

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

ALINE DE ALMEIDA OLIVEIRA

O PAPEL DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER* E OS
RECEPTORES KIR NAS LEUCEMIAS AGUDAS

Rio de Janeiro
2007

ALINE DE ALMEIDA OLIVEIRA

O PAPEL DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER* E OS RECEPTORES KIR NAS
LEUCEMIAS AGUDAS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Oncologia do Instituto
Nacional de Câncer para a obtenção do título
de Mestre em Oncologia

Orientadora: Dra Hilda Rachel Diamond

Rio de Janeiro
2007

ALINE DE ALMEIDA OLIVEIRA

O PAPEL DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER* E OS RECEPTORES
KIR NAS LEUCEMIAS AGUDAS

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional
de Câncer, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Oncologia

Aprovada em

BANCA EXAMINADORA

Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Pedro Muanis Persechini
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Arnaldo Feitosa Braga de Andrade
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Dedico esse trabalho a Hilda, minha orientadora, pela luz, apoio e força de vontade que gentilmente me cedeu. Dedico também a minha mãe, amiga de todas as horas. Ao Marcos, amor da minha vida. Por fim, aos pacientes com leucemia, que encontrem a cura.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me guiado no caminho difícil, mas gratificante, que me trouxe a este momento. Agradeço também a Ele por ter feito tantos amigos no caminho, tantas pessoas que caminharam ao meu lado, mesmo que por apenas alguns minutos, mas tornaram tudo mais fácil. Agradeço à Hilda Rachel Diamond, a melhor orientadora que alguém poderia sonhar em ter. Obrigada por estar sempre ao meu lado, me apoiando, se preocupando comigo, me guiando, me estimulando e me desafiando a fazer melhor. Este trabalho não teria sido concluído sem a sua dedicação. Agradeço à equipe do Laboratório de Imunologia do CEMO, minhas amigas e minhas companheiras de todas as horas: Aline Ribeiro, Carla Pedrosa, Deborah Amado, Karen de Souza, Mércia Campos, Bernadete Gomes, Bárbara du Rocher, Carolina Cardoso, Claudia Diniz e em especial à Maria Helena Ornellas, que sempre nos ilumina com seus conhecimentos e sabedoria. Agradeço a todo o corpo clínico do CEMO, principalmente à Rita Tavares, Joana Lima e Décio Lerner. Gostaria de agradecer a Willian Sacramento, Christina Nogueira, César de Souza e em especial à Matilde Romero, do Laboratório de Imunogenética, que tanto contribuíram para a realização deste trabalho. Agradeço ao Flávio Braga e equipe de Banco de Cordão Umbilical, por estender a mão num momento de necessidade. Agradeço ao diretor do CEMO, Luis Fernando Bouzas; e à supervisora da Divisão Laboratorial, Eliana Abdelhay. Agradeço a Sueli e equipe de coleta do Banco de Sangue do INCA. Agradeço aos professores de estatística: Pedro Carvalho, do INCA, e Fernando Portela da UFRJ. Agradeço à equipe de médicos e residentes do IPPMG-UFRJ, em especial a Ana Paula Bueno e Elaine Sobral. Agradeço ao corpo clínico do HUPE-UERJ, principalmente à Stella Beatriz de Lucena. Agradeço a equipe da Pós-Graduação Stricto Sensu do INCA pela oportunidade, em especial ao Dr. Marcelo Barcinski. Agradeço a CAPES, FAPERJ e ao Ministério da Saúde pelo apoio financeiro. Por fim, mas não menos importante, agradeço à família e aos amigos pelo apoio nas horas difíceis. Um agradecimento especial a minha mãe, que me ensinou a amar, a ser feliz e a seguir carreira acadêmica. Um último agradecimento muito especial ao Marcos, amor da minha vida, que conteve todas as tempestades existenciais provocadas por este imenso trabalho e me trouxe a mais pura e completa felicidade.

“Grandes descobertas e conquistas envolvem,
invariavelmente, a cooperação de muitas mentes.”

(Alexander Graham Bell)

RESUMO

Recentemente tem crescido o interesse no potencial antileucêmico das células *natural killer* (NK). Diferentes leucemias parecem apresentar susceptibilidade distinta à atividade citotóxica das células NK, mas ainda não há um consenso sobre qual tipo de leucemia seria mais susceptível. A atividade citotóxica destas células é regulada pelo equilíbrio dos sinais gerados pela ligação de receptores ativadores e inibidores a moléculas específicas nas células alvo. Os receptores da família *killer immunoglobulin-like receptor* (KIR), que inclui receptores ativadores e inibidores, relacionados com a imunovigilância das células NK contra células com expressão alterada de antígeno leucocitário humano de classe I (HLA-I). O objetivo deste trabalho foi estudar *in vitro* o papel das células NK e os seus receptores KIR contra diferentes leucemias agudas, correlacionando com o fenótipo da leucemia e com a história clínica do paciente. Foi realizada atividade citotóxica de células NK de 14 doadores saudáveis contra 16 amostras de 15 pacientes contendo blastos leucêmicos. Foram estudados os genótipos de HLA de 12 pacientes e KIR/HLA de 11 doadores. Embora o tamanho da nossa amostra seja pequeno, nossos resultados sugerem que a leucemia linfoblástica aguda (LLA) pré-B seria o subtipo de LLA mais susceptível à atividade NK e os casos de leucemia mielóide aguda (LMA) secundários à síndrome mielodisplásica (SMD) os mais resistentes. Pela primeira vez na literatura, relatamos a resistência à atividade citotóxica de leucemia bifenotípica aguda (LBA). Não houve correlação entre a susceptibilidade à atividade NK e a sobrevivência dos pacientes tratados com quimioterapia, o que provavelmente está relacionado à ausência de células NK aloreativas e imunossupressão após o tratamento. Nos três pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) parece que houve uma correlação entre o resultado do transplante e a susceptibilidade à atividade NK. Houve uma correlação da incompatibilidade KIR entre doador e paciente e a susceptibilidade à lise das células leucêmicas, embora com duas exceções. Sugerimos que quanto maior o número de incompatibilidades KIR entre doador e paciente, maior o potencial aloreativo das células NK. Todos estes resultados precisam ser confirmados, pois o tamanho da amostra é pequeno. O presente trabalho, juntamente com os dados da literatura, sugere que as células NK possuem um papel antileucêmico importante, indicando que uma imunoterapia de células NK poderia beneficiar pacientes com diferentes tipos de leucemias agudas, tanto na fase inicial quanto na recaída da doença.

Palavras-chave: Células *Natural Killer*, Receptores KIR, Leucemias Agudas.

ABSTRACT

The anti-leukemic potential of natural killer (NK) cells has raised considerable interest over the years. Different leukemias appear to vary in their sensitivity toward NK cell-mediated lysis, but there is not a consensus about which subtype of leukemia is the most susceptible. NK cytotoxicity is ultimately regulated by a balance of signals from activating and inhibitory receptors. One of most studied mediators of this signals are the killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) that specifically recognize groups of human leukocyte antigen class I (HLA-I) in target cells. The regulatory mechanism mediated by these receptors is thought to protect normal cells from autologous NK cell attack, while rendering cells for which HLA-I expression is compromised susceptible to NK-mediated killing. The aim of this work was to study the role of NK cells and its receptors KIR against different acute leukemias, correlating with the leukemia phenotype and the clinical outcome. Cytotoxicity assay of 14 healthy donors was performed against 16 samples with leukemic blasts from 15 patients. We studied HLA genotyping of 12 patients and KIR/HLA genotyping of 11 donors. Although the small sample size, our results suggest that acute lymphoblastic leukemia (ALL) pre-B is the ALL type most susceptible to NK activity and the acute myeloid leukemia (AML) secondary to myelodysplastic syndromes (MDS) the most resistant. This is the first relate of biphenotypic acute leukemia (BAL) resistance to cytotoxicity activity. There was no correlation between susceptibility to NK activity and survival of chemotherapy treated patients. This is probably related to the lack of alloreactive NK cells and to immunodeficiency after the treatment. In hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) cases appears to be a correlation between the transplant outcome and susceptibility to NK activity. There was a correlation of KIR incompatibility between donor and patient and susceptibility to NK mediated lysis, although there were two exceptions. We suggest that more KIR incompatibilities are related with a stronger alloreactive potential of NK cells. All this results needs confirmation because the sample size is small. This study, together with data from other authors, suggests that NK cells have an important antileukemic potencial, indicating that an immunotherapy of NK cells could benefit patients with different kinds of leukemia, in the initial phase of the disease or in relapse after treatment.

Keywords: Natural Killer Cells, KIR receptors, Acute Leukemias.

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATG - anti-timócito globulina
- BFM - Protocolo de quimioterapia Berlin-Frankfurt-Munster
- CD - Grupo de diferenciação
- C μ - Cadeia μ de imunoglobulina intracitoplasmática
- DC - Células dendríticas
- DECH - Doença enxerto-contra-hospedeiro
- DNFB - 2,4-dinitrofluorobenzeno
- ECL - Enxerto-contra-leucemia
- FAB - Grupo cooperativo Francês-Americano-Britânico
- GM-CSF- Fator de estimulação de colônia de macrófago e granulócito
- HLA - Antígeno leucocitário humano
- IFN - Interferon
- Igs - Imunoglobulina de superfície
- IL - Interleucina
- ILD - Infusão de linfócitos de doador
- ITAM - *Immunoreceptor tyrosine-based activating motif*
- ITIM - *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*
- KIR - *Killer immunoglobulin-like receptor*
- LBA - Leucemia bifenotípica aguda
- LFA-1 - Função linfóide associada ao antígeno 1
- LMA - Leucemia mielóide aguda
- LMC - Leucemia mielóide crônica
- LLA - Leucemia linfoblástica aguda
- MHC - Antígenos de histocompatibilidade maior
- NCR - Receptores de citotoxicidade natural
- NK - *Natural killer*
- SMD - Síndrome mielodisplásica
- TCR - Receptor de linfócitos T
- TCTH - Transplante de células tronco hematopoéticas
- TGF- β - Fator beta de transformação do crescimento
- TNF - Fator de necrose tumoral
- TRAIL- Ligante de apoptose relacionado ao TNF

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1. Leucemias agudas	18
3.1.1. <u>Leucemia linfoblástica aguda</u>	18
3.1.2. <u>Leucemia mielóide aguda</u>	23
3.1.3. <u>Leucemia bifenotípica aguda</u>	27
3.2. Tratamento das leucemias agudas	29
3.2.1. <u>Quimioterapia</u>	29
3.2.2. <u>Transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH)</u>	32
3.3. Células <i>natural killer</i> (NK)	41
3.3.1. <u>Biologia das células NK</u>	41
3.3.2. <u>Subpopulações das células NK</u>	46
3.3.3. <u>As células NK e a sua participação na resposta adaptativa</u>	48
3.4. Receptores de células <i>natural killer</i>	53
3.4.1. <u>Reconhecimento das células alvo</u>	53
3.4.2. <u>Família <i>killer immunoglobulin-like receptor</i> (KIR)</u>	58
3.4.3. <u>Clones de células NK e o TCTH</u>	61
3.5. Atividade antileucêmica das células <i>natural killer</i>	72
3.5.1. <u>Susceptibilidade e resistência dos diferentes tipos de leucemia</u> ..	72
3.5.2. <u>Imunoterapia de células NK</u>	76
4. METODOLOGIA	79
4.1. Doadores saudáveis	79
4.2. Pacientes	80
4.3. Imunofenotipagem por citometria de fluxo	83
4.4. Atividade citotóxica	84
4.5. Genotipagem KIR e antígeno leucocitário humano (HLA)	85
4.6. Análise estatística	88
5. RESULTADOS	89

5.1. Perfil dos indivíduos saudáveis	89
5.1.1. <u>Perfil imunofenotípico</u>	89
5.1.2. <u>Atividade citotóxica</u>	95
5.1.3. <u>Genótipo KIR e HLA</u>	98
5.2. Pacientes	100
5.2.1. <u>Susceptibilidade à atividade NK</u>	100
5.2.2. <u>Genótipo KIR e HLA e a susceptibilidade à atividade NK</u>	104
6. DISCUSSÃO	114
7. CONCLUSÕES	126
REFERÊNCIAS	128
ANEXOS	139

O48p

Oliveira, Aline de Almeida.

O papel das células natural de Killer e os receptores KIR nas leucemias agudas/ Aline de Almeida Oliveira - Rio de Janeiro: INCA, 2007.
138p. il. color. tab.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Oncologia - Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2007.

Orientador (a): Dr^a Hilda Rachel Diamond.

1. Células Natural Killer. 2. Leucemia. 3. Receptor KIR.
I. Diamond, Hilda Rachel. II. Instituto Nacional de Câncer.
III. Título.

CDD 616.9941907

1. INTRODUÇÃO

As leucemias agudas são um grupo heterogêneo de doenças com diferentes características clínicas, morfológicas, imunofenótípicas, citogenéticas e moleculares em que ocorrem proliferações malignas de células precursoras hematopoéticas seqüestradas em determinados estágios de diferenciação (Weir e Borowitz, 2001; Szczepanski et al., 2003). As leucemias agudas são divididas em dois tipos, de acordo com a linhagem afetada: leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia mielóide aguda (LMA) (Riley et al., 2002; Szczepanski et al., 2003). Estas duas linhagens têm características clínicas e laboratoriais distintas (Jennings e Foon, 1997; Pui et al., 2004).

Na última década tem sido feito um considerável progresso no tratamento e entendimento da biologia das leucemias agudas. Este progresso levou a uma melhora na sobrevida de crianças afetadas por LLA e LMA, através da evolução da estratificação de risco, quimioterapia, transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) e cuidados de suporte. Atualmente, cerca de 80% das crianças diagnosticadas com LLA e 50% das com LMA alcançam a cura (Pui et al., 2004). Apesar destes avanços, ainda não houve grandes melhoras na sobrevida livre de doença nos casos de adultos com LMA e LLA, que se mantêm em torno de 30 a 40% (Hoelzer et al., 2002; Stone et al., 2004).

As classificações mais atuais de leucemias agudas incluem, além da LMA e da LLA, outras entidades mais raras, como a leucemia bifenotípica aguda (LBA), caracterizada pela co-expressão de marcadores de mais de uma linhagem na mesma população de células. Com relação à LBA, ainda não há um protocolo de tratamento bem definido, mas há uma associação desta entidade com mau prognóstico (Matutes et al., 1997; Killick et al., 1999; Szczepanski et al., 2003).

O tratamento dos pacientes com leucemias agudas é definido de acordo com a estratificação de risco, a partir de uma avaliação de características clínicas e laboratoriais.

Inicialmente é feita uma terapia de indução de remissão, na maioria das vezes quimioterapia, cujo objetivo é eliminar as células leucêmicas, permitindo a recuperação das populações de células normais e levando à remissão. De acordo com a resposta ao tratamento de indução e com os fatores de prognóstico, é realizada uma terapia de consolidação que visa evitar a recaída (Hoelzer et al., 2002; Pui et al., 2004; Stone et al., 2004).

O TCTH alogeneico é um tratamento bem estabelecido e tem sido muito utilizado como estratégia curativa para uma variedade de doenças hematológicas malignas associadas a um mau prognóstico com a quimioterapia convencional ou que continuaram progredindo após uma resposta inicial à quimioterapia (Riddell et al., 2003). Na última década, o paradigma do tratamento de leucemias por TCTH mudou. O foco inicial era utilizar doses mieloablativas de radiação e quimioterapia para eliminar a leucemia e o transplante era realizado para prevenir a morte por falha da medula óssea. Atualmente o enfoque do TCTH alogeneico consiste em um regime de condicionamento com baixas doses de quimioterapia e radioterapia, suficientes apenas para permitir a “pega” das células tronco hematopoéticas do doador. Neste modelo de transplante mais atual, as células aloimunes de origem do doador é que serão responsáveis por erradicar as células leucêmicas como uma forma de imunoterapia adotiva (Kolb et al., 2004).

Uma das maiores limitações do TCTH alogeneico é a doença enxerto contra hospedeiro (DECH), que é causada por um ataque das células T do doador contra aloantígenos do receptor. Uma tentativa de evitar esta doença foi feita através da depleção das células T que, embora tenha prevenido a DECH, levou à falha da “pega” do enxerto e a um aumento da recaída da doença de base (Asai et al., 1998; Shlomchik et al., 1999). A partir desta observação foi sugerido que as células T do doador produzam uma resposta imunológica capaz de induzir a remissão contínua da leucemia, o que é conhecido como efeito enxerto contra leucemia, ECL (Jaksch e Mattsson, 2005). A eficiência do ECL pôde ser avaliada

através da resposta observada em pacientes que receberam infusão de linfócitos de doador (ILD) como tratamento de recaída após TCTH alogeneico (Kolb et al., 1995).

Tem sido sugerido que os linfócitos T não são as únicas células efetoras importantes envolvidas no ECL (Jaksch e Mattsson, 2005). Recentemente foi demonstrado que as células *natural killer* (NK) também participam como mediadoras deste efeito (Barret et al., 2003) e o interesse no potencial antileucêmico destas células tem crescido nos últimos anos (Torelli et al., 2005).

Desde a década de 80, as células NK foram consideradas como a primeira linha de defesa contra células tumorais. Nesta época, foi demonstrado que estas células tinham atividade citotóxica contra diversos tipos de leucemias, tanto células primárias quanto linhagens estabelecidas. Diferentes leucemias parecem apresentar susceptibilidade distinta à atividade citotóxica das células NK, mas ainda não há um consenso sobre qual tipo de leucemia seria mais susceptível (Oshimi et al., 1983; Yan et al., 1998; Pende et al., 2005)

As células NK são importantes componentes do sistema imune inato e têm a capacidade de lisar células alvo, além de fornecer citocinas imunoregulatórias. As principais citocinas produzidas por estas células são: interleucina 3 (IL-3), fator de estimulação de colônia de macrófago e granulócito (GM-CSF), fator beta de transformação do crescimento (TGF- β), interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa, TNF- α (Farag et al., 2002; O'Connor et al., 2006).

Essas células são as primeiras a se recuperarem após o TCTH e são capazes de mediar à resposta imune inicial, já que a recuperação das células T é mais tardia (Keever et al., 1989; Diamond et al., 1995). Além da capacidade de promover o ECL, estas células são capazes de promover a “pega” do enxerto e prevenir a DECH, conforme demonstrado em modelos animais e em transplante em humanos (Asai et al., 1998; Ruggeri et al. 2002).

As células NK, como outras células do sistema imune inato, utilizam uma estratégia de reconhecimento do alvo através de múltiplos receptores. Estes receptores podem gerar sinais ativadores ou inibidores e a atividade citotóxica destas células é regulada pelo equilíbrio dos sinais gerados pela ligação destes receptores a moléculas específicas nas células alvo (Farag et al., 2002; Raulet, 2004).

Os sinais inibitórios melhor caracterizados são aqueles gerados por receptores que reconhecem especificamente moléculas de antígeno leucocitário humano (HLA) nas células alvo (O'Connor et al., 2006). Ljunggren e Karre (1990) propuseram que, apesar de tolerantes com as células autólogas normais, as células NK conseguem reconhecer e atacar células autólogas que tenham baixa expressão de HLA classe I, como células transformadas e infectadas por vírus. Essa teoria ficou conhecida como hipótese do “*missing-self*”.

Os receptores ativadores também têm um papel importante na regulação da função efetora das células NK. Esses receptores fazem o reconhecimento de moléculas codificadas por patógenos e de proteínas próprias que têm a expressão aumentada em células transformadas ou infectadas (Raulet, 2004).

Os receptores de células NK melhor caracterizados e estudados pertencem à família *killer immunoglobulin-like receptor* (KIR). Estas moléculas se apresentam como conjuntos de receptores ativadores e inibidores pareados que primariamente reconhecem as moléculas de HLA-A, -B e -C. Estes receptores, portanto, estariam relacionados com a imunovigilância das células NK contra células com expressão alterada de HLA (Moretta e Moretta, 2004 ; Farag e Caligiuri, 2006).

Foi demonstrado que a ausência de ligantes de HLA no paciente para receptores KIR inibidores do doador (incompatibilidade KIR) pode estar relacionada ao efeito ECL e à DECH. Este tipo de estudo foi iniciado por um grupo de pesquisadores italianos no TCTH haploidêntico, no qual foi demonstrado que incompatibilidade KIR levava à geração de clones

de células NK aloreativos, causando: menor incidência da DECH, através da lise de células apresentadoras de antígenos; aumento no efeito ECL, pela lise de células leucêmicas residuais; e a melhora da sobrevida dos pacientes. Estes efeitos foram observados em casos de LMA, mas não de LLA (Ruggeri et al., 1999; Ruggeri et al., 2002; Velardi et al., 2002).

Este potencial antileucêmico e a capacidade de prevenir a DECH levaram à investigação do uso de células NK como uma imunoterapia adotiva, porém são necessários novos estudos antes da imunoterapia de células NK atingir a prática clínica. Ainda não está claro quais pacientes e que tipos de leucemia seriam mais beneficiados por este tratamento, por isso é de extrema importância definir melhor quais tipos de leucemias são mais susceptíveis à atividade NK e o papel dos receptores das células NK, como os KIR, na atividade antileucêmica destas células (Yan et al., 1998; Ruggeri et al., 2002; Farag et al., 2002; Miller et al., 2005; Romanski et al., 2005; Pende et al., 2005; Passweg et al., 2006).

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivo Geral:

Estudar *in vitro* o papel das células NK e dos seus receptores KIR contra diferentes leucemias agudas, correlacionando com o fenótipo da leucemia e com a história clínica do paciente.

2.2. Objetivos específicos:

- Estudar em indivíduos saudáveis da população brasileira a atividade citotóxica e o perfil imunofenotípico das células NK e das suas subpopulações;
- Estudar a susceptibilidade de diferentes tipos de leucemias à atividade citotóxica das células NK;
- Verificar se há correlação entre os subtipos de leucemias agudas e a susceptibilidade à atividade citotóxica;
- Verificar se a relação entre o genótipo KIR do doador e o HLA do paciente influencia a atividade citotóxica contra as células leucêmicas primárias;
- Comparar os resultados obtidos *in vitro* com a história clínica dos pacientes;
- Comparar os dados obtidos com a literatura.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Leucemias agudas

3.1.1. Leucemia linfoblástica aguda

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma doença heterogênea quanto aos aspectos clínicos, biológicos e prognósticos. Esta doença resulta da proliferação clonal e do conseqüente acúmulo de progenitores linfóides com anomalias graves de diferenciação e maturação, suprimindo a hematopoese normal (Kebriaei et al., 2003). A LLA é a doença neoplásica mais comum na infância, apresentando um pico de incidência na idade de 3 a 4 anos (Hoelzer e Gökbuget, 2000). Corresponde a 80% das leucemias da infância (cerca de 30% das neoplasias até 15 anos de idade) e 20% das leucemias agudas em adultos (de Souza et al., 1998; Riley et al, 2002).

Esta doença não tratada se torna rapidamente fatal. Uma alta taxa de sucesso tem sido alcançada no tratamento de crianças com LLA, chegando a 80% de cura, mas os casos de adultos são geralmente mais resistentes à terapia, sendo que 25 a 40% dos pacientes são curados (Hoelzer et al., 2002; Pui et al., 2004).

Os principais sintomas desta doença resultam de graus variáveis de anemia, neutropenia, trombocitopenia e de infiltrações de células leucêmicas na medula óssea e em outros tecidos. Já que elas entram no sangue periférico, qualquer órgão sistêmico pode estar envolvido, mas linfonodos, baço, fígado, sistema nervoso central e pele são os sítios mais comumente detectados clinicamente (Kebriaei et al., 2003).

O quadro clínico geralmente ocorre de forma súbita e os pacientes apresentam uma história de fadiga e sangramentos espontâneos. Perda de peso, febre e sudorese durante o sono também são comuns, mas tipicamente estes sintomas não são severos. Outro sintoma comum é dor nas articulações e/ou nos ossos. Metade dos adultos com LLA apresenta

linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia. Pode ocorrer infiltração das meninges, levando a vômitos, dores de cabeça ou papiloedema (Kebriai et al., 2003).

O diagnóstico da LLA depende de características clínicas e avaliações laboratoriais dos blastos leucêmicos. Geralmente é sugerido o diagnóstico a partir de um hemograma, no qual a contagem de leucócitos pode estar ocasionalmente muito alta, mas também pode estar normal ou até diminuída. Deve ser encontrado no mielograma mais de 25% de blastos linfóides na medula óssea para ser considerado diagnóstico de LLA. A citogenética, biologia molecular e imunofenotipagem por citometria de fluxo são utilizadas para identificar os subtipos relevantes (de Souza et al., 1998; Farias e Castro, 2004).

A LLA é subdividida em L1, L2 e L3, de acordo com a classificação do Grupo Cooperativo Francês-Americano-Britânico (FAB). O subtipo L1 é caracterizado por apresentar células pequenas, de citoplasma escasso, núcleo de contornos regulares e nucléolo pouco evidente; o subtipo L2 é constituído por células de dimensões variáveis, porém maiores que no subtipo L1, citoplasma abundante, núcleo irregular e nucléolo proeminente; o subtipo L3 é composto por células grandes, de citoplasma intensamente basófilo e vacuolizado, núcleo regular e nucléolo evidente. Esta classificação para LLA tem valor histórico, mas falha no reconhecimento de subtipos de LLA biologicamente relevantes e tem valor prognóstico limitado (Pui, 1995).

De forma contemporânea à classificação FAB, surgem as primeiras evidências de que o comportamento clínico das LLA é distinto quando estão envolvidas no processo neoplásico as linhagens linfóides B ou T (Szczepanski et al., 2003). Os linfoblastos podem expressar antígenos comuns aos diferentes estágios de diferenciação destas linhagens; entretanto, a LLA-B é o subtipo mais comum, em torno de 85% de todos os casos de LLA, enquanto a LLA-T representa cerca de 15% dos casos (Riley et al, 2002).

A caracterização e a classificação em grupos e subgrupos biológicos são de extrema importância, pois a taxa de sobrevivência dos pacientes pode ser aumentada por terapias ajustadas para os subgrupos (Hoelzer & Gökbuget, 2000). Além disso, os subtipos variam de acordo com a idade. Por exemplo, os casos de LLA-T são mais comuns em adultos e adolescentes, enquanto a LLA-B precoce é mais comum na infância (Szczepanski et al., 2003).

As classificações atuais, baseadas em imunofenotipagem, distinguem pelo menos oito subtipos de LLA: quatro subtipos de LLA-B e pelo menos quatro subtipos de LLA-T. A classificação imunológica na LLA mimetiza parcialmente a diferenciação normal de precursores de células linfóides (Pui, 1995). Apesar de esta classificação representar os vários níveis de maturação, com relação às LLA-T não foram encontradas características clínicas exclusivas dentro dos subgrupos e nenhuma diferença com relação à duração da remissão e sobrevivência (Riley et al., 2002). Por isso a subdivisão da LLA-T é pouco usada. A classificação mais utilizada para LLA e as principais diferenças imunofenotípicas entre seus subtipos estão representadas na **tabela 1**.

Tabela 1. Classificação de LLA mais utilizada e principais marcadores imunofenotípicos de cada subtipo

Subtipos de LLA	Principais marcadores
LLA-T	CD7 ⁺ , TCR ⁺ e CD3 ⁺ .
LLA pró-B	CD10 ⁻ , cμ ⁻ , Igs ⁻ e CD19 ⁺ .
LLA-B precoce	CD10 ⁺ , cμ ⁻ , Igs ⁻ e CD19 ⁺ .
LLA pré-B	CD10 ⁺ , cμ ⁺ , Igs ⁻ e CD19 ⁺ .
LLA-B madura	CD10 ⁺ , cμ ⁺ , Igs ⁺ e CD19 ⁺ .

Abreviações: cμ – cadeia μ de imunoglobulina intracitoplasmática; Igs – Imunoglobulina de superfície, CD – grupo de diferenciação.

A LLA de precursor T é caracterizada por uma predominância do sexo masculino (73%) e geralmente afeta adultos e adolescentes. Estão associadas a esta doença as seguintes características: leucometria alta, maior que 30.000 (62%); tumor no mediastino (60%); envolvimento do sistema nervoso central (15%); e alta taxa de recaída no sistema nervoso

central. Duas décadas atrás, a LLA-T era um sinônimo de mau prognóstico tanto em crianças quanto em adultos. A média de tempo de remissão era de 10 meses ou menos. Agora as taxas de remissão completa são de mais de 80% e a sobrevivência livre de doença pode ser alcançada em 40 a 50% dos adultos. Ter leucometria elevada (acima de 30.000), assim como idade maior do que 10 anos, e alcançar tardiamente a remissão completa são fatores de mau prognóstico (Hoelzer e Gökbuget, 2000).

Os antígenos mais importantes para o diagnóstico e a identificação desta linhagem são o CD3 intracitoplasmático, o receptor de linfócitos T (TCR) e o CD7. O marcador mais importante para LLA-T parece ser o CD7, que está presente de 95% a 100% dos casos de LLA-T. Deve ser evitado o diagnóstico deste subtipo na ausência de CD7. Por outro lado, a presença deste antígeno em blastos não é sinônimo de LLA-T, pois ocorre em um grande número de leucemias da linhagem B e mielóide. Portanto, para confirmar o diagnóstico de LLA-T é importante o uso de outros marcadores desta linhagem, como o CD3, CD1a, CD2 e CD5 (Riley et al, 2002).

O principal marcador para o diagnóstico de LLA-B é o CD19, por estar presente em quase todos os estágios de maturação da linhagem B, desde pré-B a B-maduro. Outros marcadores importantes específicos desta linhagem são os antígenos intracitoplasmáticos CD79a e cadeias de imunoglobulina, além dos antígenos de superfície CD22 e CD20 (Riley et al, 2002).

A LLA-B é dividida de acordo com o estágio de maturação em LLA pró-B (pré pré B ou CALLA negativo), LLA-B precoce (LLA comum ou LLA CALLA positivo), LLA pré-B (LLA de precursor B) e LLA-B madura (Hoelzer & Gökbuget, 2000). A principal diferença imunofenotípica entre estes subtipos de LLA-B está em três marcadores: a imunoglobulina de superfície (Igs), a cadeia pesada de imunoglobulina intracitoplasmática (μ) e o CD10, embora este último não seja específico para a linhagem B. A LLA pró-B não expressa

nenhum destes marcadores; a LLA-B precoce expressa CD10, mas não Igs ou $\kappa\mu$; a LLA pré-B expressa CD10 e $\kappa\mu$, mas não Igs; enquanto a LLA-B madura expressa estes três marcadores (Szczepànski et al., 2003), conforme observado na **tabela 1**.

A LLA pró-B é caracterizada por parâmetros específicos clínicos e biológicos, como alta leucometria, coexpressão de antígenos mielóides (CD15/CD65w) em 50% dos casos (Hoelzer e Gökbuget, 2000). O fenótipo de pró-B (negativo para CD10) tem sido associado com mau prognóstico (Schabath et al, 2003).

A LLA-B precoce é o subtipo mais comum, representando 75% dos casos de LLA na infância e 50% dos casos no adulto, e apresenta os seguintes marcadores: CD19, CD22, TdT, CD79a intracitoplasmático, CD34 e CD10. A expressão de CD10 causa um impacto favorável no prognóstico (Kebriaei et al., 2003; Farias e Castro, 2004). Este subtipo é tradicionalmente considerado o mais favorável, com relação à duração da remissão (Levitt e Lin, 1996).

A LLA pré-B, que é definida pela presença da $\kappa\mu$, recapitula um estágio mais tardio do desenvolvimento normal comparada ao subtipo B precoce (Weir e Borowitz, 2001). A LLA pré-B representa aproximadamente 15% das crianças com LLA e 10% dos casos em adultos. Este subtipo expressa $\kappa\mu$, em adição a CD19, CD20 e CD10 (Farias e Castro, 2004).

As células de LLA-B madura expressam fortemente o CD45 e possuem características citológicas de linfoma de Burkitt, que é LLA-3 da classificação FAB (Jouault, 2002). A LLA B-madura é caracterizada por alta frequência de envolvimento de órgãos (34%) e do sistema nervoso central (12%) e altos níveis de LDH, sendo que 88% têm acima de 500 U/L (Hoelzer e Gökbuget, 2000). A LLA-B madura é rara e responsável somente por 1 a 2% de todos os casos de LLA na infância. Ocorre mais frequentemente no sexo masculino, na raça branca e com contagem de leucócitos elevada, sendo caracterizada pela doença extramedular (Kebriaei et al., 2003).

3.1.2. Leucemia mielóide aguda

Como as LLA, as leucemias mielóides agudas (LMA) representam um grupo de doenças hematopoéticas clonais em que a falha na diferenciação e proliferação da célula tronco hematopoética resulta num acúmulo de células não funcionais, só que no caso das LMA elas são chamadas de mieloblastos (Stone et al., 2004). Uma combinação de estudos morfológicos, citogenéticos e imunofenotípicos normalmente são necessários para o estabelecimento de diagnóstico de LMA (Pui et al., 2004).

A LMA pode surgir *de novo* ou evoluir a partir da síndrome mielodisplásica (SMD). A SMD compreende um grupo heterogêneo de desordens clonais da medula óssea, caracterizada por vários graus de citopenias periféricas (Aul et al., 1998). A SMD causa falha progressiva da medula óssea e a transformação para LMA é vista em um terço dos casos (Greenberg, 2002).

Os avanços no entendimento da fisiopatologia da LMA ainda não levaram a grande melhora na sobrevida livre de doença. Apenas um terço dos pacientes com idade entre 18 e 60 anos que são diagnosticados com LMA podem ser curados. A sobrevida livre de doença é rara e as terapias disponíveis atualmente para indivíduos idosos são devastadoras (Stone et al., 2004). Com relação às crianças, a sobrevida atingiu um patamar de aproximadamente 60% (Pui et al., 2004).

Os sintomas apresentados por pacientes com LMA não são específicos e estão relacionados com a diminuição da produção de células hematopoéticas normais e invasão de outros órgãos por células leucêmicas. Os pacientes normalmente apresentam sintomas similares a uma infecção viral curta, caracterizada por fadiga e mal estar, ou podem apresentar uma infecção progressiva na pele depois de uma abrasão menor. Outros sintomas incluem anemia, trombocitopenia, petéquias, equimoses, sangramentos na gengiva, sangramentos excessivos por traumas menores e esplenomegalia (Hoffman et al., 2004).

Uma combinação de estudos morfológicos, imunofenotípicos e citogenéticos é normalmente necessária para o estabelecimento de um diagnóstico de LMA (Pui et al., 2004). A LMA é tradicionalmente subclassificada por morfologia e citoquímica de acordo com os critérios da FAB e conforme modificações que incorporam os dados imunofenotípicos em oito subtipos, que vão de M0 a M7 (Cheng et al., 2005). Os principais marcadores imunofenotípicos para o diagnóstico de LMA são CD13, CD33, CD65 e MPO (Szczepanski et al., 2003). A **tabela 2** apresenta as principais características imunofenotípicas dos subtipos de LMA.

Tabela 2. Principais características de imunofenotipagem por citometria de fluxo dos subtipos de LMA

Subtipo	Principais marcadores	Observações
M0/M1	MPO, CD13, CD33, CD34	Região dos linfoblastos, pelo menos um marcador mielóide específico
M2	CD13 > CD33 HLA-DR, MPO e CD34, CD15	Região de mieloblastos até células mielóides maduras
M3	CD33 > CD13 MPO, CD15, CD34 ^{+/-} , HLA-DR ⁻	Hipergranular mais com baixa expressão de CD45
M4/M5	CD33 > CD13 HLA-DR, CD14 ^{+/-} , CD34 ^{+/-} e CD15	Região dos monócitos
M6	HLA-DR, CD13 ^{+/-} , CD33 ^{+/-} , CD34 e CD45 fraco.	Região eritróide
M7	HLA-DR ^{+/-} , CD33 ^{+/-} , CD34, CD61 e CD41	Região de megacariócito

+/-, variável, mas geralmente positivo; -/+ variável, mas geralmente negativo; - negativo.

O subtipo M0 representa cerca de 5% dos casos de LMA e essencialmente é encontrado em adultos (Jouault, 2002). Neste subtipo, as células leucêmicas são identificadas por citometria de fluxo na região dos linfoblastos devido ao pequeno tamanho, baixa granulosidade e expressão de CD45 de baixa intensidade de fluorescência. Por definição, os blastos são negativos para citoquímica, mas expressam pelo menos um marcador mielóide específico, como: MPO, CD13, CD33 ou CD11b. Estas células são geralmente negativas para marcadores linfóides, mas podem expressar CD7 ou CD4. Os blastos de M0 são geralmente positivos para HLA-DR e CD34 (Jennings e Foon, 1997; Szczepanski et al., 2003).

Através da citometria de fluxo é difícil distinguir a LMA-M1 da M0. As células blásticas de M1 são geralmente positivas para CD13, CD33 e HLA-DR, mas podem não expressar tanto CD34 quanto M0 (Jennings e Foon, 1997). M0 e M1 geralmente não expressam marcadores associados com estágios mais diferenciados da maturação mielóide, como: CD15, CD11b ou CD14. Quando presentes, estes marcadores são expressos apenas em uma pequena subpopulação de células (Weir e Borowitz, 2001).

A LMA-M2 é chamada de leucemia com diferenciação granulocítica e, além de uma população de blastos dominante, apresenta evidências de maturação, pelo menos até o nível de pró-mielócitos ou mielócitos (Weir e Borowitz, 2001). Na citometria de fluxo, tipicamente há um espectro de células com graus variáveis de granulosidade abrangendo a região dos mieloblastos até de células mielóides maduras. A maior diferença entre M2 e M1 é a presença de maturação e uma redução no percentual de blastos. CD34 é menos proeminente e CD15 é mais proeminente em M2 do que em M1. Na maioria dos casos, o marcador HLA-DR é positivo. O marcador CD13 algumas vezes é expresso mais fortemente do que CD33 (Jennings e Foon, 1997).

O subtipo M3 é hipergranular, embora apresente baixa expressão de CD45 comparado com células maduras e ausência ou redução de HLA-DR na maioria dos casos. CD34 é menos proeminente do que em M2. A expressão de CD33 e baixa expressão de CD13 são normalmente encontradas. Pode haver expressão de CD2 (Jennings e Foon, 1997).

Os subtipos M4 e M5 são fenotipicamente semelhantes, apesar de que em M4 é mais comum a CD34 do que em M5. Na citometria de fluxo, os blastos de M5 se apresentam na região de monócitos. Estas células expressam CD13, CD33, HLA-DR, CD14 e CD15. A intensidade de expressão de CD33 pode ser mais forte do que a de CD13 (Jennings e Foon, 1997). Os marcadores mais imaturos, como CD34 e CD117, normalmente estão ausentes na

leucemia monocítica. A M5 geralmente expressa os marcadores relacionados a monócitos, como CD14 e CD64 (Weir e Borowitz, 2001).

O subtipo M6 é raro e não é bem caracterizado. HLA-DR, CD34 e possivelmente CD13 e CD33 estão geralmente presentes. A análise de CD45 e granulosidade mostra um componente eritróide proeminente. Anticorpos contra glicoforina podem demonstrar a diferenciação eritróide (Jennings e Foon, 1997). Outro marcador importante para a leucemia eritróide é o CD71. A dificuldade de caracterização desta leucemia por citometria de fluxo vem do fato de que precursores eritróides muitas vezes são susceptíveis ao procedimento de lise usado para a preparação da amostra (Weir e Borowitz, 2001).

O subtipo M7 representa de 3 a 5% dos casos de LMA, atingindo adultos e crianças, e é conhecido como leucemia megacariocítica aguda (Jouault, 2002). Este subtipo é diagnosticado quando mais de 30% das células não eritróides são megacarioblastos, que são identificados pela expressão de CD61 e/ou CD41 (Jennings e Foon, 1997; Szczepanski et al., 2003). Há ausência de expressão dos antígenos MPO, HLA-DR e CD34 (Jouault, 2002).

3.1.3. Leucemia bifenotípica aguda

As leucemias agudas que possuem características tanto mielóide quanto linfóide são chamadas de linhagem mista, híbridas ou leucemia bifenotípica aguda (LBA). A LBA provavelmente surge de uma célula progenitora multipotente. A incidência desta doença é em torno de 4% dentro das leucemias agudas. Muitas vezes é difícil distinguir a LBA das outras leucemias, pois tanto a LMA quanto a LLA podem apresentar expressão aberrante de marcadores de outras linhagens (Matutes et al., 1997; Killick et al., 1999).

A LBA pode afetar adultos ou crianças, particularmente com menos de 2 anos de idade. Elas podem aparecer *de novo* ou, raramente, podem se tornar aparente durante uma recaída após um tratamento contra LLA ou LMA. A leucometria é geralmente alta e a maioria dos casos tem uma proporção variante de blastos circulantes. Não existe um critério uniforme de como tratar a LBA. Esta doença está associada a um prognóstico negativo tanto em crianças quanto em adultos e isto pode estar relacionado com a alta incidência de anormalidades cromossômicas associadas à LBA (Matutes et al., 1997).

O diagnóstico de LBA é baseado na imunofenotipagem. A maioria dos casos é TdT⁺ e expressa marcadores hematopoiéticos iniciais como o CD34 e determinantes HLA-DR de classe II. Para o diagnóstico desta doença, deve ser utilizado um painel amplo, com marcadores das três linhagens. O fenótipo mais comum é a expressão de marcadores B e mielóides e menos freqüentemente ocorre o fenótipo T com marcadores mielóides. Casos com a linhagem T e B ou com uma diferenciação nas três linhagens são raros (Matutes et al., 1997). Nosso grupo submeteu um trabalho à publicação sobre um caso raro de leucemia bifenotípica B e T (Costa ES, Thiago LS, Otazu IB, Ornellas MH, **Oliveira AA**, Borojevic R, Land MG, Orfao A; *Pediatric Blood & Cancer*).

Matutes et al. (1997) propuseram um sistema de pontuação com objetivo de ajudar a distinguir a LBA de outras leucemias com expressão aberrante de marcadores de outra

linhagem. O sistema é baseado no número e grau de especificidade dos marcadores linfóides e mielóides expressos por células leucêmicas. A leucemia será considerada bifenotípica quando a pontuação encontrada for maior que 2 para mais de uma linhagem (**tabela 3**).

Tabela 3 - Pontuação dos marcadores utilizados para identificação de leucemia bifenotípica aguda

Pontuação	Linhagem B	Linhagem T	Linhagem mielóide
2	CD79a ic, cμ, CD22	CD3ic, anti-TCR	MPO
1	CD19, CD20, CD10	CD2, CD5, CD8	CD13, CD33, CD65
0,5	TdT, CD24	TdT, CD7, CD1a	CD14, CD15, CD64, CD11b

É necessário mais do que 2 pontos em mais de uma linhagem para ser considerada leucemia bifenotípica aguda (adaptado a partir de Matutes et al., 1997 e Kebriaei et al., 2003).

Este sistema de pontuação foi testado por um grupo de pesquisadores em 676 pacientes recém diagnosticados com leucemia aguda e foram identificados 3,6% de casos de BAL. A maioria apresentava blastos com características morfológicas semelhantes aos subtipos FAB M2 e L1. Todos os pacientes foram positivos para marcadores mielóides e marcadores linfóides B (74%) ou T (35%), sendo que dois casos apresentaram marcadores das três linhagens. Estes autores concluíram que o sistema de pontuação é um método eficaz de diagnóstico de LBA (Owaidah et al., 2006).

3.2. Tratamento de leucemias agudas

3.2.1. Quimioterapia

O tratamento padrão de LLA é baseado em ciclos de quimioterapia combinada, administrada de forma seqüencial. As principais fases são: indução; consolidação ou intensificação; e tratamento de manutenção. A fase de indução de remissão tem o objetivo de rapidamente destruir as células leucêmicas e minimizar a carga de células leucêmicas residuais. A fase de consolidação ou intensificação é desenhada para diminuir ainda mais a carga de células leucêmicas e resolver questões de resistência a drogas antileucêmicas. Esta fase normalmente consiste em utilizar doses maiores da mesma droga usada na fase de indução ou altas doses de outras drogas. A fase de manutenção é feita para erradicar a carga de células leucêmicas residuais. Um dos protocolos de tratamento de leucemias agudas mais utilizado foi criado pelo grupo alemão Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) e utiliza a resposta precoce junto com outros fatores prognósticos para estratificar o risco e guiar o tratamento (Dordelmann et al., 1999; Hoelzer e Gökbuget, 2000; Hoffman et al., 2004).

Como a LLA é uma doença heterogênea com grupos biológicos e prognósticos distintos, estratégias de tratamento desenhadas para grupos prognósticos específicos levaram à melhora nos resultados de crianças com LLA. Estratégias similares, baseadas em estratificação de risco, estão agora sendo aplicadas para adultos com LLA (Kebriaei et al., 2003).

Os pacientes, na maioria dos estudos, são divididos em três grupos de risco de acordo com os fatores prognósticos: risco padrão, alto ou altíssimo risco. Vários fatores prognósticos influenciam a sobrevida de pacientes com LLA: anormalidades citogenéticas, imunofenótipo, leucometria inicial, tempo levado para alcançar a remissão completa, sexo, idade, acometimento do sistema nervoso central e outras variáveis (Hoelzer e Gökbuget, 2000; Pui et al., 2004).

Apesar do tratamento de indução da remissão para LLA ser o mesmo para todos os grupos de risco em alguns estudos clínicos, em todos os estudos a intensidade do tratamento pós-remissão difere de acordo com o grupo de risco. Pacientes com alto risco são tipicamente tratados com quimioterapia intensificada após a remissão e pacientes com altíssimo risco são considerados candidatos ao TCTH alogeneico. O Grupo de Oncologia em Crianças (Estados Unidos) incluiu um quarto grupo, o de baixo risco, para permitir que aqueles com riscos de recaída muito baixos recebam um tratamento de intensidade reduzida (Pui et al., 2004).

A maioria dos casos de LLA na infância é altamente sensível à quimioterapia, com quase todos os pacientes atingindo remissão completa após a terapia de indução de remissão. Entretanto, quase um terço destes pacientes em remissão sofrem recaída e a maioria destes pacientes morre da doença (van Wering et al, 1995, Weir et al, 1999). Nos adultos, a remissão completa é alcançada em 80 a 85% dos pacientes e a sobrevida livre de doença em apenas 30 a 40% dos casos (Hoelzer et al., 2002).

A maioria dos pacientes com LMA morre da doença, apesar do otimismo atual. As principais estratégias terapêuticas básicas para tratar pacientes com esta doença mudaram pouco nos últimos 20 anos. O tratamento dos casos de LMA classicamente envolve as mesmas fases do tratamento para LLA: indução; consolidação ou intensificação; e tratamento de manutenção. Cerca de apenas 30% dos adultos com LMA podem ser curados. A sobrevida livre de doença é rara e a terapia atual é devastadora para idosos com esta doença. Os dois principais fatores prognósticos de pacientes com LMA são: idade e estado citogenético. Recentemente, alguns fatores prognósticos baseados em biologia molecular foram identificados, entretanto o impacto destes achados na escolha do tipo de tratamento ainda não está claro (Stone et al., 2004).

Apesar de várias estratégias de aumentar a intensidade da terapia, a sobrevida em crianças atingiu um patamar estável de aproximadamente 60%, sugerindo que o aumento da

intensificação do tratamento por si não é capaz de melhorar substancialmente a taxa de sobrevida. Existem diferenças consideráveis tanto nas características clínicas e biológicas quanto na resposta e tolerância à terapia por grupos de idade. Portanto, para melhorar a resposta dos pacientes pediátricos com LMA, será necessário o uso de terapias específicas tanto para a doença e idade do paciente. No entanto, apenas um número limitado de drogas é ativo contra subgrupos específicos de LMA e atualmente é impossível aplicar terapia individualizada na grande maioria dos casos desta doença (Pui et al., 2004).

De uma maneira geral, está claramente definido que, uma vez que a remissão é alcançada, para que seja possível um longo período de sobrevida livre de doença, faz-se necessário o uso de terapia adicional para reduzir as células leucêmicas a níveis indetectáveis. A terapia anti-leucêmica mais efetiva é o TCTH alogeneico (Hoelzer et al., 2002; Stone et al., 2004).

3.2.2. Transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH)

O transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) se refere a um procedimento onde essas células são infundidas em um paciente com o objetivo de repor o sistema hematopoético. As células tronco hematopoéticas podem ser derivadas de diferentes fontes como: medula óssea, sangue de cordão umbilical ou sangue periférico (Ljungman et al., 2006).

O TCTH pode ser autólogo, quando as células tronco hematopoéticas infundidas são obtidas do próprio paciente; ou alogeneico, quando as células tronco hematopoéticas são de origem de um doador. As taxas de recaída são menores no TCTH alogeneico comparado com o autólogo, devido ao efeito enxerto contra leucemia, o ECL (Blazar e Murphy, 2005). O TCTH alogeneico revolucionou os tratamentos de hemopatias malignas, doenças hematopoéticas hereditárias e anemia aplástica (Shlomchik, 1999). Classicamente, o doador do TCTH alogeneico pode ser aparentado HLA-idêntico, aparentado haploidêntico ou um doador não aparentado com alto grau de compatibilidade (9/10 ou 10/10), selecionado numa rede de registro de doadores (Ljungman et al., 2006).

Nos casos de LLA da infância, o transplante (aparentado ou não aparentado) só é recomendado em casos específicos, de acordo com o resultado da quimioterapia e em grupos de pacientes considerados de alto risco. Alguns autores consideram que o TCTH alogeneico é indicado para todos os pacientes pediátricos de LMA com um doador aparentado HLA-compatível porque se acredita que seja mais efetivo que ciclos intensivos de quimioterapia pós-remissão. Nos casos da LMA da infância associado a um mau prognóstico e que tenham poucas chances de cura por outras terapias, o TCTH não aparentado é indicado quando não houver doador na família (Ravindranath, 2003; Pui et al., 2004).

Nos pacientes adultos com LLA, o TCTH é uma parte essencial no tratamento de consolidação, mas ainda existe a questão se todo paciente na primeira remissão completa com

um doador adequado deve receber o transplante ou se este tratamento deve ser reservado para pacientes em grupos de alto risco (Hoelzer et al., 2002). Os casos de adultos com LLA com características de mau prognóstico são candidatos ao TCTH tanto com doador HLA-idêntico aparentado quanto não aparentado (Ljugman et al., 2006).

Nos casos de adultos com LMA, o TCTH é uma terapia efetiva. Os obstáculos para a larga aplicação desta terapia para a maioria dos pacientes com LMA são: dificuldade de controlar a leucemia com a terapia primária de indução, dificuldade de encontrar um doador compatível, toxicidade dos regimes de condicionamento e complicações a longo termo causadas pelo transplante (Stone et al., 2004).

Na última década, o paradigma do tratamento de leucemias por TCTH mudou. O foco inicial era utilizar doses mieloablativas de radiação e quimioterapia para eliminar a leucemia e o transplante era realizado para prevenir a morte por falha da medula. Atualmente o enfoque do TCTH alogeneico consiste em um regime de condicionamento com baixas doses de quimioterapia e radioterapia, suficientes apenas para permitir a “pega” das células tronco hematopoéticas do doador. Estes regimes de condicionamento de intensidade reduzida permitiram o uso do TCTH alogeneico em pacientes idosos ou debilitados, pois anteriormente o regime mieloablativo causava alta mortalidade nestes pacientes (Kolb et al., 2004; Schetelig et al., 2005; Barrett e Savani, 2006).

Neste modelo mais atual de transplante, as células aloimunes de origem do doador é que serão responsáveis por erradicar as células leucêmicas como uma forma de imunoterapia adotiva (Kolb et al., 2004). As principais reações aloimunes que acometem o pós TCTH são representadas pela doença enxerto contra hospedeiro (DECH) e o ECL. Estes eventos envolvem células T, células NK e as células tronco hematopoéticas (Barret et al., 2003).

Apesar das melhorias do TCTH alogeneico, a DECH continua a ser um problema significativo e é a maior causa de morte após o transplante. A maioria dos pacientes que são

submetidos a este procedimento apresenta algum grau de DECH. Esta reação severa é definida como uma doença sistêmica de rápida progressão, caracterizada por imunossupressão e injúria de tecidos em vários órgãos como fígado, pele e mucosa intestinal. A destruição destes tecidos resulta em erupções cutâneas, denudação da mucosa e diarreia. Apesar do progresso no entendimento dos mediadores envolvidos na DECH, o tratamento efetivo contra esta doença continua elusivo. A maioria dos pacientes que desenvolvem manifestações severas desta doença acaba sucumbindo a ela ou a complicações de seus tratamentos (Jaksch e Mattsson, 2005).

Devido ao aparecimento de certas características clínicas e de mecanismos patogênicos diferentes após o TCTH alogeneico, a DECH tem sido, tradicionalmente, classificada em dois tipos: DECH aguda e DECH crônica (Vargas-Diez et al., 2005).

A imunobiologia da DECH aguda é complexa e pode ser dividida em três etapas. Na primeira etapa, o regime de condicionamento (quimioterapia e/ou radioterapia) leva a danos nos tecidos do hospedeiro e indução de produção de citocinas pró-inflamatórias. A segunda etapa é caracterizada pela ativação dos linfócitos T do doador através de interações com células apresentadoras de antígeno do hospedeiro no local da injúria e a consequente proliferação, diferenciação e secreção de citocinas que leva ao recrutamento das células efetoras até os órgãos alvo. Na terceira e última etapa ocorrem as funções efetoras de células aloimunes que levam a danos no tecido do hospedeiro, onde participam linfócitos T citotóxicos, células NK e fagócitos (Reddy e Ferrara, 2003).

Acredita-se que DECH crônica seja causada pelos linfócitos T que são reativos contra tecidos do hospedeiro e escaparam da seleção negativa no timo no pós-transplante. Isto pode ser explicado pelo fato do timo estar danificado pelos regimes de condicionamento ou pela sua atrofia em consequência da idade ou da DECH aguda. Neste caso, os linfócitos B serão

induzidos pelos linfócitos T efetores à síntese de auto-anticorpos contra vários tecidos do hospedeiro (Arai e Vogelsang, 2000; Devetten e Vose, 2004).

Apesar do efeito negativo da DECH, ela parece estar associada ao efeito ECL, que é positivo. A primeira evidência desta associação foi uma análise estatística em 242 pacientes submetidos ao TCTH alogeneico que mostrou que pacientes que sofreram de DECH após o transplante têm menor risco de desenvolver recaída da doença hematológica maligna (Weiden et al., 1979). Os linfócitos T foram considerados os principais efetores destes dois efeitos a partir da observação de que o TCTH com depleção destas células tem menor incidência de DECH e maior chance de ocorrer recaída da leucemia, o que levou a um impasse terapêutico. Uma forma de escapar deste impasse foi a depleção dos linfócitos T do TCTH seguida da realização de subseqüentes infusões de linfócitos de doador, a ILD (Kolb et al., 2004).

Mais tarde, a ILD passou a ser utilizada para tratar pacientes com recaída da leucemia após TCTH (Kolb et al., 1995). Foi demonstrado que diferentes doenças hematológicas malignas têm resposta distinta a esta terapia. Dois fatores parecem determinar a eficácia do ECL: a taxa proliferativa da doença (doenças malignas que têm uma evolução lenta respondem melhor) e o fenótipo. Neste caso, a LLA parece ser a menos sensível (Barrett et al., 2003). Em um estudo com 135 pacientes a remissão completa foi alcançada em 73% dos pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC), 29% com LMA, 25% dos casos de SMD. Entretanto, os pacientes portadores de LLA não responderam ao tratamento (Kolb et al., 1995).

Evidências consistentes suportam a hipótese de que o efeito do ILD que leva à eliminação de células leucêmicas residuais é mediado primariamente pelas células T. No entanto, a maioria dos pacientes que respondem ao ILD também desenvolve uma DECH significativa, por isso, na prática, tem sido difícil distinguir o efeito ECL da DECH (Claret et al., 1997).

Tem sido demonstrado que o ECL é mediado por células como as NK e os linfócitos T. Parece que os linfócitos CD8 estão mais envolvidos na DECH, enquanto os CD4 estão mais relacionados ao ECL. As células dendríticas e macrófagos podem ter um papel acessório no ECL por facilitarem a apresentação de antígenos e a secreção de citocinas. Citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ estão envolvidas na DECH e no ECL (Mehta, 2004).

As células leucêmicas podem induzir uma resposta específica se expressarem antígenos que não estão presentes ou são pouco expressos em células normais. No TCTH alogeneico isso pode ocorrer pela apresentação direta de antígenos na superfície de células malignas do receptor, levando à indução de expansão de células T específicas para o ECL (Barret, 1997; Barret et al., 2003). Proteínas envolvidas na transformação celular (como ras mutado ou bcr/abl) podem gerar peptídeos únicos na região da mutação ou no sítio de fusão e representar um alvo específico para os linfócitos T participantes do ECL (Riddell et al., 2003). Pode ocorrer também uma resposta menos específica, que medeia ECL e a DECH, como a que ocorre contra os antígenos maiores e menores de histocompatibilidade, pois estes são expressos tanto nos alvos da DECH quanto nas células leucêmicas (Barret, 1997). Uma vez ativadas, as células T participam da etapa efetora do ECL através da citotoxicidade direta ou pela produção de citocinas inflamatórias que recrutam uma resposta imune integrada (Barret et al., 2003).

A importância da apresentação de antígenos para o desenvolvimento de uma ECL eficaz pôde ser demonstrada através de vários estudos que utilizaram células dendríticas carregadas com antígenos leucêmicos que funcionaram como uma vacina para LMA. As células dendríticas podem ser geradas a partir de monócitos e precursores CD34⁺ da medula óssea e podem ser carregadas, fundidas ou transformadas com antígenos relevantes de tumores. O mais interessante é que, nos casos de LMA e leucemia mielóide crônica, as células leucêmicas podem ser diferenciadas em células dendríticas, conservando seu repertório de

antígenos específicos de leucemia e adquirindo capacidade de apresentação de antígeno (Houtenbos et al., 2007; Delluc et al., 2007).

Outros estudos tentaram controlar a aloreatividade para prevenir a DECH e ao mesmo tempo manter o ECL, o que é um grande desafio. Uma estratégia é o TCTH ou ILD com a depleção de subpopulações de células T específicas, como o CD8 que, conforme dito anteriormente, parece estar mais relacionado com a DECH do que com o ECL (Giralt et al., 1995). Outra linha de pesquisa para controlar a DECH e continuar com o efeito ECL foi realizada por Litvinova et al (2002) em camundongos. Este experimento consistiu em transformar geneticamente linfócitos T através do processo de inserção *ex-vivo* de um gene suicida: a timidina quinase do vírus *Herpes simplex* tipo 1. O fundamento deste experimento é que os linfócitos T modificados fariam o metabolismo do ganciclovir em trifosfato (forma ativa do ganciclovir), inibindo o alongamento do DNA e causando a morte na fase da divisão celular. Estes linfócitos T modificados eram infundidos em camundongos juntamente com o TCTH. Quando as células T modificadas do doador reconheciam os aloantígenos do receptor, tornavam-se ativadas e se dividiam, tornando-se sensíveis à droga. Observou-se que se o ganciclovir fosse utilizado no momento certo, poderia evitar a DECH através da eliminação seletiva de células T aloreativas, enquanto o ECL pôde ser preservado através das células T que não se dividiram durante o tratamento (Litvinova et al, 2002).

Tem sido sugerido que a DECH e o efeito anti-tumoral podem ser separados dependendo da célula efetora que está sendo examinada. Foi montado um modelo experimental de DECH em camundongos, em que era feito um TCTH completamente incompatível acrescido de células T do doador. Neste modelo, foi examinado se a transferência adotiva de células NK do doador ativadas com IL-2 poderia prevenir a DECH sem comprometer o efeito antitumoral. Foi observado um efeito protetor contra a DECH. Este efeito ocorreu quando as células NK foram infundidas no dia do TCTH, mas não quando a

infusão ocorria de forma mais tardia. Conforme dito anteriormente, acredita-se que as células NK não sejam capazes de iniciar a DECH, entretanto elas podem ter um papel na patologia desta doença quando já iniciada por células T do doador. Estes resultados indicaram que as células NK tiveram a capacidade de suprimir o estágio de sensibilização da DECH no momento em que as células T do doador estavam reagindo pela primeira vez contra aloantígenos do hospedeiro (Asai et al., 1998).

Neste mesmo estudo, foi demonstrado que enquanto a infusão de células T levou a um aumento do efeito antitumoral e à indução da DECH, as células NK alogeneicas ativadas foram capazes de inibir a DECH e, ao mesmo tempo, promover o efeito antitumoral. Este efeito foi observado através de um aumento na sobrevida e um menor número de metástases no pulmão dos animais onde as células NK eram infundidas com o TCTH e células T alogeneicas. Os animais que recebiam apenas o TCTH com as células T alogeneicas apresentavam mais metástases no pulmão e morriam de DECH. Este estudo levou à sugestão de que era possível separar o ECL da DECH a partir das células NK (Asai et al., 1998). Posteriormente, em humanos, o papel das células NK na prevenção da DECH e mediação do ECL foi demonstrado de forma efetiva em TCTH haploidêntico (Ruggeri et al., 1999).

O TCTH haploidêntico tem sido utilizado como uma forma de tratamento em pacientes que não encontram doadores compatíveis. Apesar da rede mundial de registro de doadores de medula óssea, que inclui mais de três milhões de doadores voluntários com tipagem de HLA realizada, cerca de 40% dos pacientes não conseguem encontrar um doador HLA compatível. Muitos destes pacientes precisam do transplante de forma urgente e recaem da doença enquanto esperam por um doador. Por outro lado, virtualmente todo paciente possui um membro da família que tem compatibilidade completa de um haplótipo (conjunto de alelos de HLA herdado em um cromossomo paterno ou materno) com o outro haplótipo

completamente incompatível. Este parente poderia servir imediatamente como doador (Reisner et al., 2004).

No início, este tipo de transplante não era bem sucedido devido à incidência de uma DECH incontrolável. Quando era feita a depleção de células T como medida profilática para a DECH, ocorria a rejeição do enxerto. A falha do enxerto foi resolvida com uso de uma dose muito alta de células tronco hematopoéticas e um regime de condicionamento fortemente imunossupressor (Reisner et al., 2004; Ruggeri et al., 2004).

Sabe-se que a depleção de células T, além de gerar rejeição do enxerto, gera um aumento da chance de recaída de leucemia. A partir desta observação, começou a ser questionado se haveria outras células capazes de exercer o ECL neste tipo de transplante. Com o avanço nos conhecimentos da biologia das células NK e seus receptores que reconhecem alelos específicos de HLA-I na célula alvo, foi estudado o papel da aloreatividade de células NK no transplante haploidêntico. Um estudo realizado *in vitro* em seres humanos demonstrou a presença de clones de células NK aloreativos se houvesse determinadas diferenças entre o HLA do paciente e doador. Estes clones eram capazes de lisar células leucêmicas do paciente, sendo as LMA mais susceptíveis que as LLA. Estes clones também reagiram contra linhagens geradas a partir de linfócitos normais do paciente (Ruggeri et al., 1999).

Num outro estudo realizado por Ruggeri et al (2002) em TCTH haploidêntico, os pacientes foram divididos em dois grupos: o grupo 1 consistiu em pares pacientes-doadores em que não havia presença de células NK aloreativas; e o grupo 2 em pares pacientes-doadores com a presença das células NK aloreativas. A presença destas células NK aloreativas levou à diminuição do risco de recaída nos casos de pacientes com LMA (75% de probabilidade de recaída em 5 anos no grupo 1 contra 0% no grupo 2), mas isto não aconteceu nos casos de pacientes com LLA (90% de probabilidade de recaída em 5 anos no grupo 1

contra 85% no grupo 2). Nos casos de LMA também houve melhora da sobrevida livre de doença (no grupo 1, a probabilidade de sobrevida em 5 anos era 5% contra 60% no grupo 2). A presença de células NK aloreativas também levou à diminuição de rejeição do enxerto (15% no grupo 1 contra 0% no grupo 2).

A partir desses resultados em TCTH haploidêntico realizado em seres humanos juntamente com outros ensaios realizados *in vitro* e em modelos animais, ficou estabelecido que as células NK aloreativas eram capazes de promover o ECL (por lisar as células leucêmicas do paciente) e a “pega” do enxerto (por matar as células tronco hematopoéticas normais residuais do paciente, mas não de outros tecidos normais). Além disto, foi observado que estas células são capazes de prevenir a DECH através da lise de células apresentadoras de antígeno de origem do paciente (Ruggeri et al., 1999; Ruggeri et al., 2002; Velardi et al., 2002). Estes efeitos estão representados na **figura 1**.

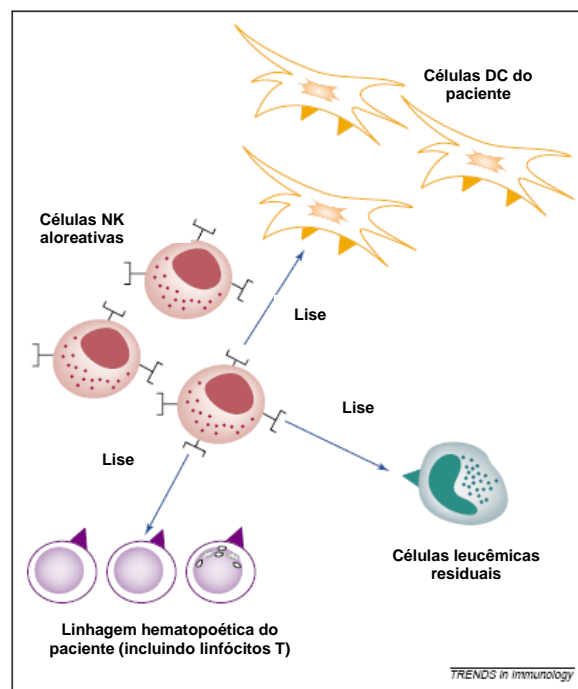


Figura 1 - A aloreatividade de células NK no TCTH haploidêntico que leva ao favorecimento do efeito ECL, através da lise de células leucêmicas residuais; a “pega” do enxerto, através da lise de células hematopoéticas normais; e prevenção da DECH, através de lise de células dendríticas do paciente. Fonte: Velard et al., 2002

Para entender melhor os mecanismos envolvidos no papel das células NK no TCTH, é necessário conhecer a biologia das células NK e os seus receptores, assim como os mecanismos de susceptibilidade/resistência das leucemias à atividade citotóxica destas células.

3.3. Células *natural killer* (NK)

3.3.1. Biologia das células NK

As células NK compreendem cerca de 10% dos linfócitos do sangue periférico. Elas foram caracterizadas há mais de 30 anos como importantes componentes do sistema imune inato, que têm a capacidade de lisar células alvo, além de fornecer citocinas imunoregulatórias (Farag et al., 2002; Vivier, 2006). Elas foram primeiramente identificadas por sua habilidade em matar células tumorais e células infectadas por vírus sem sensibilização prévia (O'Connor et al., 2006). As células NK parecem ter surgido evolutivamente antes dos linfócitos T e B, já que são encontradas em invertebrados que não possuem sistema imune adaptativo (Robertson e Ritz, 1990).

A atividade citotóxica das células NK foi descrita pela primeira vez na década de 70. Nesta época, foi observado que linfócitos isolados a fresco de indivíduos normais e não imunizados poderiam lisar linhagens de células tumorais alogeneicas. Mais tarde, devido às características diferentes apresentadas por estas células, em comparação aos outros linfócitos, passaram a ser chamadas de células matadoras naturais (*natural killer* - NK). Foram descritas várias atividades destas células *in vivo* incluindo destruição de células tumorais, resistência a infecções virais e regulação da hematopoese (Robertson e Ritz, 1990).

A determinação das células NK como uma população diferente de outros linfócitos foi feita através de microscopia e uso de anticorpos monoclonais. Morfologicamente elas são caracterizadas como linfócitos grandes e granulares. Os principais antígenos utilizados para

identificar as células NK são o CD56 e o CD16. O antígeno CD56 parece ser idêntico à molécula de adesão de célula neural (NCAM). Até hoje a função da molécula CD56 nas células NK é desconhecida. As células NK não fazem rearranjo gênico, por isso não expressam o TCR nem a molécula acessória CD3. A maioria das células NK expressa CD16, receptor para a porção Fc de IgG (Robertson e Ritz, 1990; Farag e Caligiuri, 2006).

A maior parte dos pesquisadores concorda que os linfócitos T, B e células NK se originam de um precursor comum. A medula óssea é considerada o sítio primário de geração das células NK porque possui todos os substratos celulares e fatores solúveis necessários para a maturação destas células. Entretanto, ainda não está claro se a medula óssea sozinha é suficiente para garantir a maturação completa das células NK. Existe a possibilidade de que as células NK sejam geradas na medula óssea e completem sua maturação em outro sítio. Foram encontrados precursores de células NK no fígado, baço e linfonodos, suportando esta teoria (Blom e Spits, 2006; Di Santo, 2006).

A principal função das células NK maduras é a atividade citotóxica. Esta citotoxicidade é considerada rápida, muito potente e possui múltiplas facetas. Dessa forma, a morte da célula alvo pode ocorrer em minutos, dificultando a atuação de mecanismos de resistência. A morte celular mediada pelas células NK ocorre através da exocitose de grânulos e a indução de apoptose através da sinalização via membros da família de receptores de morte celular do TNF (Smyth et al., 2005).

O primeiro passo para a citotoxicidade mediada por células NK é a adesão. Integrinas e outras moléculas de adesão têm um papel crucial na formação de conjugados entre a célula NK e a célula alvo. Vários ensaios *in vitro* indicaram um papel essencial para um tipo de integrina chamado função linfóide associada ao antígeno-1 (LFA-1). Esta molécula tem a função de induzir a polimerização de actina, rearranjos do citoesqueleto e aglomeração de

vesículas lipídicas. Estes sinais mediados por LFA-1 sozinhos podem ser suficientes para ativar a citotoxicidade mediada por células NK (Tassi et al., 2006).

O processo de adesão à célula alvo induz alterações dinâmicas na morfologia celular das células NK: grânulos líticos são movidos em direção ao sítio de interação com a célula alvo. Este movimento é realizado através de estruturas de citoesqueleto que são orquestradas pelo centro de organização de microtúbulos. Em seguida, a membrana externa do grânulo se funde com a membrana citoplasmática, liberando seu conteúdo no espaço sináptico (**figura 2**). Os principais conteúdos destes grânulos são moléculas de perforina e granzima (Uhrberg¹, 2005).

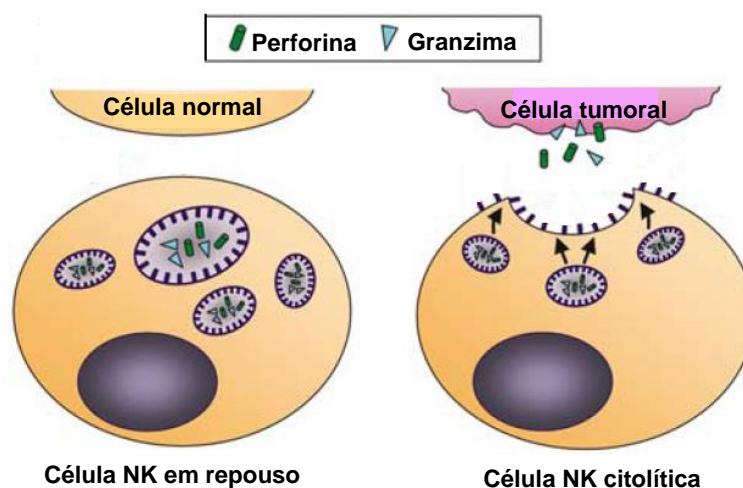


Figura 2 – Esta figura mostra que as células NK ativadas, por exemplo, por uma célula tumoral, movem os grânulos em direção ao sítio de interação com a célula alvo e ocorre a fusão da membrana do grânulo com a membrana da célula NK liberando seu conteúdo no espaço sináptico. Adaptado a partir de Uhrberg, 2005.

As perforinas são proteínas que formam poros na membrana das células alvo que podem perturbar a permeabilidade e levar a lise osmótica enquanto as granzimas são uma família de serina-proteases estruturalmente relacionadas com várias especificidades de substrato. Em humanos há cinco tipos de granzimas (A, B, H, K e M). A granzima B é considerada o mais importante membro pró-apoptótico desta família. É importante ressaltar que a perforina ajuda a permitir a apoptose mediada por granzimas (Liu et al, 1995; Trapani, 2001).

O outro mecanismo de morte celular mediado por células NK é através da ligação de receptores específicos presentes nas células alvo com ligantes na superfície das células NK. Estes ligantes pertencem à superfamília do TNF e a sua ligação induz a apoptose da célula alvo. As células NK expressam dois membros desta família: FasL (também conhecido como CD95L) e o ligante de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL). Muitas células tumorais não expressam Fas (receptor que se liga a FasL), mas as células NK podem diretamente induzir a expressão de Fas em células cancerosas através da secreção de TNF. A atividade citotóxica mediada por TRAIL é relativamente seletiva porque mata linhagens celulares tumorais humanas e não causa efeito nas células normais (Srivastava, 2001; Cappello et al., 2002; Smyth et al., 2005).

A atividade citotóxica das células NK é regulada por agentes endógenos, como citocinas e hormônios. Estes agentes também podem ser utilizados de forma exógena, por exemplo, no tratamento de doenças. As citocinas como IFN- γ , IFN- α/β , IL1, IL2, IL7 e TNF- α são capazes de estimular a atividade NK. Entre os hormônios que regulam a atividade NK de forma positiva, destacam-se: o hormônio adenocorticotrófico, beta-endorfina e prolactina. A atividade NK é modulada de forma negativa por glicocorticosteróides (Holbrook et al., 1983; Robertson e Ritz, 1990; Souza et al., 2001). A regulação da citotoxicidade das células NK por hormônios, como cortisol e prolactina, ocorre através de alteração na expressão de receptores que ativam a atividade citotóxica, sendo que o cortisol diminui a expressão destes receptores enquanto a prolactina aumenta (Mavoungou et al., 2005).

A atividade citotóxica também é influenciada por fatores, como o gênero e idade. Um estudo em Israel com 46 indivíduos mostrou que os homens têm maiores níveis de atividade das células NK do que as mulheres (Yovel et al., 2001). Porém, um estudo realizado em 40 indivíduos da população brasileira não encontrou diferença estatisticamente significativa entre os gêneros, embora houvesse uma tendência de maior atividade citotóxica em indivíduos do

gênero masculino (De La Roque et al., 1988). Mulheres que fazem uso de anticoncepcional oral têm atividade citotóxica menor do que mulheres que não usam (Yovel et al., 2001). Com relação à influência da fase do ciclo menstrual, assim como do gênero, ainda há controvérsias. Um estudo em 78 indivíduos (30 do gênero feminino e 48 do masculino) da população brasileira demonstrou que na fase folicular do ciclo menstrual há um aumento em relação à fase luteínica. Além disso, mulheres na fase folicular do ciclo mostraram atividade citotóxica semelhante a mulheres que já entraram na menopausa e aos homens (Souza et al., 2001). No entanto, Yovel et al. (2001) não encontrou diferenças entre as fases do ciclo menstrual.

A atividade das células NK também pode variar com a idade. Foi observado um pequeno, mas significativo, aumento na atividade NK do nascimento à idade adulta (Pross e Baines, 1982). De La Roque (1988), estudando 40 indivíduos adultos não detectou influência da idade na atividade NK, porém havia poucos indivíduos idosos em sua amostra. Em idosos, há resultados controversos devido aos diferentes critérios de seleção utilizados. Se for utilizado um critério de seleção que inclui apenas idosos muito saudáveis, a atividade citotóxica das células NK é mantida e a queda é mais claramente observada em indivíduos com idade entre 75 e 85 anos (Mocchegiani e Malavolta, 2004). A resposta destas células à IL-2 está alterada no envelhecimento no que diz respeito à proliferação, expressão de CD69 e mobilização de Ca^{2+} , enquanto a produção de TNF- α não foi significativamente alterada (Borrego et al., 1999).

O número de células NK no sangue periférico também sofre variação ao longo da vida: é alto ao nascimento, reduzindo-se até a adolescência (Shearer et al., 2003). Em adultos o número de células NK aumenta, principalmente a partir dos 50 anos. Nos idosos há uma significativa expansão no número destas células. Este aumento no envelhecimento ocorre principalmente em uma de suas subpopulações, que é conhecida como CD56^{dim} (Borrego et al., 1999; Mocchegiani e Malavolta, 2004).

3.3.2. Subpopulações de células *natural killer*

A citotoxicidade direta contra células cancerosas ou infectadas por vírus é apenas um componente da resposta das células NK. Outro componente é a produção de citocinas liberadas por estas células, como IFN- γ , que também restringe a angiogênese tumoral e estimula a imunidade adaptativa (Smyth et al., 2005). Foi observado que dois subtipos distintos de células NK eram responsáveis por estes dois papéis. Na década de 80, estes subtipos foram identificados através de diferenças na densidade de expressão de superfície de CD56. A maioria das células NK humanas tem baixa expressão de CD56 e alta expressão de CD16, e são conhecidas como células CD56^{dim}. A outra subpopulação é caracterizada por alta expressão de CD56 e expressão baixa ou negativa de CD16 e por isso é chamada de CD56^{bright}. Estas duas subpopulações também têm características funcionais distintas: a CD56^{dim} é a mais citotóxica, enquanto a CD56^{bright} é a maior responsável por produção de citocinas (Cooper¹ et al., 2001). As principais características que diferenciam estas células estão representadas na **figura 3**. O significado funcional *in vivo* destes subtipos distintos de células NK humanas e como eles podem interagir ainda não estão completamente definidos (Farang e Caligiuri, 2006).

O subtipo CD56^{dim} é predominante no sangue periférico (cerca de 90%) e tem maior participação na citotoxicidade celular dependente de anticorpos por possuir maior expressão de CD16 que, conforme dito anteriormente, é receptor para a porção Fc de anticorpos. Além disso, este subtipo tem maior citotoxicidade natural contra alvos sensíveis às células NK e respondem a IL-2 com um aumento da citotoxicidade. Esta diferença no potencial citotóxico pode ser devido ao fato destes dois subtipos terem padrões distintos de expressão de receptores de células NK importantes no reconhecimento e morte da célula alvo. Além disso, as células da subpopulação CD56^{dim} têm maior concentração de grânulos que as CD56^{bright}. Após o tratamento com IL-2, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, os dois subtipos de células NK

passam a apresentar níveis semelhantes de citotoxicidade. (Cooper et al., 2001¹; Farag e Caligiuri; 2006).

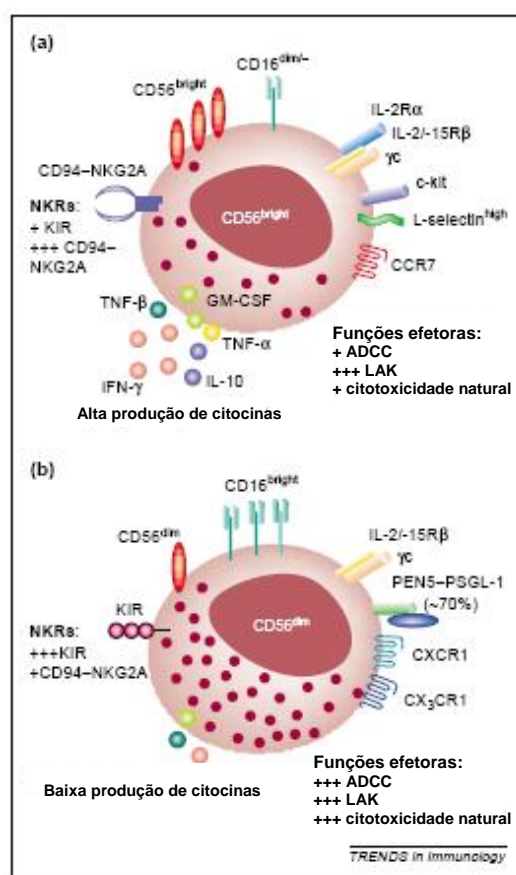


Figura 3 – Esta figura representa as duas subpopulações de células NK e as suas principais características fenotípicas e funcionais. Em (a) está representado o CD56^{bright} e (b) CD56^{dim}. Fonte: Cooper et al., 2001¹

As células NK CD56^{bright} produzem citocinas imunoregulatórias, incluindo TNF-α, TNF-β, IFN-γ, GM-CSF, IL-10 e IL-13. Esta subpopulação expressa constitutivamente o receptor de IL-2 de alta afinidade e expande *in vitro* e *in vivo* em resposta a baixas doses (picomolar) de IL-2, com pouca atividade citolítica. Em contraste, as CD56^{dim} só expressam o receptor de afinidade intermediária para IL-2 e proliferam pouco em resposta a altas concentrações (nanomolar) de IL-2. Embora o subtipo CD56^{bright} seja raro no sangue ($\pm 10\%$ das células NK), representa o subtipo predominante nos tecidos e linfonodos. Isto pode ser justificado pelo fato das células CD56^{bright} expressarem moléculas de adesão e receptores de quimiocinas diferentes das CD56^{dim}. O subtipo CD56^{bright} tem expressão das moléculas

necessárias para trafegarem para os linfonodos periféricos através de vênulas endoteliais. Nos linfonodos, estas células se localizam na mesma região onde estão os linfócitos T e as células dendríticas, o que é consistente com o seu potencial papel imunoregulatório da resposta adaptativa (Cooper² et al., 2001; Fehniger et al., 2003; Farag e Caligiuri, 2006).

3.3.3. As células NK e a sua participação na resposta adaptativa

A princípio acreditava-se que a participação das células NK na resposta imune adaptativa era restrita à modulação da resposta dos linfócitos T e B através de secreção de citocinas e quimiocinas. Mais recentemente, foi demonstrado que a sua participação na resposta imune adaptativa ocorre também através da interação com células dendríticas (DC) (Raulet, 2004; Zingoni et al., 2005).

Em 1999 foi descoberto que as funções efectoras das células NK podem ser estimuladas via contato direto com as células DC ativadas. A importância da ativação das células NK mediada por DC foi demonstrada a partir da observação de que a infusão de DC (e também de substâncias que ativam as DC) aumentou de forma considerável a proteção mediada por células NK contra células tumorais transferidas *in vivo* em modelo murino. Mais tarde ficou claro que a interação DC/NK era bidimensional e complexa, importante não só para a ativação de células NK, mas também para as DC. Esta interação envolve a produção de citocinas além do contato célula a célula (Fernandez et al., 1999; Walzer et al., 2005).

Paradoxalmente, as células NK ativam as DC imaturas, mas também as matam. Aparentemente o que controla este efeito é a proporção NK/DC. Ensaios *in vitro* mostraram que quando as células NK estavam em maior número, ocorria lise das DC imaturas. Por outro lado, se houvesse maior número de DC imaturas, ocorria a ativação das DC por células NK. As DC maduras são resistentes à lise por células NK. A morte/ativação de DC imaturas, mediada por células NK, pode ter um papel importante no equilíbrio entre tolerância e

imunidade. Mas para que esta hipótese seja confirmada, é preciso que seja determinado se as células NK podem lisar as DC em condições fisiológicas normais. Até hoje, esta lise só foi demonstrada em condições exclusivamente encontradas *in vitro*, situações patogênicas ou outras situações atípicas, como no TCTH haploidêntico. Conforme dito anteriormente, neste tipo de transplante as células NK aloreativas do doador podem lisar as DC do receptor, resultando na prevenção na DECH (Ruggeri et al., 2002; Raulat, 2004; Walzer et al., 2005).

A ativação de DC induzida por células NK é dependente tanto da secreção de TNF- α e IFN- γ quanto do contato direto célula a célula envolvendo um receptor ativador específico das células NK (NKp30). A secreção destas citocinas por células NK leva à maturação das DC. Por sua vez, a produção *in vitro* de IL-12/IL-18, IL-15 e IFN α/β pelas células dendríticas ativadas aumenta nas células NK, a produção de IFN- γ , proliferação e potencial citotóxico, respectivamente. Parece que a proliferação e produção de IFN- γ por células NK ativadas por DC ocorrem exclusivamente em células do subtipo CD56^{brigh} que, conforme citado anteriormente, estão presentes nos órgãos linfóides secundários, o que permite a interação com DC durante uma resposta imune (Walzer et al., 2005; O'Connor et al., 2006).

As interações entre as células NK e as DC *in vivo* podem ocorrer em órgãos linfóides assim como em tecidos não linfóides, e as suas conseqüências são múltiplas. A ativação de células NK causada por células tumorais pode promover de forma indireta a resposta antitumoral de células T através da indução da ativação das DC. Reciprocamente, as DC ativadas pelo reconhecimento direto de patógenos via uma classe específica de receptores (os receptores Toll-like) podem induzir potentes reações mediadas por células NK na resposta contra microorganismos. Portanto, as DC e células NK são equipadas com conjuntos complementares de receptores que permitem o reconhecimento de infecção microbiana e transformação tumoral, enfatizando o papel da interação entre estas duas células na coordenação das respostas imunes inatas e adaptativas (Walzer et al., 2005).

As células NK possuem algumas características semelhantes à imunidade adaptativa. Isto foi demonstrado através de um estudo *in vivo*, em que as células NK foram recrutadas localmente pela inoculação de células tumorais e infecção viral. A migração de células NK pôde ser induzida pela inoculação de várias quimiocinas, como proteína inflamatória de macrófago 1α e citocinas, como TNF- α e IL-2. Foi demonstrado então, que as células NK foram recrutadas para a cavidade peritoneal e ativadas se houvesse inoculação de tumor (Glas et al., 2000).

Outra característica que as células NK compartilham com a imunidade adquirida é a ativação e expansão clonal que ocorre *in vivo* quando células NK são ativadas por patógenos ou células tumorais infundidas em modelos animais. O conjunto de células NK amplificadas resultantes pode persistir por alguns dias, fornecendo uma proteção mediada por células NK a curto prazo. No entanto, existem diferenças entre esta expansão de células NK e a que ocorre na imunidade mediada por linfócitos B e T, e acredita-se que a maior delas é que não existe memória imunológica com longa duração mediada por células NK (Raulet, 2004).

Especificidade e memória são características essenciais da resposta imune adaptativa. Enquanto a resposta inata não se altera mediante a exposição repetitiva a um dado agente, a resposta adaptativa torna-se mais eficaz a cada encontro subsequente com o mesmo agente (memória imunológica). Relacionada a esta abordagem, um estudo em camundongos realizado por O'Leary et al (2006) encontrou resultados não esperados, que levaram à sugestão de que as células NK seriam capazes de mediar especificidade e memória. Esta resposta de células NK foi demonstrada num modelo de dermatite de contato, na ausência de linfócitos T e B.

Um modelo muito utilizado para estudar este tipo de reação, considerada dependente da resposta adaptativa, consiste na sensibilização de roedores pintando o dorso destes animais com um corante, o 2,4-dinitrofluorobenzeno (DNFB). Alguns dias mais tarde, o animal é

desafiado com o mesmo corante, mas desta vez aplicado num sítio diferente, como as orelhas. A resposta é específica, pois não ocorre se o corante utilizado para a sensibilização for diferente do utilizado para o desafio. Para determinar se esta resposta era dependente exclusivamente de linfócitos T, este modelo de dermatite de contato foi aplicado em um camundongo transgênico, chamado de $Rag2^{-/-}$. Este animal tem ausência de um gene responsável pelo rearranjo gênico ($Rag2$) que ocorre em linfócitos T e B para gerar receptores específicos para um determinado antígeno. Conforme citado anteriormente, as células NK não fazem este tipo de rearranjo. Portanto, nestes camundongos $Rag2^{-/-}$ os linfócitos T e B não podem ser produzidos e as células NK são os únicos linfócitos circulantes. A dermatite de contato continuava a ocorrer neste modelo murino com ausência de linfócitos T e B (O'Leary et al., 2006).

Estes autores constataram que as células NK eram responsáveis pela reação causada pelo contato com o corante na ausência de células T, através de experimentos em que as células NK de um animal sensibilizado eram transferidas para outro camundongo $Rag2^{-/-}$ que nunca tinha entrado em contato com o DNFB. Este animal que tinha recebido células NK, ao ser estimulado com o DNFB, desenvolvia a reação de dermatite de contato. Além disso, foi demonstrado que se as células NK fossem bloqueadas de alguma forma (por exemplo, com o uso de anticorpos específicos) em camundongos $Rag2^{-/-}$, o estímulo com o corante não levava a dermatite de contato. Também foi observado que esta resposta mediada por células NK era específica, pois se o animal fosse sensibilizado com um corante e desafiado com outro corante diferente, não ocorria dermatite de contato. Estes autores também observaram que a dermatite de contato poderia ocorrer um mês após a sensibilização, o que levou à sugestão de que as células NK estariam mediando algum tipo de memória imunológica (O'Leary et al., 2006).

Este estudo de O'Leary et al (2006) ilustrou a versatilidade funcional e adaptativa de um subtipo específico de células NK na ausência de linfócitos T funcionantes. No entanto, os

mecanismos envolvidos nesta resposta aparentemente adaptativa das células NK ainda não estão claros. Parham (2006) sugeriu que a memória imunológica observada poderia se tratar na verdade de uma resposta contínua, pois não foi claramente demonstrado que a resposta primária ao DNFB tinha acabado completamente no momento do segundo contato com esta substância. Outros estudos sobre o assunto são requeridos para confirmar esta hipótese e explicar melhor como as células NK estariam atuando neste modelo.

Neste estudo de O'Leary et al. (2006), a resposta mediada por células NK só se tornou aparente na ausência de células da imunidade adaptativa. Em outros sistemas, o papel das células NK também se torna mais evidente na ausência dos linfócitos T. Por exemplo, conforme dito anteriormente, no TCTH as células NK são as primeiras células a se recuperarem, fazendo assim o papel do sistema imune, enquanto as células da imunidade adaptativa ainda não se recuperaram (Keever et al., 1989; Diamond et al., 1995; Parham, 2006). Outro exemplo é o TCTH haploidêntico, onde é necessária a depleção de células T e foi demonstrado que as células NK podem mediar o ECL e prevenir a DECH, conforme discutido anteriormente. No entanto, os mecanismos envolvidos nesta resposta mediada por células NK não estão completamente claros. Pode ser que haja uma relação com a forma única como as células NK reconhecem seus alvos através de um repertório próprio de receptores (Ruggeri et al., 2002; O'Leary et al., 2006; Parham, 2006).

3.4. Receptores de células *natural killer*

3.4.1. Reconhecimento das células alvo

Por muitos anos ficou desconhecido o mecanismo de reconhecimento das células alvo pelas células NK. Na década de 80, foi observado que a susceptibilidade à atividade das células NK era inversamente proporcional à expressão de antígenos de histocompatibilidade maior (MHC) na célula alvo. Também foi identificado que linhagens celulares com expressão de MHC diminuída eram mais sensíveis à lise mediada por células NK do que suas linhagens parentais. Além disso, a resistência à atividade NK podia ser restaurada pela introdução de genes normais de MHC. Por último, “mascarar” antígenos de MHC com anticorpos monoclonais aumentava a susceptibilidade à função efetora das células NK (Robertson e Ritz, 1990).

A partir destas e outras observações, foi proposto que, apesar de tolerantes com as células autólogas normais, as células NK conseguem reconhecer e atacar células que tenham baixa expressão de MHC classe I, como células infectadas por vírus e células transformadas. Essa teoria ficou conhecida como hipótese do *missing-self* (Ljunggren e Karre, 1990). Essa imunovigilância da perda ou alteração da expressão de moléculas de MHC-I mediada por células NK é uma tarefa essencial do sistema imune inato porque constitui um dos pontos falhos da resposta adaptativa: as células T só reconhecem antígenos no contexto do MHC, portanto a perda da expressão de MHC representa um mecanismo de escape ao ataque das células T (Uhrberg², 2005). Na última década, a teoria do *missing-self* foi confirmada através da identificação de vários receptores inibidores de células NK humanas que reconhecem especificamente moléculas do antígeno maior de histocompatibilidade clássicas, como HLA-A, B e C; ou não clássicas, como HLA-E e G (Farag et al., 2002).

Os receptores expressos por células NK podem gerar sinais inibidores ou ativadores e têm um papel crucial na regulação da atividade lítica e produção de citocinas. A atividade das

células NK é regulada por um balanço entre os sinais provocados por estes receptores (**Figura 4**). Se houver mais sinais inibidores do que ativadores, ocorrerá a predominância dos sinais inibitórios e a célula alvo será protegida da lise por células NK. Por outro lado, se houver mais sinais ativadores do que inibidores, ocorrerá a predominância dos sinais ativadores e a célula alvo será lisada. Acredita-se que se houver uma equivalência entre sinais inibidores e ativadores, o sinal inibidor prevaleça (Borrego et al., 2002; Farag et al., 2002).

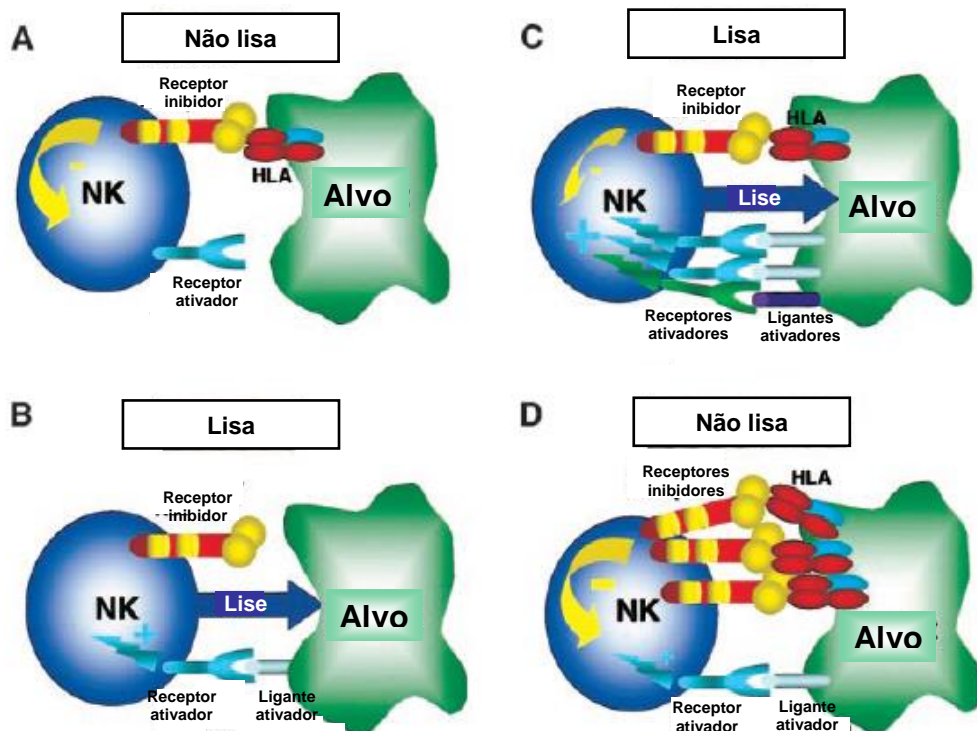


Figura 4 – Regulação da atividade citotóxica das células NK por receptores ativadores e inibidores em diferentes situações: Em (A), o sinal inibidor prevalece por não haver ligação de nenhum receptor ativador. Em (B), há ligação de receptor ativador na ausência de sinais inibidores, de forma que ocorre lise da célula alvo. (C) e (D) representam situações mais complexas, em que ocorrem simultaneamente ligações de receptores ativadores e inibidores. Se houver mais sinais ativadores do que inibidores (C), ocorre lise da célula alvo. Por outro lado, se houver mais sinais inibidores do que ativadores (D), a célula alvo será protegida da lise por células NK. Fonte: Farag et al., 2002

A maioria dos receptores inibitórios reconhece moléculas de MHC nas células alvo e o sinal inibitório é mediado por domínios *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*

(ITIM) que fazem parte da porção intracitoplasmática de receptores inibidores. Os receptores ativadores reconhecem moléculas de MHC-I e outros tipos de moléculas nas células alvo. Muitos receptores ativadores não possuem domínios capazes de mediar sinal em sua cauda citoplasmática e por isso estão associados a moléculas adaptadoras (ex: DAP-12) que possuem domínios *immunoreceptor tyrosine-based activating motif* (ITAM) e, dessa forma, podem gerar os sinais ativadores, conforme observado na **figura 5** (Blery, et al., 2000; Borrego et al., 2002).

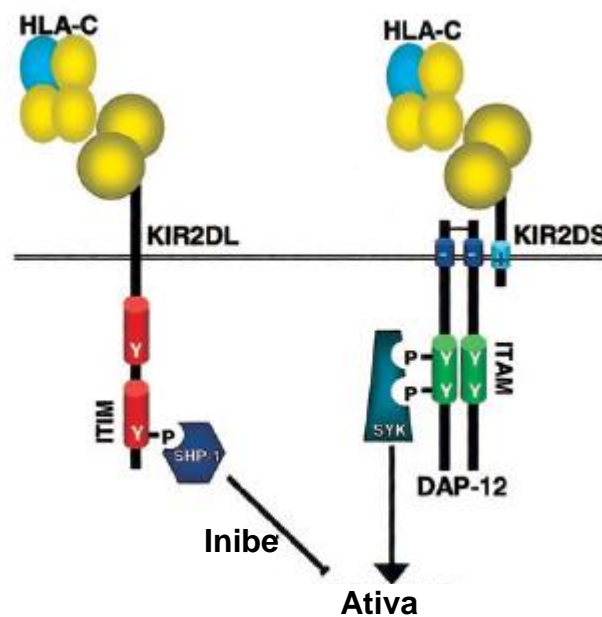


Figura 5- Na figura à esquerda é mostrado um exemplo de um receptor inibidor (KIR2DL) que apresenta os domínios de ITIM como parte de sua cauda intracitoplasmática e iniciam a sinalização inibitória. À direita é mostrado um exemplo de um receptor ativador (KIR2DS) que utiliza uma molécula adaptadora (DAP-12) com domínios de ITAM para gerar sinal ativador. Fonte: Farag et al., 2002.

Três famílias principais de receptores são encontradas em células NK: a superfamília de receptores semelhantes à lectina tipo C, que reconhece moléculas de HLA classe I não clássicas e moléculas semelhantes à classe I; os receptores de citotoxicidade natural (NCR), cujos ligantes ainda estão mal definidos; e, por último, a superfamília *killer immunoglobulin-*

like receptor (KIR), que reconhece moléculas clássicas de HLA classe I (Farag e Caligiuri, 2006).

A primeira família de receptores de células NK é estruturalmente caracterizada pelos domínios extracelulares semelhantes à lectina do tipo C e seus receptores são expressos como heterodímeros compostos de uma subunidade comum (CD94). Os principais membros desta família são: CD94/NKG2A/B, que reconhece HLA-E e fornece sinal inibidor; CD94/NKG2C, que também reconhece HLA-E, mas fornece sinal ativador; e CD94/NKG2E/H, que gera sinal ativador, mas cujo ligante é desconhecido (Farag et al., 2002). Estes receptores estão relacionados à teoria do “missing-self”, pois a expressão de HLA-E só ocorre se houver a expressão total das moléculas de HLA-I (A, B e C) nas células (Moretta et al., 2006).

Outro receptor pertencente a esta família é o receptor ativador NKG2D, que tem relação distante com os outros receptores da família NKG2, apresentando apenas uma pequena sequência similar e não interagindo com o CD94. O NKG2D humano reconhece MICA e MICB, que são proteínas de transmembrana codificadas por genes que fazem parte do complexo do MHC. Diferente dos MHC convencionais, MICA e MICB são proteínas minimamente expressas nos tecidos normais, mas têm expressão aumentada em células submetidas a estresse e células tumorais. Outras proteínas reconhecidas por NKG2D são ULBP1, ULBP2 e ULBP3, inicialmente identificadas pela capacidade de se ligarem a uma proteína codificada pelo citomegalovírus humano (proteína UL16). O nível de expressão de NKG2D pode ser aumentado nas células NK por exposição à IL-15. Estes achados sugerem que NKG2D possa ter uma participação importante na imunovigilância das células NK contra células tumorais e células infectadas por vírus (Lanier, 2001; Gilfillan et al., 2002; Moretta et al., 2006).

A segunda família de receptores de células NK é composta exclusivamente de receptores ativadores e é conhecida como NCR, sendo representada por NKp46, NKp44 e

NKp30. Como a expressão de NCR é restrita às células NK, estes são os marcadores mais confiáveis para identificação destas células. NKp46 e NKp30 são constitutivamente expressos nas células NK do sangue periférico, enquanto NKp44 é expresso apenas em células NK ativadas. NCR tem papel principal na atividade citolítica mediada por células NK contra células tumorais. No entanto, os ligantes destes receptores ainda não foram identificados. O NKp30 também é importante na interação com células dendríticas, conforme dito anteriormente (Moretta et al., 2004; Zingoni et al., 2005; Farag e Caligiuri, 2006).

A terceira e última superfamília principal de receptores de células NK é conhecida como KIR. Este receptor tem sido mais estudado e considera-se que ele tenha um papel importante na aplicação da imunoterapia de câncer, principalmente no TCTH haploidêntico. Estas moléculas se apresentam como conjuntos de receptores ativadores e inibidores pareados que, primariamente, reconhecem moléculas de HLA-A, B e C nas células alvo (Rugeri et al., 2002; Moretta e Moretta, 2004; Farag e Caligiuri, 2006).

3.4.2. Família *killer immunoglobulin-like receptor* (KIR)

Os receptores da família KIR são designados pelo número de domínios (D) de imunoglobulinas (KIR2D e KIR3D). Sua função ativadora ou inibidora é determinada pelo tamanho de sua cauda citoplasmática, curta (representada por S, ex: KIR2DS1) ou longa (representada por L, ex. KIR2DL1), pois, conforme dito anteriormente, enquanto os inibidores já possuem em sua própria cadeia domínios sinalizadores, os ativadores precisam de uma molécula adaptadora para gerar sinal (Uhrberg et al., 1997; Farag et al., 2002). A expressão de genes KIR é restrita às células NK e células T CD8 de memória (Vilches e Parham, 2002).

Até o momento, foram descritos 14 genes da família KIR e 2 pseudogenes. Estes genes estão localizados no cromossoma 19 na região q13.4. Dez destes genes codificam receptores com dois domínios de imunoglobulina, genes KIR2D, e quatro possuem três domínios de imunoglobulina, genes KIR3D (Moretta e Moretta, 2004; Uhrberg², 2005).

Os ligantes para o receptor KIR considerados mais importantes são alelos de HLA-C. Os receptores KIR reconhecem dois grupos distintos de HLA-C, cuja diferença está no dimorfismo de aminoácidos na posição 77. O grupo 1 de epítomos de HLA-C apresenta serina na posição 77 (Cw*01, 03, 07, 08, 1202/03/06/08, 1402/03/05, 1507, 1601/04) e são reconhecidos por KIR2DL2 e KIR2DL3. As moléculas do grupo 2 de HLA-C possuem asparagina na posição 77 (Cw*02, 0307/15, 04, 05, 06, 0707/09, 1204/05, 1404, 15, 1602, 17, 18) e são reconhecidos por KIR2DL1. Outro receptor KIR cujo ligante está bem definido é o KIR3DL1, que reconhece o epítomo de HLA-B Bw4 (B*08, 13, 27, 44, 51, 52, 53, 57 e 58). Os outros KIR inibidores têm especificidades menos definidas, como KIR3DL2, que reconhece algumas variantes de HLA-A (-A3, -A11), ou não têm nenhum ligante conhecido até o momento. O KIR2DL4 apresenta cauda intracitoplasmática longa, porém evidências recentes mostram que a ligação deste receptor a HLA-G em células NK em repouso resultam

numa ativação que leva à produção de IFN- γ sem atividade citotóxica (Farag et al., 2002; Moretta e Moretta, 2004; Carrington e Norman, 2003).

Apesar de alguns receptores KIR ativadores apresentarem uma estrutura de reconhecimento do ligante muito semelhante a receptores inibidores, como no par 2DL1/2DS1 e no trio de 2DL2/2DL3/2DS2, a afinidade de ligação das variantes ativadoras é fortemente reduzida em comparação às variantes inibidoras. Por isso, quando há ligação de receptores inibidores e ativadores ao mesmo tempo, acredita-se que o sinal inibidor prevaleça. Ainda não foram definidos os ligantes dos outros KIR ativadores (Farag et al., 2002; Uhrberg², 2005). A **tabela 4** apresenta todos os receptores KIR e seus ligantes identificados até o momento.

Tabela 4 - Receptores KIR e seus ligantes identificados até hoje.

	Receptor	Especificidade de ligante
inibidores	KIR2DL1	Grupo 2 de HLA-C
	KIR2DL2	Grupo 1 de HLA-C
	KIR2DL3	Grupo 1 de HLA-C
	KIR2DL5	Não definido
	KIR3DL1	HLA-Bw4
	KIR3DL2	A3, A11 e outros não definidos
	KIR3DL3	Não definido
ativadores	KIR2DS1	Grupo 2 de HLA-C
	KIR2DS2	Grupo 1 de HLA-C
	KIR2DS3	Não definido
	KIR2DL4	HLA-G
	KIR2DS4	Não definido
	KIR2DS5	Não definido
	KIR3DS1	Não definido

Fonte: Farag et al., 2002, Moretta e Moretta, 2004; Uhrberg², 2005.

Foi observado que o número e a composição de genes KIR podem variar entre diferentes indivíduos. Isso levou à descrição de dois grupos de haplótipos KIR: designados A e B. Os haplótipos do grupo A não possuem outros genes KIR ativadores além do KIR2DS4 e apresentam os genes inibidores KIR2DL1, KIR2DL3 e KIR3DL1. Outros 4 genes KIR estão

presentes em todos os haplótipos, tanto do grupo A quanto do B, com raras exceções. São os genes KIR3DL3, KIR3DL2, KIR2DL4 e KIR3DP1 (DP – pseudogene). Os haplótipos do grupo A não variam em conteúdo de genes, mas têm extensiva variação no nível alélico, enquanto os do grupo B têm alta variação no conteúdo de genes, mas possuem polimorfismo alélico apenas moderado. Os haplótipos B apresentam mais genes que o do grupo A, incluindo o KIR2DL5, assim como várias possíveis combinações de genes ativadores (Vilches e Parham, 2002; Uhrberg², 2005).

Análises imunogenéticas demonstraram que diferentes populações étnicas apresentam distribuição distinta dos genes KIR. Como o haplótipo A predomina na população caucasiana, o KIR2DS4 é mais freqüente do que qualquer outro gene KIR ativador nesta população (Niokou et al., 2003). A população de ameríndios venezuelanos apresenta uma distribuição equivalente de haplótipos do grupo A e B (Gendzekhadze et al., 2006). Um estudo em uma população negra (África do Sul) mostrou uma maior freqüência de 2DL1, 2DL3, 3DL1 e 2DS4 e menor freqüência de 2DL5, 2DS1-3, 2DS5 e 3DS1 (Norman et al., 2002).

Com relação à população brasileira, um estudo foi realizado em 118 indivíduos saudáveis, sendo que a maioria era mestiça (75%). Neste estudo foi encontrada uma freqüência superior a 95% nos seguintes genes KIR: 2DL1, 2DL4, 2DS4, 3DL1, 3DL2 e 3DL3. Os genes com freqüência intermediária foram: 2DL3 (77%), 2DL2 (50%), 2DL5 (56%) e 2DS2 (56%). Os genes KIR menos freqüentes (em torno de 37%) foram: 2DS1, 2DS3, 2DS5 e 3DS1. Foi identificado que cerca de 9% das amostras não apresentaram todos os receptores KIR inibidores para os ligantes de HLA presentes no indivíduo (Oliveira et al., 2006).

Além do polimorfismo e da variação do conteúdo de genes KIR de indivíduo para indivíduo, a expressão dos genes KIR também varia de célula para célula dentro do mesmo indivíduo, ou seja, os KIR têm uma distribuição clonal nas células NK. Com poucas exceções,

todos os genes KIR presentes no genoma de um indivíduo são expressos em sua população de células policlonal. Entretanto, os clones individuais de células NK expressam apenas alguns genes KIR, aparentemente em combinações estocásticas que são reguladas principalmente no nível de transcrição e são mantidas de forma estável. Os mecanismos moleculares que regulam a expressão e distribuição celular de KIR ainda são desconhecidos (Vilches e Parham, 2002).

3.4.3. Clones de células NK e o TCTH

As famílias de receptores de células NK específicos para MHC são expressas de forma variada e sobreposta, com um grau de independência substancial. As observações feitas tanto em humanos quanto em camundongos sugerem que o repertório de células NK contém células expressando virtualmente todas as possíveis combinações de receptores. Tem sido estimado que cada célula NK expressa de 3 a 7 receptores específicos para MCH-I. A partir desta estimativa, um indivíduo com genes de aproximadamente 10 receptores para MHC-I possui aproximadamente 1000 clones distintos de células NK expressando combinações diferentes destes receptores. Esses padrões de expressão de receptores são estabelecidos durante o desenvolvimento das células NK e permanecem estáveis, mesmo após múltiplos ciclos de proliferação (Raulet et al., 2001; Parham, 2004).

Estudos da hematopoese de células NK sugerem que células do estroma da medula óssea estão envolvidas na expressão de KIR (Miller e McCullar, 2001). O repertório das células NK depende tanto do polimorfismo KIR quanto HLA. Isso pôde ser observado através de estudos com irmãos: quando os irmãos são KIR e HLA idênticos, possuem um repertório semelhante de células NK, enquanto irmãos com diferenças em KIR ou HLA exibem variações nos repertórios (Yawata et al., 2006).

Enquanto os genes KIR estão localizados no cromossoma 19, os genes de seus ligantes, HLA, estão localizados no cromossoma 6, fazendo com que a herança de KIR e HLA não seja pareada. Dessa forma, muitos indivíduos apresentam genes KIR inibidores para os quais não há ligantes de HLA, e vice versa. Como a expressão dos receptores de células NK se faz de maneira randômica, teoricamente, podem surgir clones de células NK sem receptores inibidores específicos para MHC-I próprio e/ou clones expressando receptores estimuladores para MHC-I próprio. Estes tipos de clones poderiam mediar autoimunidade, mas uma variedade de estudos demonstrou que ocorre tolerância ao próprio. Os processos envolvidos neste evento ainda não são bem entendidos (Raulet et al., 2001; Witt e Christiansen., 2006). Foi demonstrado tanto em modelo murino quanto em seres humanos que a tolerância ao próprio ocorre pela aquisição de um fenótipo funcional hiporesponsivo, similar ao conceito de anergia aceito para as células B e T (Fernandez et al., 2005; Anfossi et al., 2006).

As células NK são claramente autotolerantes, porém podem ser aloreativas contra células de outros indivíduos. As células NK serão aloreativas contra células de indivíduos que não têm expressão de moléculas de HLA que servem como ligantes para seus KIR inibitórios. Isto é conhecido como incompatibilidade KIR. Inversamente, as células NK de um indivíduo são tolerantes para células de outros indivíduos que tenham os HLA que servem como ligantes para os KIR inibitórios, ou seja, quando houver compatibilidade KIR. Estas duas situações estão representadas na **figura 5** (Ruggeri et al., 1999; Farag et al., 2002).

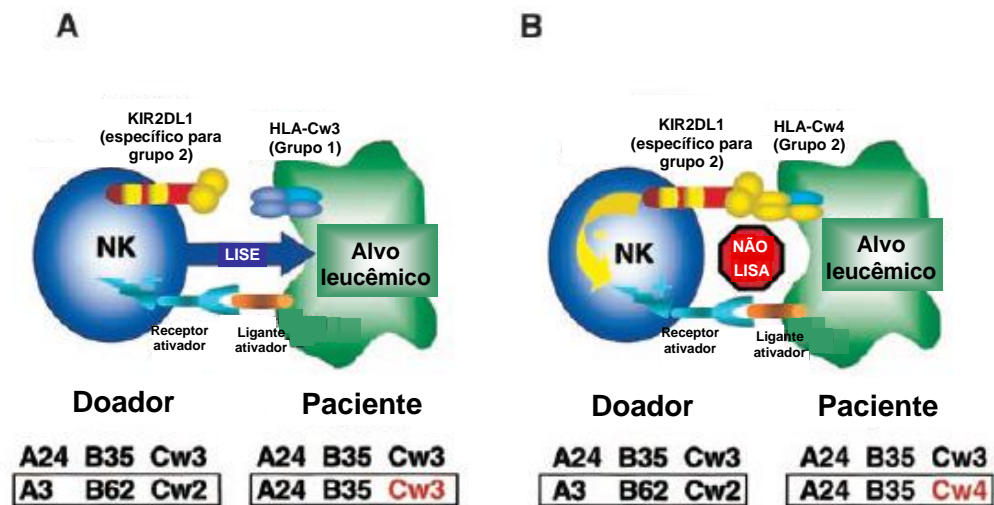


Figura 5 – Potencial aloreativo de células NK. Se o paciente não tiver ligantes de HLA para receptores KIR do doador (incompatibilidade KIR), as células NK do doador terão potencial aloreativo contra as células do paciente (A). Se o paciente tiver ligantes para os KIR inibidores do doador não haverá potencial aloreativo (B).

Esta aloreatividade pode ser prevista de duas maneiras. Alguns estudos reduzem a análise à compatibilidade de epítomos de HLA, ignorando a análise direta do repertório KIR. Neste tipo de estudo, a aloreatividade é prevista nos casos em que o doador possui HLA-C do grupo 1 e o paciente do grupo 2, ou doador do grupo 2 e paciente do grupo 1. Outra possibilidade é com relação a Bw4. Se o doador possuir Bw4 e o paciente não tiver este tipo de HLA-B, é considerado que este doador possui potencial aloreativo contra o paciente. Este tipo de estudo pode ser referido como modelo ligante-ligante, já que não é feita uma análise direta do receptor KIR. Este modelo já contém cerca de 10% de erro embutido, já que a chance de prever o repertório KIR pela análise de ligantes de HLA é de cerca de 90%. Num outro tipo de estudo, considerado um modelo mais sofisticado, além da análise de incompatibilidade de HLA, o repertório KIR do doador é analisado diretamente, de forma que a incompatibilidade KIR só é considerada presente quando a análise do repertório KIR do doador confirmar a presença de receptores KIR para os quais o paciente não possui ligante. Este modelo mais específico é conhecido como modelo receptor-ligante (Witt e Christiansen; 2006).

Como as células NK são os primeiros tipos de linfócitos a se recuperarem após o TCTH, este potencial aloreativo das células NK contra indivíduos com ausência de ligantes para receptores KIR inibidores poderia influenciar o resultado do transplante. Uma questão importante é saber como ocorre a recuperação do repertório KIR após o TCTH, pois se os pacientes após o transplante mantiverem o repertório KIR semelhante ao do doador, a aloreatividade das células NK pode causar um efeito mais prolongado, pois não será dependente apenas das células NK do doador infundidas no momento do transplante, mas também das células NK do doador que serão recuperadas no paciente. Por outro lado, se a recuperação das células NK for influenciada pelo ambiente de HLA do hospedeiro, as células NK aloreativas terão uma vida curta. Até o momento foram realizados alguns estudos sobre a recuperação KIR após o TCTH HLA idêntico e haploidêntico, e foi demonstrado que o repertório KIR recuperado é semelhante ao do doador e não ao do paciente antes do transplante, sugerindo que seja possível um potencial aloreativo a longo prazo (Keever et al., 1989; Diamond et al., 1995; Shilling et al., 2003; Leung et al., 2004; Witt e Christiansen; 2006).

A incompatibilidade KIR no TCTH pode estar relacionada ao efeito ECL e à DECH. Este tipo de estudo foi iniciado por um grupo de pesquisadores italianos no TCTH haploidêntico, no qual foi demonstrado que a incompatibilidade KIR levava à geração de clones de células NK aloreativos, causando uma menor incidência da DECH através da lise de células apresentadoras de antígenos, aumento no efeito ECL através de lise de células leucêmicas residuais e a melhora da sobrevida dos pacientes (Ruggeri et al., 1999; Ruggeri et al., 2002; Velardi et al., 2002).

A partir destas observações, um grande número de estudos demonstrou efeitos benéficos ou deletérios da incompatibilidade de ligantes KIR em vários tipos de TCTH (**Tabela 5**). A interpretação mais parcimoniosa destes dados conflitantes é que o efeito da

incompatibilidade KIR é muito dependente dos protocolos de transplante, sendo que possivelmente a depleção de células T seja a variável mais importante (Witt e Christiansen; 2006).

Tabela 5 - Resumo dos resultados dos estudos publicados sobre o papel da incompatibilidade KIR no TCTH.

Estudo	Pacientes	Tipo de TCTH	Resultado do grupo KIR compatível	Resultado do grupo KIR incompatível
Ruggeri et al., 2002	N=92, 57 casos de LMA e 35 casos de LLA	Haploidêmico com depleção de células T.	DECH de 13,7%*, rec. de LLA de 90%, rec. de LMA de 75%* e SLD de 5%*.	DECH de 0%*, rec. de LLA de 85% , rec. de LMA de 0%* e SLD de 60%*.
Leung et al., 2004	N=38, 17 casos de LMA e 19 de LLA	Haploidêmico com depleção de células T	Rec. (LMA e LLA) de 54%*	Rec. (LMA e LLA) de 13%*
Bishara et al., 2004	N=62, 15 casos de LMA, 24 casos de LLA, 13 casos de LMC	Haploidêmico com depleção de células T menos efetiva.	rec. de 50%, DECH de 45%* e SG de 19%*.	rec de 42% e DECH de 70%* e SG de 5%*.
Davies et al., 2002	N=175, 14 casos de LMA, 35 de LLA, 58 de LMC, 16 de outras leucemias, 9 SMD e 43 com outras doenças	Não aparentado com incompatibilidade de pelo menos 1 alelo de HLA-A, B, C ou DRB1.	DECH de 50%, rec. de 12% e SG de 40%.	DECH de 61%, rec. de 9% e SG de 32%.
Giebel et al., 2003	N=130, 22 casos de LMA, 38 de LLA, 23 de SMD, 42 de LMC e 5 de outras doenças	Não aparentado, uso de ATG, HLA idêntico ou com pequeno grau de incompatibilidade.	SLD de 39%*, rec. de 18% e DECH de 43%.	SLD de 87%*, rec. de 0% e DECH de 30%.
Bornhäuser et al., 2004	N=118, 59 casos de LMA, 14 de SMD e 45 de LMC	Não aparentado, uso de ATG, HLA idêntico ou com pequeno grau de incompatibilidade.	DECH de 69%, SG de 55% e rec. de 35%*.	DECH de 46%, SG de 45% e rec. de 60%*.
Beelen et al., 2005	N= 374, 138 casos de LMA e 236 de LMC	Não aparentado e aparentado, HLA idêntico ou com pequeno grau de incompatibilidade	Rec. no HLA-idêntico de 22% e no não idêntico de 18%; DECH no HLA-idêntico de 39%*, e no não idêntico de 58%; SLD no HLA-idêntico de 53% e no não idêntico de 50%.	Rec. de 5%*, DECH de 58% e SLD de 55%.
Hsu et al., 2005	N= 178, 45 casos de LLA, 57 de LMA, 61 de LMC e 15 de SMD	Aparentado, HLA idêntico, com depleção de células T.	Os autores não apresentaram os resultados deste grupo.	Grupo de LLA: SG de 0,73, SLD de 0,78 e rec. de 1,27. Grupo de LMC: SG de 1,59, SLD de 1,11 e rec de 0,65. Grupo de LMA e SMD: SG de 0,53*, SLD de 0,53* e rec. de 0,51* .

* marca diferenças estatisticamente significantes entre o grupo de KIR compatível e KIR incompatível; DECH – incidência de DECH; rec. – taxa de recaída; SG. – sobrevida global; SLD – sobrevida livre de doença.

Como no TCTH haploidêmico existe grande diferença de HLA entre doador e paciente, este tipo de transplante representa a melhor oportunidade para estudar o efeito da

incompatibilidade KIR. No entanto, além do grupo italiano cujos estudos já foram discutidos, até o momento foram realizados poucos estudos sobre este assunto (Ruggeri et al., 2002; Leung et al., 2004; Bishara et al., 2004).

Leung et al. (2004) estudou o papel da aloratividade NK em TCTH haploidêntico com depleção de células T em crianças com LMA (n=17) e LLA (n=19). Além do modelo ligante-ligante, foi estudado o modelo receptor-ligante através da detecção de expressão de KIR em superfície por citometria de fluxo e/ou detecção de transcritos KIR por biologia molecular. Foi demonstrado que o modelo receptor-ligante é mais preciso para detectar o grupo com maior risco de recaída. Neste modelo, o grupo com incompatibilidade KIR apresentou menor taxa de recaída (**Tabela 5**). Enquanto Ruggeri et al. (2002) observou melhoras nas taxas de recaídas apenas nos casos de LMA, Leung et al. (2004) obteve melhora na recaída tanto dos casos de LLA quanto de LMA. Isso pode estar relacionado ao fato que Leung et al. (2004) estudou crianças e Ruggeri et al. (2002) apenas adultos.

O outro estudo relativo ao papel das células NK alorreativas no TCTH haploidêntico apresentou resultados bem distintos (Bishara et al., 2004). Este grupo estudou 62 pacientes, sendo 15 casos de LMA, 24 casos de LLA e 13 casos de leucemia mielóide crônica (LMC). Foi utilizado apenas o modelo ligante-ligante e, ao invés de encontrar uma melhora no resultado do TCTH nos casos em que havia incompatibilidade KIR, houve uma considerável piora na sobrevida e maior incidência de DECH (**Tabela 5**). Os autores acreditam que este resultado negativo inesperado seja por diferenças no protocolo do TCTH, por exemplo o regime de condicionamento foi menos citoreduzidor e a depleção de células T menos eficaz em comparação com o estudo de Ruggeri et al. (2002). Além disso, os pacientes do estudo de Bishara et al. (2004) apresentavam doenças mais agressivas, já que somente pacientes com características associadas a mau prognóstico fizeram parte deste estudo.

O papel da incompatibilidade KIR também foi avaliado em estudos de TCTH HLA-compatível não aparentado. Como métodos acurados para detecção de HLA-C só foram desenvolvidos mais recentemente, muitos transplantes deste tipo podem contar com incompatibilidades do locus C que não podiam ser detectadas anteriormente. Portanto existe a possibilidade de ocorrer aloreatividade mediada por células NK neste tipo de transplante (Witt e Christiansen, 2005).

O primeiro estudo em TCTH não aparentado foi realizado por Davies et al. (2002) e apresentava pelo menos uma incompatibilidade de um alelo de HLA-A, -B, -C ou DRB1. O potencial aloreativo das células NK foi estudado através do modelo ligante-ligante em 175 pacientes, entre adultos e crianças: 58 casos eram de LMC, 35 de LLA, 14 de LMA, 9 de síndrome mielodisplásica (SMD), 16 pacientes com outras leucemias e 43 com outras doenças. Usando o modelo ligante-ligante, não foi encontrada nenhuma relação entre a incompatibilidade KIR e a incidência de DECH, chance de recaída ou probabilidade de sobrevida (**Tabela 5**). Neste estudo só houve depleção de células T em 35% dos casos, e mesmo assim com uma eficiência muito menor do que a relatada por Ruggeri et al. (2002). O esquema de recuperação na presença de células T pode ter encoberto o potencial aloreativo das células NK. Além disso, por causa da presença de linfócitos T, foi necessária uma forte imunossupressão que também pode ter influenciado o papel aloreativo das células NK (Davies et al., 2002).

Outro grupo de pesquisadores (Giebel et al., 2003) estudou o papel da aloreatividade das células NK utilizando o modelo ligante-ligante em TCTH alogeneico não aparentado. Entre os 130 pacientes estudados, foram incluídos TCTH HLA-idêntico ou com pequeno grau de incompatibilidade de HLA. Foi observado um efeito benéfico na sobrevida livre de doença no grupo com incompatibilidade KIR. Os autores consideraram que houve também uma menor incidência de DECH e menor chance de recaída neste grupo, embora estes resultados

não sejam estatisticamente significantes (**Tabela 5**). Foi sugerido que o uso de anti-timócito globulina (ATG) levou a uma depleção *in vivo* das células T, o que favoreceu o papel aloreativo das células NK no estudo de Giebel et al. (2003) em comparação ao estudo de Davies et al. (2002).

Bornhäuser et al. (2004) estudando o potencial aloreativo através do modelo ligante-ligante em 118 pacientes com vários tipos de doenças mielóides (LMA, SMD e LMC), submetidos ao TCTH alogeneico não aparentado com HLA compatível ou com pequeno grau de incompatibilidade, encontrou resultados conflitantes com o de Giebel et al. (2003), pois a resposta do TCTH foi pior no grupo de incompatibilidade KIR. Embora estes pacientes também fizessem uso de ATG na profilaxia da DECH, não houve vantagem no grupo de incompatibilidade KIR com relação à incidência de DECH ou sobrevida. Com relação às chances de recaída, houve desvantagem no grupo de incompatibilidade KIR (**Tabela 5**). As discrepâncias observadas podem ser justificadas por diferenças nas características dos pacientes entre os estudos de Giebel et al. (2002) e de Bornhäuser et al. (2004). O estudo de Bornhäuser et al. (2004) apresentou pacientes mais velhos, com maior incidência de DECH e com doenças em fases mais avançadas. Por causa destes três fatores, a aloreatividade das células NK pode ter ficado prejudicada.

Um outro grupo de pesquisadores (Beelen et al., 2005) estudou a aloreatividade de células NK através do modelo ligante-ligante em TCTH alogeneico utilizando um protocolo de transplante homogêneo para todos os pacientes (regime de condicionamento mieloablativo, sem depleção de células T e sem uso de ATG), mas incluía doadores aparentados e não aparentados com HLA-idêntico ou pequenos graus de incompatibilidade. Foram estudados 374 pacientes com doenças mielóides malignas: 138 casos de LMA (sendo alguns secundários a SMD) e 236 casos de LMC. Os pacientes foram divididos em 3 grupos: HLA-idêntico, pequeno grau de incompatibilidade de alelos de HLA irrelevante ao KIR (na **tabela 5** este

grupo é referido como HLA-não idêntico) e incompatibilidade KIR. No grupo com incompatibilidade KIR foram encontradas menores chances de recaída, porém não houve diferença com relação à incidência de DECH ou sobrevida livre de doença (**Tabela 5**).

No caso do TCTH aparentado, a maioria dos doadores é HLA idêntico aos pacientes. Neste contexto, a chance de disparidade KIR/HLA permanece, mas é muito reduzida em comparação ao transplante haploidêntico ou ao transplante não aparentado. Por isso, Cook et al. (2004) investigou se em TCTH aparentado HLA idêntico a presença de KIR ativadores no doador poderia afetar de forma significativa a resposta dos pacientes ao transplante. Estes autores observaram que pacientes com doenças mielóides que não tinham alelos de HLA-C pertencentes ao grupo 1 tinham uma pior sobrevida relacionada à infecção e recaída, mas não DECH. Além disso, este efeito só era observado se o doador carregasse em seu genoma o KIR ativador KIR2DS2, que se acredita que reconheça HLA-C do grupo 1. O mesmo efeito não era observado em doenças linfóides (Cook et al., 2004). Neste estudo, os modelos ligante-ligante ou receptor-ligante não foram acessados de forma direta, pois estes modelos levam em consideração apenas o papel de KIR inibidores, por isso a comparação deste estudo com os outros autores citados anteriormente fica prejudicada.

Outro grupo (Hsu et al., 2005) estudou o papel da aloreatividade de células NK no TCTH aparentado HLA idêntico com depleção de células T. Este estudo incluía 178 pacientes: 45 casos de LLA, 57 de LMA, 61 de LMC e 15 de SMD. A análise do genótipo KIR do doador com HLA do paciente demonstrou que 62,9% dos pacientes não tinham ligantes de HLA para os KIR inibitórios do doador. Em pacientes com LMA e SMD foi encontrada uma melhora significativa na sobrevida global, aumento da sobrevida livre de doença e menor incidência de recaída em pacientes com incompatibilidade KIR com o doador, analisada através do modelo receptor-ligante. Os KIR ativadores não tiveram nenhuma contribuição significativa na resposta destes pacientes. Não foi observado nenhum

efeito nos casos de LLA e LMC (**Tabela 5**). Esta melhora na sobrevida e diminuição de riscos de recaída nos casos de LMA e SMD, mas não de LLA, estão de acordo com os resultados encontrados no estudo em TCTH haploidêntico de Ruggeri et al. (2002). Os resultados encontrados por Hsu et al. (2005) diferem dos encontrados por Cook et al. (2004). Isso pode estar relacionado com o fato de Hsu et al (2005) ter realizado depleção de células T, o que não foi feito no estudo de Cook et al. (2004).

Apesar dos resultados conflitantes (**tabela 5**), os estudos sobre a incompatibilidade KIR nos diferentes tipos de TCTH levam à sugestão de que pode haver benefícios da aloreatividade das células NK de doador, porém estes benefícios são muito dependentes do protocolo utilizado no transplante. A questão mais importante parece ser a depleção de células T, o que pode estar relacionado à omissão ou diminuição do regime profilático da DECH neste tipo de transplante, o que facilita uma reconstituição imunológica rápida e permite os efeitos benéficos da aloreatividade de células NK (Ruggeri et al., 2002; Giebel et al., 2003; Leung et al., 2004; Bishara et al., 2004; Bornhäuser et al., 2004; Cook et al., 2004; Beelen et al., 2005; Hsu et al., 2005; Witt e Christiansen et al., 2006).

A maioria dos estudos sobre incompatibilidade KIR e TCTH é feita de forma retrospectiva, muitas vezes baseados apenas na genotipagem HLA sem incluir estudos funcionais ou avaliação direta dos receptores KIR presentes nos doadores. A análise direta dos receptores KIR é importante, pois os genes KIR e HLA estão em cromossomos diferentes e segregam de forma independente, ou seja, não se pode prever o genótipo KIR a partir do genótipo HLA. Uma avaliação mais precisa da frequência real das células NK aloreativas requer o estudo do repertório clonal ou uma combinação de análises fenotípicas e funcionais ao nível da população (Raulet et al., 2001; Leung et al., 2004; Witt e Christiansen et al., 2006). Um exemplo de análise precisa da frequência de clones células NK mostrou que

maiores percentuais de células NK aloreativas resultaram em maiores níveis de atividade citotóxica contra as células leucêmicas do paciente (Pende et al., 2005).

Apesar do grande número de estudos sobre o assunto, ainda não ficou estabelecido quais tipos de pacientes e quais leucemias teriam maiores benefícios do potencial aloreativo das células NK. Portanto, há necessidade de novos estudos, em populações maiores e mais homogêneas, incluindo ensaios funcionais, identificação dos subtipos de leucemias mais susceptíveis à atividade NK e avaliação direta do repertório KIR, para verificar o papel das células NK e seus receptores KIR no TCTH (Raulet et al., 2001; Leung et al., 2004; Witt e Christiansen et al., 2006).

3.5. Atividade antileucêmica das células *natural killer*

3.5.1. Susceptibilidade e resistência dos diferentes tipos de leucemia

Desde as décadas de 70 e 80 tem sido estudado o potencial antileucêmico das células NK. Inicialmente foram realizados estudos contra linhagens leucêmicas estabelecidas, como a K562, obtida a partir de eritroleucemia humana. Mais tarde foi relatado que células leucêmicas primárias obtidas de pacientes podiam ser lisadas por células NK alogeneicas. Nesta época foi demonstrado que a adição de IFN ou IL-2 aumentou o potencial antileucêmico, inclusive fazendo com que as células NK passassem a matar algumas células leucêmicas primárias resistentes à atividade citotóxica de células NK não ativadas. Foi observado que as células NK alogeneicas poderiam matar tanto leucemias agudas linfóides quanto mielóides (Oshimi et al., 1983; Pattengale et al., 1983). Também foi demonstrado que células NK autólogas ativadas puderam matar células primárias de LMA e LLA (Torelli et al., 2002; Torelli et al., 2005).

Existem evidências de que nem todos os tipos de leucemias são igualmente susceptíveis à atividade NK. Yan et al. (1998) estudou a susceptibilidade de diferentes tipos de leucemias utilizando uma linhagem de células NK (NK-92). Esta linhagem é dependente de IL-2 e apresenta características de uma célula NK ativada. A NK-92 tem ausência de expressão de todos os KIR inibitórios e alta expressão de receptores ativadores, como NKG2D, NKp46, NKp30 e NKp44, possuindo, portanto, maior potencial citotóxico em comparação com as células NK obtidas a partir de doadores saudáveis. Por isso, a linhagem NK92 é utilizada em vários estudos de susceptibilidade/resistência à atividade NK (Yan et al., 1998; Romanski et al., 2005).

No estudo de Yan et al. (1998), a sensibilidade de células leucêmicas primárias à citotoxicidade da NK-92 foi categorizada em três tipos: insensível, sensível e altamente sensível. Foi verificado que em 46 amostras de pacientes, 24 (52,2%) foram sensíveis ou

altamente sensíveis à atividade citotóxica. A susceptibilidade à atividade NK variou com o tipo de leucemia aguda: 50% (6 em 12) das LMA, 100% (7 em 7) das LLA T e 35,7% (5 em 14) das LLA B foram sensíveis ou altamente sensíveis (Yan et al., 1998).

Outro estudo que mostrou sensibilidade distinta entre LMA e LLA foi realizado por Ruggeri et al. (1999) em TCTH haploidêntico. No grupo com incompatibilidade KIR entre o doador e o paciente, clones de células NK de origem do doador eram preparados *in vitro*. Estes clones eram selecionados especificamente por aloreatividade contra epítomos de HLA específicos. Foram realizados ensaios de citotoxicidade utilizando estes clones contra células leucêmicas dos respectivos pacientes em 4 casos de LMA e 5 de LLA. Todas as amostras de LMA foram sensíveis a este ensaio de atividade NK enquanto apenas duas amostras de LLA foram sensíveis. Análises de imunofluorescência mostraram que todos os casos de LLA resistentes à atividade NK exibiram baixa expressão de superfície de LFA-1 quando comparadas com as amostras de LLA e LMA susceptíveis. Conforme citado anteriormente, LFA-1 é uma molécula de adesão essencial para a formação de conjugados entre a célula efetora e a célula alvo e para ativação das células NK.

Outro estudo realizado por este grupo (Ruggeri et al., 2002) demonstrou que a incompatibilidade KIR em pacientes com LMA submetidos ao TCTH haploidêntico levava a uma melhora na sobrevida e diminuição no risco de recaída. No entanto, a incompatibilidade KIR não causou nenhum impacto em LLA, sugerindo que as células de LLA exibissem mecanismos de resistência à atividade NK, além do envolvimento do KIR (Ruggeri et al., 2002).

Estes estudos mostraram que muitas vezes as LLA apresentam um alto grau de resistência à atividade citotóxica das células NK, mas os mecanismos envolvidos ainda não estão bem compreendidos. Romanski et al. (2005) estudou a atividade citotóxica da linhagem NK-92 contra 12 linhagens estabelecidas de LLA e 16 amostras primárias obtidas a partir de

pacientes com LLA com objetivo de verificar quais mecanismos de resistência estariam envolvidos. Quase todas as células de LLA linhagem B se mostraram resistentes à atividade citotóxica enquanto os casos de LLA-T apresentaram susceptibilidade moderada. Para todos os tipos de LLA estudados, as células leucêmicas primárias foram mais resistentes comparadas às linhagens. Este estudo demonstrou que as moléculas de adesão, como LFA-1, contribuem apenas parcialmente para a susceptibilidade das células alvo. Neste estudo também foi observado que fatores solúveis derivados de blastos de LLA resistentes não são capazes de diminuir o potencial lítico contra células sensíveis. Foi analisado o papel do receptor ativador NKG2D que, conforme citado anteriormente, reconhece MICA, MICB e ULBP. Ao analisar a expressão de MICA e MICB em linhagens de LLA, estes autores observaram que a expressão destas moléculas só ocorria nas linhagens susceptíveis à atividade NK (Romanski et al., 2005).

Outros autores estudaram a expressão de ligantes de receptores ativadores de células NK em leucemia. Salih et al. (2003) mostrou que há expressão heterogênea de ligantes de NKG2D (MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 e ULBP3) em leucemia. Foram estudados 25 pacientes, sendo 15 casos de LMA, 2 de LLA e 7 de outras leucemias. A expressão de ligantes de NKG2D ocorreu em 56% dos pacientes e não parecia se correlacionar com entidades específicas de leucemia. Utilizando uma linhagem de células NK (NKL), que expressa altos níveis de NKG2D e baixos de receptores ativadores da família NCR (NKp30, NKp44 e NKp46), foi realizada atividade citotóxica contra as células leucêmicas primárias e foi demonstrado que a expressão de NKG2D está correlacionada com a susceptibilidade à atividade NK.

Outro estudo demonstrou que uma baixa expressão de ligantes para os receptores ativadores NKG2D e da família NCR (NKp30, NKp44 e NKp46) está relacionada à resistência à atividade antileucêmica das células NK de células primárias de LMA. Foi

também observado que a indução do aumento da expressão destes ligantes nas células leucêmicas aumentou a sua susceptibilidade à atividade NK (Nowbakht et al., 2005).

A expressão de HLA-I na superfície de células leucêmicas também pode ter um papel importante na susceptibilidade da leucemia à atividade NK. Pende et al. (2005) estudou a expressão de HLA na superfície de células primárias de pacientes com LMA através de um anticorpo monoclonal que reconhece todas as moléculas de HLA-I. Dos 24 casos de LMA estudados, 16 tiveram uma clara diminuição na expressão de HLA-I e o restante manteve a expressão de HLA-I normal ou aumentada. Houve, portanto, grande variabilidade na expressão entre as diferentes leucemias estudadas, mas não foi possível fazer uma correlação entre a expressão de HLA e a classificação FAB. Foi demonstrado que a susceptibilidade das diferentes amostras de LMA à atividade NK foi mais facilmente detectada nas leucemias que tinham baixa expressão de HLA-I. Estes autores também estudaram a expressão de HLA-I em 14 casos de LLA. Apenas 3 casos de LLA tinham expressão de HLA-I diminuída enquanto 7 tinham expressão de HLA-I aumentada e os outros 4 casos tinham expressão normal de HLA-I. Este aumento da expressão de HLA-I em LLA pode estar relacionado com a maior resistência desta leucemia à atividade NK observada neste estudo (Pende et al., 2005).

A capacidade das células NK de matar células leucêmicas *in vitro* e os estudos recentes de seu papel no TCTH sugerem que estas células têm um papel central no controle e eliminação das leucemias. Diferentes mecanismos são utilizados por células leucêmicas para escapar à imunovigilância das células NK. Ainda não existe um consenso de quais subtipos de LLA e LMA são mais susceptíveis à atividade NK e quais mecanismos de resistência estão associados a cada subtipo de leucemia. A aquisição deste conhecimento é de extrema importância para desenvolvimento de novas modalidades imunoterapêuticas para tratar leucemias agudas (Yan et al., 1998; Ruggeri et al., 1999; Ruggeri et al., 2002; Pende et al., 2005; Romanski et al., 2005).

3.5.2. Imunoterapia de células NK

O estudo da atividade antileucêmica das células NK e seus receptores está fazendo com que cada vez mais seja percebida a importância destas células para a imunovigilância anti-tumoral e imunoterapia. Muitas pesquisas focaram em meios de manipular as funções das células NK para funções terapêuticas. Na década de 80, foi demonstrado que células NK ativadas administradas em modelos animais poderiam resultar em resistência à metástase e regressão de tumores estabelecidos. Porém, durante muitos anos, a dificuldade de gerar um número suficiente de células *in vitro* mantendo a sua capacidade anti-tumoral *in vivo* foi um dos maiores obstáculos para a aplicação clínica da imunoterapia adotiva de células NK. Entretanto, com os avanços da última década dos conhecimentos de como as células NK reconhecem as células alvo e metodologias mais avançadas de purificação destas células, surgiram possibilidades de novos avanços na imunoterapia adotiva de células NK para o tratamento de leucemias e outros tipos de tumor (Robertson e Ritz, 1990; Yan et al., 1998; Heberman et al., 2002; Farag et al., 2002).

O estudo do papel das células NK no TCTH levou à sugestão de que a aloreatividade de células NK poderia ter um impacto no desenvolvimento de novos procedimentos clínicos. As células NK aloreativas poderiam ser infundidas para prevenir recaídas, favorecer a pega do enxerto e modular o DECH no TCTH. As células NK aloreativas, de origem do mesmo doador do transplante ou de um doador diferente, poderiam ser infundidas antes do TCTH como parte de um regime de condicionamento de intensidade reduzida ou a infusão destas células poderia ocorrer depois do transplante, numa tentativa de tratar recaídas, semelhante à imunoterapia de infusão de linfócitos do doador (Velardi et al., 2002).

Alguns grupos têm investigado a preparação e infusão de células NK de doador purificada e depletada de células T com o objetivo de consolidar a pega e induzir ECL nos pacientes após TCTH haploidêntico ou com outros tipos de doador. Ainda não há dados

clínicos ou experimentais para ajudar a definir uma dose de células NK adequada (Passweg et al., 2006).

Embora atualmente não exista nenhuma técnica disponível para mobilizar as células NK para o sangue periférico, uma metodologia que pode ser utilizada para imunoterapia de células NK consiste em fazer uma leucaférese e posteriormente separar as células NK. Uma forma de purificar células NK em larga escala é através do método imunomagnético de duas etapas, em que a primeira consiste de depleção de CD3⁺ e a segunda de enriquecimento de CD56⁺. Este método obtém pureza de 90% de células NK com depleção eficiente de células T. A citotoxicidade natural das células NK purificadas aumenta aproximadamente em cinco vezes em comparação com as células mononucleares. Pode ser feita uma expansão *ex-vivo* com objetivo de ativar as células CD56⁺ recém selecionadas (aumentando o potencial citotóxico destas células) e aumentar o número total de células NK. A seleção, enriquecimento, ativação e expansão de células NK purificadas para aplicação clínica são possíveis atualmente, porém o procedimento laboratorial é longo, caro e precisa de pessoal especializado (Passweg et al., 2006).

Um grupo de pesquisadores explorou o uso de infusão de células NK aloreativas de doadores haploidênticos, sem realizar TCTH, como tratamento anti-tumoral após regime de condicionamento em 43 pacientes (10 com melanoma metastásico, 13 com carcinoma renal metastásico, 1 com doença de Hodgkin refratária e 19 pacientes com LMA de mau prognóstico). A dose de células NK infundida foi de $8,5 \times 10^6$ células/Kg, com forte depleção de células T e contaminação por células B e monócitos. Após a infusão, os pacientes receberam doses diárias de IL-2. Neste estudo foi demonstrado que as células NK infundidas podiam ser expandidas *in vivo* após um regime de condicionamento de alta dose, mas não em regime de condicionamento de baixa dose. O procedimento foi realizado de forma segura e bem tolerado, sem sinais de toxicidade. Apesar da resposta tumoral não ser o objetivo

principal deste estudo, 5 dos 19 pacientes de LMA com mau prognóstico atingiram remissão completa com esta terapia, principalmente quando havia incompatibilidade KIR (Miller et al., 2005).

São necessários novos estudos antes da imunoterapia de células NK atingir a prática clínica. Ainda existem várias questões em aberto, como a dose de células NK, o momento da infusão e seleção apropriada de doadores e pacientes para este procedimento. O potencial desta terapia é muito grande devido ao efeito antileucêmico comprovado das células NK e o fato de aparentemente elas não desenvolverem DECH. Ainda não está claro quais pacientes e que tipos de leucemia seriam mais beneficiados por este tratamento. Por isso, é de extrema importância definir melhor quais tipos de leucemias são mais susceptíveis à atividade NK e o papel dos receptores das células NK, como os KIR, na atividade antileucêmica destas células (Yan et al., 1998; Ruggeri et al., 2002; Farag et al., 2002; Miller et al., 2005; Romanski et al., 2005; Pende et al., 2005; Passweg et al., 2006).

4. METODOLOGIA

4.1. Doadores saudáveis

Foram estudados indivíduos saudáveis para definir o perfil imunofenotípico, a atividade citotóxica das células NK e o genótipo KIR de uma amostra da população brasileira. Todas as amostras de doadores saudáveis foram obtidas com a aplicação de termo de consentimento livre e informado (modelos no ANEXO A e B). A imunofenotipagem por citometria de fluxo foi realizada em amostras de 52 indivíduos, sendo 23 do gênero feminino e 29 do masculino, com idades variando de 3 a 66 anos. Cinco indivíduos deste grupo, ao assinar o termo de consentimento livre e informado, não preencheram a idade e não foi possível contatá-los para coletar esta informação.

Um grupo de 29 doadores foi estudado para definir os padrões de atividade citotóxica utilizando como célula alvo a linhagem de células K562. Este grupo consistiu de 15 indivíduos do gênero feminino e 14 do masculino, com idades variando de 12 a 59 anos. Deste grupo, 3 indivíduos não preencheram a idade no termo de consentimento livre e informado e não foi possível contatá-los para coletar esta informação.

Além da atividade citotóxica contra a K562, foi estudada a atividade das células NK contra as células leucêmicas primárias obtidas a partir de amostras de pacientes. Neste grupo, 14 doadores saudáveis foram estudados, sendo 7 do gênero feminino e 7 do masculino, com idades variando entre 21 e 56 anos. Foi realizada a genotipagem dos receptores KIR e HLA de 11 destes doadores com objetivo de correlacionar o efeito deste receptor e seus ligantes (HLA) no papel antileucêmico das células NK. Estes doadores eram selecionados no banco de sangue de forma aleatória ou, nos casos de TCTH aparentado HLA idêntico, era utilizada uma amostra do mesmo doador do transplante (CEMO). No caso de TCTH não aparentado, houve uma maior dificuldade de ter acesso à amostra de sangue do doador do transplante, pois na

maioria das vezes o cadastro e a coleta de amostras do doador eram realizados em instituições de outros estados do Brasil, ou até mesmo de outro país.

4.2. Pacientes

Foram estudadas 16 amostras de 15 pacientes de diferentes instituições públicas do Rio de Janeiro, como: Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) do Instituto Nacional de Câncer (INCA), Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) e Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG). Este estudo foi aprovado no comitê de ética em pesquisa de todas as instituições envolvidas. Foi realizado o estudo de atividade citotóxica de células NK de doadores saudáveis contra as células primárias de pacientes. As células leucêmicas dos pacientes foram obtidas a partir de amostras de medula óssea ou sangue periférico, coletadas ao diagnóstico ou no momento da recidiva da doença, com o devido termo de consentimento livre e informado (modelos no ANEXO C, D, E).

As amostras dos pacientes foram analisadas por citometria de fluxo para obtenção de um diagnóstico mais preciso e verificação do percentual de blastos. Como critério de inclusão no estudo, as amostras de pacientes deveriam apresentar mais de 60% de blastos. Foi utilizada como controle a linhagem K562, que é conhecida pela sua susceptibilidade às células NK. Foi realizada a genotipagem de HLA dos pacientes estudados, com exceção de 3 pacientes (775/05, 566/05 e 883/06), pois não foi possível coletar amostras desses indivíduos devido a óbito ou mudança de residência para outro estado.

Os pacientes estudados apresentavam os seguintes tipos de leucemia: 8 casos de LLA, 6 casos de LMA e 1 caso de LBA. As idades variaram de 1 a 79 anos, sendo que 11 eram crianças, 2 adultos e 2 idosos. Cinco pacientes eram do gênero feminino e 10 do gênero masculino.

Doze pacientes foram tratados com quimioterapia e as suas principais características estão representadas na **tabela 6**. Oito pacientes apresentavam LLA, sendo 5 casos de B-precoce, 2 pré-B e 1 LLA-T. Quatro pacientes apresentavam LMA, sendo 3 casos secundários à SMD (um caso de M1, um de M2 e um de M4) e um paciente com LMA-M4. Foram coletadas amostras destes pacientes para realização dos ensaios de susceptibilidade à atividade NK antes do início do tratamento da doença. O protocolo de quimioterapia BFM foi utilizado como tratamento da leucemia em 10 pacientes, sendo 8 casos de LLA (idades de 1 a 17 anos) e 2 casos com LMA (1 e 2 anos de idade). Dois pacientes, por serem idosos (71 e 79 anos) e apresentarem LMA secundária à SMD, foram tratados apenas com quimioterapia paliativa (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Principais características dos pacientes estudados que foram tratados com quimioterapia

Paciente	Sexo	idade	raça	doença	Tratamento
248/05	F	6	Branco	LLA-B precoce	Protocolo BFM de quimioterapia
566/05	M	14	Negro	LLA-B precoce	Protocolo BFM de quimioterapia
915/06	F	5	Pardo	LLA-B precoce	Protocolo BFM de quimioterapia
916/06	M	1	Pardo	LLA-B precoce	Protocolo BFM de quimioterapia
1170/06	M	11	Negro	LLA-B precoce	Protocolo BFM de quimioterapia
939/06	F	1	Pardo	LLA pré-B	Protocolo BFM de quimioterapia
388/06	F	4	Pardo	LLA pré-B	Protocolo BFM de quimioterapia
280/05	M	17	Pardo	LLA-T	Protocolo BFM de quimioterapia
775/05	M	1	Branco	LMA-M4	Protocolo BFM de quimioterapia
131/06	F	2	Branco	LMA-M1 secundária à SMD/síndrome de Down	Protocolo BFM de quimioterapia
784/06	M	79	Branco	LMA-M2 secundária à SMD	Quimioterapia paliativa
883/06	M	71	Branco	LMA-M4 secundária à SMD	Quimioterapia paliativa

Três pacientes foram submetidos ao TCTH e as principais características destes pacientes estão representadas na **tabela 7**. Dois destes transplantes foram com doador

aparentado HLA-idêntico e um com doador não relacionado HLA idêntico. Os regimes de condicionamento foram diferentes entre os três pacientes estudados, de acordo com as características clínicas dos pacientes.

O primeiro paciente foi transplantado em remissão parcial e apresentava LBA. Após o transplante, desenvolveu DECH, que foi resolvida no dia 113 (D+113). Ele sofreu recaída de BAL no D+189. Este paciente foi estudado em dois momentos, no pré TCTH (501/05) e na recaída da doença no pós TCTH (269/06). O segundo caso submetido ao TCTH apresentava LMA-M1 secundária à SMD refratária (867/06). A amostra estudada deste paciente foi coletada antes do início do regime de condicionamento. O terceiro caso apresentava LMA-M2 (1035/06) e foi transplantado em segunda remissão completa em 2001. Teve a primeira recaída pós-transplante em 2003, quando recebeu DLI e quimioterapia e entrou novamente em remissão completa. Este paciente foi estudado no momento da segunda recaída tardia, 5 anos após o TCTH. Posteriormente ao estudo o paciente foi submetido à quimioterapia e à ILD (Tabela 7).

Tabela 7 – Principais características dos pacientes estudados que foram submetidos ao TCTH.

Paciente	Gênero / idade	Raça	doença	Estado pré TCTH	Tipo de TCTH	Regime de condicionamento
501/05 e 269/06*	M / 45	Branco	LBA	1º remissão parcial	Aparentado HLA idêntico	Ciclofosfamida e irradiação corpórea total
867/06	M / 13	Branco	LMA-M1 secundária à SMD	Doença refratária	Doador não aparentado HLA idêntico	Busulfan, ciclofosfamida e globulina anti-timócito
1035/06	M / 42	Pardo	LMA-M2	2º remissão completa	Aparentado HLA idêntico	Busulfan e ciclofosfamida

* Este paciente recebeu dois números, pois foram estudadas duas amostras: a primeira em remissão parcial pré-TCTH (501/05) e a segunda no momento da recaída pós TCTH (269/06).

4.3. Imunofenotipagem por citometria de fluxo

As amostras de sangue periférico ou medula óssea foram diluídas em solução salina fosfatada tamponada/soro albumina bovina (PBS/BSA) para uma concentração de 1×10^6 células/ml e incubadas com anticorpos monoclonais por 15 minutos no escuro a 4°C. Para os doadores saudáveis foram utilizados os seguintes anticorpos: CD16 conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD56 conjugado à ficoeritrina (PE) e CD3 conjugado à proteína clorofil de peridina (PercP) (Beckton & Dickson - BD). Foram avaliados os valores percentuais e absolutos das seguintes populações: linfócitos T, através da expressão do anticorpo monoclonal CD3; linfócitos TNK, através da expressão simultânea de CD3 e CD56; células NK através da expressão de CD56 na ausência de CD3; e, por último, subpopulações de células NK, através da intensidade de expressão de CD56 e CD16.

No caso dos pacientes, o painel variou de acordo com a história clínica, mielograma e outros exames laboratoriais. Nos casos de recaída, o painel era montado de acordo com imunofenotipagem realizada previamente. Os principais anticorpos utilizados nos pacientes foram: CD10, CD19, CD22, Ig, CD20, CD79a, para a linhagem B; HLA-DR, CD34, CD38, TdT, CD117, marcadores de células mais imaturas; CD2, CD3, CD5, CD7, CD4, CD8, marcadores da linhagem T; e CD13, CD33, CD14, CD15, CD45, MPO, marcadores mielóides. Estes anticorpos eram conjugados a FITC, PE ou PercP e foram obtidos da BD, Beckman Coulter ou Dako.

Após a incubação com anticorpos monoclonais, as amostras foram hemolisadas com solução comercial (FACS lising – BD), incubadas à temperatura ambiente e no escuro, por 10 minutos. Em seguida foram centrifugadas (5 minutos, 500g) e o sobrenadante desprezado. As amostras foram ressuspensas em PBS/BSA e submetidas à nova centrifugação (5 minutos, 500g) e adição de solução salina fosfatada tamponada / formaldeído (PBS/FORMOL) a 1%.

As amostras fixadas foram lidas num citômetro de fluxo, modelo FACSCAN (BD), sendo adquiridos 50.000 eventos na população de linfócitos nas amostras de doadores e 20.000 eventos totais nas amostras de pacientes. As aquisições foram realizadas no programa CellQuest (BD) e as análises de doador no programa PaintAGate (BD) e de pacientes no CellQuest (BD).

4.4. Atividade citotóxica

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada através do método de liberação de cromato de sódio radioativo (^{51}Cr). A partir de uma amostra de sangue periférico do doador, as células efetoras foram separadas num gradiente de densidade (Histopaque- 1077, Sigma), lavadas com salina livre de cálcio e magnésio e ressuspensas em meio de cultura (RPMI, Gibco) na concentração de 5×10^6 células/ml.

Foram utilizadas como alvos a linhagem K562 e células leucêmicas primárias. A linhagem K562 (eritroleucemia humana) foi mantida por repiques semanais em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco), antibióticos e L-glutamina. Na véspera do experimento, o volume do meio de cultura era dobrado para que as células estivessem proliferando no dia do ensaio. As células leucêmicas primárias foram obtidas a partir de amostras de sangue periférico ou medula óssea de pacientes com leucemia e separadas em gradiente de densidade (Histopaque- 1077, Sigma).

As células alvo foram incubadas por 2 horas a 37°C na presença de $100\mu\text{Ci}$ de ^{51}Cr (cromato de sódio radioativo), oriundo da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), em um volume final de $200\mu\text{l}$ ($100\mu\text{l}$ de SFB + $100\mu\text{l}$ de ^{51}Cr). Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com solução de 50% de salina e 50% de RPMI suplementado com 10% de SFB, uma vez com meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB e em seguida ressuspensas em uma concentração de 5×10^4 células/ml.

Proporções diferentes de células efetoras/células alvo (100/1, 50/1 e 25/1) foram incubadas em microplacas de 96 poços com fundo em V num volume final de 200µl por 4h numa estufa à 37°C e com 5% de CO₂. Após o período de incubação, foram coletados 100µl do sobrenadante e a leitura da radioatividade foi medida num contador gama (LKB-Wallac CliniGama 1272 do fabricante Wallac Oy). A quantidade de ⁵¹Cr detectada foi proporcional à lise celular das células alvo e foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de lise} = \frac{\text{cpm}^* \text{ experimental} - \text{cpm espontânea}}{\text{cpm máxima} - \text{com espontânea}} \times 100$$

*cpm- contagem por minuto

4.5. Genotipagem KIR e antígeno leucocitário humano (HLA)

Para verificação do genótipo dos receptores KIR de células NK e do genótipo HLA foi realizada a extração de DNA pelo protocolo “Salting-out” a partir de amostras de sangue periférico coletadas com anticoagulante EDTA. Em um tubo cônico de 50 ml foram adicionadas as amostras de sangue e tampão TE (trisHCl + EDTA) até completar um volume de 40 ml. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 7min a 480g e o sobrenadante descartado. Em seguida foram adicionados 3ml de tampão de lise, 400µl do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) e 130µl de proteinase K (≈1,2mg). As amostras foram incubadas em banho-maria a 56°C até o dia seguinte. O sobrenadante foi transferido para outro tubo cônico de 50ml contendo álcool 100%. Como resultado da reação, ocorre a precipitação do DNA, que foi retirado com uma pipeta e transferido para um frasco pequeno (eppendorf) contendo 1ml de álcool a 70% e em seguida centrifugada por 3 min a 14.000 rpm. Após este procedimento o sobrenadante foi desprezado. As amostras foram incubadas no banho seco a 65°C por 10 minutos. Por fim, as amostras foram ressuspensas em água purificada pelo sistema milli-Q (modelo Biocel do fabricante Millipore).

A identificação do gene KIR foi realizada por PCR-SSO (reação de polimerase em cadeia com oligonucleotídeo de seqüência específica), utilizando kit comercial (KIR SSO genotyping test – One Lambda) e aquisição em um citômetro de fluxo adaptado para esta tecnologia (Luminex - One Lambda). A identificação dos alelos de HLA-I (A, B e C) foi realizada por hibridização reversa PCR-SSO, utilizando kit comercial (INNO-Lipa test - Innogenetics).

A amostra de DNA a ser amplificada por PCR foi introduzida numa mistura de reagentes contendo nucleotídeos (dNTP), iniciadores “Sense e Anti-sense” e enzima DNA polimerase (Taq) termoestável. Por aquecimento, as duas cadeias da dupla hélice de DNA foram separadas (desnaturação), expondo a seqüência alvo aos primers (emparelhamento). Estes são complementares às regiões da seqüência alvo a ser amplificada. À temperatura determinada, a enzima (Taq) utiliza os nucleotídeos para estender de acordo com a fita alvo (extensão). Assim, a cada processo de desnaturação e extensão foram produzidas duas cópias da seqüência molde, numa progressão exponencial.

Para a leitura do KIR no Luminex foram utilizadas sondas oligonucleotídicas (SSO) específicas para seqüências ligadas à micro-esferas codificadas por fluorescência para identificação de alelos codificados pelo DNA da amostra. O produto de PCR foi biotilado, o que permitiu a detecção utilizando streptavidina conjugada de R-ficoeritrina (SAPE). O produto de PCR foi desnaturado e deixado re-hibridizar nas sondas complementares de DNA conjugado com as micro-esferas codificadas por fluorescência. Um citômetro de fluxo adaptado para esta técnica (LABScan 100 – One Lambda), identificou a intensidade fluorescência da PE (ficoeritrina) em cada micro-esfera. A atribuição da tipagem KIR baseou-se no padrão de reação comparado com os padrões associados às seqüências de genes KIR publicados.

Foi analisado nos pares de doador-paciente se havia presença ou ausência dos ligantes de HLA no paciente para os KIR inibidores e ativadores do doador cujos ligantes são conhecidos. Os alelos de HLA foram identificados por genotipagem de média resolução e foram segregados, quando apropriado, em epítomos de HLA-C do grupo 1 (Cw*01, 03, 07, 08, 1202/03/06/08, 1402/03/05, 1507, 1601/04), HLA-C do grupo 2 (Cw*02, 0307/15, 04, 05, 06, 0707/09, 1204/05, 1404, 15, 1602, 17, 18) ou HLA-Bw4 (B*08, 13, 27, 44, 51, 52, 53, 57 e 58). A presença de ligante KIR é definida como a presença de epítomos de HLA no paciente para os KIR identificados no doador. A ausência de ligantes KIR é definida pela ausência de um ou mais epítomos de HLA no paciente para os KIR identificados no doador. Dessa forma, se um doador possui KIR3DL1 e o paciente não possui alelos de Bw4, será considerado que este paciente não tem ligantes para KIR3DL1. Se o doador não possui KIR2DL3, não é considerado que o paciente tenha ausência de ligante para KIR2DL3, independente do genótipo HLA do paciente. Análises similares foram feitas com relação aos grupos 1 e 2 de HLA-C, inclusive com os receptores ativadores que reconhecem estes tipos de HLA-C. Embora seja conhecido que o KIR3DL2 se liga aos alelos de HLA A3 e A11, acredita-se que ele se ligue a outros alelos de HLA ainda não identificados. Por isso, se o paciente não apresentasse A3 ou A11 e o doador possuir o KIR3DL2, não é considerado como ausência de ligante para KIR3DL2.

4.6. Análise estatística

Os dados obtidos no presente estudo foram analisados utilizando-se tabelas, gráficos, estatística descritiva, aplicação de testes estatísticos paramétricos e não paramétricos. As análises estatísticas foram realizadas através dos seguintes softwares: Microsoft Excel, Assistat e SPSS.

Foram utilizados gráficos de *boxplot* para representar os valores dos parâmetros analisados na população de indivíduos normais. As linhas horizontais deste tipo de gráfico representam de baixo para cima as seguintes medidas estatísticas: mínimo, primeiro quartil, mediana, segundo quartil e máximo. Foram também utilizados gráficos de dispersão e de barras.

Para verificar se determinado grupo de dados se comportava dentro de uma curva normal foi utilizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. O teste paramétrico do coeficiente de Pearson foi utilizado para avaliar a correlação linear. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi realizado para comparar duas variáveis independentes. Para todos os testes estatísticos aplicados, os valores eram considerados significantes se apresentassem um $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Perfil dos indivíduos saudáveis

5.1.1. Perfil imunofenotípico

Resultados preliminares do perfil imunofenotípico foram apresentados no encontro da Sociedade Brasileira de Imunologia (anexo F). Os 52 doadores estudados (23 do gênero feminino e 29 do masculino) apresentavam idades variando de 3 a 66 anos (**figura 4**) e que, de acordo com o teste de normalidade de Kolmogorovi-Smirnov, representaram uma distribuição normal. As faixas etárias mais frequentes foram de 20 a 30 anos de idade (12 indivíduos), seguidas por 30 a 40 anos (8 indivíduos), 40 a 50 anos (8 indivíduos) e 10 a 20 anos (7 indivíduos). Havia apenas 4 indivíduos com menos de 10 anos e 1 com mais de 60 anos.

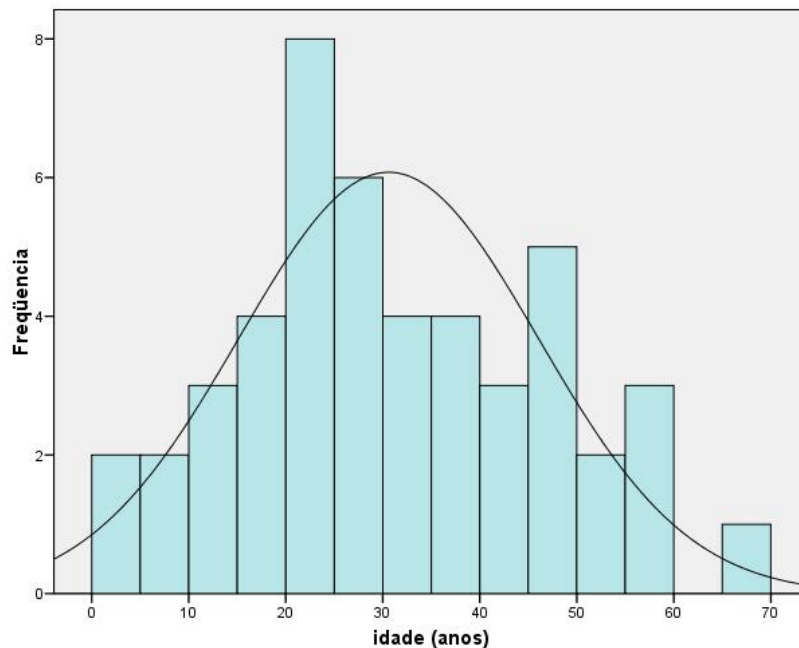


Figura 4 – Histograma de idade dos doadores saudáveis estudados para o perfil imunofenotípico

As análises das subpopulações linfocitárias - células T ($CD3^+$), células TNK ($CD3^+CD56^+$), células NK ($CD3^-CD56^+$) e as subpopulações de células NK ($CD56^{dim}$ e $CD56^{bright}$) - foram realizadas conforme exemplo da **figura 5**. As medianas encontradas para os valores absolutos das populações avaliadas foram: linfócitos T de 1205 células/ mm^3 (674 a

2491 células/mm³), linfócitos TNK de 66,5 células/mm³ (16 a 165 células/mm³), células NK de 123 células/mm³ (37 a 349 células/mm³), da subpopulação NK CD56^{dim} de 113 células/mm³ (26 a 340 células/mm³) e da subpopulação NK CD56^{bright} de 6 células/mm³ (2 a 13 células/mm³), conforme observado na **figura 6**. Com relação aos valores percentuais, as medianas encontradas foram: linfócitos T de 72,48% (58,32 a 83,68%), linfócitos TNK de 3,73% (0,55 a 8,45%), células NK de 8,38% (2,57% a 16,85%), da subpopulação NK CD56^{dim} de 95,59% (89,29 a 99,25%) e da subpopulação NK CD56^{bright} de 4,41% (0,75 a 10,71%), conforme observado na **figura 7**.

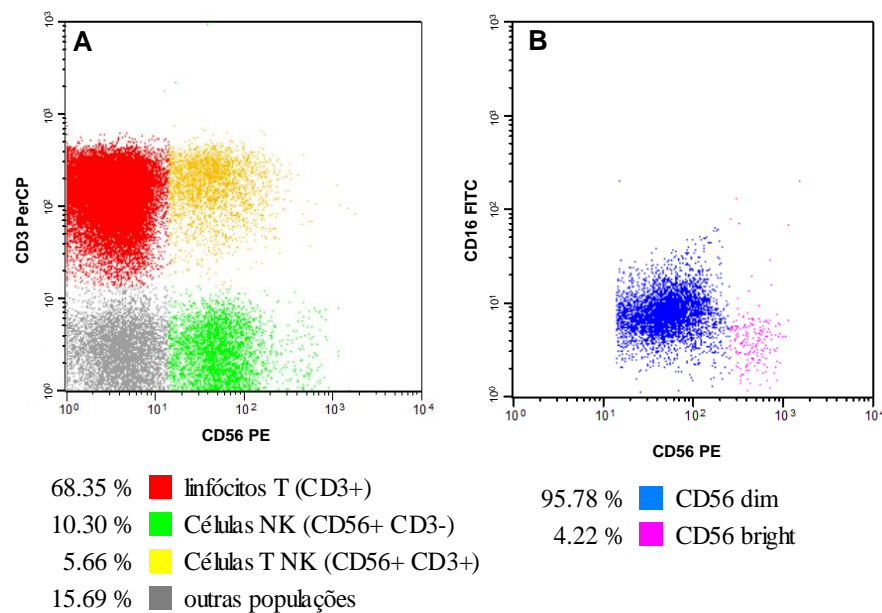


Figura 5 – Exemplo de análise de imunofenótipo de indivíduos saudáveis. As subpopulações linfocitárias são identificadas em **A** e as subpopulações de células NK são identificadas em **B**.

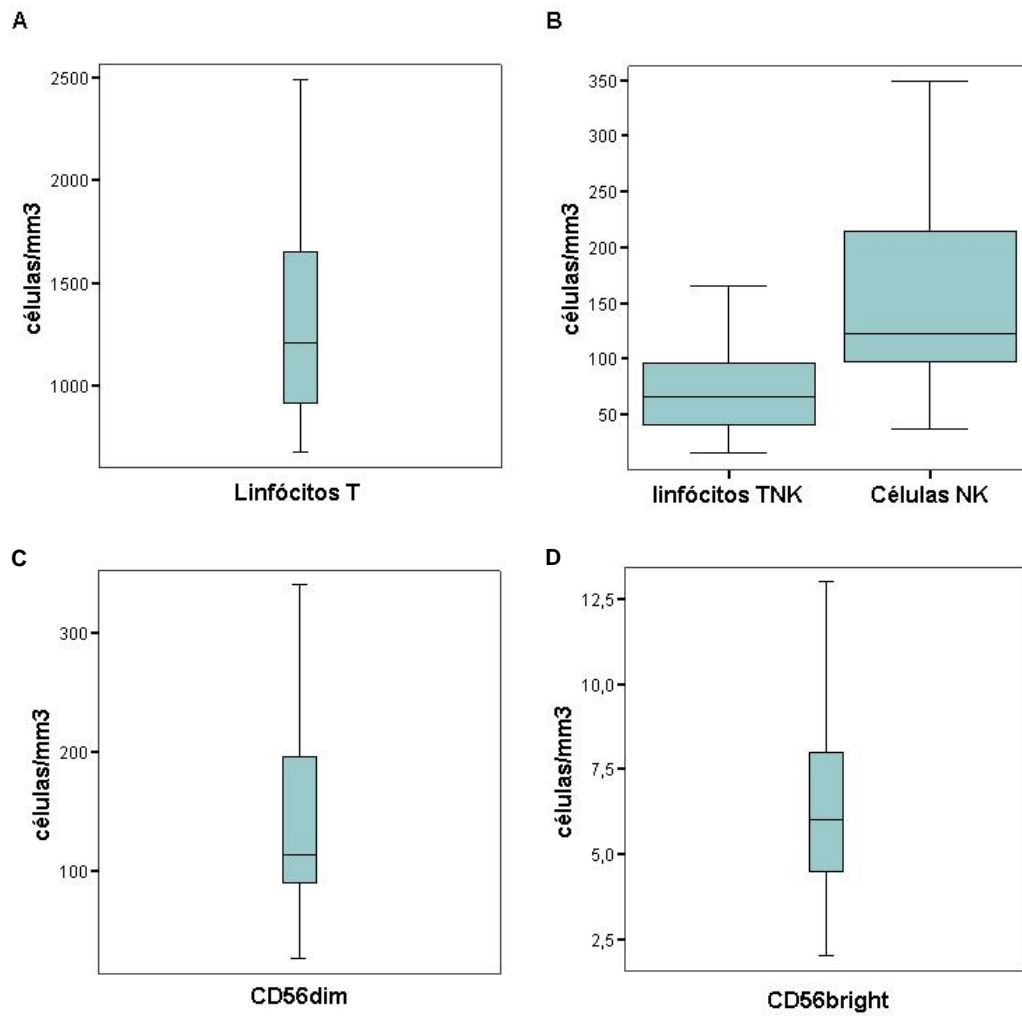


Figura 6 – *Boxplot* de valores absolutos: (A) representa a população de linfócitos T; (B) os linfócitos TNK e as células NK; (C) a subpopulação de células NK CD56^{dim}; (D) a subpopulação CD56^{bright}.

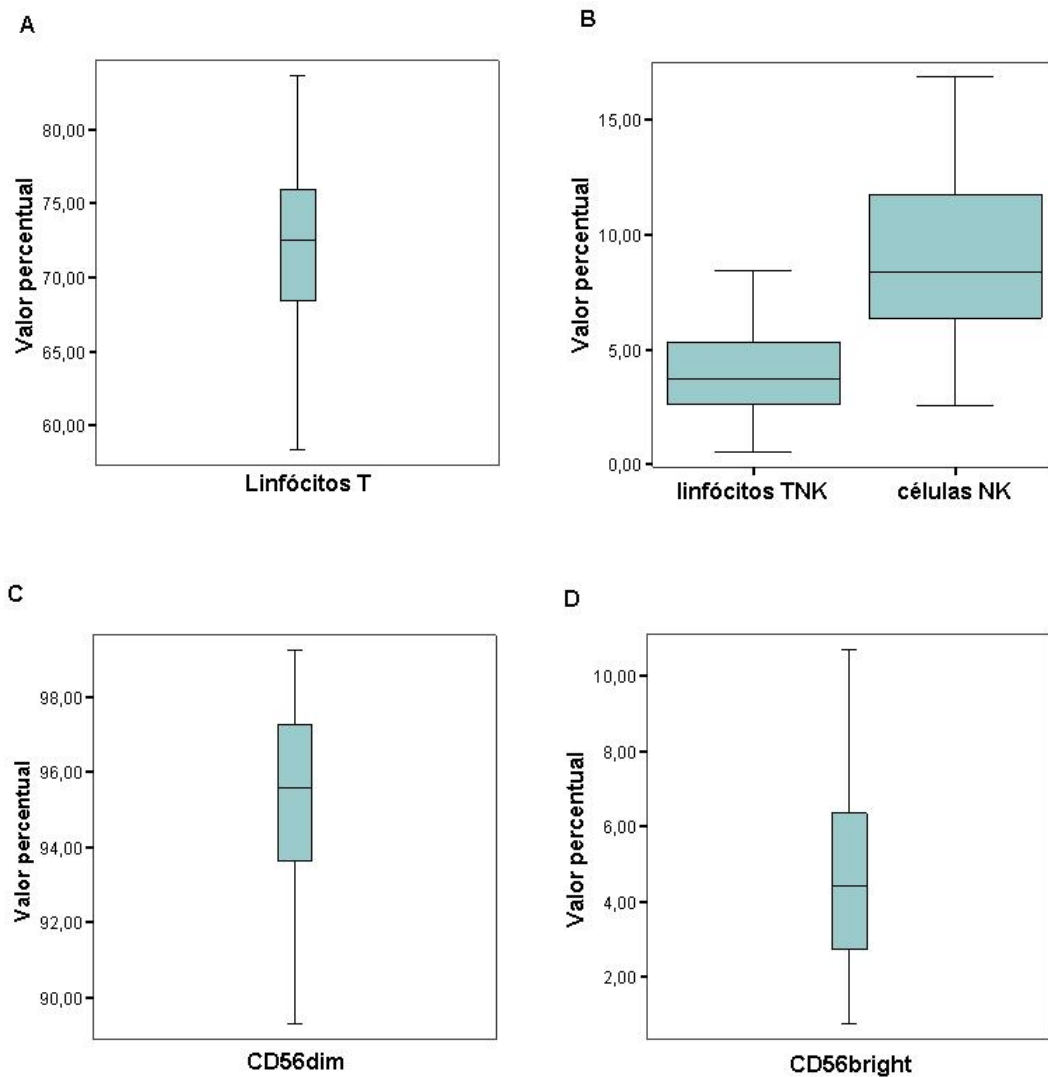


Figura 7 - Boxplot de valores percentuais: (A) representa a população de linfócitos T; (B) os linfócitos TNK e as células NK; (C) a subpopulação de células NK CD56^{dim}; (D) a subpopulação CD56^{bright}.

Neste grupo de 52 doadores (de 3 a 66 anos) não foi encontrada correlação linear, através do coeficiente de Pearson, entre idade e os valores absolutos de linfócitos T ($r = -0,178$ e $p = 0,230$), linfócitos TNK ($r = 0,231$ e $p = 0,118$), células NK ($r = 0,081$ e $p = 0,605$) ou no subtipo CD56^{dim} ($r = 0,113$ e $p = 0,471$). A única correlação linear encontrada entre idade e valores absolutos ocorreu na subpopulação de células NK CD56^{bright} ($r = -0,304$ e $p = 0,047$). A **figura 8** mostra os gráficos de dispersão de idade x valores absolutos.

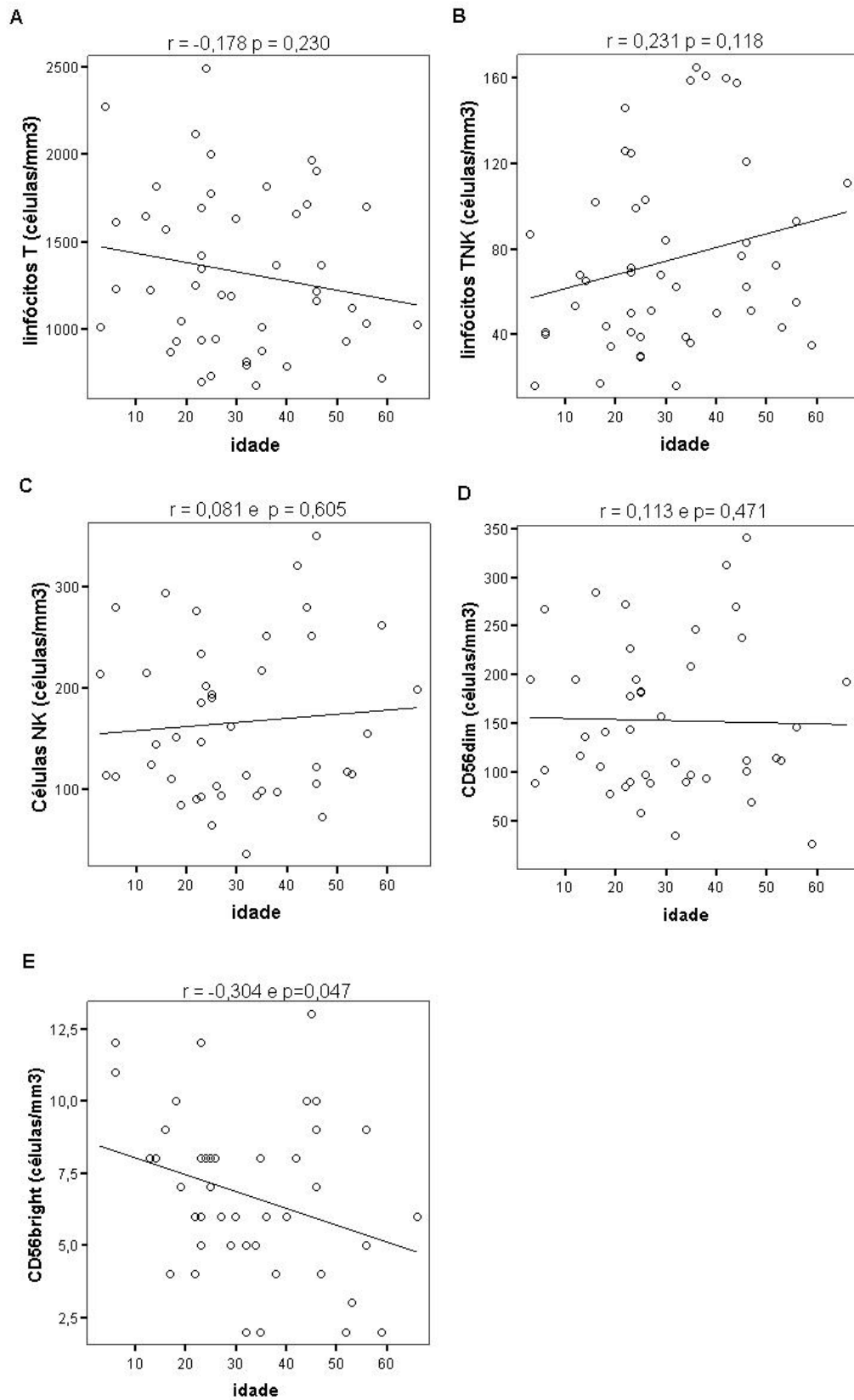


Figura 8 - Gráficos de distribuição de valores absolutos por idade: (A) linfócitos T x idade; (B) linfócitos TNK x idade; (C) células NK x idade; (D) CD56^{dim} x idade; (E) CD56^{bright} x idade.

Através do teste de Mann-Whitney, foi avaliada a influência do gênero nos valores absolutos das diferentes populações de células. Foi observado que o gênero masculino está associado a um maior número de células NK ($Z = 2,17$ e $p < 0,05$) e da subpopulação CD56dim ($Z = 1,99$ e $p < 0,05$). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os gêneros nos linfócitos T ($Z = 0,36$ e $p < 0,05$), nos linfócitos TNK ($Z = 0,29$ e $p < 0,05$) e na subpopulação de células NK CD56bright ($Z = 0,35$ e $p < 0,05$), conforme observado na tabela 8.

Tabela 8 – A influência do gênero nos valores absolutos através do teste de Mann-Whitney.

	Feminino (Média ± DV)	Masculino (Média ± DV)	Mann-Whitney (Z)
Linfócitos T	1308 ± 473	1275 ± 450	0,36
Linfócitos TNK	75 ± 44	72 ± 41	0,29
Células NK	143 ± 70	215 ± 136	2,17*
CD56^{dim}	135 ± 69	207 ± 136	1,99*
CD56^{bright}	7 ± 4	8 ± 5	0,35

DV – desvio padrão.

*Valores significantes ao nível de 0,05

5.1.2. Atividade citotóxica

Foi estudada a atividade citotóxica das células NK de 29 doadores saudáveis (15 do gênero feminino e 14 do masculino) com idades variando entre 12 e 59 anos. De acordo com o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, a distribuição destes doadores por idade não formou uma curva normal (**figura 9**). A faixa etária mais freqüente foi de 20 a 30 anos com 9 indivíduos. Não foram estudados indivíduos com idades entre 35 e 45 anos. Havia 5 indivíduos entre 10 e 20 anos e 4 entre 50 e 60 anos.

As medianas encontradas para atividade citotóxica das amostras de doadores saudáveis nas diluições 100/1, 50/1 e 25/1 foram respectivamente 20,5% (3,7 a 47,5%), 12,95% (0,6 a 25,3%) e 2,5% (0,0 a 16,0%), conforme observado na **figura 10**. A diluição 100/1 foi utilizada para representar a atividade NK em todos os testes estatísticos aplicados e também para fins comparativos da susceptibilidade dos diferentes tipos de leucemias estudados.

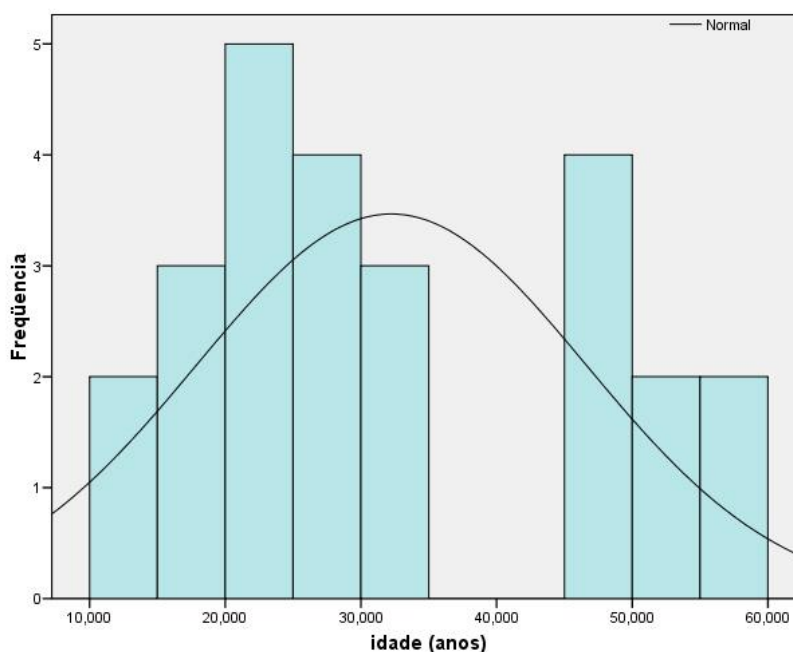


Figura 9 - Histograma de idade dos doadores saudáveis estudados para a atividade citotóxica

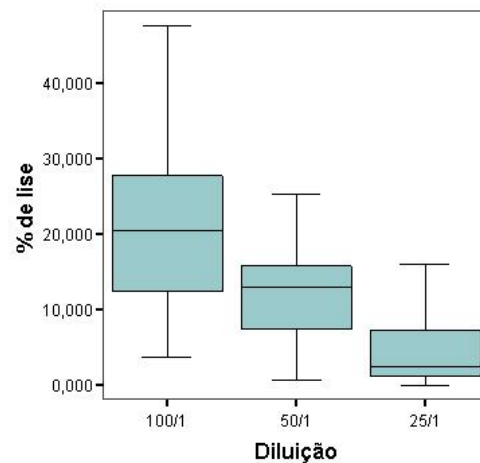


Figura 10 – Box plot de atividade citotóxica das células NK em diferentes proporções de células efectoras/células alvo: 100/1, 50/1 e 25/1

Foi avaliado se a atividade NK estava correlacionada com a idade através do coeficiente de Pearson, mas não foi encontrada uma correlação linear ($r = 0,373$ e $p=0,79$), **figura 11**. De acordo com o teste de Mann-Whitney, não houve diferença estatisticamente significativa da atividade citotóxica entre os gêneros ($U=68$ e $p>0,05$), apesar de haver uma tendência dos valores de atividade citotóxica serem maiores nos indivíduos do gênero masculino, mediana de 25,30% (7,5 a 47,46%); em comparação ao feminino, mediana de 20,5% (3,7 a 34,50%).

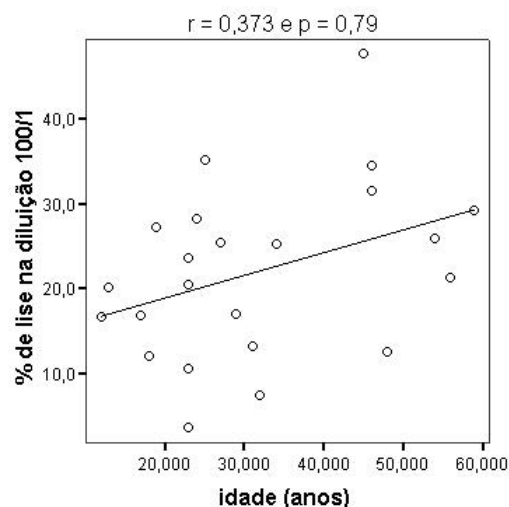


Figura 11 – Gráfico de dispersão entre a idade e atividade citotóxica.

Foi avaliado se havia correlação linear através do coeficiente de Pearson entre a atividade citotóxica e os valores absolutos de células NK e suas subpopulações. Foi encontrada uma correlação linear da atividade citotóxica com os valores absolutos de células NK ($r = 0,551$ e $p = 0,012$) e de $CD56^{dim}$ ($r = 0,542$ e $p = 0,014$), mas não com $CD56^{bright}$ ($r = 0,333$ e $p = 0,140$), conforme observado na **figura 12**.

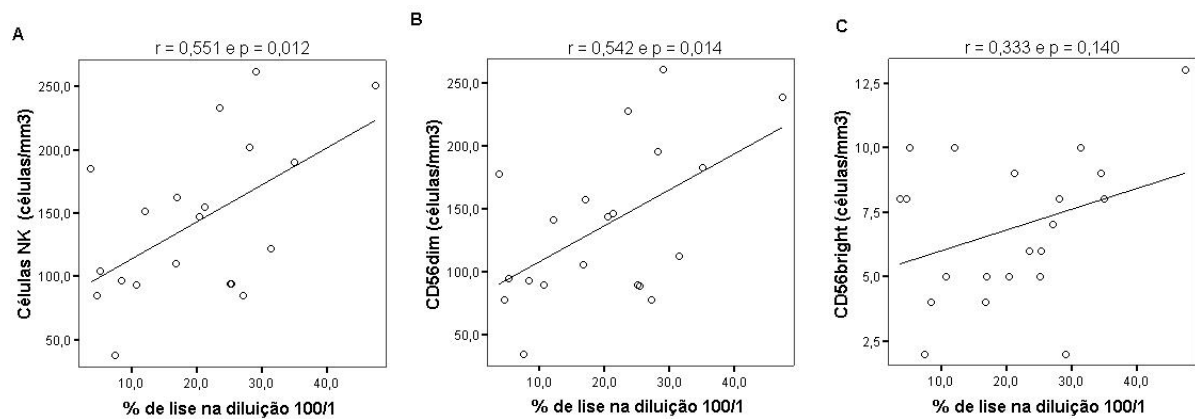


Figura 12 – Correlação entre atividade citotóxica e valores absolutos: (A) diluição 100/1 x células NK; (B) diluição 100/1 x $CD56^{dim}$ e (C) diluição 100/1 x $CD56^{bright}$.

5.1.3. Genótipo KIR e HLA

Foi avaliado o genótipo dos receptores KIR e HLA dos doadores cuja atividade citotóxica foi estudada contra amostras de pacientes. Foram estudados 11 doadores saudáveis, sendo 7 indivíduos brancos, 3 pardos e 1 negro. A **tabela 9** apresenta o resultado da genotipagem de HLA, destacando os alelos de HLA que são reconhecidos pelos receptores KIR. Com relação ao HLA-C, considerado mais importante para o reconhecimento KIR, 8 doadores só apresentavam HLA-C do grupo 2, dois indivíduos só do grupo 1 e apenas um doador apresentava os dois grupos de HLA-C. O Bw4, considerado o segundo ligante mais importante para o KIR, estava presente em 8 doadores.

A genotipagem KIR dos 11 doadores resultou em 9 perfis distintos, apresentando de 8 a 11 genes. Apenas os doadores 249/06, 1034/06 e 1217/06 apresentavam um perfil genotípico semelhante para os receptores KIR (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DS2, 2DS4, 3DL1, 3DL2, 3DL3), embora o 1034/06 fosse pardo e os outros dois doadores brancos (**tabela 10**). Todos os doadores saudáveis estudados apresentavam receptores KIR inibidores para os quais não possuíam ligantes de HLA e 2 indivíduos apresentavam ligantes de HLA para os quais não possuíam receptores KIR inibidores (**tabela 9 e 10**).

A frequência individual de cada gene KIR estudado está representada na **figura 12**. O único gene KIR presente em todos os indivíduos estudados foi o KIR3DL2, cujo ligante ainda não está bem definido, embora já tenham sido identificados os alelos de HLA A3 e A11. Os genes KIR2DL1 (reconhece HLA-C do grupo 2), 2DL3 (reconhece HLA-C do grupo 1) e 3DL3 (ligante não definido) estavam presentes em 10 dos 11 doadores avaliados. O KIR3DL1, responsável pelo reconhecimento de Bw4, estava presente em 9 dos 11 doadores estudados e o KIR2DL4, específico para HLA-G, presente em 8 dos 11 indivíduos saudáveis. Os genes 2DL2, 2DS2 e 2DS4 apresentaram frequência intermediária, estado presente em 7 dos 11 indivíduos estudados. Os genes 2DL5, 2DS5 e 3DS1, todos eles com ligantes

desconhecidos, estavam presentes em 5 dos 11 indivíduos avaliados. O gene KIR mais raro, presente em apenas 3 indivíduos, foi o KIR2DS3, cujo ligante também é desconhecido. Apenas 8 dos 11 doadores estudados tinham KIR inibidores para todos os três grupos de ligantes de HLA-I conhecidos.

Tabela 9 – Resultado da genotipagem HLA dos doadores saudáveis, destacando os alelos de HLA que são reconhecidos pelos receptores KIR.

Doador	Idade	Gênero	Cor	HLA	Alelos de HLA reconhecidos por receptores KIR
249/05	36	F	Branco	A30, A32, B07, B27, C0202 e C07	B27 (Bw4), C0202 (C do grupo 2) e C07 (C do grupo 2).
506/05	41	M	Negro	A29, A80, B13, B57, C0401 e C0202	B13 (Bw4), B57 (Bw4), C0401 (C do grupo 2) e C0202 (C do grupo 2).
134/06	39	F	Branco	A02, A24, B07, B15, C0303, C07	C0303 (C do grupo 1) e C07 (C do grupo 1)
268/06	56	F	Branco	A11, A24, B35, B45, C0401, C1601	C0401 (C do grupo 2) e C1601 (C do grupo 1).
393/06	45	M	Branco	A02, A-, B44, B-, C05, C-	B44 (Bw4) e C05 (C do grupo 2).
788/06	54	F	Branco	A02, A-, B35, B-, C04, C-	C04 (C do grupo 2).
865/06	31	M	Pardo	A02, A11, B41, B52, C07, C1202	B52 (Bw4), C07 (C do grupo 1) e C1202 (C do grupo 1).
918/06	41	F	Branco	A02, A33, B15, B53, C04, C-	B53 (Bw4) e C04 (C do grupo 2).
941/06	25	F	Pardo	A02, A11, B44, B-, C04, C1602	B44 (Bw4), C04 (C do grupo 2) e C1602 (C do grupo 2)
1034/06	44	M	Pardo	A02, A36, B27, B53, C0401, C0202	B27 (Bw4), B53 (Bw4), C0401 (C do grupo 2) e C0202 (C do grupo 2)
1217/06	42	M	Branco	A30, A68, B13, B57, C06, C-	B13 (Bw4), B57 (Bw4), C06 (C do grupo 2).

Tabela 10 – Genótipo KIR dos doadores saudáveis.

KIR Doador	2DL1 (C2)	2DL2 (C1)	2DL3 (C1)	2DL4 (G)	2DL5	2DS1 (C2)	2DS2 (C1)	2DS3	2DS4	2DS5	3DL1 (Bw4)	3DL2	3DL3	3DS1
249/05	■	■	■	■		■	■		■		■	■	■	
506/05	■		■		■	■	■		■	■	■	■	■	■
134/06	■		■		■	■	■		■		■	■	■	■
268/06	■	■	■		■	■	■	■	■		■	■	■	■
393/06			■			■			■		■			
788/06	■		■			■			■		■	■	■	
865/06	■	■	■		■	■	■		■	■		■	■	■
918/06	■	■		■	■	■	■		■			■	■	■
941/06	■	■	■		■	■	■		■		■	■	■	
1034/06	■	■	■	■		■	■		■		■	■	■	
1217/06	■	■	■	■		■	■		■		■	■	■	

Abaixo do gene KIR está representado entre parênteses o ligante de HLA quando conhecido: C1 - HLA-C do grupo 1, C2 - HLA-C do grupo 2 e G - HLA-G.

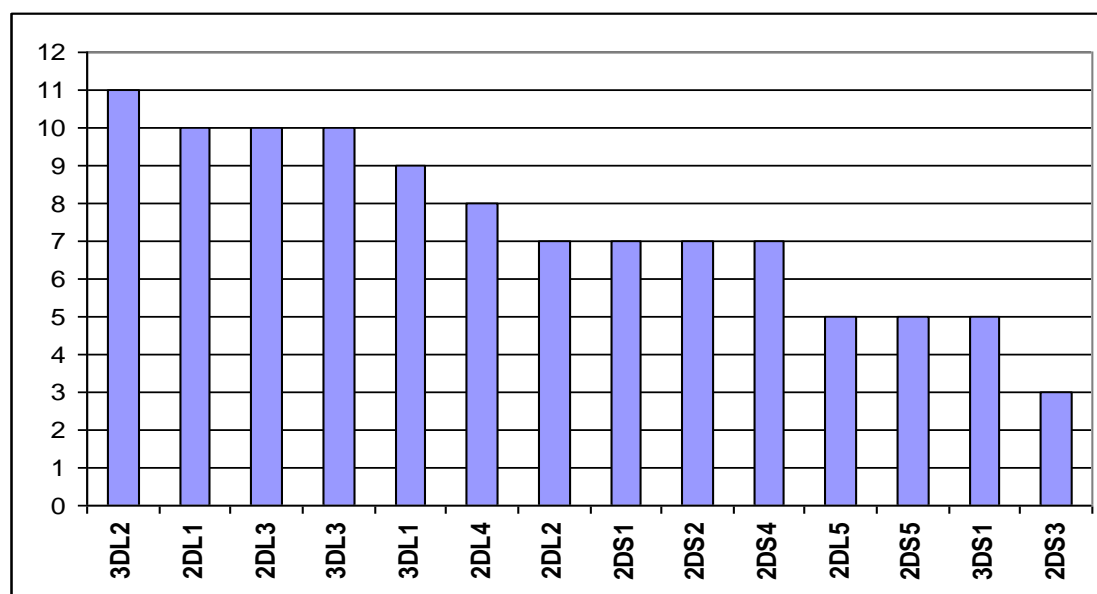


Figura 12 - Frequência encontrada para cada gene KIR estudado.

5.2. Pacientes

5.2.1. Susceptibilidade à atividade NK

Foi realizada atividade citotóxica de células NK de 14 doadores saudáveis contra 16 amostras de 15 pacientes contendo blastos leucêmicos. O grau de sensibilidade destas amostras foi delimitado através dos quartis do percentual de atividade citotóxica de doadores saudáveis contra a K562, sabidamente susceptível à atividade NK (**figura 10**). Foi considerado como limite inferior o primeiro quartil, de 12%, e como limite superior o terceiro quartil, de 28%. Desta forma, quando o percentual de lise apresentado pelas células leucêmicas do paciente na diluição 100/1 fosse menor que 12%, era considerado resistente; entre 12 e 28%, era considerado sensível e; maior que 28%, considerado altamente sensível.

Com relação aos casos de LLA, 3 em 8 foram sensíveis ou altamente sensíveis. Estes pacientes apresentavam diferentes subtipos de LLA. Entre os cinco casos de LLA-B precoce (248/05, 566/05, 915/06, 916/06 e 1170/06), apenas um foi altamente sensível: o paciente 248/05, que apresentou lise de 83,18%. Este paciente respondeu bem ao tratamento e atualmente se encontra em remissão completa. Entre os quatro casos de LLA-B precoce

resistentes à atividade citotóxica (todos eles com 0% de lise), dois pacientes encontram-se atualmente em remissão completa (915/06 e 1170/06) e dois sofreram óbito por septicemia (566/05 e 916/06). Os dois pacientes com LLA pré-B (388/06 e 939/06) foram sensíveis à atividade citotóxica (lise de 26,77% e 22,31%, respectivamente), sendo que o primeiro atualmente encontra-se em remissão completa (388/06) e o segundo sofreu óbito por septicemia (939/06). O paciente com LLA-T (280/05) foi resistente à atividade NK (4,52% de lise) e sofreu óbito por septicemia (**tabela 11**).

Tabela 11 – Susceptibilidade das células leucêmicas primárias dos casos de LLA à atividade citotóxica de células NK de doadores saudáveis

Paciente	Subtipo da doença	% de blatos	Susceptibilidade à atividade NK	% lise na diluição 100/1	Estado atual
248/05	B-precoce	88,59%	Altamente sensível	83,18%	Remissão completa
566/05	B-precoce	89,00%	Resistente	0,00%	Óbito por septicemia (D+261)
915/06	B-precoce	78,90%	Resistente	0,00%	Remissão completa
916/06	B-precoce	80,89%	Resistente	0,00%	Óbito por septicemia (D+36)
1170/06	B-precoce	81,15%	Resistente	0,00%	Remissão completa
388/06	Pré-B	71,91%	Sensível	26,77%	Remissão completa
939/06	Pré-B	75,14%	Sensível	22,31%	Óbito por septicemia (D+30)
280/05	T	97,38%	Resistente	4,52%	Óbito por septicemia (D+263)

Entre parênteses estão representados quantos dias (D+) após o tratamento ocorreu o óbito.

Os casos de LMA foram mais resistentes à atividade citotóxica em comparação aos casos de LLA. Houve sensibilidade em apenas 1 (1035/06) dos 6 casos de LMA. Quatro pacientes apresentavam LMA secundária à SMD (131/06, 784/06, 867/06 e 883/06) e todos eles foram resistentes à atividade citotóxica. Um dos pacientes com LMA secundária à SMD (867/06) foi submetido ao TCTH e teve óbito precoce, apenas 22 dias após o transplante, por evolução da doença. Outros dois pacientes com LMA secundária à SMD eram idosos (784/06

e 883/06), receberam quimioterapia apenas paliativa e sofreram óbito por causas distintas. Apenas um paciente com LMA secundária à SMD (131/06) se encontra atualmente em remissão completa, justamente o caso que também apresentava síndrome de Down. Os outros dois casos de LMA estudados eram uma M2 e uma M4. O caso de LMA-M2 (1035/06) foi susceptível à atividade citotóxica. No momento do estudo, este paciente estava em recaída tardia 5 anos após TCTH e foi submetido a novo ciclo de quimioterapia e à ILD. Ele respondeu bem ao tratamento, não apresentou DECH e entrou em remissão completa. Atualmente se encontra em nova recaída (4 meses após o DLI) e foi encaminhado para novo ciclo de quimioterapia. O último paciente de LMA estudado apresentava o subtipo M4 (775/05) e foi resistente à atividade NK. Este paciente foi recentemente encaminhado ao TCTH e atualmente se encontra em remissão completa (**tabela 12**).

Tabela 12 - Susceptibilidade das células leucêmicas primárias dos casos de LMA à atividade citotóxica de células NK de doadores saudáveis

Paciente	Subtipo da doença	% de blatos	Susceptibilidade à atividade NK	% lise (100/1)	Estado atual
775/05	M4	71,58%	resistente	0,00%	Remissão completa
1035/06	M2	71,92%	sensível	15,76%	Recaída
131/06	M1 Secundária a SMD / Síndrome de Down	63,77%	resistente	0,00%	Remissão completa
784/06	M2 Secundária a SMD	59,44%	resistente	4,54%	Óbito por evolução da doença e septicemia (D+139)
867/06	M1 Secundária a SMD / refratária	70,26%	resistente	0,00%	Óbito por evolução da doença (D+22)
883/06	M4 Secundária a SMD	71,00%	resistente	0,00%	Óbito por falência múltipla (D+127)

Entre parênteses estão representados quantos dias (D+) após o tratamento ocorreu o óbito.

O paciente com LBA foi estudado em duas ocasiões: em remissão parcial antes do TCTH e em recaída da doença após o TCTH. No ensaio realizado no pré-transplante foram utilizadas células efetoras de um doador não aparentado, selecionado de forma aleatória no banco de sangue. Na ocasião da recaída, a atividade citotóxica foi realizada utilizando células efetoras do doador de medula óssea aparentado (HLA idêntico). Embora o ensaio tenha sido realizado com dois doadores distintos, nos dois momentos as células primárias de LBA foram resistentes à atividade NK. Após este estudo, o paciente foi enviado para o centro de origem para receber novo ciclo de quimioterapia para tratar a recaída e sofreu óbito por evolução da doença (**tabela 13**). Por se tratar de um caso raro, um estudo de caso deste paciente foi submetido à publicação na revista indexada *Haematologica* (anexo G). Este estudo de caso também foi apresentado no congresso da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea (anexo H).

Tabela 13 - Susceptibilidade das células leucêmicas primárias do paciente de LBA à atividade citotóxica de células NK de dois doadores diferentes

Doador utilizado	Estado do paciente no momento do estudo	% de blastos	Susceptibilidade à atividade NK	% lise na diluição 100/1
Doador não aparentado (41 anos, masculino)	Remissão parcial pré TCTH	33,62%	resistente	0,09%
Doador aparentado (56 anos, feminino)	Recaída pós TCTH	84,35%	resistente	0,00%

5.2.2. Genótipo KIR e HLA e a susceptibilidade à atividade NK

Foram estudados os genótipos HLA e KIR do doador e HLA do paciente para avaliar se a incompatibilidade KIR poderia prever a susceptibilidade das leucemias à atividade NK. Foram analisados os genótipos de HLA de 12 pacientes e KIR/HLA de 11 doadores. As células efectoras do doador 134/06 foram estudadas contra as células alvo de dois pacientes, o 280/05 e o 131/06. O mesmo ocorreu com o doador 918/06, que foi estudado contra os pacientes 915/06 e 916/06 (**tabela 14**). Conforme citado anteriormente, foi estudada a susceptibilidade à atividade NK do paciente com LBA contra dois doadores distintos: o 506/05, doador não aparentado; e o 268/06, doador aparentado.

Neste estudo havia dois doadores aparentados HLA idênticos ao paciente e os outros doadores eram selecionados de forma aleatória, ou seja, eram completamente HLA incompatíveis ao paciente. Entre os treze pares doador/paciente estudados em 11 casos, os pacientes não apresentavam de 1 a 3 ligantes para os KIR inibidores do doador cujos ligantes são conhecidos (**tabela 14**).

O HLA do paciente 867/06 era incompatível com o doador 865/06, com exceção do C07. Este paciente apresentava ligantes de HLA para 3 KIR inibidores (2DL1, 2DL3 e 2DL2) e 2 KIR ativadores (2DS1 e 2DS2) do doador (**figura 13, A**). Portanto, todos os KIR inibidores com ligantes conhecidos puderam se ligar a alelos de HLA do paciente, o que sugere não haver potencial alorreativo. De fato este paciente foi resistente à atividade citotóxica, apresentando 0% de lise. Ele era portador de LMA-M1 secundária a SMD (**tabela 14**).

O paciente 915/06, portador de LLA-B precoce, era HLA incompatível com o doador 918/06, apresentando compatibilidade apenas do alelo C04. Este paciente apresentava ligantes para 2 KIR inibidores (2DL1 e 2DL2) e 2 KIR ativadores (2DS1 e 2DS2) do doador (**figura**

13, B). Não houve ausência de ligantes para KIR inibidores do doador, sugerindo que não houve aloreatividade e, de fato, houve resistência à atividade NK, lise de 0% (**tabela 14**).

Tabela 14 –KIR inibidores presentes nos doadores cujos ligantes são atualmente conhecidos, HLA do paciente e a atividade citotóxica.

Doador	Paciente	Doença	KIR inibidores dos doadores cujos ligantes são conhecidos	KIR do doador para os quais o paciente não possui ligante	N° de KIR inibidores sem ligante/ total de KIR inibidores com ligantes conhecidos	% de lise (100/1)
865/06	867/06	LMA-M1 secundária à SMD	2DL1, 2DL2, 2DL3	-----	0/3	0%
918/06	915/06	LLA-B precoce	2DL1, 2DL2	-----	0/2	0%
918/06	916/06	LLA-B precoce	2DL1, 2DL2	-----	0/2	0%
249/05	248/05	LLA-B precoce	2DL1, 2DL2, 2DL3, 3DL1	-----	0/4	83,18%
268/06*	269/06**	LBA	2DL1, 2DL2, 2DL3, 3DL1	3DL1 (Bw4)	1/4	0%
506/05	501/05**	LBA	2DL1, 2DL3, 3DL1	3DL1 (Bw4)	1/3	0,09%
1217/06	1170/06	LLA-B precoce	2DL1, 2DL2, 2DL3, 3DL1	3DL1 (Bw4)	1/4	0%
788/06	784/06	LMA-M2 secundária à SMD	2DL1, 2DL3, 3DL1	3DL1 (Bw4)	1/3	4,54%
134/06	131/06	LMA-M1 secundária à SMD	2DL1, 2DL3, 3DL1	2DL1 (C grupo 2)	1/3	0%
1034/06*	1035/06	LMA-M2	2DL1, 2DL2, 2DL3, 3DL1	2DL2 (C grupo 1), 2DL3 (grupo 1)	2/4	15,76%
134/06	280/05	LLA-T	2DL1, 2DL3, 3DL1	2DL3 (C grupo 1), 3DL1 (Bw4)	2/3	4,52%
941/06	939/06	LLA pré-B	2DL1, 2DL2, 2DL3, 3DL1	2DL2 (C grupo 1), 2DL3 (C grupo 1) 3DL1 (Bw4)	3/4	22,31%
393/06	388/06	LLA pré-B	2DL3, 3DL1	2DL3 (C grupo1)	1/1***	26,77%

* doadores aparentados HLA idêntico ao paciente. **Mesmo paciente (caso de LBA). *** Não foi possível identificar os alelos de HLA-B deste paciente, portanto neste caso não se sabe as possibilidades de ligação do 3DL1.

O paciente 916/06, portador de LLA-B precoce, era HLA incompatível com o doador 918/06, com exceção dos alelos A02 e C04, que eram compatíveis. Este paciente apresentava ligantes de HLA para 2 KIR inibidores (2DL1 e 2DL2) e dois KIR ativadores (2DS1 e 2DS2) do doador (**figura 13, C**). Como nos pacientes anteriores, havia ligantes para todos os KIR inibidores do doador, não havendo potencial aloreativo, o que coincidiu com o resultado da atividade citotóxica, 0% de lise (**Tabela 14**).

O paciente 248/05 era HLA incompatível com o doador 249/05, apresentando como única compatibilidade o alelo C07. Neste caso, houve 4 KIR inibidores (2DL1, 2DL2, 2DL3 e 3DL1) e 1 ativador (2DS2) capazes de fazer ligação com os HLA-I do paciente (**figura 14, A**). Neste caso, todos os KIR inibidores com ligantes conhecidos do doador se ligaram a alelos de HLA do paciente, o que sugeria ausência de potencial aloreativo. No entanto, este paciente foi susceptível à atividade citotóxica, apresentando 83,18% de lise. Este paciente era portador de LLA-B precoce (**tabela 14**).

O paciente 268/06, portador de LBA, era HLA idêntico ao doador aparentado do TCTH (269/06), que foi o mesmo doador do TCTH. Este paciente apresentava ligantes de HLA para 4 KIR inibidores (2DL1, 2DL2, 2DL3 e 3DL2) e 2 KIR ativadores (2DS1 e 2DS2) do doador (**figura 14, B**). Este paciente não apresentou ligante para o KIR3DL1, ou seja, houve incompatibilidade em 1/4 dos KIR inibidores com ligantes conhecidos. Esta incompatibilidade não foi capaz de causar aloreatividade, pois a lise encontrada na atividade NK foi de 0% (**tabela 14**).

Este mesmo paciente também recebeu o número 501/05, antes do TCTH, no momento em que foi estudado contra um doador não aparentado HLA incompatível, com exceção do C1601. Neste caso, o paciente apresentou ligantes de HLA para 3 KIR inibidores (2DL1, 2DL3 e 3DL2) e 1 KIR ativador (2DS1) do doador (**figura 14, C**). Foi encontrado apenas 1/3

de KIR inibidor (3DL1) com ausência de ligantes no paciente. Esta amostra foi resistente à atividade citotóxica, apresentando lise de 0,09% (**tabela 14**).

O paciente 1170/06, portador de LLA-B precoce, era completamente HLA incompatível com o doador 1217/06. Este paciente apresentava ligantes de HLA para 3 KIR inibidores (2DL1, 2DL2 e 2DL3) e 1 KIR ativador (2DS2) do doador (**figura 15, A**). Foi encontrado 1/4 de KIR inibidor (3DL1) sem ligante no paciente, que foi resistente à lise (0%) mediada por células NK (**tabela 14**).

O paciente 784/06, portador de LMA-M2 secundária à SMD, apresentava 3 alelos de HLA compatíveis (A02, B35 e C04) e 3 incompatíveis (A31, B07 e C07) com o doador 788/06. O paciente possuía ligantes de HLA para 2 KIR inibidores (2DL1 e 2DL3) e nenhum KIR ativador do doador (**figura 15, B**). Havia ausência de ligantes em 1/3 de KIR inibidor (3DL1) e esta amostra foi resistente (4,54%) à atividade NK (**tabela 14**).

O paciente 131/06, portador de LMA-M1 secundária à SMD, era HLA incompatível com o doador 134/06, com exceção dos alelos A02, C03 e C07. Este doador apresentava 1 KIR inibidor (2DL3) que podia se ligar a dois alelos de HLA do paciente (C03 e C07) e um KIR inibidor (3DL1) capaz de se ligar ao alelo de HLA B58 (**figura 15, C**). Foi encontrado 1/3 de KIR inibidor (2DL1) que não se ligava a HLA do paciente. O percentual de lise encontrado foi de 0% (**tabela 14**).

O paciente 1035/06, portador de LMA-M2, era HLA idêntico ao doador 1034/06, que foi o mesmo do TCTH. Este doador apresentava o KIR inibidor 2DL1, que podia fazer ligação com dois alelos de HLA do paciente (C0401 e C0202), e o KIR inibidor 3DL1, que também podia fazer ligação com dois alelos de HLA do paciente, B27 e B53 (**figura 16, A**). Neste caso houve 2/4 de KIR inibidores (2DL2 e 2DL3) que não se ligaram ao HLA do paciente que foi susceptível à lise (15,76%) mediada por células NK (**tabela 14**).

O paciente 280/05, portador de LLA-T, era HLA incompatível com o doador 134/06, com exceção dos alelos A02 e B15. Este doador apresentava 1 KIR inibidor (2DL1) que poderia fazer ligação com 2 alelos de HLA do paciente (C04 e C0202) e um KIR ativador (2DS1) que também poderia se ligar aos mesmos 2 alelos de HLA do paciente (**figura 16, B**). Houve 2/3 de KIR inibidores (2DL3, 3DL1) que não se ligaram ao HLA do paciente. No entanto este paciente foi resistente à atividade NK (4,52%), conforme observado na **tabela 14**.

O paciente 939/06, portador de LLA-pré-B, era HLA incompatível com o doador 941/06, com exceção do C04. Este doador apresentava um KIR inibidor (2DL1) capaz de se ligar a 2 alelos de HLA do paciente (C04 e C18) e um KIR ativador (2DS1) capaz de se ligar a C04 e C18 (**figura 16, C**). Houve incompatibilidade em 3/4 dos KIR inibidores (2DL2, 2DL3, 3DL1). Este paciente foi susceptível às células NK, apresentado 22,31% de lise (**tabela 14**).

O paciente 388/06, portador de LLA pré-B, era compatível com o doador para os dois alelos de HLA-A (A02, A-) e completamente incompatível para o HLA-C. Não foi possível identificar os alelos de HLA-B deste paciente. Foi identificado que um KIR ativador (2DS1) do doador era capaz de reconhecer 2 alelos de HLA deste paciente, o C04 e o C15. Como não foram identificados os HLA-B deste paciente, não foi possível saber se o KIR3DL1 poderia ou não fazer ligações (**figura 17**). O KIR2DL3 não se ligou ao HLA do paciente, que foi susceptível à lise (26,77%) por células NK (**tabela 14**).

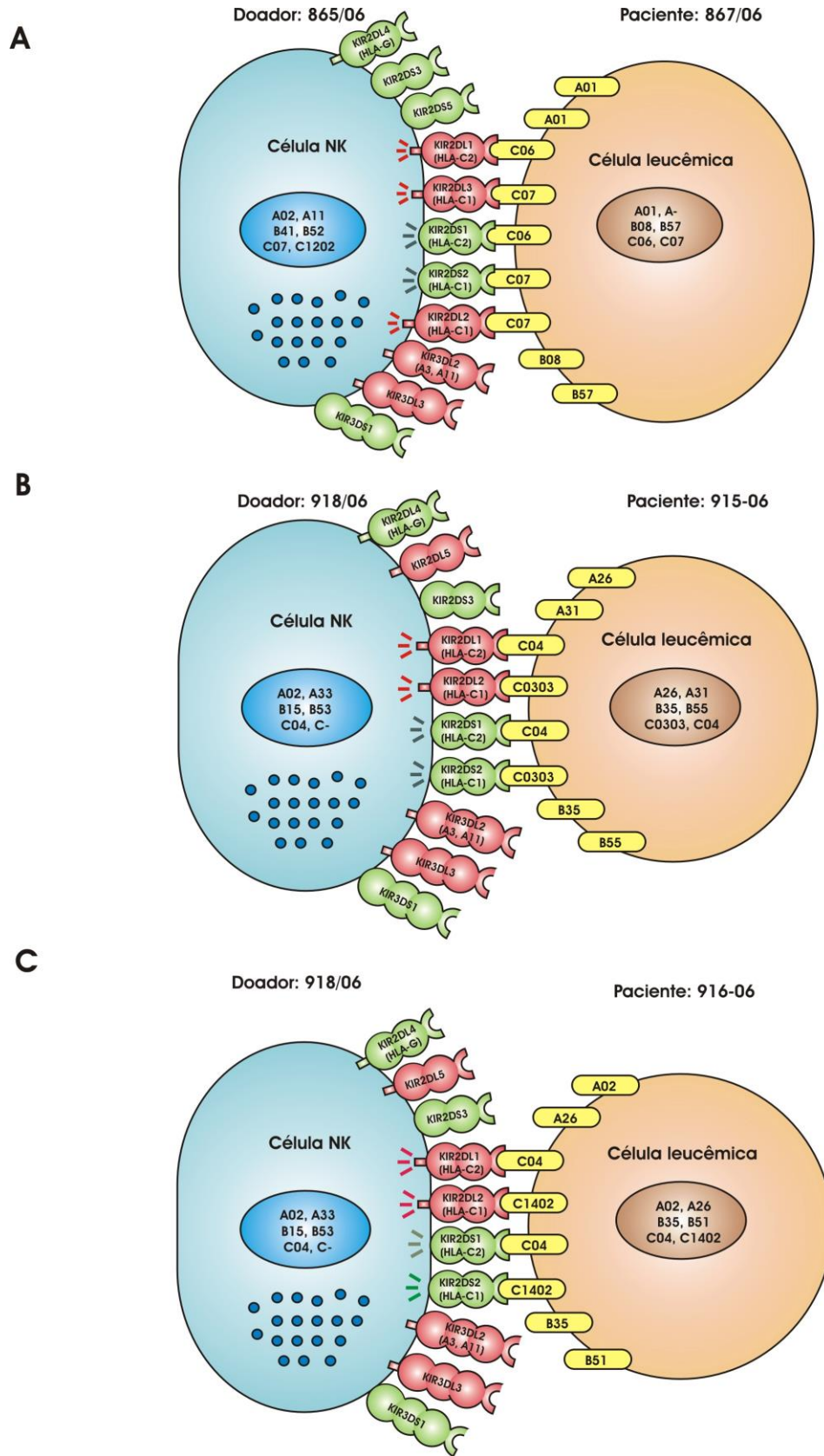


Figura 13 – Possíveis ligações entre o KIR do doador e HLA do paciente. Na célula do doador: genótipo HLA no núcleo e os receptores KIR inibidores (vermelho) e KIR ativadores (verde) na superfície. O genótipo de HLA do paciente está representado tanto no núcleo quanto na superfície da célula. (A) doador 865/06 x paciente 867/06; (B) doador 918/06 x paciente 915/06; (C) doador 918/06 x paciente 916/06.

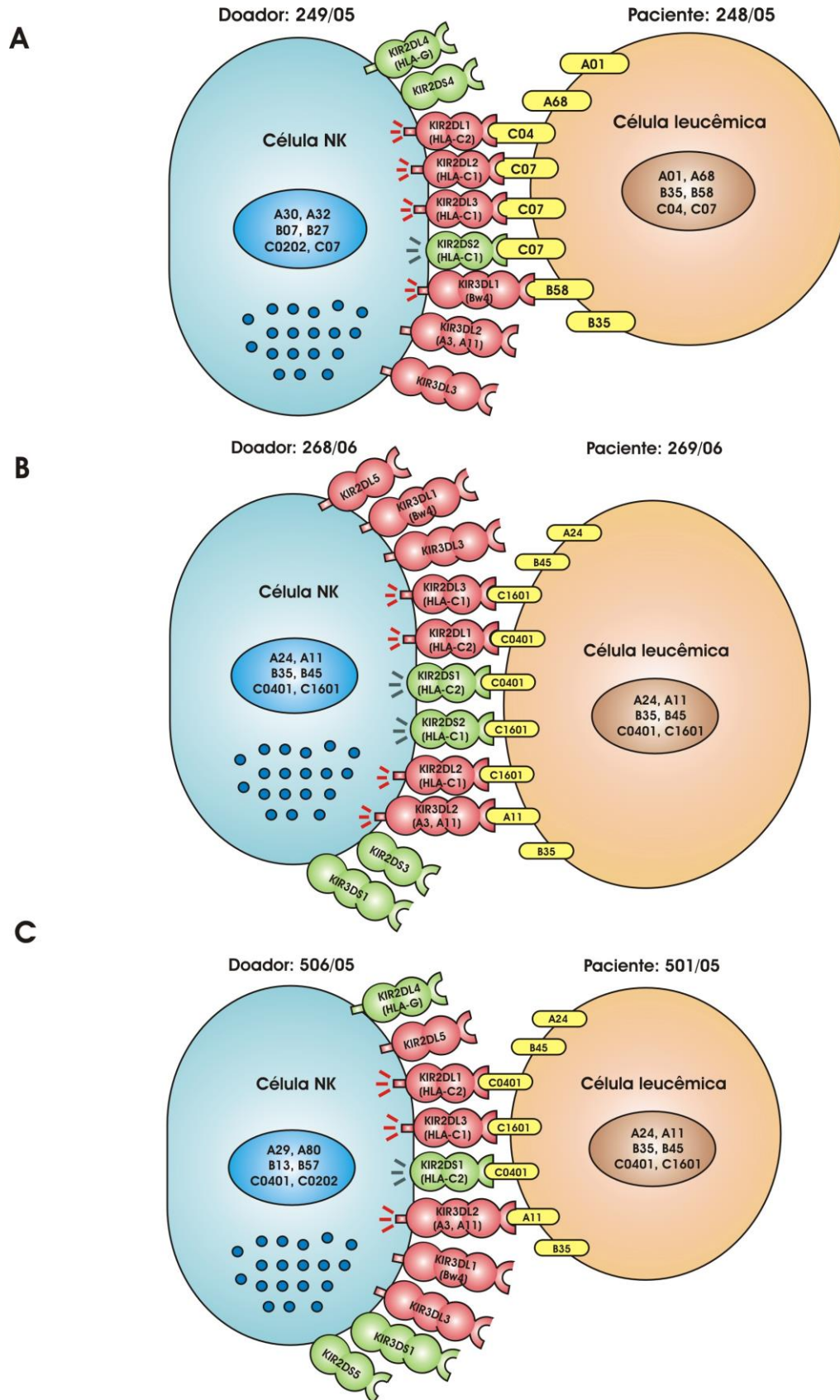


Figura 14 - Possíveis ligações entre o KIR do doador e HLA do paciente. Na célula do doador: genótipo HLA no núcleo e os receptores KIR inibidores (vermelho) e KIR ativadores (verde) na superfície. O genótipo de HLA do paciente está representado tanto no núcleo quanto na superfície da célula. (A) doador 249/05 x paciente 248/05; (B) doador 268/06 x paciente 269/06; (C) doador 506/05 x paciente 501/05.

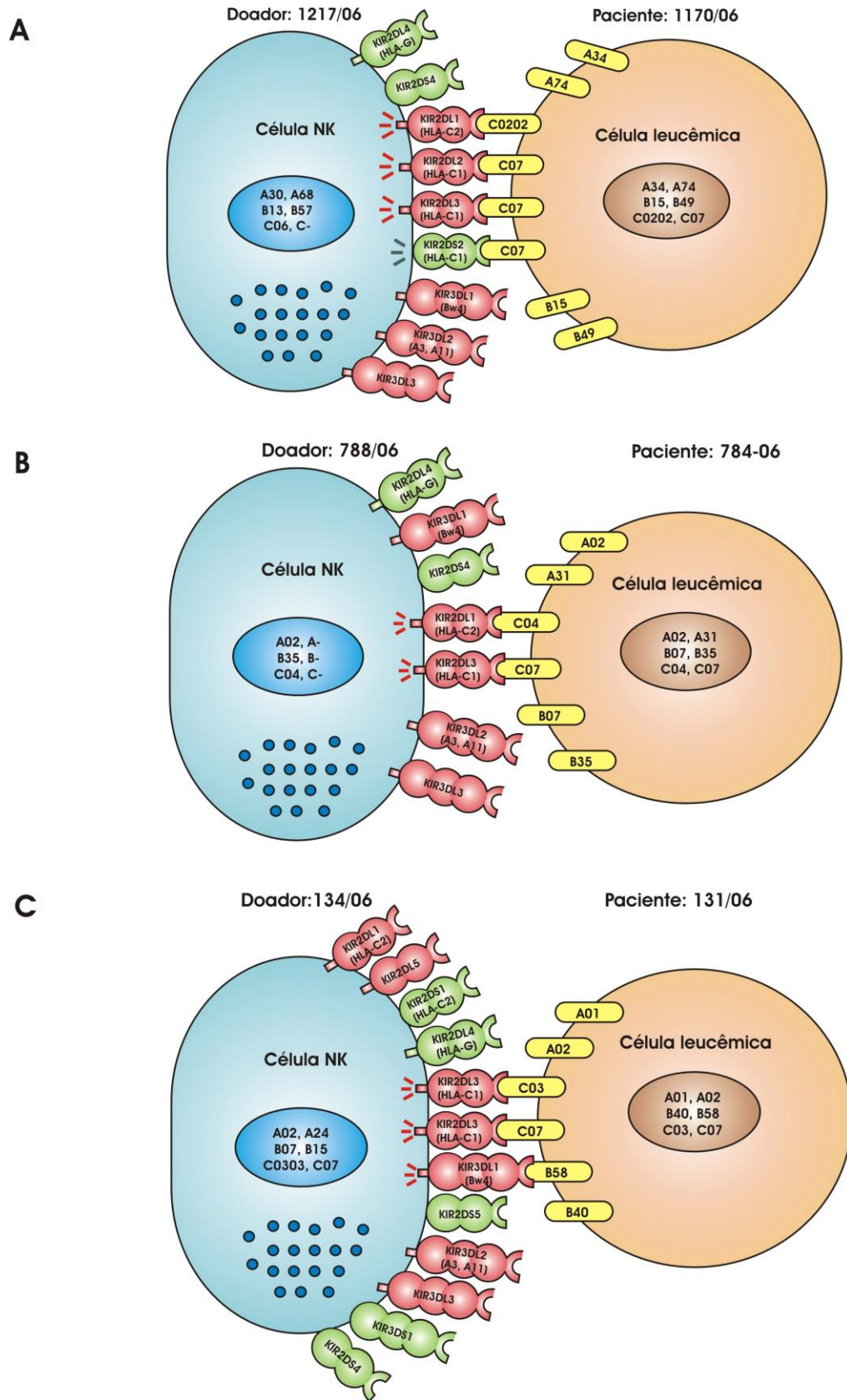


Figura 15 - Possíveis ligações entre o KIR do doador e HLA do paciente. Na célula do doador: genótipo HLA no núcleo e os receptores KIR inibidores (vermelho) e KIR ativadores (verde) na superfície. O genótipo de HLA do paciente está representado tanto no núcleo quanto na superfície da célula. (A) doador 1217/06 x paciente 1170/06; (B) doador 788/06 x paciente 784/06; (C) doador 134/06 x paciente 131/06.

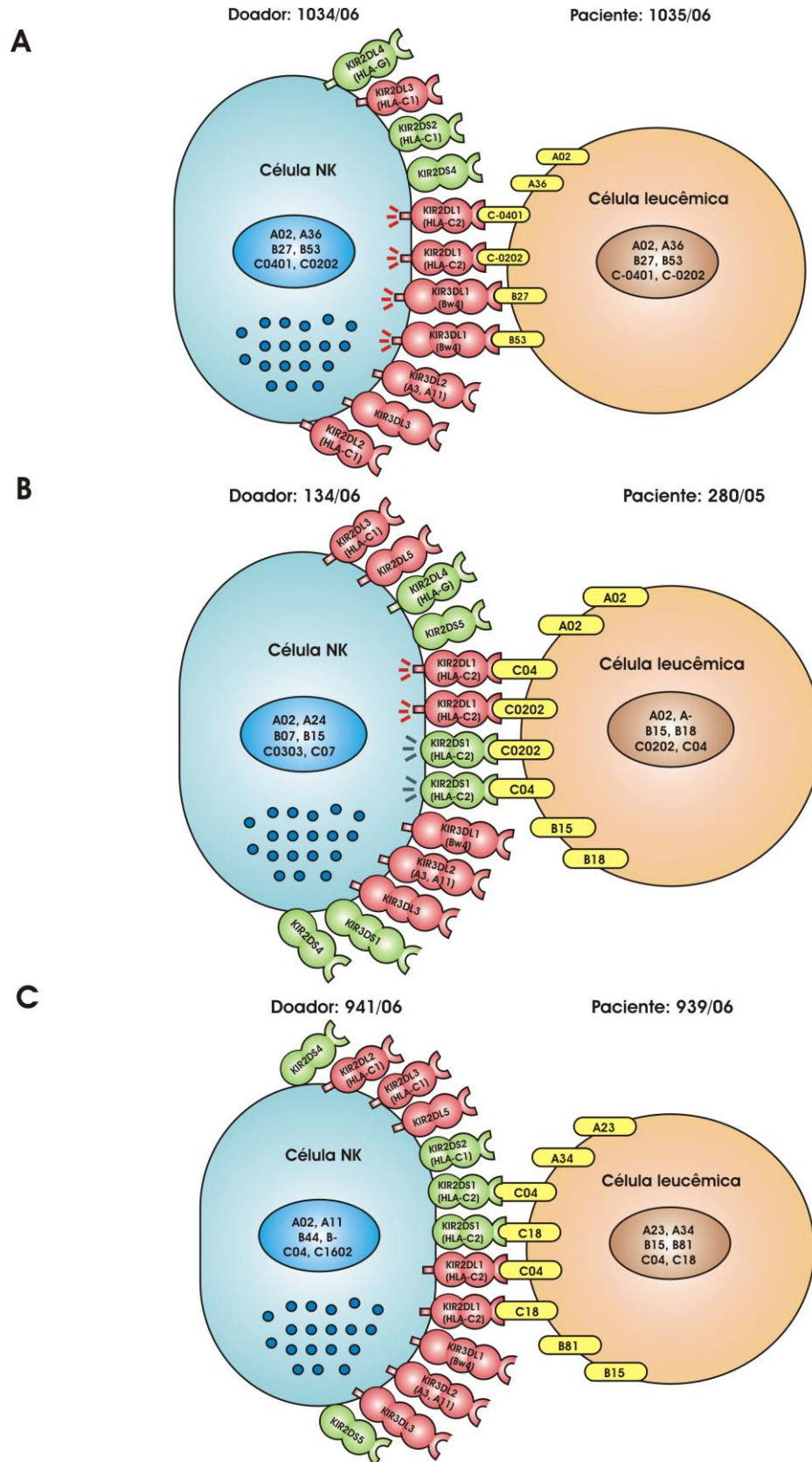


Figura 16 - Possíveis ligações entre o KIR do doador e HLA do paciente. Na célula do doador: genótipo HLA no núcleo e os receptores KIR inibidores (vermelho) e KIR ativadores (verde) na superfície. O genótipo de HLA do paciente está representado tanto no núcleo quanto na superfície da célula. (A) doador 1034/06 x paciente 1035/06; (B) doador 134/06 x paciente 280/06; (C) doador 941/06 x paciente 939/06.

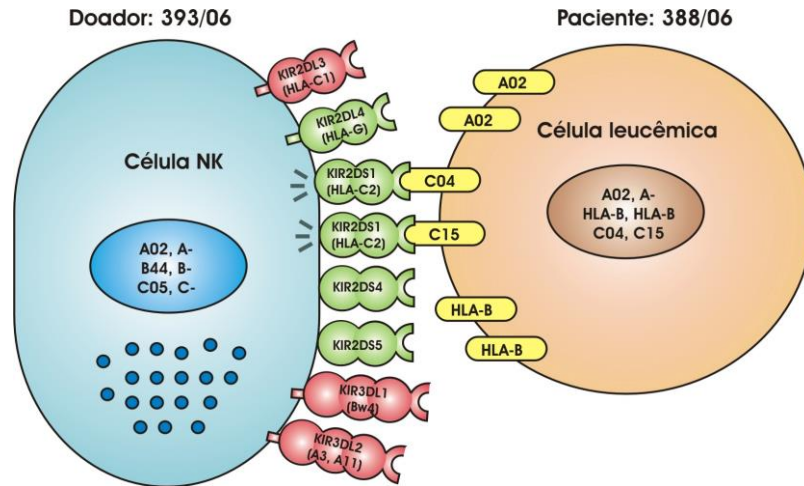


Figura 17 - Possíveis ligações entre o KIR do doador e HLA do paciente. Na célula do doador: genótipo HLA no núcleo e os receptores KIR inibidores (vermelho) e KIR ativadores (verde) na superfície. O genótipo de HLA do paciente está representado tanto no núcleo quanto na superfície da célula. Doador 393/06 x paciente 388/06.

6. DISCUSSÃO

Foram avaliados por citometria de fluxo os valores absolutos e percentuais das populações de linfócitos T, linfócitos TNK, células NK e as subpopulações de CD56^{dim} e CD56^{bright} em um grupo de 52 indivíduos saudáveis, com idades variando de 3 a 66 anos. A grande maioria era de adultos, sendo apenas 9 indivíduos com menos de 18 anos e 6 com mais de 50 anos. Os valores encontrados neste estudo em comparação com outros autores estão representados na **tabela 15**. Os valores absolutos de linfócitos T (1205 células/mm³, variando de 674 a 2491 células/mm³) estão de acordo com os valores encontrados em um estudo alemão (Jentsch-Ulrich et al., 2005) realizado em adultos de 19 a 85 anos, sendo que a maioria dos indivíduos apresentava idade entre 20 e 60 anos (1320 células/mm³, de 780 a 2240 células/mm³). Os valores de linfócitos TNK encontrados no presente estudo (66,5 células/mm³, de 16 a 165 células/mm³) estão de acordo com um estudo espanhol (72 ± 46 células/mm³). Esta semelhança deve estar relacionada ao fato de que no nosso estudo a grande maioria dos indivíduos estudados é adulta, e no espanhol foram estudados 14 indivíduos com idades de 19 a 39 anos (Borrego et al., 1999). Os valores percentuais encontrados para a população de linfócitos T e linfócitos TNK também estão de acordo com os estudos alemão (Jentsch-Ulrich et al., 2005) e espanhol (Borrego et al., 1999), apesar das diferenças no número de amostras e na faixa etária entre estes três estudos.

Os valores absolutos de células NK encontrados no nosso estudo (123 células/mm³, de 37 a 349 células/mm³) foram menores do que os de um estudo alemão (Jentsch-Ulrich et al., 2005) em indivíduos de 19 a 85 anos (280 células/mm³, de 80 a 690 células/mm³), do estudo realizado na Espanha (Borrego et al., 1999) em indivíduos de 19 a 39 anos (291 ± 87 células/mm³) e de um estudo realizado no Reino Unido (Chidrawar et al.; 2006) em indivíduos de 20 a 40 anos (194,9 ± 140,4 células/mm³) e de 40 a 60 anos (187,6 ± 144,5

células/mm³). Os valores absolutos das subpopulações CD56^{dim} e CD56^{bright} também foram menores do que os encontrados por estes autores (**tabela 15**).

Tabela 15 – Resultados encontrados nas populações de células avaliadas: comparação entre este estudo e de outros autores.

População	Este estudo	Jentsch-Ulrich et al., 2005	Borrego et al., 1999	Chidrawar et al.; 2006
	Brasileira	Alemã	Espanhola	Britânica
Faixa etária (N)	3 a 66 anos (52)	19 a 85 anos (100)	Grupo 1: 19 a 39 anos (14), grupo 2: 77 a 89 anos (19)	Grupo 1: 20 a 40 anos (25), grupo 2: 41 a 60 anos (23), grupo 3: > 60 anos (67)
Valor absoluto de linfócitos T*	1205 (674 a 2491)	1320 (780 a 2240)	Grupo 1: 1485 ± 350, Grupo 2: 982 ± 380	-----
Valor percentual de linfócitos T	72,48% (58,32 a 83,68%)	53 a 83%	Grupo 1: 77% ± 8% Grupo 2: 60% ± 9%	-----
Valor absoluto de linfócitos TNK*	66,5 (16 a 165)	-----	Grupo 1: 72 ± 46 Grupo 2: 80 ± 35	-----
Valor percentual de linfócitos TNK	3,73% (0,55 a 8,45%)	-----	Grupo 1: 4% ± 3% Grupo 2: 9% ± 4%	-----
Valor absoluto de células NK*	123 (37 a 349)	280 (80 a 690)	Grupo 1: 291 ± 87 Grupo 2: 407 ± 176	Grupo 1: 194,9 ± 140,4 Grupo 2: 187,6 ± 144,5 Grupo 3: 205,8 ± 184,0
Valores percentuais de células NK	8,38% (2,57 a 16,85%)	5 a 32%	Grupo 1: 14% ± 3% Grupo 2: 32% ± 10%	Grupo 1: 9,25% ± 6,1% Grupo 2: 10,59% ± 7,5% Grupo 3: 11,22% ± 9,1%
Valores absolutos de CD56^{dim}*	113 (26 a 340)	-----	Grupo 1: 280 ± 86 Grupo 2: 392 ± 148	Grupo 1: 179 ± 135,3 Grupo 2: 174,8 ± 135 Grupo 3: 197,7 ± 180,3
Valores percentuais de CD56^{dim}	95,59% (89,29 a 99,25%)	-----	Grupo 1: 92% ± 5% Grupo 2: 97% ± 4%	Resultado não mostrado
Valores absolutos de CD56^{bright}*	6 (2 a 13)	-----	Grupo 1: 25 ± 18 Grupo 2: 18 ± 14	Grupo 1: 15,64 ± 12,8 Grupo 2: 12,81 ± 12 Grupo 3: 8,13 ± 7,9
Valores percentuais de CD56^{bright}	4,41% (0,75 a 10,71%)	-----	Grupo 1: 6% ± 3% Grupo 2: 3% ± 2%	Resultado não mostrado

* os valores absolutos estão representados em células/mm³

Os valores percentuais de células NK neste estudo (8,38 %, de 2,57 a 16,85%) foram bem menores que os da população alemã (5 a 32%) e espanhola ($14 \pm 3\%$ na faixa etária de 19 a 39 anos), mas foram semelhantes ao da população britânica, que apresentou 9,25% ($\pm 6,61\%$) no grupo de 20 a 40 anos e 10,59% ($\pm 7,5\%$) no grupo de 41 a 60 anos. Os valores percentuais das subpopulações de células NK CD56^{dim} e CD56^{bright} são semelhantes aos encontrados pelo estudo realizado na Espanha (**tabela 15**).

No nosso estudo foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa da distribuição das células NK entre os gêneros. O gênero masculino apresentou maior valor absoluto de células NK em comparação ao gênero feminino ($Z = 2,17$ e $p < 0,05$). Este resultado está de acordo com o estudo realizado por Jentsch-Ulrich et al. (2005) em uma população de 100 indivíduos adultos e de Rudy et al (2002) em uma população de 198 adolescentes.

Foi encontrada uma diminuição da distribuição dos valores absolutos de CD56^{bright} com o aumento da idade ($r = -0,304$ e $p = 0,047$). Não foi encontrada uma correlação linear entre as outras populações estudadas e a idade. Este resultado está de acordo com o encontrado por Chidrawar et al. (2006) que associou diminuição da subpopulação CD56^{bright} com o envelhecimento, mas não com Borrego et al. (1999), que não encontrou diferença na distribuição de CD56^{bright} com a idade e sim um aumento de CD56^{dim} com o envelhecimento.

As diferenças encontradas nos valores absolutos e percentuais das células NK e suas subpopulações, entre este estudo e os resultados dos autores europeus podem estar relacionadas com as características únicas da população brasileira, refletir diferenças metodológicas ou o número de indivíduos estudados. Existem também diferenças entre o estudo espanhol e britânico sobre os valores absolutos e percentuais de células NK e suas subpopulações no envelhecimento. Os valores encontrados para as populações de linfócitos T

e TNK estão de acordo com o descrito na literatura, conforme observado na **tabela 15** (Borrego et al., 1999; Jentsch-Ulrich et al., 2005; Chidrawar et al.; 2006).

Foi estudada a atividade citotóxica de 29 indivíduos saudáveis (idades de 12 a 59 anos) e como resultado foi encontrada uma mediana de 20,5%. Este valor se assemelha a um outro estudo realizado em 40 indivíduos da população brasileira, onde foi encontrada uma mediana de 19% (De La Rocque et al., 1988). No nosso estudo não foi encontrada uma correlação entre atividade NK e idade, o que pode estar relacionado ao pequeno número de crianças estudadas (2 indivíduos com menos de 18 anos). Na literatura está descrito que há um aumento pequeno, mas significativo, da atividade citotóxica do nascimento à idade adulta. Durante a idade adulta não há correlação com a idade e uma queda na atividade NK é observada apenas a partir de 75 anos (Pross e Baines, 1982; De La Rocque et al., 1988; Monccheagiani e Malavolta, 2004). No nosso estudo não foi encontrada uma influência do gênero na atividade NK, o que está de acordo com outros estudos realizados na população brasileira (De La Rocque et al., 1988; Souza et al., 2001), mas não com um estudo realizado em Israel, que encontrou um aumento da atividade citotóxica no gênero masculino (Yovel et al., 2001).

Foi estudada a correlação entre os valores absolutos de células NK e a atividade citotóxica. O número de células NK e o de CD56^{dim} apresentaram uma correlação linear positiva com a atividade NK, enquanto a subpopulação CD56^{bright} não influenciou a atividade citotóxica. Este resultado está de acordo com o esperado, já que CD56^{dim} é a população de células NK responsável pela atividade citotóxica natural, enquanto a CD56^{bright} é responsável por produção de citocinas e apresenta atividade citotóxica considerável apenas após estímulos com citocinas, como a IL-2 (Cooper¹ et al., 2001).

Foi estudado o genótipo KIR e HLA de 11 indivíduos saudáveis, sendo que a maioria dos indivíduos (7 em 11) eram brancos. Todos os 11 doadores saudáveis estudados

apresentavam receptores KIR inibidores para os quais não possuíam ligantes em seu genótipo de HLA e 2 indivíduos apresentavam ligantes de HLA em seu genótipo para os quais não possuíam receptores KIR inibidores. Estes resultados sugerem que não é possível prever de forma precisa o genótipo KIR a partir da genotipagem HLA, como é feito por autores que identificam a incompatibilidade KIR através do modelo ligante-ligante, mostrando a importância da avaliação direta do repertório KIR, ou seja, o modelo receptor-ligante (Leung et al., 2004; Witt e Christiansen et al., 2006).

O único gene KIR presente em todos os doadores foi o KIR3DL2, cujo ligante ainda não está bem definido, embora já tenha sido identificado o A3 e A11. Os outros genes KIR mais frequentes foram: 2DL1, 2DL3, 3DL1 e 3DL3. Estes resultados estão de acordo com outro estudo realizado em 118 indivíduos da população brasileira (Oliveira et al., 2006). Porém, este último estudo encontrou frequência intermediária para o 2DL3 e inclui no grupo de maior frequência os genes 2DL4 e 2DS4. No nosso estudo, as frequências destes genes KIR foram intermediárias. Outros genes com frequência intermediária foram: 2DL2, 2DS1 e 2DS2. O estudo de Oliveira et al. também encontrou frequência intermediária para o 2DL2 e 2DS2, porém encontrou baixa frequência para o 2DS1. No nosso estudo, os genes KIR 2DL5, 2DS5 e 3DS1 estavam presentes em apenas 5 indivíduos e o 2DS3 em apenas 3. No outro estudo brasileiro, estes genes KIR apresentavam frequência baixa. Estes resultados mostram uma distribuição de genes KIR semelhante, mas com algumas diferenças que podem estar relacionadas com o pequeno tamanho de nossa amostra (apenas 11 indivíduos) e com as características étnicas, pois no nosso estudo houve predomínio de brancos, enquanto no de Oliveira et al. (2006) houve predomínio de mestiços.

O desenvolvimento e a progressão do câncer são facilitados pela capacidade das células tumorais de escapar da imunovigilância de células efetoras imunes, incluindo as células NK. Estas células medeiam à morte espontânea de várias células tumorais sem

precisar de sensibilização prévia e fornecem uma das primeiras linhas de defesa contra o câncer. Apesar de existirem numerosos estudos sugerindo que as células NK são importantes para a imunovigilância contra leucemia, ainda não há um consenso de quais subtipos de leucemias são mais susceptíveis à atividade NK. Este conhecimento é essencial, pois pode ajudar a definir quais pacientes poderiam ser beneficiados por uma imunoterapia adotiva de células NK (Oshimi et al., 1983; Yan et al., 1998; Ruggeri et al., 1999; Romanski et al., 2005; Passweg et al., 2006).

Com objetivo de definir a sensibilidade de diferentes leucemias agudas, foi estudada a atividade NK de doadores saudáveis contra amostras de 15 pacientes. As LLA foram mais susceptíveis (3 em 8 casos) em comparação às LMA (1 em 6 casos). Este resultado difere do encontrado por Ruggeri et al. (1999) e Pende et al. (2005), que sugeriram que as LLA seriam mais resistentes que as LMA. Um outro autor (Yan et al., 1998) encontrou maior sensibilidade das LLA em relação às LMA, mas do subtipo T, pois 100% das amostras de LLA-T estudadas foram susceptíveis à atividade NK. Outro grupo, estudando apenas casos de LLA, também observou que 100% das LLA-T foram sensíveis à atividade NK (Romanski et al., 2005). No nosso estudo, havia apenas um caso de LLA-T e este foi resistente à atividade NK.

Com relação à LLA de linhagem B, nós verificamos que 3 dos 7 casos foram susceptíveis. Yan et al. (1998) observou uma proporção semelhante, 5 de 14 amostras de LLA-B foram sensíveis à atividade NK. Estes dois estudos discordam do de Romanski et al. (2005), que encontrou resistência de todas as amostras obtidas de pacientes com LLA-B. Os estudos de Yan et al. (1998) e Romanski et al. (2005) não fizeram a classificação dos subtipos de LLA-B. No nosso estudo, 1 em 5 casos de LLA-B precoce e 2 em 2 dos casos de LLA pré-B foram susceptíveis à atividade NK. Estes resultados sugerem que pode haver diferença de sensibilidade entre os subtipos de LLA-B, e que o fenótipo pré-B seria o mais susceptível à atividade NK.

Neste estudo, quase todas as amostras de LMA foram resistentes à atividade NK, entre os 6 casos estudados apenas 1 foi sensível. Todos os quatro casos de LMA secundários à SMD foram resistentes à lise mediada por células NK. Apenas 2 casos de LMA não eram secundários à SMD e entre estes um foi sensível. Não foi encontrada nenhuma correlação entre a classificação FAB e a susceptibilidade à atividade citotóxica. Yan et al. (1998) encontrou 6 em 12 casos de LMA sensíveis e também não encontrou nenhuma correlação da susceptibilidade com a classificação FAB. Porém, este autor não comentou se os pacientes estudados apresentavam LMA *de novo* ou secundária à SMD.

O único caso de LBA foi estudado em dois momentos (com dois doadores distintos, um aparentado e outro não aparentado) e foi resistente à atividade NK. Este é um resultado inédito, pois não há relatos na literatura sobre a susceptibilidade deste tipo raro de leucemia. Por este motivo, este caso foi submetido à publicação na revista *Haematológica* (anexo G). Esta doença é considerada de mau prognóstico e este paciente sofreu óbito por evolução da doença durante recaída pós TCTH.

Não foi encontrada uma correlação entre a susceptibilidade à atividade NK e a sobrevida dos pacientes tratados com quimioterapia. Isto pode estar relacionado ao fato de que não havia células NK alogeneicas atuando nestes pacientes. Além disso, a grande maioria dos pacientes teve septicemia como causa de óbito, o que sugere uma imunossupressão devido ao tratamento, de forma que as células NK autólogas não puderam atuar. Para confirmar esta sugestão, seria interessante fazer um acompanhamento do paciente através de ensaios de atividade citotóxica de células NK autólogas contra as células leucêmicas primárias congeladas e a K562 como controle. Existem relatos na literatura de que células NK podem ter potencial citotóxico contra células leucêmicas primárias autólogas, tanto em casos de LMA quanto de LLA (Torelli et al., 2002; Torelli et al., 2005).

Com relação aos três casos de pacientes submetidos ao TCTH, em dois deles os ensaios de citotoxicidade foram realizados com o mesmo doador HLA idêntico do transplante. Um paciente foi resistente à atividade NK e sofreu óbito por evolução da doença. O outro paciente foi susceptível à atividade NK, não sofreu óbito, mas atualmente se encontra em recaída. O único paciente de TCTH que não utilizamos no ensaio de citotoxicidade o mesmo doador do transplante foi resistente à atividade NK e sofreu óbito por evolução da doença apenas 23 dias após o TCTH. Os dois pacientes submetidos ao TCTH que sofreram óbito devido à evolução da doença não foram transplantados em remissão completa. Um deles apresentava doença refratária e o outro tinha respondido apenas de forma parcial à quimioterapia.

Outra questão importante é que todos os TCTH deste estudo foram feitos na ausência de depleção de células T. O único paciente que tomou ATG, o que poderia acarretar numa depleção de células T *in vivo*, foi transplantado em franca doença e faleceu por evolução da leucemia apenas 23 dias após o TCTH. Na literatura tem sido sugerido que o potencial aloreativo das células NK se torna mais evidente com depleção de linfócitos T, o que pode estar relacionado à omissão ou diminuição do regime profilático da DECH neste tipo de transplante, o que facilita uma reconstituição imunológica rápida e permite os efeitos benéficos da aloreatividade de células NK (Ruggeri et al., 2002; Giebel et al., 2003; Leung et al., 2004; Bishara et al., 2004; Bornhäuser et al., 2004; Cook et al., 2004; Beelen et al., 2005; Hsu et al., 2005; Witt e Christiansen et al., 2006).

A atividade citotóxica das células NK é regulada pelo equilíbrio dos sinais gerados pela ligação de receptores ativadores e inibidores a moléculas específicas nas células alvo (Farag et al., 2002; Raulat, 2004). De acordo com a teoria do “missing-self”, apesar de tolerantes com as células autólogas normais, as células NK conseguem reconhecer e atacar células autólogas que tenham baixa expressão de HLA classe I, como células tumorais e

infectadas por vírus (Ljunggren e Karre, 1990). Os receptores de células NK de várias famílias reconhecem epítomos de HLA. Os melhor caracterizados e considerados mais importantes pertencem à família KIR, que inclui receptores ativadores e inibidores (Moretta e Moretta, 2004; Farag e Caligiuri, 2006). Estudos realizados em TCTH haploidênticos demonstraram que incompatibilidade KIR levava à geração de clones de células NK aloreativos, causando uma diminuição nos riscos de recaída através de lise de células leucêmicas residuais (Ruggeri et al., 1999; Ruggeri et al., 2002; Velardi et al., 2002).

No nosso estudo, foi verificado se a relação entre KIR do doador e HLA do paciente influenciava o resultado da atividade citotóxica contra as células leucêmicas primárias. Foi observado que 3 em 4 casos em que os pacientes apresentavam ligantes para todos os KIR inibidores do doador foram resistentes à atividade NK. Estes resultados estão de acordo com o esperado, pois quando não há incompatibilidade KIR, não há potencial aloreativo (Ruggeri et al., 1999). No entanto, houve uma exceção neste grupo de ausência de incompatibilidade KIR, pois um paciente que apresentava LLA-B precoce foi susceptível à atividade NK, apresentando 83,28% de lise. Sugerimos que este resultado possa ser devido à diminuição da expressão de HLA-I. Para confirmar esta sugestão, seria necessário realizar um estudo da expressão de HLA nas células leucêmicas deste paciente. Essa perda de expressão de HLA ocorre em alguns casos de leucemia e embora funcione como mecanismo de escape aos linfócitos T, permite a ativação das células NK por não apresentar ligantes para receptores inibidores que reconhecem HLA (Robertson e Ritz, 1990; Ljunggren e Karre, 1990; Farag et al., 2002; Uhrberg², 2005; Pende et al., 2005).

Havia 5 casos em que os pacientes apresentavam ausência de ligante de HLA para um receptor KIR inibidor entre 3 ou 4 KIR inibidores identificados para o doador.. Todos estes casos foram resistentes à atividade NK, fugindo da regra de que basta uma incompatibilidade KIR para haver potencial aloreativo nas células NK. Nós sugerimos que esta diferença esteja

relacionada ao fato de estudarmos o papel antileucêmico das células NK *in vitro*, sem ativação por citocinas, enquanto os outros estudos se baseiam em preparação de clones de células NK com citocinas e/ou de acompanhamento após TCTH (Ruggeri et al., 1999, Ruggeri et al., 2002; Farag et al., 2002).

Foram encontrados 4 casos em que os pacientes tinham ausência de ligante de HLA para metade ou mais dos KIR inibidores dos doadores com ligantes conhecidos. Destes, 3 casos foram susceptíveis à atividade NK. Estes resultados sugerem que *in vitro* com células NK não ativadas seja necessário um maior número de incompatibilidades KIR para haver potencial aloreativo. Houve uma exceção neste grupo de um paciente que apresentava ausência de ligantes de HLA para 2 dos 3 KIR inibidores do doador e foi resistente à atividade NK, apresentando lise de 4,52%. É importante ressaltar que a atividade NK deste mesmo doador contra a K562 também foi baixa, 8,07% de lise, embora a mediana de atividade NK de doadores contra a K562 seja de 20,5%. A partir desta observação, nós sugerimos que a possível explicação para esta exceção é que o doador apresenta atividade citotóxica baixa independente da célula alvo.

Portanto este estudo mostrou que, diferente da literatura, com pequeno grau de incompatibilidade KIR (apenas 1 incompatibilidade entre 3 ou 4 KIR inibidores) houve resistência à atividade NK, com exceção de um paciente com LLA-B precoce, que apesar da total ausência de incompatibilidade KIR foi susceptível à atividade NK. Quando houve um nível maior de incompatibilidade KIR (pelo menos metade dos KIR inibidores identificados para o doador) ocorreu sensibilidade à atividade citotóxica, com percentual de lise variando de 15,76% a 26,77%. A única exceção neste grupo foi um paciente com LLA-T que, apesar de apresentar alto grau de incompatibilidade KIR, foi resistente à atividade NK. Esta diferença da literatura sugere a importância de estudar se a resistência/susceptibilidade à lise

continua com o mesmo padrão em relação à incompatibilidade KIR se as células NK estiverem ativadas com IL-2.

Dos 13 pares doador/paciente em que foram estudados os genótipos KIR e HLA, dois casos eram de doadores/pacientes HLA idênticos aparentados. No primeiro caso, o paciente apresentava LBA e o estudo KIR e HLA mostrou ausência de potencial aloreativo, compatível com a resistência à atividade NK observada *in vitro*. Este paciente recaiu após o TCTH e sofreu óbito por evolução da doença. No segundo caso, o paciente apresentava LMA-M2, a genotipagem KIR e HLA sugeriram um potencial aloreativo e as células leucêmicas do paciente foram susceptíveis à atividade NK. Este paciente respondeu à ILD, mas atualmente se encontra em recaída após o TCTH.

Relacionado ao TCTH aparentado HLA idêntico, Hsu et al. (2005) observou que a incompatibilidade KIR influenciou o resultado do transplante. O grupo de pacientes com LMA e SMD com mais de uma incompatibilidade KIR apresentou melhor sobrevida livre de doença em comparação ao grupo com apenas uma incompatibilidade KIR, que apresentou melhores resultados que o grupo sem incompatibilidade KIR. Os nossos resultados junto com os desse autor sugerem que quanto maior o número de incompatibilidades KIR entre o doador e o paciente, maior o potencial aloreativo, mesmo em casos em que o doador é HLA idêntico ao paciente.

Por muito tempo foi considerado que o efeito ECL provinha das células T maduras do doador que eram infundidas no momento do TCTH e/ou da ILD. No entanto, estas células têm levado o paciente a sofrer uma reação que acarreta a DECH. Apesar do progresso de profilaxia contra esta doença, ela é ainda responsável por uma significativa morbidade e mortalidade no pós-transplante. Recentemente foi encontrada uma aloreatividade benigna relacionada às células NK. Esta aloreatividade é proveniente da incompatibilidade KIR

(Ruggeri et al., 2002; Velardi et al., 2002; Reddy e Ferrara, 2003; Barret et al., 2003; Kolb et al., 2004; Passweg et al., 2006).

Embora o tamanho da amostra seja pequeno, nossos resultados enfatizam que as células NK aloreativas podem ter um papel antileucêmico importante, o que sugere que uma imunoterapia baseada em células NK seja de grande valia para tratar leucemias agudas. Os resultados do presente estudo indicam que pacientes com LLA, principalmente do subtipo pré-B, assim como pacientes com LMA *de novo*, poderiam ser os principais beneficiados desta terapia. Além disso, apesar do pequeno tamanho da amostra, nosso estudo mostrou que mesmo doadores HLA-idêntico ao paciente podem apresentar potencial aloreativo e atividade antileucêmica, sugerindo que esta imunoterapia poderia ser utilizada a partir de células NK de doadores aparentados e não aparentados.

Este estudo foi baseado nos receptores KIR cujos ligantes se encontram atualmente definidos na literatura. Os receptores KIR cujos ligantes são desconhecidos poderiam também estar atuando na regulação da atividade citotóxica das células NK neste estudo, ressaltando a importância da identificação destes ligantes. Além disso, outros receptores de células NK poderiam estar atuando no reconhecimento da célula alvo nas amostras estudadas.

Uma continuação interessante deste trabalho seria estudar a expressão de fatores co-estimulatórios, como LFA-1; a expressão de ligantes conhecidos para outros receptores ativadores de células NK, como MICA e MICB; além da expressão de HLA-I nas células leucêmicas. A correlação destes novos estudos com os resultados da atividade NK e do genótipo KIR e HLA poderia ajudar a entender mecanismos de resistência de leucemias à atividade NK, o que ajudaria a desenvolver uma imunoterapia baseada nestas células para tratar pacientes com leucemias agudas.

7. CONCLUSÕES:

- Podemos concluir que o perfil imunofenotípico dos doadores saudáveis para os linfócitos T e linfócitos TNK estão de acordo com a literatura. Com relação às células NK e suas subpopulações CD56^{dim} e CD56^{bright}, nosso estudo apresentou valores menores que os encontrados na literatura.
- Entre as populações de células estudadas, a subpopulação de células NK CD56^{bright} foi à única que diminuiu com o aumento da idade.
- Os valores de atividade NK encontrados estão semelhantes a outros estudos brasileiros.
- Conforme esperado, houve uma correlação entre a atividade citotóxica e os valores absolutos de células NK e CD56^{dim}, mas não de CD56^{bright}.
- Foi observado, através do estudo do genótipo KIR e HLA, que não é possível prever o repertório KIR através apenas da análise de HLA, como é proposto no modelo ligante-ligante.
- A frequência encontrada para os genes KIR neste estudo está semelhante a outro relato da literatura sobre a população brasileira.
- Embora o tamanho da nossa amostra seja pequeno, nossos resultados sugerem que a LLA pré-B seria o subtipo de LLA mais susceptível à atividade NK e os casos de LMA secundários à SMD os mais resistentes.
- O caso de LBA é o primeiro relato na literatura sobre a resistência à atividade NK e sua correlação com o genótipo KIR e HLA.
- Sugerimos que não houve correlação entre a susceptibilidade à atividade NK e a sobrevida dos pacientes tratados com quimioterapia devido à ausência de células NK aloreativas e à imunossupressão das células NK autólogas.

- Nos três pacientes submetidos ao TCTH parece que houve uma correlação entre a sobrevida e a susceptibilidade à atividade NK.
- Houve uma correlação da incompatibilidade KIR entre doador e paciente com a susceptibilidade à lise das células leucêmicas, embora com duas exceções.
- Os nossos resultados sugerem que quanto maior o número de incompatibilidades KIR entre doador e paciente, maior o potencial aloreativo das células NK.
- A partir do papel antilêucêmico encontrado nos ensaios de atividade citotóxica e genótipo KIR e HLA, apesar do pequeno tamanho da amostra, sugerimos que uma imunoterapia de células NK de doador poderia beneficiar pacientes com diferentes tipos de leucemias agudas.

REFERÊNCIAS

- Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C. S., Roetynck, S., Stewart, C. A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., Romagne, F., Ugolini, S., and Vivier, E., Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I, *Immunity*, Vol. 25, No. 2, pp. 331-342, 2006
- Arai, S. and Vogelsang, G. B., Management of graft-versus-host disease, *Blood Rev.*, Vol. 14, No. 4, pp. 190-204, 2000.
- Asai, O., Longo, D. L., Tian, Z. G., Hornung, R. L., Taub, D. D., Ruscetti, F. W., and Murphy, W. J., Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation, *J.Clin.Invest*, Vol. 101, No. 9, pp. 1835-1842, 1998.
- Aul, C., Bowen, D. T., and Yoshida, Y., Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes, *Haematologica*, Vol. 83, No. 1, pp. 71-86, 1998.
- Barrett, A. J. and Savani, B. N., Stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning regimens: a review of ten years experience with new transplant concepts and new therapeutic agents, *Leukemia*, Vol. 20, No. 10, pp. 1661-1672, 2006.
- Barrett, A. J. and van Rhee, F., Graft-versus-leukaemia, *Baillieres Clin. Haematol.*, Vol. 10, No. 2, pp. 337-355, 1997.
- Barrett, A. J., Rezvani, K., Solomon, S., Dickinson, A. M., Wang, X. N., Stark, G., Cullup, H., Jarvis, M., Middleton, P. G., and Chao, N., New developments in allotransplant immunology, *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.*, pp. 350-371, 2003.
- Beelen, D. W., Ottinger, H. D., Ferencik, S., Elmaagacli, A. H., Peceny, R., Trenschele, R., and Grosse-Wilde, H., Genotypic inhibitory killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility enhances the long-term antileukemic effect of unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias, *Blood*, Vol. 105, No. 6, pp. 2594-2600, 2005.
- Bishara, A., De Santis, D., Witt, C. C., Brautbar, C., Christiansen, F. T., Or, R., Nagler, A., and Slavin, S., The beneficial role of inhibitory KIR genes of HLA class I NK epitopes in haploidentically mismatched stem cell allografts may be masked by residual donor-alloreactive T cells causing GVHD, *Tissue Antigens*, Vol. 63, No. 3, pp. 204-211, 2004.
- Blazar, B. R. and Murphy, W. J., Bone marrow transplantation and approaches to avoid graft-versus-host disease (GVHD), *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, Vol. 360, No. 1461, pp. 1747-1767, 2005.
- Blery, M., Olcese, L., and Vivier, E., Early signaling via inhibitory and activating NK receptors, *Hum. Immunol.*, Vol. 61, No. 1, pp. 51-64, 2000.
- Blom, B. and Spits, H., Development of human lymphoid cells, *Annu. Rev. Immunol.*, Vol. 24, pp. 287-320, 2006.

Bornhauser, M., Schwerdtfeger, R., Martin, H., Frank, K. H., Theuser, C., and Ehninger, G., Role of KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors, *Blood*, Vol. 103, No. 7, pp. 2860-2861, 2004.

Borrego, F., Alonso, M. C., Galiani, M. D., Carracedo, J., Ramirez, R., Ostos, B., Pena, J., and Solana, R., NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people, *Exp. Gerontol.*, Vol. 34, No. 2, pp. 253-265, 1999.

Borrego, F., Kabat, J., Kim, D. K., Lieto, L., Maasho, K., Pena, J., Solana, R., and Coligan, J. E., Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells, *Mol. Immunol.*, Vol. 38, No. 9, pp. 637-660, 2002.

Cappello, P., Novelli, F., Forni, G., and Giovarelli, M., Death receptor ligands in tumors, *J. Immunother.*, Vol. 25, No. 1, pp. 1-15, 2002.

Carrington, M., Norman, P. The KIR gene cluster. National Library of Medicine, United States of America, NCBI, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mono_003.TOC&depth=2> Acesso em 07 mar. 2007.

Cheng, J. and Sakamoto, K. M., Topics in pediatric leukemia--acute myeloid leukemia, *Med Gen Med.*, Vol. 7, No. 1, pp. 20, 2005.

Chidrawar, S. M., Khan, N., Chan, Y. L., Nayak, L., and Moss, P. A., Ageing is associated with a decline in peripheral blood CD56bright NK cells, *Immun. Ageing*, Vol. 3, pp. 10, 2006.

Claret, E. J., Alyea, E. P., Orsini, E., Pickett, C. C., Collins, H., Wang, Y., Neuberg, D., Soiffer, R. J., and Ritz, J., Characterization of T cell repertoire in patients with graft-versus-leukemia after donor lymphocyte infusion, *J. Clin. Invest*, Vol. 100, No. 4, pp. 855-866, 1997.

Cook, M. A., Milligan, D. W., Fegan, C. D., Darbyshire, P. J., Mahendra, P., Craddock, C. F., Moss, P. A., and Briggs, D. C., The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia, *Blood*, Vol. 103, No. 4, pp. 1521-1526, 2004.

Cooper¹, M. A., Fehniger, T. A., and Caligiuri, M. A., The biology of human natural killer-cell subsets, *Trends Immunol.*, Vol. 22, No. 11, pp. 633-640, 2001.

Cooper², M. A., Fehniger, T. A., Turner, S. C., Chen, K. S., Ghaheri, B. A., Ghayur, T., Carson, W. E., and Caligiuri, M. A., Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset, *Blood*, Vol. 97, No. 10, pp. 3146-3151, 2001.

Davies, S. M., Ruggieri, L., DeFor, T., Wagner, J. E., Weisdorf, D. J., Miller, J. S., Velardi, A., and Blazar, B. R., Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor, *Blood*, Vol. 100, No. 10, pp. 3825-3827, 2002.

De La Rocque, L., Zalis, M., Goulart, J., Rumjanek, V. M. Espectro de atividade NK em um pequeno grupo populacional brasileiro. *Rev. Bras. Cancerol.* V. 34, n. 1, p. 19-25, 1988

de Souza, M. H., Diamond, H. R., Santos, M. P., Silva, M. L., de Azevedo, A. M., Wajnberg, H., da Silva, T. M., Schmidt, L. H., Deterling, L. C., Campos, M. M., Harab, R. C., and Basica, P., Immunophenotypic study of acute lymphoblastic leukemia (a prospective study in Brazilian children), *Med. Pediatr. Oncol.*, Vol. 31, No. 3, pp. 185-186, 1998.

Delluc, S., Tourneur, L., Fradelizi, D., Rubio, M. T., Marchiol-Fournigault, C., Chiocchia, G., and Buzyn, A., DC-based vaccine loaded with acid-eluted peptides in acute myeloid leukemia: the importance of choosing the best elution method, *Cancer Immunol. Immunother.*, Vol. 56, No. 1, pp. 1-12, 2007.

Devetten, M. P. and Vose, J. M., Graft-versus-host disease: how to translate new insights into new therapeutic strategies, *Biol. Blood Marrow Transplant.*, Vol. 10, No. 12, pp. 815-825, 2004.

Di Santo, J. P., Natural killer cell developmental pathways: a question of balance, *Annu. Rev. Immunol.*, Vol. 24, pp. 257-286, 2006.

Diamond, H. R., Souza, M. H., Bouzas, L. F., Tabak, D. G., Campos, M. M., Camara, F. P., and Rumjanek, V. M., Deficit of T-cell recovery after allogeneic bone marrow transplantation in chronic myeloid leukemia patients, *Anticancer Res.*, Vol. 15, No. 4, pp. 1553-1560, 1995.

Dordelmann, M., Reiter, A., Borkhardt, A., Ludwig, W. D., Gotz, N., Viehmann, S., Gadner, H., Riehm, H., and Schrappe, M., Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia, *Blood*, Vol. 94, No. 4, pp. 1209-1217, 1999.

Farag, S. S. and Caligiuri, M. A., Human natural killer cell development and biology, *Blood Rev.*, Vol. 20, No. 3, pp. 123-137, 2006.

Farag, S. S., Fehniger, T. A., Ruggeri, L., Velardi, A., and Caligiuri, M. A., Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect, *Blood*, Vol. 100, No. 6, pp. 1935-1947, 2002.

Farias, M. G., Castro, S. M., Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, V. 40, n. 2, p. 91-8, 2004

Fehniger, T. A., Cooper, M. A., Nuovo, G. J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., and Caligiuri, M. A., CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity, *Blood*, Vol. 101, No. 8, pp. 3052-3057, 2003.

Fernandez, N. C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E., and Zitvogel, L., Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo, *Nat. Med.*, Vol. 5, No. 4, pp. 405-411, 1999.

Fernandez, N. C., Treiner, E., Vance, R. E., Jamieson, A. M., Lemieux, S., and Raulet, D. H., A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules, *Blood*, Vol. 105, No. 11, pp. 4416-4423, 2005.

Gendzekhadze, K., Norman, P. J., Abi-Rached, L., Layrisse, Z., and Parham, P., High KIR diversity in Amerindians is maintained using few gene-content haplotypes, *Immunogenetics*, Vol. 58, No. 5-6, pp. 474-480, 2006.

Giebel, S., Locatelli, F., Lamparelli, T., Velardi, A., Davies, S., Frumento, G., Maccario, R., Bonetti, F., Wojnar, J., Martinetti, M., Frassoni, F., Giorgiani, G., Bacigalupo, A., and Holowiecki, J., Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors, *Blood*, Vol. 102, No. 3, pp. 814-819, 2003.

Gilfillan, S., Ho, E. L., Cella, M., Yokoyama, W. M., and Colonna, M., NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation, *Nat. Immunol.*, Vol. 3, No. 12, pp. 1150-1155, 2002.

Giralt, S., Hester, J., Huh, Y., Hirsch-Ginsberg, C., Rondon, G., Seong, D., Lee, M., Gajewski, J., Van Besien, K., Khouri, I., Mehra, R., Przepiorka, D., Korbling, M., Talpaz, M., Kantarjian, H., Fischer, H., Deisseroth, A., and Champlin, R., CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation, *Blood*, Vol. 86, No. 11, pp. 4337-4343, 1995.

Glas, R., Franksson, L., Une, C., Eloranta, M. L., Ohlen, C., Orn, A., and Karre, K., Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell phenotype. An adaptive component of NK cell-mediated responses, *J. Exp. Med.*, Vol. 191, No. 1, pp. 129-138, 2000.

Greenberg, P. L., Young, N. S., and Gattermann, N., Myelodysplastic syndromes, *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.*, pp. 136-161, 2002.

Herberman, R. B. Cancer immunotherapy with natural killer cells. *Seminars in Oncol.* V. 29, n. 3, p. 27-30, 2002.

Hoelzer, D. and Gokbuget, N., Recent approaches in acute lymphoblastic leukemia in adults, *Crit Rev. Oncol. Hematol.*, Vol. 36, No. 1, pp. 49-58, 2000.

Hoelzer, D., Gokbuget, N., Ottmann, O., Pui, C. H., Relling, M. V., Appelbaum, F. R., van Dongen, J. J., and Szczepanski, T., Acute lymphoblastic leukemia, *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.*, pp. 162-192, 2002.

Hoffman, R., Benz, E. J., Shattil, S. J., Furie, B., Cohen, H. J., Silberstein, L. E., McGlave, P. Hematology basic principles and practice. 4. ed. United Kingdom. Oxford: Churchill Livingstone, 2004.

Holbrook, N. J., Cox, W. I., and Horner, H. C., Direct suppression of natural killer activity in human peripheral blood leukocyte cultures by glucocorticoids and its modulation by interferon, *Cancer Res.*, Vol. 43, No. 9, pp. 4019-4025, 1983.

Houtenbos, I., Westers, T. M., Dijkhuis, A., de Gruijl, T. D., Ossenkoppele, G. J., and van de Loosdrecht, A. A., Leukemia-specific T-cell reactivity induced by leukemic dendritic

cells is augmented by 4-1BB targeting, *Clin. Cancer Res.*, Vol. 13, No. 1, pp. 307-315, 2007.

Hsu, K. C., Keever-Taylor, C. A., Wilton, A., Pinto, C., Heller, G., Arkun, K., O'Reilly, R. J., Horowitz, M. M., and Dupont, B., Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes, *Blood*, Vol. 105, No. 12, pp. 4878-4884, 2005.

Jaksch, M. and Mattsson, J., The pathophysiology of acute graft-versus-host disease, *Scand. J. Immunol.*, Vol. 61, No. 5, pp. 398-409, 2005.

Jennings, C. D. and Foon, K. A., Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy, *Blood*, Vol. 90, No. 8, pp. 2863-2892, 1997.

Jentsch-Ullrich, K., Koenigsmann, M., Mohren, M., and Franke, A., Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults--a monocentric German study, *Clin. Immunol.*, Vol. 116, No. 2, pp. 192-197, 2005.

Jouault, H. Place de la cytométrie en flux pour le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Revue Française des Laboratoires*, n. 344, p.25-30, 2002.

Kebriaei, P. and Larson, R. A., Progress and challenges in the therapy of adult acute lymphoblastic leukemia, *Curr. Opin. Hematol.*, Vol. 10, No. 4, pp. 284-289, 2003.

Keever, C. A., Small, T. N., Flomenberg, N., Heller, G., Pekle, K., Black, P., Pecora, A., Gillio, A., Kernan, N. A., and O'Reilly, R. J., Immune reconstitution following bone marrow transplantation: comparison of recipients of T-cell depleted marrow with recipients of conventional marrow grafts, *Blood*, Vol. 73, No. 5, pp. 1340-1350, 1989.

Killick, S., Matutes, E., Powles, R. L., Hamblin, M., Swansbury, J., Treleaven, J. G., Zomas, A., Atrá, A., and Catovsky, D., Outcome of biphenotypic acute leukemia, *Haematologica*, Vol. 84, No. 8, pp. 699-706, 1999.

Kolb, H. J., Schattenberg, A., Goldman, J. M., Hertenstein, B., Jacobsen, N., Arcese, W., Ljungman, P., Ferrant, A., Verdonck, L., Niederwieser, D., van Rhee, F., Mittermueller, J., de Witte, T., Holler, E., and Ansari, H., Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients, *Blood*, Vol. 86, No. 5, pp. 2041-2050, 1995.

Kolb, H. J., Schmid, C., Barrett, A. J., and Schendel, D. J., Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras, *Blood*, Vol. 103, No. 3, pp. 767-776, 2004.

Lanier, L. L., On guard--activating NK cell receptors, *Nat. Immunol.*, Vol. 2, No. 1, pp. 23-27, 2001.

Leung, W., Iyengar, R., Turner, V., Lang, P., Bader, P., Conn, P., Niethammer, D., and Handgretinger, R., Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells, *J. Immunol.*, Vol. 172, No. 1, pp. 644-650, 2004.

Levitt, L. and Lin, R., Biology and treatment of adult acute lymphoblastic leukemia, *West J. Med.*, Vol. 164, No. 2, pp. 143-155, 1996.

- Litvinova, E., Maury, S., Boyer, O., Bruel, S., Benard, L., Boisserie, G., Klatzmann, D., and Cohen, J. L., Graft-versus-leukemia effect after suicide-gene-mediated control of graft-versus-host disease, *Blood*, Vol. 100, No. 6, pp. 2020-2025, 2002.
- Liu, C. C., Walsh, C. M., Eto, N., Clark, W. R., and Young, J. D., Morphologic and functional characterization of perforin-deficient lymphokine-activated killer cells, *J. Immunol.*, Vol. 155, No. 2, pp. 602-608, 1995.
- Ljunggren, H. G. and Karre, K., In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition, *Immunol. Today*, Vol. 11, No. 7, pp. 237-244, 1990.
- Ljungman, P., Urbano-Ispizua, A., Cavazzana-Calvo, M., Demirer, T., Dini, G., Einsele, H., Gratwohl, A., Madrigal, A., Niederwieser, D., Passweg, J., Rocha, V., Saccardi, R., Schouten, H., Schmitz, N., Socie, G., Sureda, A., and Apperley, J., Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe, *Bone Marrow Transplant.*, Vol. 37, No. 5, pp. 439-449, 2006.
- Matutes, E., Morilla, R., Farahat, N., Carbonell, F., Swansbury, J., Dyer, M., and Catovsky, D., Definition of acute biphenotypic leukemia, *Haematologica*, Vol. 82, No. 1, pp. 64-66, 1997.
- Mavoungou, E., Bouyou-Akotet, M. K., and Kremsner, P. G., Effects of prolactin and cortisol on natural killer (NK) cell surface expression and function of human natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp44 and NKp30), *Clin. Exp. Immunol.*, Vol. 139, No. 2, pp. 287-296, 2005.
- Mehta, J. Are graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia separable? *Reviews in Clin. And Exp. Hematol. Suppl.* 1, p. 30-39, 2004.
- Miller, J. S. and McCullar, V., Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2, *Blood*, Vol. 98, No. 3, pp. 705-713, 2001.
- Miller, J. S., Soignier, Y., Panoskaltsis-Mortari, A., McNearney, S. A., Yun, G. H., Fautsch, S. K., McKenna, D., Le, C., Defor, T. E., Burns, L. J., Orchard, P. J., Blazar, B. R., Wagner, J. E., Slungaard, A., Weisdorf, D. J., Okazaki, I. J., and McGlave, P. B., Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer, *Blood*, Vol. 105, No. 8, pp. 3051-3057, 2005.
- Mocchegiani, E. and Malavolta, M., NK and NKT cell functions in immunosenescence, *Aging Cell*, Vol. 3, No. 4, pp. 177-184, 2004.
- Moretta, L. and Moretta, A., Killer immunoglobulin-like receptors, *Curr. Opin. Immunol.*, Vol. 16, No. 5, pp. 626-633, 2004.
- Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Castriconi, R., Mingari, M. C., and Moretta, A., Surface NK receptors and their ligands on tumor cells, *Semin. Immunol.*, Vol. 18, No. 3, pp. 151-158, 2006.

- Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Vitale, M., Mingari, M. C., and Moretta, A., Different checkpoints in human NK-cell activation, *Trends Immunol.*, Vol. 25, No. 12, pp. 670-676, 2004.
- Niokou, D., Spyropoulou-Vlachou, M., Darlamitsou, A., and Stavropoulos-Giokas, C., Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors in the Greek population, *Hum. Immunol.*, Vol. 64, No. 12, 2003, pp. 1167-1176.
- Norman, P. J., Carrington, C. V., Byng, M., Maxwell, L. D., Curran, M. D., Stephens, H. A., Chandanayingyong, D., Verity, D. H., Hameed, K., Ramdath, D. D., and Vaughan, R. W., Natural killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) locus profiles in African and South Asian populations, *Genes Immun.*, Vol. 3, No. 2, pp. 86-95, 2002.
- Nowbakht, P., Ionescu, M. C., Rohner, A., Kalberer, C. P., Rossy, E., Mori, L., Cosman, D., De Libero, G., and Wodnar-Filipowicz, A., Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias, *Blood*, Vol. 105, No. 9, pp. 3615-3622, 2005.
- O'Connor, G. M., Hart, O. M., and Gardiner, C. M., Putting the natural killer cell in its place, *Immunology*, Vol. 117, No. 1, pp. 1-10, 2006.
- O'Leary, J. G., Goodarzi, M., Drayton, D. L., and von Andrian, U. H., T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells, *Nat. Immunol.*, Vol. 7, No. 5, pp. 507-516, 2006.
- Oliveira, D. C. M., Freire, F. C., Cardoso, J., Porto, L. C. M. S. Identificação dos genótipos KIR na população brasileira. *Rev. Bras. de Hematol. e Hemoter.* V. 28, supl. 1, p. 33, 2006.
- Oshimi, K., Oshimi, Y., Motoji, T., Kobayashi, S., and Mizoguchi, H., Lysis of leukemia and lymphoma cells by autologous and allogeneic interferon-activated blood mononuclear cells, *Blood*, Vol. 61, No. 4, pp. 790-798, 1983.
- Owaidah, T. M., Al Beihany, A., Iqbal, M. A., Elkum, N., and Roberts, G. T., Cytogenetics, molecular and ultrastructural characteristics of biphenotypic acute leukemia identified by the EGIL scoring system, *Leukemia*, Vol. 20, No. 4, pp. 620-626, 2006.
- Parham, P., Immunology: adaptable innate killers, *Nature*, Vol. 441, No. 7092, pp. 415-416, 2006.
- Parham, P., Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response, *Immunol. Lett.*, Vol. 92, No. 1-2, pp. 11-13, 2004.
- Passweg, J. R., Koehl, U., Uharek, L., Meyer-Monard, S., and Tichelli, A., Natural-killer-cell-based treatment in haematopoietic stem-cell transplantation, *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.*, Vol. 19, No. 4, pp. 811-824, 2006.
- Pattengale, P. K., Sundstrom, C., Yu, A. L., and Levine, A., Lysis of fresh leukemic blasts by interferon-activated human natural killer cells, *Nat. Immun. Cell Growth Regul.*, Vol. 3, No. 4, pp. 165-180, 1983.

- Pende, D., Spaggiari, G. M., Marcenaro, S., Martini, S., Rivera, P., Capobianco, A., Falco, M., Lanino, E., Pierri, I., Zambello, R., Bacigalupo, A., Mingari, M. C., Moretta, A., and Moretta, L., Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112), *Blood*, Vol. 105, No. 5, pp. 2066-2073, 2005.
- Pross, H. F. and Baines, M. G., Studies of human natural killer cells. I. In vivo parameters affecting normal cytotoxic function, *Int. J. Cancer*, Vol. 29, No. 4, pp. 383-390, 1982.
- Pui, C. H., Childhood leukemias, *N. Engl. J. Med.*, Vol. 332, No. 24, pp. 1618-1630, 1995.
- Pui, C. H., Schrappe, M., Ribeiro, R. C., and Niemeyer, C. M., Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia, *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.*, pp. 118-145, 2004.
- Raulet, D. H., Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response, *Nat. Immunol.*, Vol. 5, No. 10, pp. 996-1002, 2004.
- Raulet, D. H., Vance, R. E., and McMahon, C. W., Regulation of the natural killer cell receptor repertoire, *Annu. Rev. Immunol.*, Vol. 19, pp. 291-330, 2001.
- Ravindranath, Y., Recent advances in pediatric acute lymphoblastic and myeloid leukemia, *Curr. Opin. Oncol.*, Vol. 15, No. 1, pp. 23-35, 2003.
- Reddy, P. and Ferrara, J. L., Immunobiology of acute graft-versus-host disease, *Blood Rev.*, Vol. 17, No. 4, pp. 187-194, 2003.
- Reisner, Y., Gur, H., Reich-Zeliger, S., Martelli, M. F., and Bachar-Lustig, E., Crossing the HLA barriers, *Blood Cells Mol. Dis.*, Vol. 33, No. 3, pp. 206-210, 2004.
- Riddell, S. R., Berger, C., Murata, M., Randolph, S., and Warren, E. H., The graft versus leukemia response after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *Blood Rev.*, Vol. 17, No. 3, pp. 153-162, 2003.
- Riley, R. S., Massey, D., Jackson-Cook, C., Idowu, M., and Romagnoli, G., Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, Vol. 16, No. 2, pp. 245-99, 2002.
- Robertson, M. J. and Ritz, J., Biology and clinical relevance of human natural killer cells, *Blood*, Vol. 76, No. 12, pp. 2421-2438, 1990.
- Romanski, A., Bug, G., Becker, S., Kampfmann, M., Seifried, E., Hoelzer, D., Ottmann, O. G., and Tonn, T., Mechanisms of resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity in acute lymphoblastic leukemia, *Exp. Hematol.*, Vol. 33, No. 3, pp. 344-352, 2005.
- Rudy, B. J., Wilson, C. M., Durako, S., Moscicki, A. B., Muenz, L., and Douglas, S. D., Peripheral blood lymphocyte subsets in adolescents: a longitudinal analysis from the REACH project, *Clin. Diagn. Lab Immunol.*, Vol. 9, No. 5, pp. 959-965, 2002.

Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R. S., Martelli, M. F., and Velardi, A., Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation, *Blood*, Vol. 94, No. 1, pp. 333-339, 1999.

Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Mancusi, A., Perruccio, K., Burchielli, E., Tosti, A., Topini, F., Aversa, F., Martelli, M. F., Velardi, A. Impacto f natural killer cell alloreactivity on mismatched hematopoietic transplantation. *Reviews in Clin. And Exp. Hematol. Suppl.* 1, p. 40-49, 2004.

Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M. F., and Velardi, A., Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants, *Science*, Vol. 295, No. 5562, pp. 2097-2100, 2002.

Ruggeri, L., Mancusi, A., Burchielli, E., Perruccio, K., Aversa, F., Martelli, M. F., and Velardi, A., Natural killer cell recognition of missing self and haploidentical hematopoietic transplantation, *Semin. Cancer Biol.*, Vol. 16, No. 5, pp. 404-411, 2006.

Salih, H. R., Antropius, H., Gieseke, F., Lutz, S. Z., Kanz, L., Rammensee, H. G., and Steinle, A., Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia, *Blood*, Vol. 102, No. 4, pp. 1389-1396, 2003.

Schabath, R., Ratei, R., and Ludwig, W. D., The prognostic significance of antigen expression in leukaemia, *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.*, Vol. 16, No. 4, pp. 613-628, 2003.

Schetelig, J., Kiani, A., Schmitz, M., Ehninger, G., and Bornhauser, M., T cell-mediated graft-versus-leukemia reactions after allogeneic stem cell transplantation, *Cancer Immunol.Immunother.*, Vol. 54, No. 11, pp. 1043-1058, 2005.

Shearer, W. T., Rosenblatt, H. M., Gelman, R. S., Oyomopito, R., Plaeger, S., Stiehm, E. R., Wara, D. W., Douglas, S. D., Luzuriaga, K., McFarland, E. J., Yogev, R., Rathore, M. H., Levy, W., Graham, B. L., and Spector, S. A., Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study, *J. Allergy Clin. Immunol.*, Vol. 112, No. 5, pp. 973-980, 2003.

Shilling, H. G., McQueen, K. L., Cheng, N. W., Shizuru, J. A., Negrin, R. S., and Parham, P., Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation, *Blood*, Vol. 101, No. 9, pp. 3730-3740, 2003.

Shlomchik, W. D., Couzens, M. S., Tang, C. B., McNiff, J., Robert, M. E., Liu, J., Shlomchik, M. J., and Emerson, S. G., Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells, *Science*, Vol. 285, No. 5426, pp. 412-415, 1999.

Smyth, M. J., Cretney, E., Kelly, J. M., Westwood, J. A., Street, S. E., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S. L., Degli-Esposti, M. A., and Hayakawa, Y., Activation of NK cell cytotoxicity, *Mol. Immunol.*, Vol. 42, No. 4, 2005, pp. 501-510.

Souza, S. S., Castro, F. A., Mendonca, H. C., Palma, P. V., Morais, F. R., Ferriani, R. A., and Voltarelli, J. C., Influence of menstrual cycle on NK activity, *J. Reprod. Immunol.*, Vol. 50, No. 2, pp. 151-159, 2001.

Srivastava, R. K., TRAIL/Apo-2L: mechanisms and clinical applications in cancer, *Neoplasia.*, Vol. 3, No. 6, pp. 535-546, 2001.

Stone, R. M., O'Donnell, M. R., and Sekeres, M. A., Acute myeloid leukemia, *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.*, pp. 98-117, 2004.

Szczepanski, T., van, d. V., V, and van Dongen, J. J., Classification systems for acute and chronic leukaemias, *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.*, Vol. 16, No. 4, pp. 561-582, 2003.

Tassi, I., Klesney-Tait, J., and Colonna, M., Dissecting natural killer cell activation pathways through analysis of genetic mutations in human and mouse, *Immunol.Rev.*, Vol. 214, pp. 92-105, 2006.

Torelli, G. F., Guarini, A., Maggio, R., Alfieri, C., Vitale, A., and Foa, R., Expansion of natural killer cells with lytic activity against autologous blasts from adult and pediatric acute lymphoid leukemia patients in complete hematologic remission, *Haematologica*, Vol. 90, No. 6, pp. 785-792, 2005.

Torelli, G. F., Guarini, A., Palmieri, G., Breccia, M., Vitale, A., Santoni, A., and Foa, R., Expansion of cytotoxic effectors with lytic activity against autologous blasts from acute myeloid leukaemia patients in complete haematological remission, *Br. J. Haematol.*, Vol. 116, No. 2, pp. 299-307, 2002.

Trapani, J. A., Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases, *Genome Biol.*, Vol. 2, No. 12, pp., 2001.

Uhrberg¹, M., The CD107 mobilization assay: viable isolation and immunotherapeutic potential of tumor-cytolytic NK cells," *Leukemia*, Vol. 19, No. 5, 2005, pp. 707-709.

Uhrberg², M., The KIR gene family: life in the fast lane of evolution, *Eur. J. Immunol.*, Vol. 35, No. 1, pp. 10-15, 2005.

Uhrberg, M., Valiante, N. M., Shum, B. P., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L. L., and Parham, P., Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes, *Immunity.*, Vol. 7, No. 6, pp. 753-763, 1997.

van Wering, E. R., Beishuizen, A., Roeffen, E. T., van der Linden-Schrever BE, Verhoeven, M. A., Hahlen, K., Hooijkaas, H., and van Dongen, J. J., Immunophenotypic changes between diagnosis and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia*, Vol. 9, No. 9, pp. 1523-1533, 1995.

Vargas-Diez, E., Garcia-Diez, A., Marin, A., and Fernandez-Herrera, J., Life-threatening graft-vs-host disease, *Clin. Dermatol.*, Vol. 23, No. 3, pp. 285-300, 2005.

Velardi, A., Ruggeri, L., Alessandro, Moretta, and Moretta, L., NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation, *Trends Immunol.*, Vol. 23, No. 9, pp. 438-444, 2002.

Vilches, C. and Parham, P., KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity, *Annu.Rev.Immunol.*, Vol. 20, 2002, pp. 217-251.

Vivier, E., What is natural in natural killer cells?, *Immunol .Lett.*, Vol. 107, No. 1, pp. 1-7, 2006.

Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S. H., Zitvogel, L., and Vivier, E., Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force", *Blood*, Vol. 106, No. 7, pp. 2252-2258, 2005.

Weiden, P. L., Flournoy, N., Thomas, E. D., Prentice, R., Fefer, A., Buckner, C. D., and Storb, R., Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts, *N. Engl. J. Med.*, Vol. 300, No. 19, pp. 1068-1073, 1979.

Weir, E. G. and Borowitz, M. J., Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia, *Semin. Hematol.*, Vol. 38, No. 2, pp. 124-138, 2001.

Weir, E. G., Cowan, K., LeBeau, P., and Borowitz, M. J., A limited antibody panel can distinguish B-precursor acute lymphoblastic leukemia from normal B precursors with four color flow cytometry: implications for residual disease detection, *Leukemia*, Vol. 13, No. 4, pp. 558-567, 1999.

Witt, C. S. and Christiansen, F. T., The relevance of natural killer cell human leucocyte antigen epitopes and killer cell immunoglobulin-like receptors in bone marrow transplantation, *Vox Sang.*, Vol. 90, No. 1, pp. 10-20, 2006.

Yan, Y., Steinherz, P., Klingemann, H. G., Dennig, D., Childs, B. H., McGuirk, J., and O'Reilly, R. J., Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias, *Clin .Cancer Res.*, Vol. 4, No. 11, pp. 2859-2868, 1998.

Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Little, A. M., Partheniou, F., and Parham, P., Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function, *J. Exp. Med.*, Vol. 203, No. 3, pp. 633-645, 2006.

Yovel, G., Shakhar, K., and Ben Eliyahu, S., The effects of sex, menstrual cycle, and oral contraceptives on the number and activity of natural killer cells, *Gynecol. Oncol.*, Vol. 81, No. 2, pp. 254-262, 2001.

Zingoni, A., Sornasse, T., Cocks, B. G., Tanaka, Y., Santoni, A., and Lanier, L. L., NK cell regulation of T cell-mediated responses, *Mol. Immunol.*, Vol. 42, No. 4, pp. 451-454, 2005.