECH na maioria dos doentes, enquanto que a dose celular de 1×10^7 células T por kilograma de peso do receptor induziu remissão completa de doença pouco agressiva na ausência de DECH¹⁷.

A segunda metodologia utilizada para limitar a emergência de DECH correspondeu à depleção de células CD8⁺ do produto de leucaferese^{20,21}, dado que a infusão de um produto com predomínio de células CD4⁺ poderia exercer um efeito anti-leucémico sem induzir DECH. No estudo de Giralt et al, foram tratados 10 doentes (1 em recaída citogenética, 4 em fase crónica, 2 em fase acelerada e 3 em fase blástica) com uma dose mediana de células CD4⁺ de 4.35×10^7 por kilograma de peso, contendo uma mediana de 5×10^5 células CD8⁺ por kilograma de peso²⁰. Dos 10 doentes tratados, 6 entraram em remissão completa, em 50% dos casos sem DECH. No segundo estudo de depleção de células CD8⁺, foram tratados 19 doentes com recaída de LMC (6 em recaída citogenética, 7 em fase crónica e 6 em fase avançada) com três doses de células CD4⁺ por kilograma de peso: 3×10^7 (n=13), 10×10^7 (n=2), 15×10^7 (n=4)²¹. Dos 13 doentes com recaída citogenética ou hematológica de doença, 11 obtiveram remissão completa (6 dos 8 tratados com 3×10^7 e 5 dos 5 tratados com doses celulares mais elevadas). Dos 6 doentes tratados com um número de células CD4⁺ igual ou maior a 10×10^7 células por kilograma de peso, 4 desenvolveram DECH, o que sugere que esta complicação pode também ter correlação com o número de células CD4⁺ infundidas.

O terceiro método utilizado para limitar a emergência de DECH foi desenvolvido pelo grupo de Milão e baseia-se na transfecção de linfócitos T do dador com um retrovírus incompetente portador do gene da cinase da

timidina, o que torna estas células sensíveis ao ganciclovir²², como se descreverá mais à frente.

Estudos de Quimerismo

A maioria dos doentes que entram em remissão não têm transcritos de RNA do gene quimérico *bcr/abl* detectáveis por RT-PCR, o que ilustra bem a qualidade das remissões induzidas pela imunoterapia celular com leucócitos de dador após a transplantação alogénica de células estaminais¹⁷. Esta perda de evidência molecular de doença acompanha-se, ainda que detectada por técnicas de PCR de menor sensibilidade, da reversão do estado de quimera total de receptor ou mista para uma quimera total de dador¹⁷. De facto, a análise da identidade dos linfócitos T, que não pertencem ao clone neoplásico, antes e depois da imunoterapia celular com leucócitos de dador, permite avaliar a evolução do quimerismo no decurso da resposta à terapêutica. Invariavelmente, quando se detecta pancitopenia e aplasia medular transitória algumas semanas após a infusão de leucócitos (mais frequente em doentes em recaída hematológica de LMC), que parece corresponder à supressão da hematopoiese do receptor, documenta-se concomitantemente a transição para um quimerismo total de dador nos linfócitos T purificados (observação pessoal)¹⁷. Estes dados sugerem que o resultado terapêutico da infusão de leucócitos de dador pode resultar mais de um efeito alo-reactivo do que de uma resposta específica anti-leucémica.

Imunoterapia de receptores de TMO não familiares e/ou não HLA-compatíveis

Os receptores de transplantes não familiares também respondem à infusão de leucócitos de dador^{14,17,20}. Embora tenham sido tratados relativamente poucos doentes nestas circunstâncias, estudos preliminares sugerem que a incidência de DECH possa ser mais elevada¹⁸. Entre pares de dador/receptor não familiares e/ou não totalmente compatíveis, existem, frequentemente, divergências moleculares em antígenos polimórficos idênticos pela tipagem serológica convencional, o que condiciona uma maior probabilidade de DECH. Provavelmente, a dose celular a utilizar neste contexto imunológico será menor do que a utilizada entre familiares HLA compatíveis.³ No entanto, estudos dose-resposta entre dador e receptor não familiares e/ou não totalmente HLA-compatíveis continuam por desenvolver.

O papel do interferão alfa na resposta à imunoterapia com leucócitos de dador

O interferão alfa é um modelador de resposta biológi-

ca com actividade anti-proliferativa que tem a capacidade de induzir remissão completa hematológica e citogenética em, respectivamente, 50 e 30% dos doentes em recaída de LMC após um transplante alogénico de medula óssea⁷. O interferão alfa atrasa também a progressão da recaída citogenética para recaída hematológica nestes doentes. Embora alguns estudos sugiram que o interferão alfa não influencia a taxa de remissão completa ou a incidência de DECH após a imunoterapia com leucócitos de dador, estes dados devem ser interpretados com alguma prudência, dado que, na maioria dos casos, foram administradas doses elevadas de leucócitos de dador, que em si mesmas induzem remissão completa e DECH na generalidade dos doentes^{17,18}. Além disso, alguns doentes entraram em remissão completa unicamente após a administração de interferão alfa por não terem respondido à infusão de leucócitos, o que sugere que, de alguma forma, o interferão alfa possa potenciar o efeito alo-reactivo do enxerto e das infusões de leucócitos, não se limitando a sua acção a um simples efeito anti-proliferativo leucémico (observação pessoal). Assim, podemos dizer que o papel do interferão alfa na imunoterapia após a transplantação alogénica de medula óssea continua, em boa parte, por desvendar.

UTILIZAÇÃO DE LEUCÓCITOS DE DADOR NA RECAÍDA DE OUTRAS DOENÇAS HEMATO-ONCOLÓGICAS QUE NÃO A LEUCEMIA MIELÓIDE CRÓNICA

A maioria dos doentes tratados com leucócitos de dador no período pós-transplante tinham recaída de LMC. A cinética do clone oncológico assim o permite, dado que a maioria dos doentes recai em fase crónica da doença. As respostas em doentes com recaída de leucemias agudas têm sido ocasionais e, em regra geral, pouco duradouras.

Muitos dos doentes com leucemias agudas receberam alguma forma de quimioterapia citotóxica, dado que a agressividade da doença assim o exigia. Aparentemente, os doentes com LMA respondem mais favoravelmente do que aqueles com leucemia linfoblástica aguda. Enquanto que a imunoterapia de doentes em recaída hematológica é capaz de induzir remissão em menos de 20% dos doentes, mais de metade daqueles em que é induzida remissão completa com a quimioterapia sobrevivem pelo menos dois anos após a infusão de leucócitos de dador⁷. Nestes casos podemos especular que a redução da massa tumoral com os fármacos citotóxicos é essencial para que a imunoterapia celular desenvolva o

seu efeito alo-reactivo e/ou específico dirigido contra células leucémicas residuais.

PREVENÇÃO DA DOENÇA A CITOMEGALOVÍRUS COM A INFUSÃO DE LINFÓCITOS T ESPECÍFICOS

A infecção pelo CMV é uma das principais causas de pneumonia intersticial fatal no doente submetido a um transplante alogénico de medula óssea. Em Portugal este problema é relevante se considerarmos que a maioria da população adulta já teve contacto com o vírus. A única forma de evitar com segurança a possível reactivação do CMV tem sido a transfusão de produtos de sangue CMV⁻, se ambos dador e receptor não apresentam evidência de infecção anterior pelo vírus.

Como profilaxia da infecção pelo CMV, Riddell et al geraram clones de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ de dador específicos para o CMV, através da incubação de linfócitos do sangue periférico com fibroblastos autólogos infectados por este vírus, que depois foram estimulados *in vitro* com anticorpo monoclonal anti-CD3 (após o isolamento do clone) para rápida expansão das células específicas e subsequente administração aos doentes no período precoce pós-transplante⁸. Estes investigadores demonstraram que as infusões de células específicas para o CMV restauraram nos doentes a imunidade específica contra o vírus, não tendo sido registado qualquer caso de infecção por este vírus ou de DECH⁸. Esta é, sem dúvida, uma das mais elegantes utilizações de leucócitos de dador após um transplante alogénico de medula óssea, permitindo a profilaxia específica de uma complicação infecciosa grave pós-transplante.

IMUNOTERAPIA CELULAR DE DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVA INDUZIDAS PELO VÍRUS DE EPSTEIN-BARR

Características das doenças linfoproliferativas EBV⁺ pós-transplante

As doenças linfoproliferativas induzidas pelo EBV são uma complicação pouco frequente em doentes submetidos a transplante alogénico de medula óssea ou de órgãos sólidos³. O denominador comum necessário à emergência destas doenças linfoproliferativas após um transplante alogénico parece ser o compromisso grave da imunidade celular. Assim, na ausência de células T, os linfócitos B imortalizados pelo EBV proliferam de forma não controlada. No início, esta linfoproliferação tende a ser policlonal e muitas células B imortalizadas pelo EBV

multiplicam-se; mais tarde, são seleccionadas células com maior capacidade proliferativa, adquirindo então características oligoclonais. Nesta fase, com a persistência ou agravamento da imunossupressão grave, um clone celular imortalizado pelo EBV pode adquirir uma capacidade proliferativa invulgar e sobrepor-se aos demais, passando a existir critérios de monoclonalidade. Do exposto, entende-se que é o estado de imunodeficiência associado a um transplante alogénico e não o transplante propriamente dito que condiciona a emergência das doenças linfoproliferativas EBV⁺.

A incidência de doenças linfoproliferativas induzidas pelo EBV em doentes submetidos a transplante alogénico de medula óssea é globalmente baixa. De facto, unicamente 8 dos 506 (1,6%) doentes transplantados na Universidade de Minnesota, e 15 dos 2475 (0,6%) doentes transplantados em Seattle, desenvolveram esta complicação^{23,24}. Na primeira série, 6 dos 25 (24%) receptores de transplantes não totalmente compatíveis com depleção de células T e 1 dos 10 (10%) receptores de transplante convencional de medula óssea de dador compatível não familiar desenvolveram linfomas EBV⁺, em contraste com 1 de 424 (0,2%) receptores de transplantes convencionais HLA-compatíveis²³. Em Seattle, 4 dos 24 (16,7%) doentes tratados com OKT3 para tratamento de DECH aguda grave e 2 dos 64 (3,1%) dos receptores de transplantes com depleção de células T surgiram com linfomas EBV⁺²⁴. O aparecimento de DECH aguda, em particular no contexto de transplantes não compatíveis, parece constituir um factor de risco para a emergência de doença linfoproliferativa pós-transplante, dado que 3 dos 232 doentes com DECH grave tratados em Seattle desenvolveram esta complicação.

O risco de doença linfoproliferativa EBV⁺ parece ser máximo em receptores de transplantes em que a depleção de células T seja realizada por anticorpos monoclonais que medeiam uma inibição específica das células T, o que condiciona uma incidência de linfoma EBV⁺ entre os 11 e os 25%³. Em contraste, nos enxertos em que se procede simultaneamente à depleção de linfócitos B e T, tal como com a utilização de aglutininas de soja seguida de glóbulos vermelhos de carneiro, de anticorpo Campath-1, ou de elutriação, a incidência desta complicação é baixa (<2%), mesmo apesar da redução significativa no número de células CD3⁺ infundidas³. Este facto deve-se, provavelmente, a serem também removidos 2 a 3 log₁₀ de linfócitos B, que contêm células imortalizadas pelo EBV⁺.

Do ponto de vista clínico, estes processos linfoproliferativos surgem quase sempre nos primeiros 7 meses após

o transplante e a larga maioria dos doentes apresenta febre e linfadenopatias, frequentemente com localização cervical, verificando-se em cerca de metade dos casos infiltração hepática e esplênica^{3,25}. Em seguida, pulmão, rins e aparelho gastro-intestinal são os locais mais frequentemente envolvidos. Embora a quase totalidade dos linfomas identificados em doentes submetidos a transplante alogénico de medula óssea tenham origem nas células B do dador, existem alguns casos descritos com origem em linfócitos B do doente, que têm surgido mais de 1 ano após o transplante³. Invariavelmente, estas doenças linfoproliferativas EBV⁺ apresentam-se como linfomas de alto grau de malignidade e são monoclonais em mais de 60% dos casos por análise do rearranjo dos genes de imunoglobulina humana e/ou das sequências terminais epissômicas do DNA viral^{3,26,27}. À semelhança da generalidade das doenças linfoproliferativas que surgem em receptores de órgãos sólidos, os linfomas que se desenvolvem em doentes transplantados de medula óssea exprimem a maioria dos antigénios de infecção latente conhecidos do EBV^{26,27}. Estes processos linfoproliferativos são quase invariavelmente refractários à terapêutica convencional, nomeadamente à radioterapia e/ou quimioterapia. Dos 23 doentes descritos por Shapiro et al e por Zutter et al, 20 (87%) faleceram devido a esta complicação^{23,24}, o que ilustra bem a sua agressividade.

Imunoterapia celular de doenças linfoproliferativas EBV⁺ após transplante de células estaminais

Em 1994, Papadopoulos et al descreveram pela primeira vez em 5 doentes o efeito terapêutico da infusão de células mononucleadas colhidas do sangue periférico do dador como forma de tratamento de doenças linfoproliferativas induzidas pelo EBV, com origem em células B do dador, que surgiram precocemente no período pós-transplante no respectivo receptor de medula óssea⁴. Até Julho de 1998, um total de 23 doentes foram tratados²⁸. Todos receberam enxertos com depleção de células T através da utilização sequencial de aglutininas de soja e glóbulos vermelhos de carneiro. A quase totalidade dos doentes foram tratados com irradiação corporal total, tiotepa e ciclofosfamida, tendo também recebido ATG e metilprednisolona para prevenção de rejeição do enxerto no período pós-transplante²⁸.

Todos os doentes apresentaram febre e adenopatias, mais frequentemente no território cervical, e em quase 75% dos casos existiam também manifestações extra-ganglionares, com envolvimento relativamente frequente dos pulmões, rins e aparelho gastro-intestinal. Em todos os casos foi documentada a existência de uma linfopro-

liferação com características de linfoma de grandes células B de alto grau de malignidade com morfologia imunoblástica. A presença do EBV foi documentada por *southern blot* e/ou PCR nos 23 casos. A análise do rearranjo dos genes da imunoglobulina humana e/ou das terminações do DNA do EBV revelaram a existência de lesões monoclonais em 14 dos 16 casos analisados, e estudos de quimerismo confirmaram que estes processos tinham origem nas células B do dador nos 11 casos testados²⁸.

Todos os doentes foram tratados com células mononucleadas do sangue periférico do respectivo dador, contendo uma dose de células CD3⁺ aproximada de 1 x 10⁶ por kilograma de peso do receptor, o que corresponde a um número de linfócitos T cerca de 10 vezes superior à dose necessária para a indução de DECH na altura do transplante em doentes submetidos a um transplante com depleção de células T de dador familiar HLA-compatível, mas aproximadamente 10 vezes menor do que o número de células administradas num transplante convencional de medula óssea^{3,29}. As infusões de leucócitos foram bem toleradas, tendo-se verificado regressão completa do linfoma em 20 dos 22 doentes avaliáveis para resposta, com resolução dos sintomas e sinais no primeiro mês após a imunoterapia com os leucócitos. Nalguns casos com doença mais extensa e envolvimento extra-ganglionar significativo, a resposta completa foi documentada unicamente durante o segundo mês após o tratamento. Globalmente, as infusões de leucócitos foram complicadas em 3 casos com DECH aguda (1 Grau I e 2 Grau II) e em 9 casos por DECH crónica (5 extensa e 4 limitada). Dos 22 doentes tratados, 13 encontram-se vivos 3 a 42 meses após a infusão de leucócitos, sem recorrência do mesmo. A causa de morte mais frequente neste grupo de doentes foi a recaída da sua doença hematológica primária.

Enquanto inovador, este fenómeno terapêutico carecia de explicações biológicas satisfatórias, dado que se desconhecia qual o efeito da administração de células mononucleadas do sangue periférico de dador ao receptor de um transplante alogénico de medula óssea e, em particular, qual as células efectoras que mediarão a regressão de doença extensa.

Avaliação da função imunológica após a infusão de leucócitos de dador

O trabalho de Small et al tentou de certa forma responder a algumas destas questões, ao examinar o imunofenótipo do sangue periférico e a função imune dos doentes transplantados em períodos fixos após o trans-

plante³⁰. Nestes estudos, verificou-se que doentes tratados com leucócitos do respectivo dador de medula óssea, como profilaxia ou tratamento de linfoma EBV⁺ ou como tratamento de recaída de LMC após o transplante, tinham uma recuperação das contagens de células CD3⁺, em particular daquelas com imunofenótipo CD4, mais acelerada, que se iniciava cerca de 2 a 3 semanas após o transplante. Do mesmo modo, as células T destes doentes apresentavam respostas proliferativas a mitogénios, a anticorpo monoclonal anti-CD3 e a superantígenos, bem como uma produção de IL-2 em cultura, significativamente superiores àquelas obtidas com linfócitos T de doentes não tratados com imunoterapia celular³⁰. A diferente reconstituição imunológica é particularmente notória nos primeiros 6 a 9 meses após o transplante, período após o qual se verifica uma recuperação progressiva e aceitável da função imune, mesmo em receptores de transplantes de dador não familiar com depleção de células T. Assim, estes resultados demonstram que a infusão de leucócitos de dador ao respectivo receptor de medula óssea acelera a sua recuperação imunológica, sendo de esperar que o risco de complicações decorrentes da imunossupressão diminua nestes doentes.

Lucas et al investigaram a frequência de precursores de linfócitos T específicos para o EBV em doentes submetidos a transplante alogénico de medula óssea com e sem depleção de células T, e verificaram que uma percentagem significativa de doentes, inclusive receptores de transplantes convencionais de medula óssea, exibiam frequências muito baixas de precursores destas células nos primeiros 3 a 6 meses após o transplante. Este período corresponde, como se viu, àquele de maior risco para o desenvolvimento de doença linfoproliferativa induzida pelo EBV³¹. No entanto, estes investigadores demonstraram também que a maioria dos doentes readquiria frequências destas células efectoras idênticas às observadas em indivíduos seropositivos para o vírus depois do sétimo mês após o transplante, altura em que o risco para a emergência desta complicação é já pequeno.

Em conjunto, estes resultados sugerem que o linfócito T específico para o EBV é a célula efectora das regressões linfomatosas observadas em receptores de transplante alogénico de medula óssea. No entanto, o conhecimento do verdadeiro papel desempenhado por estas células, a sua caracterização imunofenotípica e citotóxica, bem como a contribuição de outras possíveis células efectoras nas regressões tumorais observadas, estavam largamente por desvendar. Em particular, a cinética, especificidade, necessidade ou não de entrar em contacto com as células infectadas, bem como os mecanismos

de acção *in vivo* das células efectoras permaneciam totalmente desconhecidos.

Modelos animais para o desenvolvimento e imunoterapia de doenças linfoproliferativas humanas EBV⁺

Com o objectivo de esclarecer estes pontos, estabelecemos modelos animais no ratinho *scid* para o desenvolvimento de doenças linfoproliferativas humanas induzidas pelo EBV. Neste modelo demonstrámos que estes processos linfoproliferativos que se desenvolvem no ratinho *scid* xenotransplantado com a inoculação de linhas celulares humanas imortalizadas pelo EBV têm características clínicas, morfológicas, imunofenotípicas e moleculares idênticas àquelas que se desenvolvem em doentes submetidos a um transplante alogénico de medula óssea^{32,33}. Estudos de *southern blot* confirmaram a monoclonalidade das lesões em mais de 20 animais testados.

Ao contrário do modelo humano, a administração de células mononucleadas do sangue periférico, activadas ou não com IL-2, ou de linfócitos T purificados, activados ou não com anticorpo monoclonal anti-CD3, a ratinhos *scid* portadores de doença linfoproliferativa humana autóloga induzida pelo EBV não tem qualquer efeito terapêutico para um *E/T ratio in vivo* de 1:1. Estes resultados sugerem que a frequência de precursores específicos para o EBV deve ser maior na população celular efectora para induzir um resposta terapêutica no modelo animal^{34,35}. De facto, a administração de linfócitos T específicos para o EBV, estimulados *in vitro* com a linha celular autóloga imortalizada pelo EBV, administrados por via intraperitoneal ou intravenosa a ratinhos *scid* portadores de doença linfoproliferativa humana induzida pelo EBV autóloga, mas não alogénica, para um *E/T ratio in vivo* de 1:1, resulta num prolongamento de sobrevida estatisticamente significativo em comparação com os respectivos grupos de controlo³⁴⁻³⁶.

Experiências subsequentes demonstraram que os linfócitos T específicos para o EBV têm a capacidade de infiltrar selectivamente os tumores EBV⁺ autólogos em ratinhos *scid* portadores de dois tumores EBV⁺ subcutâneos, o autólogo e o segundo totalmente díspar ou haplo-idêntico em relação ao autólogo³⁵. Este padrão de migração preferencial verifica-se desde as primeiras 24 horas após a infusão das células efectoras nos animais.

Estudos finais viriam a demonstrar que a administração intraperitoneal de linfócitos T específicos para o EBV purificados CD4⁺, com citotoxicidade restringida por antígenos HLA de classe II, ou CD8⁺, com actividade citotóxica restringida por antígenos HLA de classe

I, a ratinhos *scid* portadores de doença linfoproliferativa humana induzida pelo EBV autóloga intraperitoneal, para um *E/T ratio in vivo* de 0,2:1, resulta num prolongamento de sobrevivida estatisticamente significativo comparável àquele obtido com a administração de linfócitos T específicos para o EBV não separados³⁷.

Em conjunto, os nossos estudos nos modelos animais desenvolvidos identificam e caracterizam a actividade *in vitro* e *in vivo* das células efectoras responsáveis pelas regressões terapêuticas verificadas nos receptores de transplante alogénico de medula óssea.

IMUNOTERAPIA COM LEUCÓCITOS DE DADOR TRANSFECTADOS

O principal risco decorrente da infusão de receptores de transplantes alogénicos de medula óssea com células mononucleadas do sangue periférico do respectivo dador é o desenvolvimento de DECH grave. Conforme foi demonstrado por estudos recentes de imunoterapia celular, este risco é relativamente pequeno com a administração de uma dose controlada de leucócitos após um transplante alogénico de medula óssea de um dador familiar HLA-compatível^{3,17}. No entanto, é necessário não esquecer que uma percentagem significativa dos doentes com doença linfoproliferativa pós-transplante receberam um enxerto de um dador não totalmente compatível e/ou não familiar, existindo, neste contexto, um risco acrescido de DECH. De facto, Heslop et al descreveram um caso de um receptor de um transplante familiar com disparidade em dois antígenos HLA que desenvolveu DECH de grau IV após infusão de leucócitos de dador para tratamento de um linfoma EBV⁺ que surgiu 8 meses após o transplante.³⁸ Para circundar o obstáculo da DECH, duas estratégias foram desenvolvidas até à data, ambas utilizando vectores retrovirais, no intuito de enriquecer a frequência de células específicas para o EBV e remover células alo-reactivas.

O primeiro método, envolveu a utilização de linfócitos T específicos para o EBV do dador, gerados *in vitro* durante algumas semanas e transfectados subsequentemente com um retrovírus incompetente portador do gene da resistência à neomicina (*neo*[®])³⁹. Em seguida, estas células foram administradas aos receptores de transplante alogénico de medula óssea, na dose aproximada de 1 a 10 x 10⁷ células CD3⁺ por metro quadrado de superfície corporal com intuito terapêutico em 3 casos e profilático em todos os outros. Nos doentes com doença linfoproliferativa verificou-se uma resolução rápida dos

sintomas nas primeiras duas semanas após o transplante, obtendo-se resolução completa do quadro clínico quatro semanas após a infusão. Dado que na população das células infundidas 1 a 5% estavam eficazmente transfectadas, foi possível detectar a presença destas células efectoras no sangue dos doentes tratados mais de 12 meses após a sua infusão. Estes resultados confirmam no homem muitas das observações por nós descritas no ratinho xenotransplantado, em particular a sobrevivência prolongada *in vivo* das células efectoras. Uma observação relevante deste estudo foi a de que estas infusões não se acompanharam de DECH, mesmo em receptores de transplantes de dador não compatível e/ou não familiar³⁹.

A segunda estratégia utilizada até à data para reduzir o risco desta complicação também envolveu o desenvolvimento de linfócitos T específicos para o EBV, mas por uma outra metodologia. Nestes estudos, o grupo de Milão transfectou células reactivas contra o EBV, durante os primeiros dias de cultura com a linha celular autóloga imortalizada pelo EBV, com um retrovírus incompetente que codificava simultaneamente um receptor mutante para o factor de crescimento neuronal (NGFR - *nerve growth factor receptor*), o que permite a sua detecção e selecção com um anticorpo monoclonal, e o gene de cinase da timidina do herpesvírus, que torna estas células sensíveis ao ganciclovir^{22,40}. Devido à presença deste receptor mutante na sua superfície, foi possível isolar estas células por imuno-adsorção e administrá-las a 2 doentes submetidos a um transplante alogénico de medula óssea que tinham desenvolvido doença linfoproliferativa induzida pelo EBV no período pós-transplante. Tal como nos estudos até agora descritos, verificou-se uma resolução completa das manifestações clínicas após a infusão dos linfócitos. Curiosamente, 2 semanas após a infusão, aproximadamente 13% dos leucócitos do doente eram células CD3⁺, predominante, mas não exclusivamente, CD8⁺ e NGFR⁺, o que revela uma proliferação significativa das células infundidas. Ao contrário do estudo de Rooney et al, estas células tinham sido geradas em culturas a curto prazo e continham uma percentagem apreciável de células alo-reactivas. De facto, um dos doentes desenvolveu DECH aguda que regrediu com a administração de ganciclovir. Estes dois modelos descrevem já uma progressão em relação ao modelo descrito nos nossos estudos clínicos,³ e utilizam muitos dos princípios por nós desenvolvidos no ratinho *scid*³⁴⁻³⁷. Este último método foi também empregue em alguns doentes com recaídas pós-transplante de LMC e de leucemias agudas.⁴⁰

BIBLIOGRAFIA

1. BARRETT AJ, VAN RHEE F: Graft-versus leukaemia. *Bailliere's Clin Haematol* 1997; 10:337-355.
2. KERNAN NA, COLLINS NH, JULIANO L, CARTAGENA T, DUPONT B, O'REILLY RJ: Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft v host disease. *Blood* 1986;68:770-773.
3. O'REILLY RJ, LACERDA JF, LUCAS KG, ROSENFELD NS, SMALL TN, PAPADOPOULOS EB: Adoptive cell therapy with donor lymphocytes for EBV-associated lymphomas developing after allogeneic marrow transplants. In: de Vita VT Jr, Hellman S, Rosenberg S, eds. *Important Advances in Oncology* 1996. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996:149-166.
4. PAPADOPOULOS EB, LADANYI M, EMANUEL D et al.: Infusions of donor leukocytes as treatment of Epstein-Barr virus associated lymphoproliferative disorders complicating allogeneic bone marrow transplantation. *N Eng J Med* 1994;330:1185-1191.
5. O'REILLY RJ, SMALL TN, PAPADOPOULOS EB, LUCAS K, LACERDA J, KOULOVA L: Biology and adoptive cell therapy of Epstein-Barr associated lymphoproliferative disorders in recipients of marrow allografts. *Immunol Rev* 1997;157:195-216.
6. KOLB HJ, MITTERMULLER J, CLEMM CH et al.: Donor leukocyte transfusions for treatment of chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990;76:2462-2465.
7. KOLB HJ, MITTERMULLER J, HOLLER E, THALMEIER K, BARTRAM CR: Graft-versus-host reaction spares normal stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 1996;17:449-452.
8. RIDDELL SR, WATANABE RS, GOODRICH JM, LI CR, AGHA ME, GREENBERG PD: Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 1992;257:238-242.
9. DROBYSKI WR, KEEVER CA, ROTH MS et al.: Salvage immunotherapy using donor leukocyte infusions as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: efficacy and toxicity of a defined T-cell dose. *Blood* 1993;82:2310-2318.
10. HELG C, ROUX E, BERIS P et al.: Adoptive immunotherapy for recurrent CML after BMT. *Bone Marrow Transplantation* 1993;12:125-129.
11. HERTENSTEIN B, WIESNETH M, NOVOTNY J et al.: Interferon- α and donor buffy coat transfusions for treatment of relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1993;56:1114-1118.
12. BAR BMAM, SCHATTENBERG A, MENSINK EJM et al.: Donor leukocyte transfusions for chronic myelogenous leukemia relapsed after bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1994;11:513-519.
13. PORTER DL, ROTH MS, MCGARIGLE C, FERRARA JL, ANTIN JH: Induction of graft-versus-host disease as immunotherapy for relapsed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1994;330:100-106.
14. VAN RHEE F, LIN F, CULLIS JO et al: Relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplant: the case for giving donor leukocyte transfusions before the onset of hematologic relapse. *Blood* 1994;83:3377-3383.
15. KOLB HJ, SCHATTENBERG A, GOLDMAN JM et al: Graft-versus leukemia effect of donor leukocyte transfusions in marrow grafted patients. *European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia*. *Blood* 1995;86:2041-2050.
16. COLLINS RH, SHPILBERG O, DROBYSKI WR et al: Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1997;15:433-44.
17. MACKINNON S, PAPADOPOULOS EB, CARABASI MH et al: Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myelogenous leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease. *Blood* 1995;86:1261-1268.
18. MACKINNON S: Donor leukocyte infusions. *Bailliere's Clin Haematol* 1997;10:357-367.
19. GOLDMAN JM: Treatment of chronic myeloid leukaemia: some topical questions. *Bailliere's Clin Haematol* 1997;10:405-421.
20. GIRALT S, HESTER J, HUH Y et al: CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1995;86:4337-4343.
21. ALEYA EP, CANNING C, COLLINS H et al: Efficacy and toxicity of CD4+ donor T lymphocyte infusion for treatment of relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic BMT. *Blood* 1996;88:682a.
22. MAVILIO F, FERRARI G, ROSSINI S et al: Peripheral blood lymphocytes as target cells of retroviral vector-mediated gene transfer. *Blood* 1994;83:1988-1997.
23. SHAPIRO RS, MACLAIN K, FRIZZERA G et al: Epstein-Barr virus associated B-cell lymphoproliferative disorders following bone marrow transplantation. *Blood* 1988;71:1234-1243.
24. ZUTTER MM, MARTIN PJ, SALE GE et al: Epstein-Barr virus lymphoproliferation after bone marrow transplantation. *Blood* 1988;72:520-529.
25. COHEN JI: Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease associated with acquired immunodeficiency. *Medicine* 1991;70:137-160.
26. YOUNG L, ALFIERI C, HENNESSY K et al: Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease. *N Engl J Med* 1989;321:1080-1085.
27. GRATAMA JW, ZUTTER MM, MINAROVITS J, OOSTERVEER MAP, THOMAS ED: Expression of Epstein-Barr virus-encoded growth-transformation-associated proteins in lymphoproliferations of bone marrow transplant recipients. *Int J Cancer* 1991;47:188-192.
28. O'REILLY RJ, SMALL TN, PAPADOPOULOS EB, LUCAS K, LACERDA J, KOULOVA L: Adoptive immunotherapy for EBV-associated lymphoproliferative disorders complicating marrow allografts. *Sem Immunopathol* 1998 (em impressão).
29. KERNAN NA, FLOMENBERG N, COLLINS NH, O'REILLY RJ, DUPONT B: Quantitation of T lymphocytes in human bone marrow by a limiting dilution assay. *Transplantation* 1985;40:317-322.
30. SMALL TN, PAPADOPOULOS EB, KERNAN NA, O'REILLY RJ: Effects on immune reconstitution of unirradiated donor leukocyte infusions for the treatment or prophylaxis of EBV-lymphoproliferative disorders following unrelated bone marrow transplantation (BMT). *Blood* 1993;82:214a.
31. LUCAS KG, SMALL TN, HELLER G, DUPONT B, O'REILLY RJ: The development of cellular immunity to Epstein-Barr virus following allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996;87:2594-2603.
32. LACERDA JF, DENNIG D, LADANYI M et al: Growth of Epstein-Barr virus-induced B-cell lymphoproliferative disorders (EBV-LPD) in mice with severe combined immunodeficiency (SCID) is facilitated by depletion of mouse natural killer cell function with rabbit anti-asialo GM1 antiserum (A-asialo GM1). *Blood* 1994;84:497a.
33. LACERDA JF, LADANYI M, JAGIELLO C, O'REILLY RJ: Administration of rabbit anti-asialo GM1 antiserum facilitates the development of human EBV-induced lymphoproliferations in xenografted C.B-17 *scid/scid* mice. *Transplantation* 1996;61:492-497.
34. LACERDA JF, DENNIG D, LUCAS K et al: Adoptive immunotherapy with human Epstein-Barr virus (EBV) specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) for the treatment of severe combined immunodeficiency (SCID) mice bearing human EBV-induced lymphoproliferative disorders (EBV-LPD). *Blood* 1994;84:398a.
35. LACERDA JF, LADANYI M, LOUIE DC, FERNANDEZ JM, PAPADOPOULOS E, O'REILLY RJ: Human Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes home preferentially to and induce selective regressions of autologous EBV-induced lymphoproliferations in xenografted C.B-17 *scid/scid* mice. *J Exp Med* 1996;183:1215-1228.

36. LACERDA JF, O REILLY RJ. Characteristics of human Epstein-Barr (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes for adoptive immunotherapy of EBV-induced lymphoproliferations in xenografted SCID mice. *Ann Oncol* 1997;8:S137-S140.
37. LACERDA JMF: Imunoterapia celular de doenças linfoproliferativas induzidas pelo virus de Epstein-Barr. Tese de Doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, 1998.
38. HESLOP HE, BRENNER MK, ROONEY CM. Donor T cells to treat EBV-associated lymphoma. *N Engl J Med* 1994;331:679.
39. ROONEY CM, SMITH CA, NG CYC et al: Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 1995;345:9-13.
40. SERVIDA P, ROSSINI S, TRAVERSARI C et al: Gene transfer into peripheral blood lymphocytes for in vivo immunomodulation of donor anti-tumor immunity in a patient affected by EBV-induced lymphoma. *Blood* 1993;82:214a.